

Fatma Özgöl Özalp

**DOKTORA TEZİ**

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs 2011

Effects of Exopolysaccharide (EPS) Derived from *Coprinus Comatus* Macrofungi on  
Alcoholic Liver in Rats

Fatma Özgül Özalp

**DOCTORAL DISSERTATION**

Department of Biology

May 2011

*Coprinus comatus* Makrofungusundan Elde Edilen Ekzopolisakkaritin (EPS) Sıçanlarda  
Alkolik Karaciğer Üzerine Etkileri

Fatma Özgül Özalp

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Moleküler Biyoloji Bilim Dalında  
DOKTORA TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Mediha CANBEK

Mayıs 2011

## ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Fatma Özgül Özalp'in DOKTORA tezi olarak hazırladığı "*Coprinus comatus* Makrofungusundan Elde Edilen Ekzopolisakkaritin (EPS) Sıçanlarda Alkolik Karaciğer Üzerine Etkileri" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

**Danışman** : Doç. Dr. Mediha CANBEK

**İkinci Danışman** : -

**Doktora Tez Savunma Jürisi:**

**Üye:** Doç. Dr. Mediha CANBEK

**Üye:** Prof. Dr. Ahmet ÖZATA

**Üye:** Prof. Dr. Sibel SÜMER

**Üye:** Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

**Üye:** Yrd. Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Alkol metabolizmasının %90'ının karaciğerde gerçekleşmesinden dolayı uzun süre alkol kullanımının karaciğer hasarına yol açtığı bilinmektedir. Alkol, karaciğerdeki doğal antioksidanların seviyelerini azaltarak hasar meydana getirir ve bu hasar antioksidanların kullanımı ile kısmen de olsa önlenebilir.

Karaciğer doku hasarına karşı günümüzde doğal kaynaklı ilaçların kullanımı gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Makrofungusların ürettikleri ve büyüme ortamına salgıladıkları ekzopolisakkaritlerin (EPS) tıbbi açıdan birçok biyolojik aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir. Bu nedenle araştırmamızda *Coprinus comatus* türünden elde edilen EPS'nin, 3 farklı dozu uygulandı. *Wistar albino* cinsi sıçanlar kullanılarak; Grup I (Kontrol), Grup II (Alkol grubu), Grup III (Alkol + 50 mg/kg EPS), Grup IV (Alkol + 100 mg/kg EPS) ve Grup V (Alkol + 150 mg/kg EPS) oluşturuldu. Çalışma sonunda biyokimyasal, sitolojik ve histolojik etkiler değerlendirildi. Alanin transaminaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH) enzimlerinin serum seviyeleri ile karaciğer dokularında kaspaz 3 ve sitokrom c oksidaz aktiviteleri ile mitokondri iç ve dış zar bütünlükleri belirlendi. Elde ettiğimiz veriler sonucunda, Grup I'e göre, Grup II'de serum ALT seviyelerinde bir artış gözlenirken LDH seviyesinde bir azalma tespit edildi. Karaciğer kaspaz 3 aktiviteleri gruplar arasında farklı bulunmadı. Alkol grubu olan Grup II'ye ait sitokrom c oksidaz aktivitesinin, kontrol grubuna göre belirgin biçimde azaldığı tespit edildi. Grup II'de mitokondrial transmembran potansiyeli düşük bulundu. EPS uygulanan gruplarda ise iç zar yükünde, Grup II'ye göre istatistiksel olarak anlamlı artmalar gözlemlendi ( $p < 0.05$ ). Alkol grubu karaciğer hepatositlerinde dejenerasyon, sinüzoidal alanlarda genişlemeler gözlemlendi. 50 mg/kg uygulanan EPS dozunda bu bulgular minimal düzeyde belirlendi. Elektron mikroskobu değerlendirmelerinde Grup II'de mitokondride bozulmalar, yağlanma ve endoplazmik retikulumda şişme tespit edildi. 50 mg/kg uygulanan EPS dozunda ise kısmi olarak korunduğu görüldü. Çalışmamız sonucunda *Coprinus comatus*'un 50 mg/kg dozunun alkole bağlı karaciğer hasarını tedavi edici etkisi olduğunu söylemek mümkündür.

**Anahtar Kelimeler:** Alkolik karaciğer, sıçan, ekzopolisakkarit, elektron mikroskop

## SUMMARY

It is known that, since %90 of the alcohol metabolism takes place in liver, long-term alcohol usage causes liver damage. Alcohol causes damage by reducing the level of natural antioxidants and this damage may be prevented by the usage of antioxidants. Against liver tissue damage, usage of natural origin drugs is becoming widespread contemporarily. It is known that, exopolisaccharides (EPS), which macrofungus produce and secrete to the growing media, have many biological activity medically. For this reason, in our study, three different dosages of EPS, which were obtained from *Coprinus comatus*, were applied. Via by using albino type rats, Group I (Control), Group II (Alcohol Group), Group II (Alcohol + 50 mg/kg EPS), Group IV (Alcohol + 100 mg/kg EPS) and Group V (alcohol + 150 mg/kg EPS) were formed. At the end of the study, biochemical, cytological and histological effects were evaluated. Alanine transaminase (ALT), lactate dehydrogenase (LHD) enzymes' serum levels, and caspases 3 activities, cytochrome c oxidase and mitochondria's inner and outer membrane integrity in liver tissues were determined. As the result of data we obtained, while an increase was observed in bottom serum levels of Group II with regard to Group I, a decrease was determined in LHD level. Liver caspases 3 activities weren't found to be different between groups. It was determined that, cytochrome c oxidase activity of Group II, which is an alcohol group, decreased significantly. In Group II, mitochondrial transmembrane potential was found to be low. As for groups that were applied EPS, in inner membrane charge, statistically significant increase ( $p < 0.05$ ) was observed with regard to Group II. In alcohol group liver hepatocytes, degeneration was observed, and in sinusoidal areas expansion was observed. In 50 mg/kg applied EPS dosage, these findings were determined in minimum level. In Electron Microscopical evaluations, in Group II, corruption and lipoidosis in mitochondria and expansion in reticulum was determined. As for 50 mg/kg applied EPS, it was seen that, it was conserved partially. As the result of our study, it is possible to say that, 50 mg/kg dosage of *Coprinus comatus* has therapeutic effect for alcohol dependent liver damage.

**Keywords:** Alcoholic Liver, rat, exopolisaccharide, electron microscope

## TEŞEKKÜR

Doktora ders aşamam boyunca ve tez çalışmalarımda bana danışmanlık eden ve beni yönlendiren değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mediha CANBEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen saygın hocalarım Yrd. Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU, Arş. Gör. Emre CEYHAN ve Arş. Gör. Dr. Hakan ŞENTÜRK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvarda birlikte çalıştığım, Ahmet ÖZEN, Başak DURMUŞ, Fehmi KAYDIRAK ve Can KILIÇDOĞAN'a desteklerinden ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca bana her zaman maddi manevi her konu da destek olan ve her zaman yanımda olduklarını bildiğim ve daima bana güvenen AİLEM'e sevgi dolu teşekkürlerimi sunarım...

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ONAY.....	İV
ÖZET .....	V
SUMMARY .....	VI
TEŞEKKÜR .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XVI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XVII
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Karaciğer .....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Karaciğer Anatomisi ve Histolojisi .....	3
2.1.2. Hepatositlerin Ultrastrüktürel Yapısı .....	4
2.1.3. Karaciğer Fizyolojisi ve Biyokimyası .....	5
2.1.3.1. Karaciğer Enzimleri.....	8
<b>2.2. Alkol (Etanol) Metabolizması .....</b>	<b>11</b>
2.2.1. Alkol Dehidrogenaz (ADH) Yolağı .....	11
2.2.2. Mikrozomal Etanol Okside Edici Sistem (MEOS) .....	16
2.2.3. Katalaz.....	18
2.2.4. Alkol Metabolizması ve Serbest Radikaller .....	19



## İÇİNDEKİLER (Devam)

### Sayfa

2.2.4.1. Reaktif Oksijen Türleri .....	20
<b>2.3. Alkole Bağlı Karaciğer Hastalıkları.....</b>	<b>22</b>
2.3.1. Karaciğer Hastalığında Mitokondrinin Rolü .....	24
2.3.1.1. Mitokondri Membran Depolarizasyonu ve Permeabilite Tranzisyonu .....	26
<b>2.4. Apoptoz.....</b>	<b>26</b>
2.4.1. Alkolizm ve Apoptoz .....	26
2.4.2. Alkol Alınımında Hepatosit Apoptozunda Mitokondrilerin Rolü.....	27
2.4.3. Alkolün Apoptozu İndüklemesi .....	29
2.4.4. Kaspazlar .....	30
2.4.4.1. Kaspaz aktivasyonu .....	33
2.4.5. Ölüm Sinyalleri Aracılığıyla Hücre Ölümü .....	36
2.4.6. Sitokinler .....	40
<b>2.5. Ekzopolisakkaritler ve Özellikleri.....</b>	<b>42</b>
2.5.1. Polisakkaritler .....	43
2.5.1.1. Fungal Polisakkaritler .....	44
2.5.2. Makrofungusların Ürettiği Ekzopolisakkaritler ve Kullanım Alanları.....	45
2.5.2.1. Biyoteknolojide Kullanım Alanları .....	46
2.5.2.2. Kozmetikte Kullanım Alanları .....	47
2.5.2.3. Gıda Sektöründe Kullanım Alanları .....	47
2.5.3. <i>Coprinus comatus</i> Mantarının Makroskobik ve Mikroskobik Özellikleri ...	49
2.5.3.1. <i>Coprinus comatus</i> mantarının şapka ve sapının antioksidan özellikleri ....	51
<b>3. MATERYAL METOT.....</b>	<b>52</b>
<b>3.1. Deney Hayvanları .....</b>	<b>52</b>

**İÇİNDEKİLER (Devam)****Sayfa**

<b>3.2. Ekzopolisakkarit Üretimi.....</b>	<b>52</b>
<b>3.3. Modifiye sıvı diyet (MSD) hazırlanması .....</b>	<b>53</b>
<b>3.4. Deney Grupları ve EPS uygulamaları .....</b>	<b>53</b>
<b>3.5. Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi .....</b>	<b>55</b>
3.5.1. Serum örnekleri .....	56
3.5.2. Karaciğer doku örnekleri .....	56
3.5.2.1. Histopatolojik İncelemeler .....	57
3.5.2.2. Karaciger Doku Örneklerinde Biyokimyasal Uygulamalar .....	59
<b>3.6. İstatistiksel Değerlendirmeler.....</b>	<b>64</b>
<b>4. SONUÇLAR.....</b>	<b>65</b>
<b>4.1. Biyokimyasal Analizler.....</b>	<b>65</b>
4.1.1. Serum örneklerinde biyokimyasal analizler .....	65
<b>4.2. Karaciğer Doku Örneklerinin Histolojik Analizleri.....</b>	<b>73</b>
4.2.1. Histopatolojik Değerlendirmeler .....	73
4.2.2. Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) Değerlendirmeleri .....	81
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>91</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>101</b>

**İÇİNDEKİLER (Devam)****Sayfa**

**7. KAYNAKLAR DİZİNİ..... 102**

**ÖZGEÇMİŞ ..... 117**

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Karaciğerde histolojik olarak altıgen yapıda görülen lobüller ve lobül yapısı..	7
Şekil 2.2 Alkol metabolizmasında alkol dehidrogenaz yolağı .....	12
Şekil 2.3 Alkolün metabolizma yolları .....	16
Şekil 2.4 Hepatositlerde alkol oksidasyonu. ....	17
Şekil 2.5 Kaspaz 3'ün aktivasyonu. ....	28
Şekil 2.6 Alkolün apoptoz yolağındaki mekanizması .....	29
Şekil 2.7 Kaspaz zincirinin aktivasyonu. ....	34
Şekil 2.8 Mitokondri içeren ana apoptotik sinyal yolu. ....	36
Şekil 2.9 Ana TNF reseptörünün sinyal yolları .....	38
Şekil 2.10 Fas reseptörünün ligandına bağlanması direkt kaspaz 8 aktivasyonu ile apoptozu uyarır. ....	40
Şekil 2.11 $\beta$ -(1-3), $\beta$ -(1-4)-glukan zincire sahip polisakkarit. ....	45
Şekil 2.12 <i>Coprinus comatus</i> .....	50
Şekil 2.13 <i>Coprinus comatus</i> .....	50
Şekil 3.1 İntrakardiyak olarak kalpten kan alınması.....	56
Şekil 3.2 Alınan karaciğer örnekleri. ....	57
Şekil 4.1 Grup II, III, IV, V 'e ait hayvanların etil alkol tüketim seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiğı.....	65
Şekil 4.2 Grup I, II, III, IV ve V' e ait serum ALT seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiğı. ....	67
Şekil 4.3 Grup I, II, III, IV ve V' e ait serum LDH seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiğı. ....	68

## ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.4 Grup I, II, III, IV, V 'e ait karaciğer dokularında kaspaz-3 aktivite değerlerinin ortalama ve standart hata grafiği. ....	69
Şekil 4.5 Grup I, II, III, IV, V 'e ait karaciğer dokularında mitokondri iç zar yükü değerlerinin ortalama ve standart hata grafiği. ....	70
Şekil 4.6 Grup I, II, III, IV, V 'e ait karaciğer dokularında mitokondri dış zar yükü ve dış zar bütünlüğü değerlerinin ortalama ve standart hata grafiği.....	70
Şekil 4.7 Grup I, II, III, IV, V 'e ait karaciğer dokularında total stokrom c oksidaz ve tam mitokondriyal stokrom-c oksidaz aktivite değerlerinin ortalama ve standart hata grafiği.....	72
Şekil 4.8 Kontrol grubuna ait karaciğer kesiti. Sentralis ven ve çevresinde normal görünümlü hepatositler . ....	74
Şekil 4.9 Alkol grubuna ait karaciğer kesitindeki hepatositlerde dejenerasyon nekrotik alan . ....	75
Şekil 4.10 Alkol grubuna ait karaciğer karaciğer kesitindeki sinüzoidal alanda PMNL infiltrasyonu . ....	75
Şekil 4.11 Alkol grubuna ait karaciğer kesitindeki hepatositlerde gözlenen sitoplazmik vakuolizasyon . ....	76
Şekil 4.12 50 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta normal görünümlü hepatositler .....	77
Şekil 4.13 100 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta karaciğer kesitindeki hepatositlerde gözlenen sitoplazmik vakuolizasyon . ....	78
Şekil 4.14 100 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta karaciğer kesitindeki sinüzoidal alanda genişlemeler ve dejenere hepatositler (H&E). ....	78
Şekil 4.15 150 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta karaciğer kesitindeki sinüzoidal alanda kanamalar ve PMNL infiltrasyonu . ....	79
Şekil 4.16 150 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta karaciğer kesitindeki sentral ven alanındaki sinüzoidal alanda genişlemeler . ....	80

## ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.17 150 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta karaciğer kesitindeki sentral ven alanında ki vakuolasyon .....	80
Şekil 4.18 Kontrol grubuna ait karaciğer hepatosit hücresinde normal görünümlü mitokondriler ve çekirdek .....	81
Şekil 4.19 Kontrol grubuna ait hepatositte normal görünümlü mitokondriler .....	82
Şekil 4.20 Kontrol grubuna ait hepatositte normal görünümlü mitokondriler ve endoplazmik retikulumlar .....	82
Şekil 4.21 Alkol grubuna ait hepatositte kümeler oluşturmuş lipid damlacıkları . .....	83
Şekil 4.22 Alkol grubuna ait hepatositte mitokondri yapısında bozulmalar , endoplazmik retikulumda kırıklar .....	84
Şekil 4.23 Alkol grubuna ait hepatositte şişmiş endoplazmik retikulumlar , mitokondri yapısında bozulmalar .....	84
Şekil 4.24 50 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta normal görünümlü mitokondriler, endoplazmik retikulumlar lipid damlacıklarında azalma.....	85
Şekil 4.25 50 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta normal görünümlü mitokondriler ve düzgün kristalar .....	86
Şekil 4.26 50 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta normal görünümlü mitokondriler ve endoplazmik retikulumlar .....	86
Şekil 4.27 100 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta endoplazmik retikulumlarda genişlemeler, mitokondri yapılarında bozulmalar .....	87
Şekil 4.28 100 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta lipid vakuollerinde artış , mitokondrilerin yapılarında bozulmalar . .....	88
Şekil 4.29 150 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta lipid vakuollerinde artış , mitokondrilerde genişleme ve yapılarında bozulmalar .....	89
Şekil 4.30 150 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta endoplazmik retikulumlarda kırıklar, mitokondrilerde genişleme .....	89

**ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)****Şekil****Sayfa**

Şekil 4.31 150 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta mitokondrilerde genişleme kristalarında bozulmalar .....	90
--	----

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Kaspazların hedef proteinleri .....	32
Çizelge 3.1 Mitokondri membran grandiyetinin ölçülmesi .....	61
Çizelge 4.1 Grup I, II, III, IV, V'e ait ALT ve LDH serum seviyeleri .....	66
Çizelge 4.2 Grup I, II, III, IV, V 'e ait karaciğer dokularında kaspaz-3 aktivitesi mitokondri içzar bütünlüğü ve dış zar bütünlüğü .....	68
Çizelge 4.3 Grup I, II, III, IV, V 'e ait karaciğer dokularında total stokrom-c oksidaz ve tam mitokondriyal stokrom-c oksidaz aktivite değerleri .....	71
Çizelge 4.4 Tüm deney gruplarındaki hayvanlara ait karaciğer doku kesitlerinde histopatolojik değerlendirmeler. ....	73



**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b><u>Simgeler</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
$\alpha$	Alfa
N	Azot
$\beta$	Beta
$\varepsilon$	Epsilon
gr	Gram
g	Graviti
pH	Hidrojen derişiminin eksi logaritması
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
Ca	Kalsiyum
kg	Kilogram
L	Litre
Mn	Mangan
$\mu$ L	Mikrolitre
$\mu$ m	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mmol	Milimol
M	Molar
nm	Nanometre
C°	Santigrad derece
cm	Santimetre
cm <sup>3</sup>	Santimetreküp
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoksitkrometre

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)**

<b><u>Kısaltmalar</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
ATP	Adenozin trifosfat
w/v	Ağırlık/hacim
ALT	Alanin aminotransferazlar
ALDH	Aldehit dehidrogenaz
ADH	Alkol dehidrogenaz
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive etme faktörü
AST	Aspartat aminotransferaz
DNaz	Deoksiribonükleaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EPS	Ekzopolisakkarit
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
GGT	Gama-glutamat transferaz
GSH	Glutatyon
Gpx	Glutatyon peroksidaz
H&E	Hematoksilen&eosin
IL	İnterlökin
kcal	Kilokalori
CoA	Koenzim A
MEOS	Mikrozomal etanol okside edici sistem

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)**

<b><u>Kısaltmalar</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
MSD	Modifiye sıvı diyet
NAD	Nikotinamidadenindinükleotid
GSSG	Okside glutatayon
RNA	Ribonükleik asit
SOD	Süperoksit dismutaz
MtStCox	Mitokondrial sitokrom c oksidaz
$\Delta\Psi_m$	mitokondrial transmembran potansiyeli
pNA	p-nitroaniline
PMNL	Polimorf nükleer lökosit
Rpm	Revolution per minute (devir/dakika)
SOR	Serbest oksijen radikalleri
SF	Serum fizyolojik
StCox	Sitokrom c oksidaz
TGF- $\beta$	Transforme edici büyüme faktörü- $\beta$
TEM	Transmission elektron mikroskobu
TNF $\alpha$	Tümör nekroz faktör-alfa

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Alkol alınımı yüzyıllar boyunca insanlığın ilgi odağı ve sorunu hale gelmiştir (İlter ve Tekin, 2005). Son yıllarda alkol tüketimi hızlı bir şekilde artmış ve önemli sorunlar arasında yer almıştır (SriRajaskanthan and Preedy, 2006). Batı dünyası başta olmak üzere birçok ülkede alkolik karaciğer hastalığı önemli bir sağlık ve ekonomik sorun olmuştur (Yuan, et al., 2007). Alkole bağlı karaciğer, pankreas ve gastrointestinal sistem hastalıkları arasında en önemli olanı alkole bağlı karaciğer hastalıklarıdır (İlter ve Tekin, 2005).

Etil alkol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), hücre zarından hızlı geçebilen, suda çözünen bir bileşiktir. Alkol, emiliminden kısa bir süre sonra nefes ve idrarda görülür. Alkol, beyin ve ruh halini etkileyen bir ilaç gibidir, bunun yanında farmakolojik etkisi de vardır ve yaklaşık 7,1 kcal/g enerji değerindedir (Charles and Lieber, 2000). Vücutta depolanmayan alkolün tamamı karaciğerde metabolize olur. Karaciğerde, alkol metabolizmasının oksidasyonunun başlatılmasına aracılık eden enzim sistemleri; alkol dehidrogenaz (ADH), mikrozomal etanol oksitleyici sistem (MEOS) ve katalazdır. Alkol dehidrogenaz enzim sisteminde sitozolik alkol dehidrogenaz tarafından asetaldehitin oksidasyonunu içerir ve mitokondriyal aldehit dehidrogenaz ile de asetata dönüşür. Bu yolların her biri antioksidan savunma sistemini etkileyen serbest radikalleri üretebilir (Das and Vasudevan, 2007). Uzun süre fazla miktarda alkol tüketen bireylerde apoptoz ya da nekroz biçiminde hücre ölümü görülür. Hepatosit apoptozisin, alkol ile uyarılmış karaciğer hasarının patofizyolojisinde önemini ileri süren veriler giderek artmaktadır (Özcan ve Mengi, 1998). Ölümcül karaciğer değişikliklerinin başında karaciğer yağlanması, hepatit ve karaciğer sirozu gelir (Pramyothin, et al., 2006). Genel olarak alkol alımı süresi ve miktarına bağlı olarak ilk oluşturduğu hasar karaciğer yağlanmasıdır (Bujanda, et al., 2006). Son 50 yıldır yapılan araştırmalar sonucunda alkolün neden olduğu hepatotoksisite doğrulanmıştır (SriRajaskanthan and Preedy, 2006).

Karaciğer, vücudun hemen bütün sistemleriyle ilişkisi bulunan ve son derece karmaşık ve önemli fonksiyonları olan bir organdır (Noyan, 2000). Tek bir karaciğer hücresi 500 den fazla farklı metabolik aktiviteyi devam ettirir. Karaciğer, salgısını sindirim borusuna boşaltan en büyük bezdir. Karaciğer birçok hücre tipi içerir; hepatositler, endotel hücreleri, Kupffer ve İto hücreleri... Hepatositler, alkol dâhil olmak üzere karaciğere kanla taşınan molekülleri yıkmakla sorumludur. Endotel hücreleri küçük kan damarlarının (sinüzoidler) olduğu karaciğer boyunca kan dağıtır. Kupffer hücreleri, bir grup immün hücrelerinin makrofaj olarak bilinen grubuna aittir. Bunların görevi karaciğere giren yabancı molekülleri yok etmektir (Neuman, 2003). İto hücreleri ise endotelin altında ve sinüzoidlerde, uzun sitoplazmik uzantıları bulunan, hepatositler arasındaki bağlantıyı sağlayan hücrelerdir.

Kronik alkolizm hasarlarının önlenmesinde ya da hasarın tedavi edilmesinde bir grup uygulama yapılmakta olup kimyasal içeriği nedeniyle yan etkilerinin kötü sonuçlara da neden olması bu tercihi değiştirmekte ve alkolizm hasarı tedavisinde alternatif tıp yaklaşımlarını gerekli kılmaktadır. Günümüzde pek çok hastalığın tedavisinde sentetik ilaçlar kullanılmaktadır. Oysa son yıllarda, yan etkilerinin olmaması ya da bertaraf edilebilecek kadar az olması nedeniyle doğal kaynaklı preparatlar tercih edilmektedir (Kızılcık, 2004). Uzun zamandan beri bu amaçla kullanılan kaynaklardan biri de makrofunguslardır. Makrofunguslar ile yapılan son çalışmalarda, mantarların tıbbi açıdan; antitümör, antimikrobiyal, hipoglisemik, hipolipidemik, karaciğeri koruyucu, antialerjik ve bağışıklık sistemini güçlendirici etki mekanizmalarının olduğunu göstermektedir (Anke et al., 1989; Bobek et al., 1991; Yang, et al., 2002; Kızılcık, 2004).

Bu çalışmamızda, herhangi bir yan etkisinin saptanmaması ve besin değerinin yüksek olan yenilebilir mantarlardan birisi olan *Coprinus comatus* türü mantarlarından elde edilen ekzopolisakkaritin 3 farklı doz da alkolik karaciğer hasarı oluşturduğumuz sıçanlarda olası iyileştirici etkilerini araştırdık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Karaciğer

#### 2.1.1. Karaciğer Anatomisi ve Histolojisi

Karaciğer vücuttaki en büyük organ olup ağırlığı 1,2-1,5 kg civarındadır. Diyaframın altında karnın sağ üst çeyreğinde bulunmakta ve kaburga kemikleri tarafından korunmaktadır. İnce bağ dokusu olan Glisson kapsülü karaciğerin bütün yüzeyini kaplamaktadır. Bağ dokusu damar ve sinir kolları ve karaciğer parenkimi için internal destekleyici bir yapı sağlamakta ve parankimi iki loba ayırmaktadır (Burtis and Ashwood, 2005). Sağ lobun posterior yüzeyinde (“caudal lob”) ve inferior yüzeyinde (“quadrate lob”) iki küçük lob bulunmaktadır. Sıçan karaciğerinde bunlara ek olarak kuyruk lobu da bulunmaktadır. Bu lobların her biri, karaciğerin fonksiyonel birimi olan çok sayıda lobüle ayrılır.

Klasik karaciğer lobülü, vasküler ve biliyer damarlar ve bağ dokusu ile ayrılmış polihedral (çok yüzlü) yapıya sahiptir. Sentral ven lobülün merkezindedir. Her lobülün merkezinde bulunan sentral ven, hepatik venlere açılır. Hepatik arter ve portal ven ile birlikte safra kanalları portal üçlüyü oluşturmaktadır. Bu bölgelerde karaciğere ulaşan arter ve ven kanı hepatositler arasındaki sinusoidler aracılığıyla sentral vene dökülür. Buradan da hepatik venler sayesinde inferior vena cavaya boşalır. Kan akımı periferden merkeze doğrudur (Dilek, 2003; Burtis and Ashwood, 2005).

Parankimal epitelyum hücrelere ait tek hücre tabakaları sentral venden çıkarak yayılırlar. Sinüzoidler karaciğer hücre tabakalarının her iki tarafına kan taşıyan vasküler kanallardır ve bunlar sentral ven yakınlarında zengin, intralobüler, vasküler bir ağ oluştururlar. Sinüzoidleri kaplayan hücreler ya endotelial ya da Kupffer hücreleridir. Endotelial hücreler ile hepatositler arasındaki doku aralığı Disse aralığı

olup besin maddeleri ile kan ve karaciğerden artık ürünlerinin transferini sağlayan interstisyel sıvıyı içerir (Burtis and Ashwood, 2005).

Karaciğer birçok hücre tipi içerir; hepatositler, endotel hücreleri, Kupffer ve İto hücreleri. **Hepatositler**, karaciğer kütlesinin yaklaşık % 80'ini oluşturan, çapları yaklaşık 30 µm, çok köşeli hücreler olup karaciğerin metabolik fabrikasıdır (Burtis and Ashwood, 2005). Bir hepatositin yüzeyi üç şekilde özelleşmiştir; giren kana doğru akan sinüzoidal yüzey, sinüzoidal yüzey ile bitişik bulunan hücreler arası yüzey ve kanalikular yüzey. Disse aralığı, sinüzoidler ile onları çevreleyen hepatositler arasındaki bir doku aralığıdır. Bu hücreler alkol dâhil olmak üzere karaciğere kanla taşınan molekülleri yıkmakla sorumludur. **Endotel hücreleri** küçük kan damarlarının (sinüzoidler) olduğu karaciğer boyunca kan dağıtır. **Kupffer hücreleri**, bir grup immün hücrelerinin makrofaj olarak bilinen grubuna aittir. Bu hücrelerin görevi karaciğere giren yabancı molekülleri yok etmektir. **İto hücreleri**, farklı uzunlukta sitoplazmik çıkıntılara sahip yıldızlı hücrelerdir. Portal kan akışını düzenlerler (Burtis and Ashwood, 2005). İto hücrelerinin iki farklı fonksiyonu vardır. Bunlar; dinlenme durumunda karaciğerde yağ depolamaktır, aktif hale geldiklerinde doku rejenerasyonu için gerekli kollajen gibi proteinleri üretmektir. Karaciğer hasarı sırasında İto hücrelerinin aşırı aktivasyonu, fibrozis bir özelliği olan skar dokusunun oluşumuna neden olur (Neuman, 2003).

### 2.1.2. Hepatositlerin Ultrastrüktürel Yapısı

Hepatik parankimal hücreler aşağıdaki yapıları içerirler;

1. Yağ asidi oksidasyonu ve oksidatif fosforilasyon yoluyla enerji üretimine katılan çok sayıda mitokondri.
2. Protolitik enzimler içeren ve spesifik yıkım fonksiyonlarına sahip lizozomlar.

3. Safra asidi sentezi ve ilaç metabolizması dahil birçok fonksiyona sahip endoplazmik retikulum (ER) Düz ER; vezikül ve tubül şeklinde olup, bilirubin konjugasyonu, ilaç detoksifikasyonu ve kolesterol sentezinin gerçekleştiği yerdir. Granüllü ER; koagülasyon faktörleri, çeşitli enzimler ve albumin gibi proteinlerin spesifik sentez yerleri olan ribozomlar ile çevrelenmiş katmanlar şeklindedir.
4. Albumin sekresyonu ve proteinlerin glikozilasyonuna katılan ve çok düşük dansiteli lipoproteinleri üreten çok fonksiyonlu golgi kompleksi.
5. Kontraktıl güç üreten ve hücre şeklinin devamlılığını sağlayan makrofajları ve mikrotübüller (Burtis and Ashwood, 2005).

### 2.1.3. Karaciğer Fizyolojisi ve Biyokimyası

Karaciğer yaşam için elzem olan yüzlerce fonksiyonu gerçekleştiren multifonksiyonel bir organdır. Bu fonksiyonları dört ana başlık altında toplamak mümkündür. Bunlar;

1. Atılım fonksiyonu
2. Sentez fonksiyonu
3. Depolama fonksiyonu
4. Metabolik fonksiyonu

1. **Atılım fonksiyonu:** Hem endojen hem de ekzojen kaynaklı organik bileşikler karaciğerde biotransforme edilir ve sinüzoidal kandan safra ve idrar yoluyla atılır. Bu bileşiklerden bilirubin ve safra asitleri endojen kaynaklı, indosilyanin yeşili ve aminoprin gibi bileşikler ise ekzojen kaynaklıdır. Bunların serum düzeylerinin ölçülmesi karaciğer fonksiyonu hakkında bilgi verir.



**2. Sentez fonksiyonu:** Karaciğer, geniş sentetik kapasiteye sahip bir organ olup, karbonhidrat, lipid ve proteinlerin sentez ve metabolizmasının regülasyonunda önemli bir rol oynar.

**3. Depolama fonksiyonu:** Karbonhidratların depolama yeri karaciğerdir. Glukoz karaciğerde glikojene çevrilir ve depolanır. Gerektiğinde tekrar glukozla çevrilir. Bütün yağ da eriyen vitaminler (A,D,E,K) ve B<sub>12</sub> vitamini gibi suda eriyen vitaminler karaciğerde depo edilir.

#### **4. Metabolik fonksiyonu:**

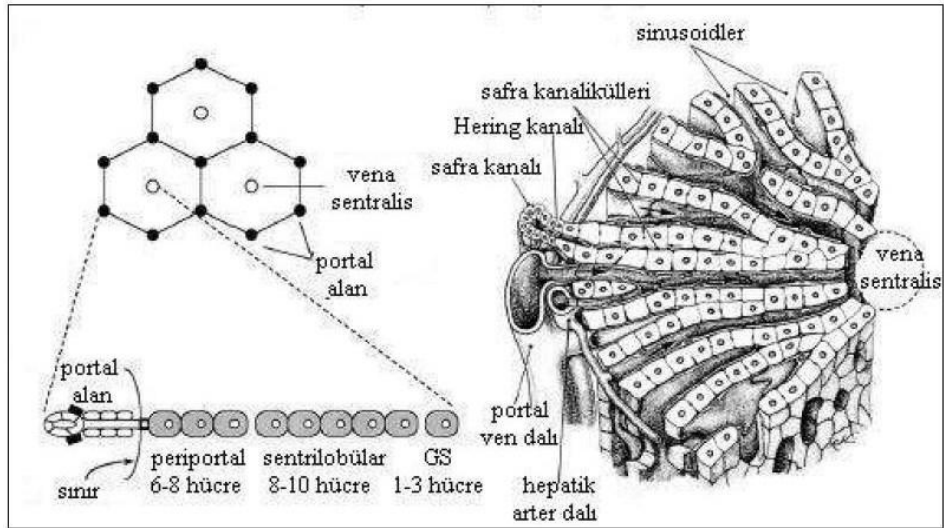
**a) Amonyak metabolizması:** Amonyak vücuttaki aminoasit ve nükleik asit metabolizmasının son ürünü olarak karaciğerde üretilir. Amonyak, sinir sistemi için son derece toksik bir maddedir.

**b) Karbonhidrat metabolizması:** Glukoz karaciğerde glikojene çevrilir ve büyük kısmı karaciğerde depolanır. Normal kan glukoz konsantrasyonu kısa süreli açlık esnasında hepatik glukoneojenez için karbon atomlarının primer kaynağı olan aminoasitler kas proteinlerinden elde edilirler. Glikoneojenez için daha az öneme sahip olan karbon kaynağı laktat ve gliseroldür. Karaciğerin diyetel ve endojen karbonhidratların en önemli işlemcisi olması nedeniyle, karaciğer hastalıkları değişik yollarla karbonhidrat metabolizmasını etkiler (Dilek,2003).

Bu görevlerinin yanında karaciğer; sindirim sisteminden kaynaklanan bakterilerin filtre edilmesi, gastrointestinal yolla safra salgılama, barsaktan dönen kanın filtrasyonu gibi önemli fonksiyonları da vardır (Dilek, 2003; Burtis and Ashwood, 2005).

Karaciğer bu fonksiyonları 3 ana sistem vasıtasıyla gerçekleştirilir:

1. **Hepatositler:** Temel biyokimyasal işlemleri gerçekleştirilir.
2. **Safra yolu:** Bilirubin atılımıyla ilgilidir.
3. **Retikuloendotelyal sistem (RES):** Hemoglobin ve bilirubin metabolizmasını kapsar (Dilek, 2003; Burtis and Ashwood, 2005).



Şekil 2.1 Karaciğerde histolojik olarak altıgen yapıda görülen lobüller ve lobül yapısı (Fausto and Campbell, 2003).

Hasarlı hepatositlerden salınan serum transaminazlar (aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferazlar (ALT)) intrasellüler enzimler olup, karaciğer hasarının belirlenmesinde kullanılan önemli belirteçlerdendir (SriRajaskanthan and Preedy, 2006).

Hepatositlerde meydana gelen hasar “hepatik hasar” olarak adlandırılmakta olup akut ve kronik olarak iki grupta incelenmektedir. Akut hepatik hasar aniden veya kısa zaman içinde ortaya çıkan tablolar için kullanılan bir terimdir. Kronik hepatit hasarı ise hepatositlerden 6 aydan daha uzun süre hasara maruz kalması ile ortaya çıkan tabloyu ifade eder. Hepatik hasarın göstergesi olan laboratuvar testleri; Transaminazlar (Aminotransferazlar), Alkalen fosfataz (ALP), Gama glutamil transferaz (GGT), Laktat dehidrogenaz (LDH), Bilirubin, Albumin ve Protrombin zamanı (PT) testleridir (Sherlock, 1975; Dilek, 2003; Burtis and Ashwood, 2005).

### **2.1.3.1. Karaciğer Enzimleri**

#### **i. Laktat Dehidrogenaz (LDH)**

LDH, dokuların çoğunda bulunan sitoplazmik bir enzimdir. En yoğun bulunduğu dokular; karaciğer, kalp kası, iskelet kası ve böbrektir. Pek çok dokuda bulunması nedeniyle tek başına karaciğer hastalıklarının değerlendirilmesinde yararlı değildir. LDH, 4 alt birimden oluşmuştur. M ve H alt birimlerinin farklı kombinasyonları sonucu 5 izoenzim oluşur. Karaciğere spesifik olan LDH-5 (MMMM)’in yarılanma ömrü 8-12 saattir. İnfeksiyöz mononükleozis’in yol açtığı hepatitte, viral hepatitlerden farklı olarak transaminazların artışına LDH yüksekliği de eşlik eder (Dilek, 2003).

#### **ii. Aminotransferazlar**

Her aminotransferaz bir ya da birkaç amino grubu vericisi için özgüdür. Aminotransferazlar spesifik amino grubu vericisine göre isimlendirilirler, çünkü amino grubu alıcısı hemen her zaman  $\alpha$ -ketoglutarattır. En önemli iki aminotransferaz

reaksiyonu *alanin aminotransferaz* ve *aspartat aminotransferaz* tarafından katalizlenir (Champe, et al., 2007). Aspartat aminotransferaz (AST) hepatositlerin sitozol ve mitokondrilerinde bulunurlar, buna ek olarak aynı zamanda iskelet kası, kalp, karaciğer, böbrek, beyin ve pankreasta da bulunurlar. Alanin aminotransferazlar (ALT) hepatositlerin sitozollerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur (SriRajaskanthan and Preedy, 2006).

#### **a. Aminotransferazların Etki Mekanizmaları**

Tüm aminotransferazlar koenzim olarak bir B6 vitamini türevi olan **piridoksal fosfata** gereksinim duyarlar. Bu koenzim, enzimin aktif bölgesindeki spesifik lizin aminoasidin  $\epsilon$ -amino grubuna kovalent olarak bağlanır. Aminotransferazlar bir aminoasidin amino grubunu koenziminin piridoksal bölümüne transfer etmek üzere etki gösterirler. Bunun sonucunda **piridoksamin fosfat** oluşur. Koenzimin piridoksamin formu bir aminoasit oluşturmak üzere bir  $\alpha$ -keto asit ile reaksiyona girer ve koenzim tekrar orijinal aldehit formuna dönüşür. Aminotransferazlar normal olarak hücre içi enzimleridir ve normal hücre yıkımı sırasında hücre içeriğinin kana geçmesi nedeniyle plazmada düşük düzeyde bulunurlar. Plazma aminotransferaz düzeyinin yükselmesi bu enzimlerce zengin hücrelerin yıkımı gösterir. Örneğin, fiziksel travma veya bir hastalık nedeniyle hücre yıkımı meydana gelir ve hücre içi enzimlerin kana karışmasına neden olur. İki aminotransferaz AST ve ALT plazmada yüksek düzeyde buldukları zaman tanısal öneme sahiptir. ALT, AST'e göre karaciğer hastalığı için daha spesifiktir. Fakat AST de karaciğer de daha fazla miktarda bulunduğundan daha duyarlıdır (Champe, et al., 2007).

### **b. Alanin aminotransferazlar (ALT)**

Önceleri *glutamat pirüvat transaminaz* (GPT) olarak adlandırılan bu enzim birçok dokuda bulunur. Alaninin amino grubunun  $\alpha$ -ketoglutarata transferine katalizleyerek pirüvat ve glutamat oluşumunu sağlar. Reaksiyon geri dönüşümlüdür. Ancak, aminoasit katabolizması sırasında, bu enzim glutamat sentezi yönünde çalışır. Böylece sonuçta glutamat, azot “toplayıcısı” olarak alaninden hareket etmiş olur (Champe, et al., 2007). ALT sitoplazmik bir enzim olduğundan, serum düzeyinin yükselmesi hepatosit plazma membranının hasara uğradığını gösterir. Transaminazların serum düzeyindeki artışı ile hasara uğrayan hücre miktarı paralellik gösterir. Bu enzimlerin aktivitesi başlıca akut viral hepatitte, karaciğer perfüzyon bozukluklarında ve akut toksik karaciğer nekrozunda üst referans değerinin 50 katı kadar yükselir (Champe, et al., 2007).

### **c. Aspartat aminotransferazlar (AST)**

Önceleri *glutamat okzaloasetat transaminaz* (GOT), olarak adlandırılan bu enzim, transaminazların amino gruplarını glutamata yönlendirirler kuralına istisnadır. Aminoasit katabolizması sırasında, AST amino gruplarını glutamattan okzaloasetata transfer ederek üre döngüsünde bir azot kaynağı olarak kullanılan aspartatı oluşturur (Champe, et al., 2007). Aspartat aminotransferazlar (AST veya SGOT) özellikle kalp, karaciğer, iskelet kası ve böbrekte bulunmaktadır. AST'nin yarılanma ömrü  $17 \pm 5$  saat, ALT'in  $47 \pm 10$  saattir. Yarı ömürlerinin kısa olması hepatik hasarın gün gün izlenmesinde en iyi göstergedir (Dilek, 2003).

## 2.2. Alkol (Etanol) Metabolizması

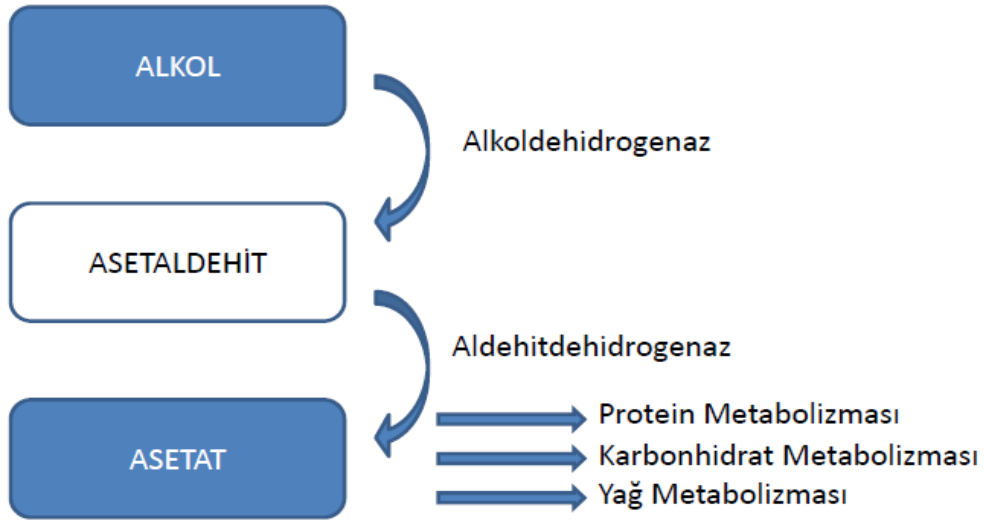
Etil alkol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), hücre zarından hızlı geçebilen suda çözünen bir bileşiktir. Alkol, absorpsiyonundan sonra nefes ve idrarda da görülür. Alkol, beyin ve ruh halini etkileyen bir ilaç gibidir, bunun yanında farmakolojik etkisi de vardır ve yaklaşık 7,1 kcal/g enerji değerindedir (Lieber, 2000). Ağır içicilerde toplam enerjinin ortalama % 50'ini buradan karşılanır (Yang, 2008). Vücutta depolanmayan alkolün tamamı karaciğerde metabolize olur. (Das and Vasudevan, 2007).

Alkolün absorpsiyonu %70 oranında mide ve %25 oranında duodenumda meydana gelir absorpsiyonun çok az bir kısmı diğer bağırsak bölgesinde gerçekleşir. Alkolün % 10' luk kısmı mide de metabolize olurken geriye kalan % 90'lık kısmı karaciğer de metabolize olur (Vonghia, et al., 2008). Uzun süre alkol kullanımı karaciğerde, kemik iliğinde ve beyinde biyokimyasal, klinik ve fizyolojik bulgular da toksik etkisi yaptığı bilinmektedir (Klein, 1999). Karaciğerde, alkol metabolizması oksidasyonunun başlatılmasına aracılık eden 3 büyük enzim sistemi vardır. Bu enzim sistemleri; alkol dehidrogenaz, MEOS ve katalazdır (Lieber, 1984; Albano, et al., 1998; Dilek, 2003; Marsano, et al., 2003; SriRajaskanthan and Preedy, 2006; Das and Vasudevan, 2007; Vonghia, et al., 2008). Her biri farklı subselüler kompartmannta lokalize olmuştur; alkol dehidrogenaz sitozolde, mikrozomal etanol okside edici sistem (MEOS); endoplazmik retikulumda ve katalaz peroksisomlarda yer alır (Lieber, 1984). Bu yolların her biri antioksidan sistemini etkileyen serbest radikalleri üretebilir (Das and Vasudevan, 2007).

### 2.2.1. Alkol Dehidrogenaz (ADH) Yolağı

Alkol ağırlıklı olarak iki yolla metabolize edilir (Şekil 2.2). İlk olarak sitozolik alkol dehidrogenaz tarafından asetaldehitin oksidasyonu içerir ve mitokondriyal aldehit dehidrogenaz ile de asetata dönüşür. Her iki adımda da NAD'ın NADH'a redükte

olmasına bağlıdır. NADH/NAD oranındaki artış karbonhidrat ve lipid metabolizmasına büyük etki yapar. Alkolik karaciğer hastalığında ilk basamak olan mitokondriyal yağ asit  $\beta$  oksidasyonunun inhibisyonu ve değiştirilmiş redoks durumu yağlı karaciğer patogenezinin sebepleri olur (Albano et al., 1998 ; Stewart et al., 2001; Das and Vasudevan, 2007).



Şekil 2.2 Alkol metabolizmasında alkol dehidrogenaz yolağı (İlter ve Tekin, 2005).

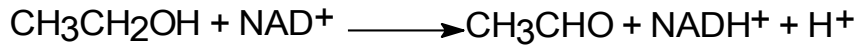
Alkol dehidrogenaz (ADH) ve aldehit dehidrogenazın (ALDH) alkol metabolizmasında belirleyici role sahiptir. Her iki enziminde polimorfik özellik göstermelerine rağmen alkole olan hassasiyetleri farklıdır (Nuutinen, 1986). Alkol dehidrogenazın, alkol metabolizmasında intrasellüler redoks durumunda değişikliklere neden olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir.

Alkolün indüklenmesiyle oluşan CYP2E1, alkol dâhil olmak üzere, toksik ürünleri aktif hale getirerek metabolize eder. Alkol alınımı, karaciğerde mikrozomal sitokrom P450'nin neden olduğu serbest radikal üretiminde bir artışa neden olur, sitozolde ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza dönüşürken mitokondride bir elektron azalmasını artırır. CYP2E1 seviyeleri çeşitli patofizyolojik koşullar altında yükselir;

bu koşullara akut ve kronik alkol tüketimi de girer. CYP2E1, superoksit anyon radikalini ve hidrojen peroksidi üretir, demir varlığında ise hidroksil radikali gibi güçlü oksidanları üretir. Redoks tepkimelerin karaciğer üzerine etkisi, Kupffer hücrelerinin ve hepatik ito hücrelerinin aktif hale getirilmesine sebep olabilir ve bu şekilde alkolik karaciğer hastalığına katkıda bulunur (Das and Vasudevan, 2007).

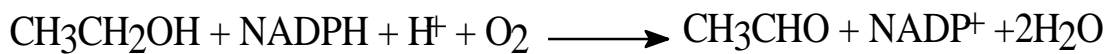
Asetaldehit, alkolün reaktif ve toksik metabolitidir. Buna ek olarak karaciğer hasarının da belirleyicisidir. Bu nedenle in vivo olarak asetaldehitin nasıl metabolize olduğunu bilmek önemlidir (Satoru, et al.,1997).

NADH düzeyleri ve  $NAD^+/NADH$  redoks oranlarında değişiklikler görülebilir (Das and Vasudevan, 2007). Alkoldehidrogenazlar sitoplazmada bulunur ve alkol metabolizmasındaki en etkin enzimlerdir. Alkolün asetaldehite çevrilmesini katalize ederler. ADH enzim sisteminin karaciğer dışında midede de bulunduğu gösterilmiştir (Dilek, 2003). Midede alkolün metabolize edilmesi, portal sisteme geçen alkol miktarının azalmasına ve karaciğerde hasarın daha az olmasına neden olur.



**ADH**, bu reaksiyonları katalizler.

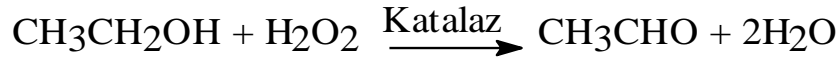
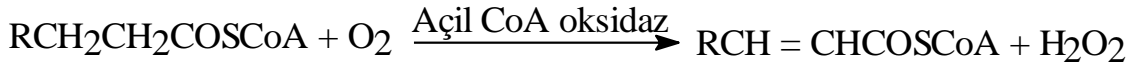
Bu reaksiyonda alkolden bir hidrit iyonu  $NAD^+$  a aktarılır. Alkol oksidasyonu sitokrom P450 izoenzimiyle birlikte mikrosomal elektron taşıma sistemine katılarak katalizlenir. Bu ailede yer alan enzimler 2E1, 1A2 ve 3A4; alkölü okside edebilme kapasitelerine göre değişen izoformlardır (Das and Vasudevan, 2007).



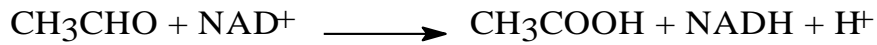
**MEOS**, bu reaksiyonları katalizler.



Bu mekanizma alkol kullanıcıları için nicel olarak daha çok önem kazanmaktadır. Buna ek olarak bu mekanizma 2E1 izoenzimleri ile alkol tüketicilerinde serbest oksijen radikal oluşumunu katalizlemesinde önemlidir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin yüksek miktarda oluştuğunu gösterebildiği gibi bu yükseklik, alkol tüketicilerinde buna bağlı olarak hidroksil radikal oluşumlarını da arttırmaktadır. Karaciğer, alkol oksidasyonu sonucu, peroksizom aktivitesine de katkıda bulunur. Bu reaksiyon;



Ağır içicilerde, peroksizom oksidasyonları sebebi ile karaciğerde yağ asitlerinin birikimi sonucu bu mekanizma daha belirgin olabilir. Alkol oksidasyonu daha fazla hepatik aldehit dehidrogenaz tarafından oksitlenen asetaldehit artışına neden olur (Das and Vasudevan, 2007).



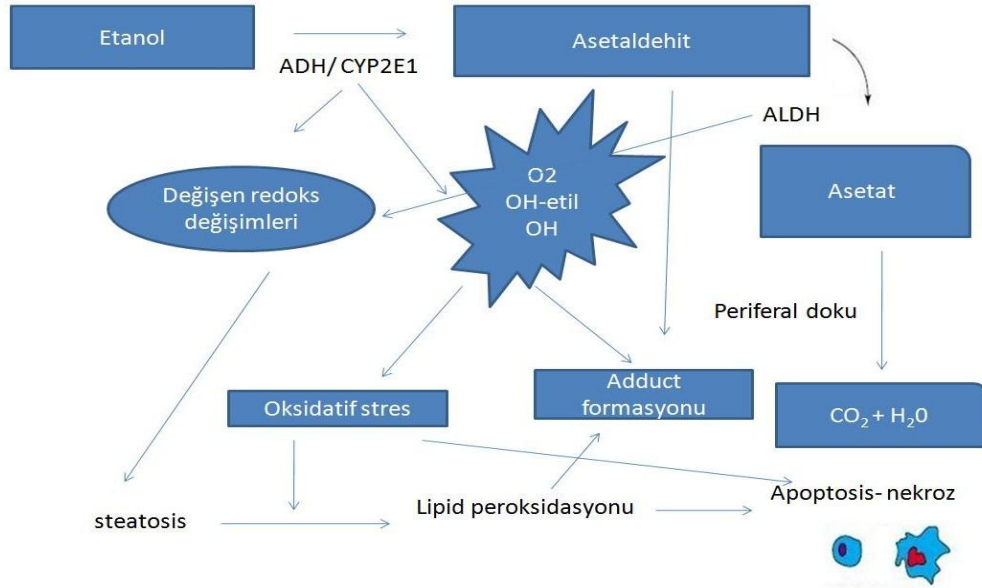
**ALDH**, bu reaksiyonu katalizler.

Aldehit dehidrogenazın mitokondriyal formu, asetaldehitin düşük konsantrasyonunda devam etmesinde önemli rol oynar. Asetat daha sonra aktif formu olan asetil CoA'ya asetil CoA sentaz tarafından çevrilir. Alkolün oksidasyonu sonucu alkol dehidrogenaz ve onu takip eden asetaldehitin oksidasyonu sonucu hepatik NADH/NAD<sup>+</sup> oranında önemli bir artış olur. Bu artış hem mitokondri hem de sitoplazmada gerçekleşir, laktat/piruvat ve β-hidroksi butirat/asetoasetat oranları ölçülür. Mitokondriyal düşük aldehit dehidrogenaz üretimi, NADH'in mitokondride

üretiminden daha fazladır. Malat-aspartat mekiği üzerinden sitoplazmik NADH mitokondri içine taşınır. Bu artan NADH, mitokondriyal elektron taşıma sistemi ile tekrar oksitlenir. Eğer doku aerobikse böylece alkol oksidasyonu mitokondride NADH'ın bulunabilirliğini de artırır (Das and Vasudevan, 2007).

Alkolün bazı zehirli etkileri, ADH yoluyla alkolün oksidasyonu tarafından oluşan NADH'ın üretimiyle ilgilidir. Çeşitli alkol dehidrogenaz formları insan karaciğerinde tanımlanmıştır. Bütün bu formların alkolün asetaldehite dönüşümünü katalizlemesi için NAD'a ihtiyaç vardır. Alkol oksidasyonu hepatic sitozolde aşırı miktarda serbest NADH indirgeyici eşdeğerini üretir. 1950-1960'ların sonlarında bazı hepatic ve metabolik hastalıkların alkol kullanımıyla ilişkili olduğu ve alkol oksidasyonu sonucu üretilen NADH'ın redoks değişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Lieber, 1984). Genellikle alkol, karaciğer hücresinin sitozolünde alkol dehidrogenaz enzimi NAD sayesinde hidrojen alıcısı tarafından asetaldehit üretmek için metabolize edilir.

İlaçların %50'si (alkollerde dâhil olmak üzere) karaciğerde ki endoplazmik retikulumun bir ailesi olan (mikrozomlar) sitokrom P450 olarak bilinen enzim tarafından metabolize olur. P450'in ikinci ailesinin E subfamilyasında bulunan bir enzim olan CYP2E1 normal olarak, alkol metabolizmasının %10'un altında sorumludur ve kofaktör olarak NAD'ı kullanır. Alkol karaciğerde CYP2E1'nin konsantrasyonunu 10 kata kadar arttırabilir. Alkol tarafından CYP2E1'in indüksiyonu alkole bağlı karaciğer hastalığı için önemli bir katkı olabilir (Şekil 2.3). CYP2E1 birçok serbest radikal üretir ve birçok ksenobiyotikleri endüstri solventlere, anestetikleri kokaine ve asetaminofen ve yüksek toksik metabolitlere dönüştürebilir (Satoru, et al., 1997).

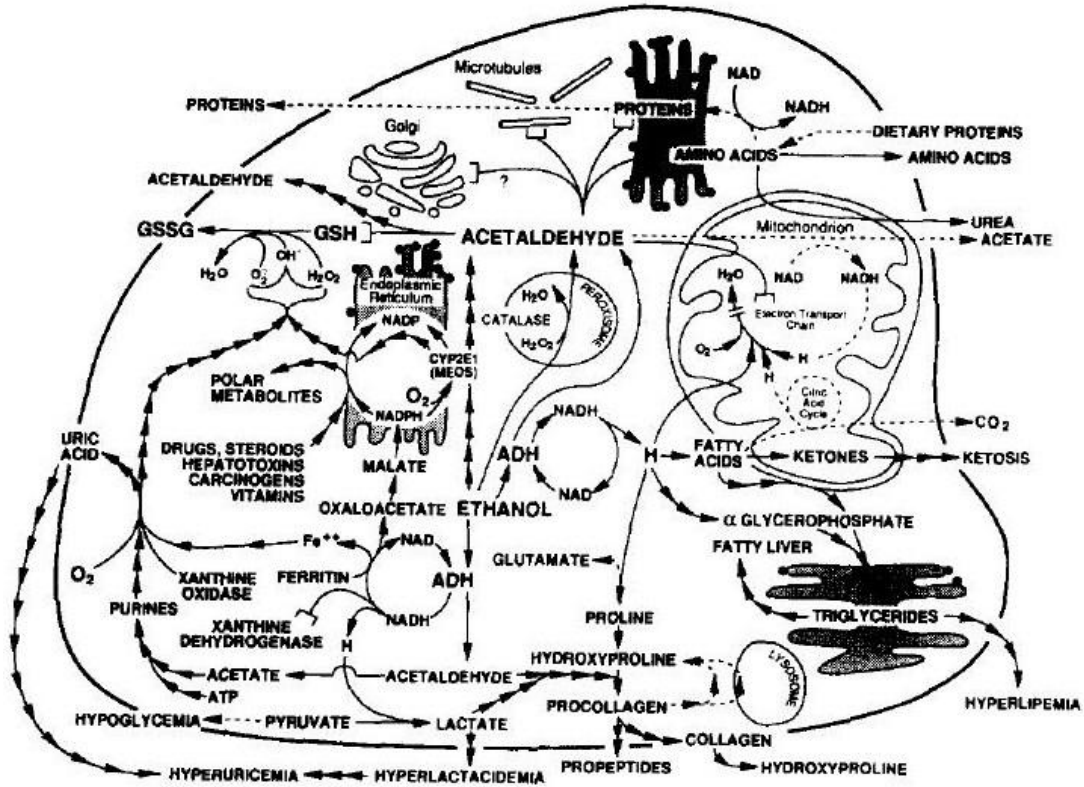


**Şekil 2.3 Alkolün metabolizma yolları.** Alkolün metabolizmasında her iki adım da, değiştirilen redoks potansiyeli ile sonuçlanır ve en sonunda, yağlı karaciğer oluşur. CYP2E1 sistemi aracılığıyla metabolizma reaktif oksijen türlerinin ve oksidatif stresin ana kaynağını teşkil eder. Lipid peroksidasyonunununundan dolayı oluşan ürünler, reaktif oksijen türleri ve asetaldehit tüm neo-antijenik adducts oluşumuna katkıda bulunur. Lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres nekroz veya apoptoz ile hücre ölümüne yol açabilir (Stewart et al.,2001).

### 2.2.2. Mikrozomal Etanol Okside Edici Sistem (MEOS)

MEOS yüksek doz alkol alınımında devreye giren bir enzim sistemidir. Birçok alkol çeşidi, karaciğerde metabolize olur. Hidrojen ve oksijen içeren oksidasyon reaksiyonları olarak bilinen bir dizi reaksiyon gerçekleşir. Alkol metabolizmasının ikinci yolu, uzun süre alkol tüketiminde aktive olan MEOS'dur. MEOS yolunda sitokrom P4502E1 ya da CYP2E1 enzimleri ile alkolden asetaldehit üretmek için hidrojen uzaklaştırılır. Bu yollar, özellikle MEOS, serbest oksijen radikal olarak adlandırılan yüksek kararsız moleküllerin oksidasyonu sonucu ortaya çıkar. Örnek olarak superoksit, hidrojen peroksit ve hidrosil radikalini verebiliriz (Şekil 2.4). Normal şartlarda karaciğerde yer alan oksijen radikalleri antioksidan olarak adlandırılan moleküller tarafından temizlenir. Ancak, ağır alkol tüketimi sadece oksijen

radikallerinin üretimini arttırmakla kalmaz antioksidanlar arasında da bir dengesizlik yaratır. Oksidatif stres kronik olduğu zaman hücre ölümüne katkı da bulunarak karaciğer hücrelerine zarar veren reaksiyonları stimüle eder (Albano, et al., 1998).



Şekil 2.4 Hepatositlerde alkol oksidasyonu (Lieber de carli 1984).

Alkolün mikrosomal oksidasyon sistemindeki etkilerine bakıldığında oksidasyonun, NADPH ve oksijen beraberliğinde karaciğerin mikrosomal fraksiyonu içinde olduğu, kısmen karbonmonoksit tarafından inhibe edildiği görülür. Diğer taraftan alkol hidrojenperoksit varlığında katalaz tarafından okside edilir. Mikrosomal fraksiyon ile NADPH oksidaz, katalaz ve ADH tarafından okside edilmeyen bütün alkolü metabolize eder (Erenoğlu, 1976).

Hidrojenin serbest kalışı ve tükenmesi arasındaki denge bozulur. Karaciğer hücresi hidrojenle dolar. Bu durum, glukoneojenezinin, sitrat döngüsünün, laktat ve piruvat azalmasına, aminoasit metabolizmasında bozulmalara, yağ ve kolesterol sentezinde artmaya neden olur (Erenoğlu, 1976).

Kronik alkoliklerde karaciğer hücresinde yağ depolama, yağ asit oksidasyonunun inhibisyonuna ve sentezine bağlıdır. Bu en azından, kısmen bir uyum mekanizmasıdır. Endoplazmik retikulum artması da böyledir. Lipoprotein sentezi inhibe edilmemiştir. Yağ metabolizasyonunun artması sonucu yağ dokusundaki artma, çok fazla alkol alınımından sonra görülür (Erenoğlu, 1976).

### 2.2.3. Katalaz

Katalaz bu üç sistem içinde en az kullanılanıdır. Karaciğer mikrosomlarında mevcut olan NADPH oksidaz, NADPH ve  $O_2$  varlığında  $H_2O_2$  meydana getirebilir. Katalaz ve bir  $H_2O_2$  meydana getiren sistemin kombinasyonunu invitro alkol ve metanolü okside eder. Katalaz  $H_2O_2$  sistemin muhtemel fizyolojik görevi  $H_2O_2$  yapımının uyarılmasını takip eden metanol oksidasyonunu arttırmadır. Katalaz peroksidasyonu ileri derecede hızlı bir enzim reaksiyonu olduğundan bu reaksiyonun hızını sınırlandıran faktörün  $H_2O_2$  konsantrasyon olduğu sanılmaktadır. Katalaz reaksiyonunun ürünleri mikrozomal alkol oksidasyonunun ürünlerinin aynısı olan asetaldehit ve sudur. Böylece hiçbir yoldan hücrenin alkol metabolizması sonucu redoks potansiyeli bozulmaz (Erenoğlu, 1976). Asetaldehit büyük oranda mitokondri de de asetaldehit dehidrogenaz enzimi ile asetik asite metabolize olur, böylece enerji açığa çıkarak karbondioksit ve suya metabolize olur. Asetaldehit her zaman hızlı metabolize olmaz. Yüksek dozda asetaldehit alkoliklerde hoş olmayan bir şekilde asetaldehit dehidrogenazı bloklayan ajan ortaya çıkar (Erenoğlu, 1976).

#### 2.2.4. Alkol Metabolizması ve Serbest Radikaller

Serbest radikaller, bir veya birden daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi başta olmak üzere süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallere iyonları ve hidroksil radikalidir. Alkol metabolizması sırasında oluşan toksik maddelerin patogenezinde birden fazla mekanizma olması olasıdır. Reaktif oksijen türleri ve diğer serbest radikallerin, alkolik karaciğer hastalığında kilit mekanizma olduğuna inanılır (Jarvelainen, et al., 2000). Bu reaktif oksijen türleri birçok kaynaktan oluşur, karaciğer Kupffer hücrelerinin aktivasyonu da bunlardan biridir, bu da alkolik karaciğer hastalığının nasıl ilerlediğini açıklamaktadır (Wheeler, 2003). Oksidatif stres, alkol tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinden doku hasarı patogenezinde anahtar rol oynar ve birçok dokuda endojen kaynaklı antioksidanları azaltılması ve lipid peroksidasyon sürecinin gelişimi ile de ilgilidir (Kawther, et al., 2006). Oksidatif stres, prooksidanların lehine ve antioksidanların lehine potansiyel hasara yol açar. Serbest radikal oluşumu alkolik karaciğer hasarı modellerinde artar. Buna ek olarak oksidatif stres doğrudan toksisiteye neden olurken inflamatuvar yanıtın da artmasına neden olabilir. Serbest radikaller redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini (NF- $\kappa$ B) aktive ederken proinflamatuvar sitokinlerin de oluşumunu artırır. Böylece oksidanlara karşı tedaviler teorik olarak insanlarda alkolik karaciğer hastalığında yararlı olabilir (Yuan, et al., 2007).

Deneysel olarak alkol alınımlı sonucu önemli antioksidan seviyelerinde bir azalma olur ve bu azalmaya katalaz, SOD ve GPX enzimleri ve non-enzimatik antioksidanlardan glutatyon, E ve C vitaminleri de dahildir. Bu değişiklikler lipid peroksidasyonunu artırır. Lipid peroksidasyon ürünleri, hücre ve dokularda oksidatif stres ile ilgili bazı patofizyolojik olaylarda katılmaktadır. Reaktif serbest radikallerin aksine aldehitler lipid peroksidasyon ürünleri üretebilir (Ostrowskaa, et al., 2004).

### 2.2.4.1. Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri, küçük, yüksek ölçüde reaktif, oksijen içeren özellikle karaciğerde hücrel moleküllere zarar veren moleküllerdir. Alkol metabolizması sadece doğrudan reaktif oksijen türlerinin üretimine katılmakla kalmaz, aynı zamanda hipoksi, endotoksin ve sitokinlerin salınımı ile ilgili oksidatif stresin oluşmasıyla da ilgilidir. Alkol vücutta bazı metallerin seviyelerini değiştirir, böylece reaktif oksijen türlerinin üretimi kolaylaştırırken antioksidanların da seviyelerini azaltır. Alkol zehirlenmesinin ardından prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki denge bozularak biyomoleküllerin yağlar, proteinler ya da DNA'ya oksidatif zarar vermesi sonucunda hücre hasarı oluşur. Karaciğerde serbest oksijen radikal üretimi ve oksidatif stres, alkolik karaciğer hastalığının gelişmesinde önemli rol oynar. Alkole bağlı olarak oksidatif stres immün reaksiyonları stimüle ederek karaciğerde kendi antijenlerine karşı tepki verir (Das and Vasudevan, 2007).

#### i. Akut Alkol Alınımı Hepatositte Oksidatif Stresi İndüklemesi

Oksidatif stres, süperoksit anyonu ve onun metabolitleri başta olmak üzere hücrenin ve dokunun oksidanlara aşırı miktarda maruz kalma durumu olarak tanımlanabilir. Antioksidanlar serbest radikallerin üretimiyle baş edemediği zaman oksidatif stres hücre bütünlüğünü etkiler. Kısa süreli alkol alınması, karaciğer mitokondrilerinde süperoksit üretimini artırır. Akut alkol alınımı, süperoksit ve lipid peroksidasyonu artırır ve mitokondride fonksiyon bozukluğunu indükler. Akut alkol alınmasına bağlı olarak NAD/NADH oranındaki azalma sonucunda solunum elektron taşıma zinciri boyunca elektron akışı artarak mitokondride süperoksit üretimini indükler. Alkol antioksidan düzeylerini azaltırken oksidatif stresi de artırır. Süperoksit anyonları mitokondride aktif MnSOD'un hidrojen peroksit katalize olmasıyla oluşur. GSH peroksidaz, hidrojen peroksiti azaltırken reaktif radikal üretimini de önler. Karaciğer hücrelerinin mitokondrileri katalaz içermediği için hidrojen peroksiti

azaltmak için mitokondrial GSH sistemi oksidatif strese karşı mitokondriyi korumak için geliştirdiği mekanizmadır (Adachi and Ishii, 2002).

#### **a. Lipid Peroksidasyonu**

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştukları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol aarlar. 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 ürünlerini oluştururlar. Poliansatüre yağ asitleri (PUFA)'nin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendine devam eden zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan poliansatüre yağ asidi 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 lipid peroksid radikali meydana gelir. Lipid peroksid radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asidlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol aarırken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid 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 katalizler. Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehidler



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 mikroviskositesi ciddi şekilde etkilenir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehid, 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, malondialdehidin niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar (Akkuş, 1995).

#### **b. Oksidan-Antioksidan Sistem Biyomarkırları**

Oksidatif stres ağır içicilerde ciddi karaciğer hasarı olmadan da gözlenebilir. Hepatik sitokrom P450 monooksijenaz aktivitesini stimüle ederek gelişmiş mikrozomal malondialdehit oluşumuna eşlik ederken antioksidan ve  $\alpha$  tokoferol düzeyinde bir azalma olur. Serumda malondialdehit ve  $\alpha$  tokoferol seviyeleri alkol sonucu oksidatif stres de biyolojik bir belirteç olarak bilinir. Ağır içicilerde okside LDL yüksekliği gelişmiş gliksidasyonun son ürünü ve asetaldehit tipik bulgulardır (Das and Vasudevan, 2007).

### **2.3. Alkole Bağlı Karaciğer Hastalıkları**

Alkol vücutta depolanmaz ve % 90 'ı karaciğer de metabolize olur geriye kalan kısım, idrar, ter ve nefesle değişmeden atılır (SriRajaskanthan and Preedy, 2006). Son 50 yıldır yapılan araştırmalar sonucunda alkolün neden olduğu hepatotoksisite doğrulanmıştır. Hala belirsiz olmakla birlikte uzun süre alkol tüketen bağımlıların %20-30'un da ağır karaciğer hastalıkları gelişmektedir. Yapılan bir çalışmada 8 yıl boyunca her gün 160 gr alkol tüketen bireylerin sadece % 14'ünde siroz gelişmiştir

(Bujanda, et al., 2006). Alkolik karaciğer hastalığı uzun süre ve ağır alkol alınımı sonucunda meydana gelir. Ölümcül karaciğer değişikliklerinin başında karaciğer yağlanması, hepatit ve karaciğer sirozu gelir (Pramyothin, et al., 2006).

Yağlı karaciğer, alkolik karaciğer hastalığında en çok görülen morfolojik değişikliktir. NAD, alkol dehidrogenaz enzimi etkisiyle alkol tarafından üretilen bir metabolittir. Yağ asitlerinin oluşumunu artırırken yağ asitlerinin oksidasyonu azaltır. Asetaldehit, alkol dehidrogenazın ve P4502E1'in bir başka metabolitidir. Mitokondri fonksiyon bozukluğuna neden olur. Alkolik yağlı karaciğer alkol kullanımının azaltılmasıyla geri dönüşümlüdür. Aminotransferazlar ve bilirubin düzeylerinde orta derecede bir anormallik, bazı durumlarda da alkole bağlı yağlı karaciğer oluşturabilmektedir. Böyle durumda Aspartat aminotransferaz (AST) seviyesinin genelde Alanin aminotransferazdan (ALT) iki kat yüksek olduğu bildirilmiştir (Yang, 2008).

Alkolün sebep olduğu yağlanma ve karaciğer hücre hasarına yol açan alkol oksidasyonu NADH toplanmasına bağlanmalıdır. Karaciğer hücre hasarı, alkol dehidrogenaz aktivitesini azaltır. Bunu takiben karaciğer hasarının düzelmesinden veya düz endoplazmik retikulum proliferasyonu ile alkole toleransı normale bazen de normalden fazlaya dönüşür. Sirozlu hastalar, sağlam karaciğerli veya dönüşümlü karaciğer hasarı olan kimselere göre genellikle düşük hepatik alkol dehidrogenaz aktivitesi gösterirler ve bu yüzden de daha fazla artan karaciğer hasarına daha müsait bir zemin oluşur. Alkoliklerdeki kronik karaciğer hasarının diyetteki noksanlıkla daha da arttığı, yüksek proteinli diyetle korunduğu ileri sürülmüştür. Anabolik steroidlerin, endoplazmik retikulumda hiperplazi, RNA sentezini artırma ve aminoasitlerin protein içine inkorporasyonlarının arttırmasından doğan karaciğer harabiyeti, hücre tamiri veya replikasyonu için gereken besin ihtiyacını artırır. Protein, mineral ve vitamene olan ihtiyaç artar. Bu durum alkoliklerde noksan olan folik asit, çalışmalarla gösterilmiştir. Alkolik karaciğer hasarlarında folik asit verilmezse nükleik asit sentezi bozulur. Bu

karaciğer rejenerasyonunu koruyacağı gibi, alkolik dehidrogenaz aktivitesinin artmasına da neden olabilir (Erenoğlu, 1976).

Alkolik hastalarda karaciğer yağlanması ve alkolik hepatit arasında dalgalanmalar olabilir ama fibrozis ve sirozla meydana gelen hasar geri dönüşümsüzdür. Yağlı karaciğer de yağ hücrelerinin karaciğer parankimasında birikmesiyle oluşur. Karaciğer içinde metabolik yolların bozulması sonucu fazla lipid oluşumu sonucu hepatositlerin içinde büyük damlacıkların oluşumuna zemin hazırlar. Klinik yönden, yağlı karaciğer değişikliğiyle hastalar, herhangi bir işaret veya karaciğer hastalığının bulgularına sahip olmayabilir. Kan değerleri de normal olabilir, ancak alanin transaminaz, alkalın fosfataz ve GGT aktivitelerin de bir yükselme olduğunda belirti verebilir (SriRajaskanthan and Preedy, 2006).

Alkol tüketenlerin hepsinde siroz ya da alkolik hepatit gelişmesi görülmez. Alkolik karaciğer hastalığını etkileyen birçok faktör vardır. Bu faktörlere genetik ve çevresel faktörleri örnek verebiliriz. Alkol ve asetaldehit metabolizmasında enzimlerinde genetik çeşitlilik vardır. 20 den fazla alkol dehidrogenazın izoenzimi ve aldehit dehidrogenazın da polimorfizmleri vardır; bunların bazıları alkolün toksisitesinden korur. Alkol dehidrogenaz ve aldehit dehidrogenazın polimorfizmleri sadece alkolizm teşhisi etmez aynı zamanda organ hasarını da belirler.

### **2.3.1. Karaciğer Hastalığında Mitokondrinin Rolü**

Alkol tüketimi mitokondride serbest radikal üretimini etkiler. Yapılan bazı çalışmalar alkol alınımı aktif oksijen türlerinin hepatosit mitokondrilerinde fonksiyon bozukluğu yaptığı düşünülse de alkol alınımı mitokondride oksidatif stres ile ilgili mekanizmalar kesin değildir. Yapılan son çalışmalar mitokondrinin apoptoz da önemli rol oynadığı yönündedir. Mitokondri, apoptoz da, apoptoz promoting faktörlerinin

sitozol salınımını regüle eder. Mitokondride apoptotik sinyallerin gerçekleştiği kesin olmasına rağmen bu apoptotik sinyallerin kesin mekanizması aydınlatılamamıştır.

Apoptoz, alkolik karaciğer hastalığında apoptotik cisimcikler gibi histopatolojik görünümünde kendini gösterir. Bazı çalışmalar alkolik karaciğer hastalığının apoptoza neden olduğunu bildirmiştir. Alkolik hepatitis hastalarında hepatosit apoptozunda artış görülmüştür. Alkolik karaciğer hastalığının hepatosit apoptozu oksidatif stres, inflamatuvar sitokinleri, tümör nekroz faktör  $\alpha$  gibi potansiyel mekanizmaları içerir. Alkolik karaciğer hastalığında oksidatif stres ve oksijen kaynaklı serbest radikallerin artmasıyla ilgili deneysel ve klinik kanıtlar artsa da oksidatif hasarın alkolik karaciğer hastalığındaki rolü netlik kazanmış değildir (Das and Vasudevan, 2007).

Mitokondride NADH'in yüksek düzeyde olması serbest radikallerin oksidatif fosforilasyon ve superoksitlerin ve hidroksi radikallerinin sızmasına, lipid peroksidasyonu ve mitokondriyal DNA hasarında bir artışa neden olur (<http://www.benbest.com/health/alcohol.html#liver>).

Karaciğerde alkol alınımının erken etkileri mitokondri yapısının değişikliği ile ortaya çıkar. Mitokondriler ya şişerek yapılarında ya da kristalarında bozulmalarla karakteristiktir. Sıçan modellerinde, mitokondride yapısal değişiklikler yağlı karaciğerin başlamasıyla başlar. Sonraki aşaması alkolik karaciğer hastalığının klasik göstergesi olan doku nekrozu, ito hücre aktivasyonu ya da perivenular fibroz görülür. Mitokondri serbest oksijen radikallerin oluşumuna karşı savunma oluşturur. Mitokondri hem oksidatif stresin hedefidir, hem de kendisi ile oksidatif mekanizmalara katkıda bulunarak stresle ilgili sinyalleri kontrol eder (Das and Vasudevan, 2007).

### **2.3.1.1. Mitokondri Membran Depolarizasyonu ve Permeabilite Tranzisyonu**

Mitokondrinin temel fonksiyonu kimyasal ve elektrik grandiyetin artışına bağlı olarak, iç mitokondriyal zarının her iki tarafında yer alan iyonları ve protonların asimetric dağıtmasıdır. İç mitokondriyal membranın iç tarafı negatif yüklüdür. Mitokondriyal membran potansiyelindeki değişimler ve zar geçirgenliği hücre canlılığını düzenleyici merkez mekanizma olduğu düşünülmektedir (Das and Vasudevan, 2007).

## **2.4. Apoptoz**

Her hücre, doğar, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve ölür (apoptozis). Doku homeostazisi, yani yeniden yapım ve yıkımın bir düzen içinde oluşu, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır (Akşit ve Bildik, 2008). Apoptoz, hücre zarındaki bileşiklerin azalması, kromatinin yoğunlaşması, mitokondriyal şişme ve makrofajlar ya da organın komşu hücreleri tarafından hücrenin fagositik olarak ortadan kaldırılmasıyla morfolojik olarak karakterize edilmiştir (Özcan ve Mengi, 1998).

### **2.4.1. Alkolizm ve Apoptoz**

Uzun süre fazla miktarda alkol tüketen bireylerde hücre ölümü görülür (apoptoz ya da nekroz). Hepatosit apoptozisinin başlamasına neden olan sitokrom P4502E1, hücre iletişimde rol oynayan sitokinler, oksidatif stres ve demir metabolizmasındaki değişimler gibi birçok faktör alkol tüketimi ile etkilenir. Alkol metabolizmasının toksik ürünü olan asetaldehit tarafından folik asitin direkt oksidatif yıkımı yapılan çalışmalarla gösterilmektedir. Folat ve metiyonin metabolizmasındaki alkolle uyarılmış değişiklikler DNA metilasyonu için gerekli olan metil gruplarının kullanılabilirliğini azaltır. Yapılan

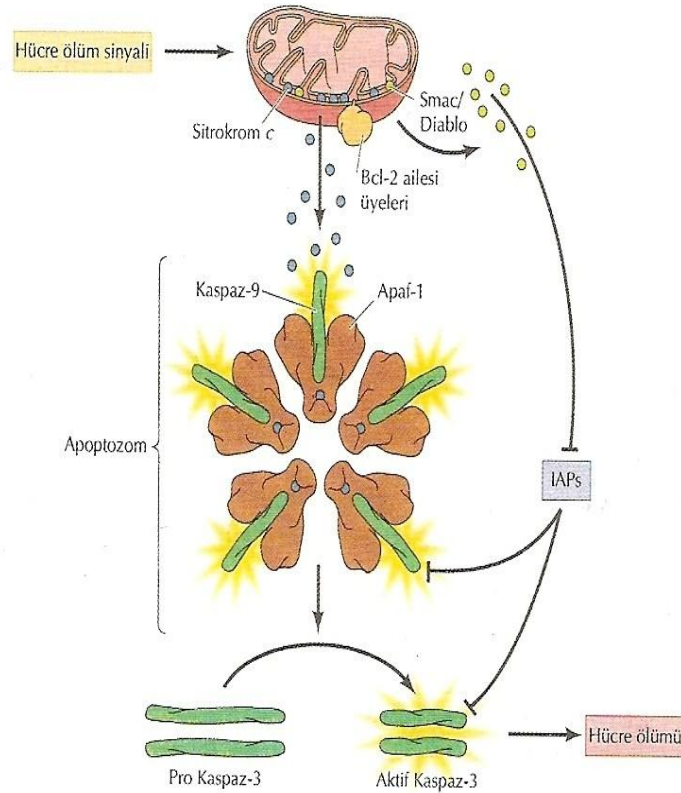
çalışmalarda fosfolipidlerin en önemli üyesi ve metil grubu kaynağı olan kolinin eksikliğinde apoptozisin uyarıldığı gösterilmiştir (Özcan ve Mengi, 1998).

Son yıllardaki çalışmalar alkolik hepatitli hastalardaki ciddi klinik belirtiler ile apoptozisin şiddeti arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. TNF  $\alpha$  ile uyarılmış apoptozis, alkolle arttırılır. Bu olay muhtemelen TNF  $\alpha$  ile uyarılmış apoptotik mekanizma ve alkol metabolizmasının bir sonucu olarak oluşan apoptozis arasındaki sinerjik bir ilişkiyi yansıtır (Özcan ve Mengi, 1998).

#### **2.4.2. Alkol Alınımında Hepatosit Apoptozunda Mitokondrilerin Rolü**

Mitokondri ökaryotik hücrelerin yaşam merkezi olan ve apoptozda anahtar rol oynayan organeldir. Mitokondri depolarizasyonu ve geçirgenlik geçişleri apoptotik hücre ölümü merkezidir. Mitokondri aracılı apoptoz, fonksiyon kaybı olarak değil biyoenerjik yetersizliğinin bir sonucu olarak apoptozu indükleyen faktörler (AIF) olarak bilinen faktörlerin salınımıyla etkilenir. Sitokrom c ve AIF'ler mitokondrinin iç membranından sitozole salınır. Sitokrom c salındığı zaman kaspaz 9 Apaf 1 ile aktif hale getirilir, daha sonra oluşan aktif formu prokaspaz 3'ü kaspaz 3 formuna dönüştürür (şekil 2.5). Apoptozun mitokondri yolunu kontrol ve düzenleyenler Bcl-2 ailesi proteinleridir. Bu protein ailesi anti apoptotik (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-w, A1) ve pro apoptotik (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bid, Bad, Bik, Bim, Blk) elemanlarından oluşur. Bazı apoptotik modellerde, antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri mitokondriden sitokrom c'nin salınımını engeller. Diğer taraftan proapoptotik Bcl-2 ailesi sitokrom c' nin salınımını arttırır. Akut alkole maruz kalınması durumunda mitokondriden sitozole sitokrom c' nin salınımını indükler ve kaspaz 9 ve kaspaz 3'ü aktive ederek apoptoza götürür (şekil 2.5). Hepatositler akut alkole maruz kaldığında bu apoptotik değişlikle antioksidanları inhibe ederek oksidatif stresin sitokrom c'nin salınmasına neden olur. Sitokrom c'nin salınımıyla mitokondri apoptoza neden olarak önemli rol

oyun ve akut alkole bağı olarak hepatositte apoptoz kaspazların aktif hale gelmesine bağıdır (Arthur, 2001).

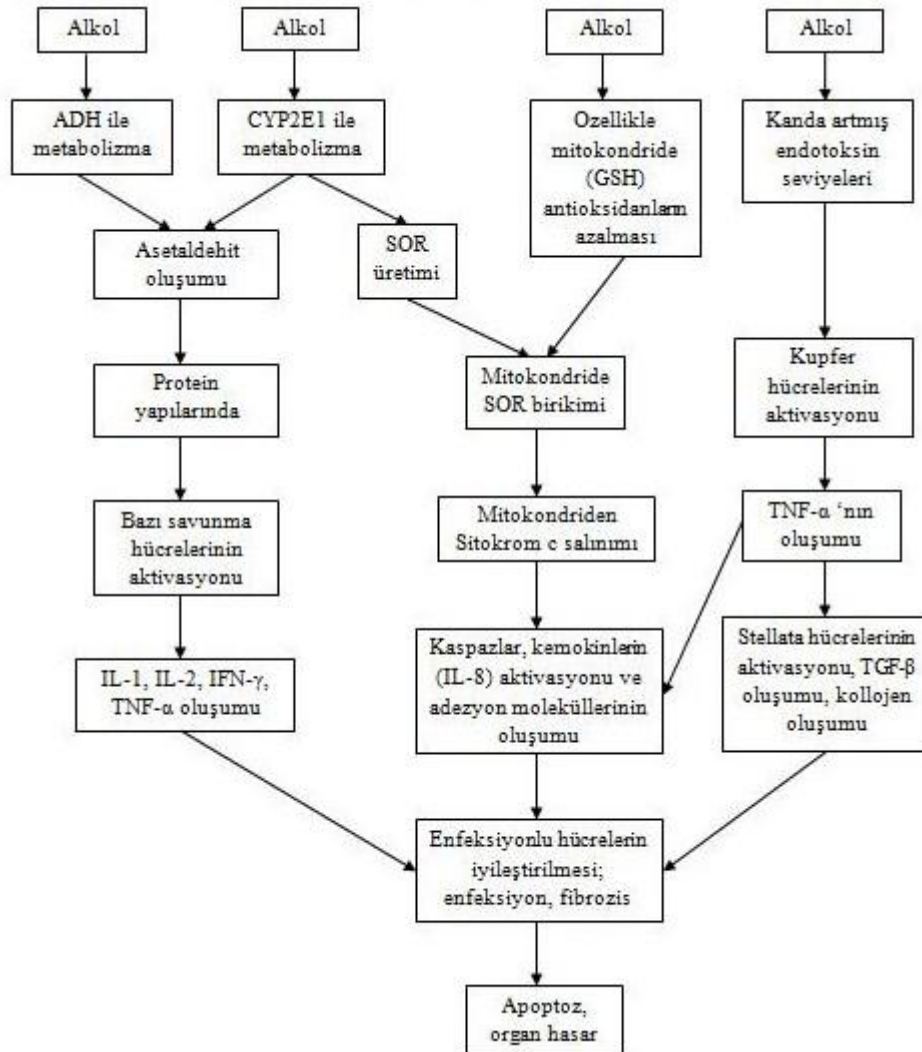


Şekil 2.5 Kaspaz 3'ün aktivasyonu (Cooper and Hausman, 2006).

Mitokondri dış zarında yerleşen Bcl-2 ailesi üyeleri mitokondrinin bütünlüğünü sağlarlar. Sitokrom c'nin mitokondriden salınımı Apaf-1 ve kaspaz 9 içeren, kaspaz 9'un aktive olduğu komplekslerin (apoptozom) oluşumuna neden olur. Daha sonra kaspaz 9 proteolitik kesim ile aşağı yöndeki kaspaz 3 gibi diğer kaspazları aktive eder. Smac/Diablo kaspaz inhibitörleri olan IAP'ların (apoptoz inhibitör proteinleri) aktivitesini engelleyerek hücre ölümünü uyarır (Cooper and Hausman, 2006).

### 2.4.3. Alkolün Apoptozu İndüklemesi

Alkol ve yıkımı öncelikle karaciğerde gerçekleşmekte olup birçok faktöre bağlıdır. Bu faktörler sonucu hepatositlerde apoptoz meydana gelir (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6 Alkolün apoptoz yolındaki mekanizması (Neuman, 2003).

Bazı asetaldehitler hücrede proteinlerle etkileşerek adducts adı verilen bazı immün hücreleri aktive ederler. Bu hücreler, çeşitli sitokinleri üreterek interlökinler, interferon gamma ve tümör nekroz faktör gibi immün hücreleri aktive ederler.



Asetaldehite ek olarak, CYP2E1 tarafından alkol metabolizması reaktif oksijen türleri olarak bilinen reaktif molekülleri üretirler, bunlar hücre yapılarında öncelikle mitokondride birikirler. SOR'lar antioksidan olarak bilinen moleküllerle özellikle glutatyon (GSH) olarak bilinen molekülle ortadan kaldırılır. Ancak, alkol hücrede GSH depolarını azaltarak, mitokondride SOR birikimini şiddetlendirilir. Bu süreç, mitokondride sitokrom c salınımına yol açarak daha sonra kaspaz adı verilen enzimleri harekete geçirerek hücrede IL-8 üretimini teşvik eder. Sonunda, kanda ve karaciğerde bakteri proteini olan endotoksin seviyelerinin artmasına yol açar. Kupffer hücrelerinin, bağışıklık hücrelerini aktive eden bu hücreler daha sonra **TNF  $\alpha$** 'yı üretir ve başka bir karaciğer hücresi olan ito hücrelerini aktive ederek transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) ve kollajen üreterek skar doku oluşmasına neden olur. **TNF  $\alpha$**  üretimi IL-8 gibi kemokin üretiminin artmasına yol açar, bu da kan dolaşımında inflamatuvar hücreleri çekerek karaciğer inflamasyonuna katkıda bulunur. Fazla **TNF  $\alpha$**  ve kemokin üretimi adhezyon moleküllerinin üretimini arttırarak fibroziste önemli rol oynar. Böylece, bu çeşitli yolların hepsi, inflamatuvar reaksiyonlar ve fibrozis organ hasarı ve apoptozis başlatma indüksiyonuyla sonuçlanır (Neuman, 2003).

#### 2.4.4. Kaspazlar

Kaspazlar (caspases) hasarlı olan hücrelerin çevrelerine zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan programlanmış hücre ölümünü (apoptosis) uyarıcı proteazlardır (Yerlikaya ve Dokudur, 2009). Bu proteinler; katalitik bölgelerinde önemli görev yapan bir sistein (cysteine) rezüdü taşıdıkları, seçici olarak hedef proteinleri C-uçlarında bulunan bir aspartat'dan kestikleri ve enzim (...ase) görevi yaptıkları için **caspase** olarak adlandırılırlar (Güneş, 2006).

İnsanlarda 15 farklı kaspaz belirlenmiştir. Kaspazlar, prokaspaz olarak sentezlendikten sonra belirli kısımları kesilip uzaklaştırılarak aktif kaspaz halini alırlar. Bu apoptoz yolağında, bir protein tarafından uyarılan **Kaspaz-9**, etkili olan **Kaspaz-3**

'ün belirli kısımlarını keserek aktifleşmesini sağlar. Aktifleşen kaspaz-3 sitozolde bulunan **ICAD**'ı (**inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease**) inaktifleştirir. İnaktifleşen ICAD, normal haldeyken bağlı olduğu **CAD**'dan (**caspase-activated deoxyribonuclease**) ayrılır. Serbest kalan CAD, nukleusa girerek kromatin yoğunlaşması ve DNA kırıklarının oluşmasına böylece hücrenin apoptoza gitmesine neden olur (Güneş, 2006).

Kaspazlar, hücre içerisinde inaktif zimojenler olarak sentezlenirler ve **prokaspaz** adını alırlar. Bu inaktif prokaspaz enzimleri apoptozis sinyalinin alınmasıyla birlikte diğer kaspazlar tarafından aspartik asit birimlerinden kesilerek aktive edilir. Aktive olan kaspaz diğer kaspazları keserek inaktif formdan aktif forma dönüştürür. Kaspazlar, büyük ve küçük olmak üzere iki altbirimden oluşur ve N-terminallerinde pro-domainleri bulunur. Büyük ve küçük altbirimler birbirleriyle etkileşime girerek enzimin aktif merkezini oluştururlar. Enzimin pro-domaini çeşitlilik gösterir; **CARD** (caspase recruitment domain) ve **DED** (death effector domain) enzimin prodomainde bulunan özel motiflerdir ve protein-protein etkileşiminde görev alırlar.

Apoptozis sırasında kaspazlardan ilk görev alanlar **başlatıcı** (upstream caspases) ya da **öncü** (initiator) kaspazlardır ve bunların uzun pro-domainleri bulunur. Apoptotik yolağın sonraki aşamalarında görev alan kaspaz enzim zincirini diğer üyeleri ise **effektör** (downstream caspases) kaspazlar olarak adlandırılır. Effektör kaspazlar başlatıcı bir kaspazla aktive edilirler. Aminoasit kütüphanelerinin taranmasıyla her bir kaspaz enzimi için optimum kesme noktasının N-terminalinde bulunan dört aminoasitlik bir motif olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu motifin görevlerinden biri kaspazın hedeflediği proteinin seçimini belirlemek, diğeri ise ilgili kaspazın peptid inhibitörlerle inaktive olmasına aracılık etmektedir (Yıldırım, vd., 2007) (Şekil 2.7). Kaspaz 2,8 ve 10 başlatıcı kaspazlardandır, kaspaz 3, 6 ve 7 ise effektör kaspazlardır. Kaspazlar hücrelerde yüzden farklı proteini substrat olarak kullanırlar.

Çizelge 2.1 Kaspazların hedef proteinleri (Yıldırım, vd., 2007).

Kaspaz	Alternatif adı	Substratları	İşlevi (ve notlar)
Kaspaz-1	ICE	Pre-interlökin-1B İnterlökin-1B Laminler	Apoptozis/ Enflamasyon
Kaspaz-2	Ich-1 (insan), Nedd2 (fare,sıçan)	Golgin-160 Laminler (?)	Apoptozis
Kaspaz-3	CPP32, Yama, Apopain	PARP SREB Kaspaz-6 Kaspaz-7 Kaspaz-9 DNA-PK MDM2 B-Catenin Laminler NuMA Topoisomerase I FAK Calpastatin P21 <sup>Waf1</sup> ICAD	Apoptozis
Kaspaz-4	Ich-2, ICE <sub>relII</sub>	Kaspaz-1	Enflamasyon /Apoptozis
Kaspaz-5	ICE <sub>relIII</sub> , TY	?	Enflamasyon /Apoptozis
Kaspaz-6	Mch2	PARP Laminler NuMA FAK Kaspaz-3 Keratin-18	Apoptozis
Kaspaz-7	Mch3, ICE- LAP3,CMH-1	PARP Gas2 SERB1 EMAPII FAK Calpastatin P21 <sup>Waf1</sup>	Apoptozis (aktivitesi cIAP1 ve cIAP2 ile bloke edilir) yapı ve substrat özgüllüğü kaspaz-3'e benzer.
Kaspaz-8	FLICE, MACH, Mch5	Kaspaz-3 Kaspaz-4 Kaspaz-6 Kaspaz-7	Apoptozis (ölüm almaçları)

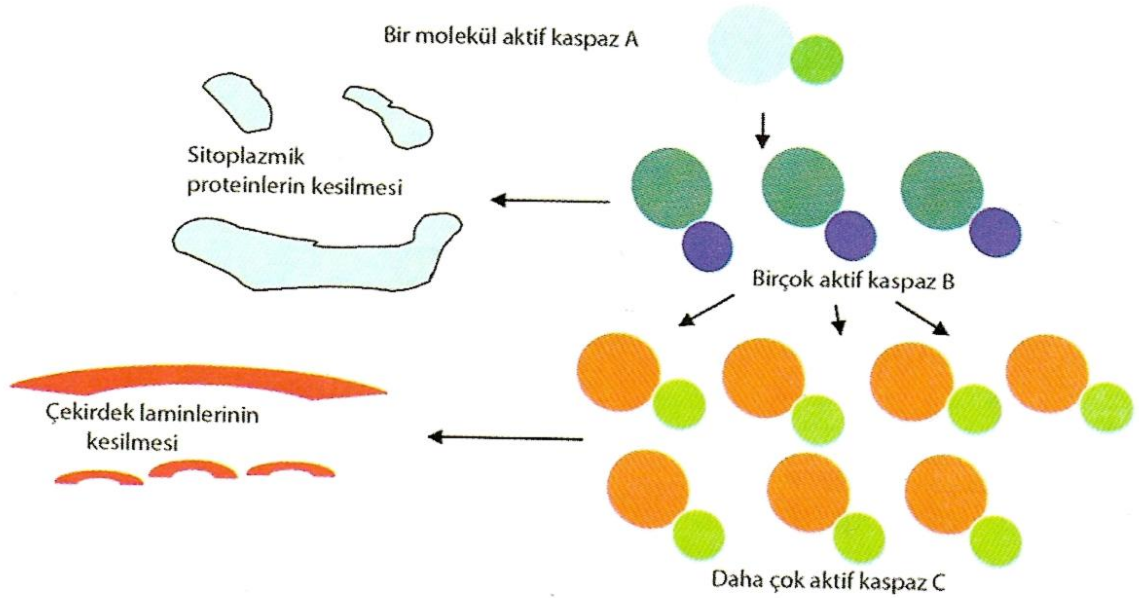
		Kaspaz-9 Kaspaz-10 Kaspaz-13 PARP Bid	
Kaspaz-9	Apaf-3, ICE-LAP6, Mch6	Kaspaz-3 Pro-kaspaz-9 Kaspaz-7 PARP	Apoptozis
Kaspaz-10	FLICE-2, Mch4	Kaspaz-3 Kaspaz-4 Kaspaz-6 Kaspaz-7 Kaspaz-8 Kaspaz-9	Apoptozis (ölüm almaçları)
Kaspaz-11	Ich-3, ICE_B	?	Murin kaspazı insankaspas-4'e benzer, enflamasyon ve apoptoziste görevli olabilir
Kaspaz-12	ICE_C	?	Endoplazmik retikulum sonrası oluşan apoptoziste görevli insan kaspaz 4 ve 5 ile ilişkili
Kaspaz-13	ERICE	?	Kaspaz-1, -4, -5, -11'i de içeren ICE aile üyesi enflamasyonda görevli

#### 2.4.4.1. Kaspaz aktivasyonu

Apoptozis sinyali alan bir hücrede başlatıcı kaspazların aktivasyonları adaptör proteinler aracılığıyla tetiklenir. Bu adaptör proteinler başlatıcı kaspazları birbirine yaklaştırarak kümelenmelerini sağlar. Kümeleşen başlatıcılar birbirlerini keserek aktive eder ve kaspaz zincirinde yer alan diğer üyeler giderek artan bir hızla aktive olmaya başlarlar. Sinyal gittikçe artarak zincirin en sonunda bulunan kaspaza kadar erişir ve bu giderek artan ölüm sinyali ölüme mahkûm edilen hücrenin her bölgesine yayılır. Aktive olan kaspazlardan bazıları lamin proteinlerini parçalarken, bazıları hücre içi iskelet proteinlerine saldırır. Başka bir kaspaz DNaz enzimi aracılığıyla onu inhibe eden proteine bağlanıp DNaz'ın serbest kalmasını sağlar ve serbest kalan DNaz çekirdek DNA'sını parçalara ayırır. Kaspaz zincirinde yer alan enzimler bir kez aktive olduktan sonra geriye dönüş yoktur ve buldukları hücreyi ölüme sürükler. Dolayısıyla

aktiviteleri hücrelerde sıkı biçimde kontrol altında tutulur. Kaspaz aktivasyonunda 3 temel mekanizma vardır;

- Başlatıcı bir kaspaz tarafından proteolitik kesim sonucu aktivasyon
- Yakın indükleme
- Holoenzim oluşumu



Şekil 2.7 Kaspaz zincirinin aktivasyonu (Yıldırım, vd., 2007).

Başlatıcı bir kaspaz tarafından diğer bir kaspazın (effektör kaspaz) proteolitik olarak kesilmesi oldukça etkin bir mekanizmadır ve efektör kaspazlar bu yolla aktive olurlar. Bu mekanizma granzim B gibi kaspaz olmayan protezların aktivasyonunda da kullanılmaktadır. İkinci mekanizmada ise birçok prokaspaz 8 molekülü birbirine yakınlaşıp kümeler oluşturarak bir araya gelir ve çapraz biçimde birbirlerini aktive ederler. Holoenzim oluşumunda ise sitokrom c ve ATP bağımlı Apaf-1

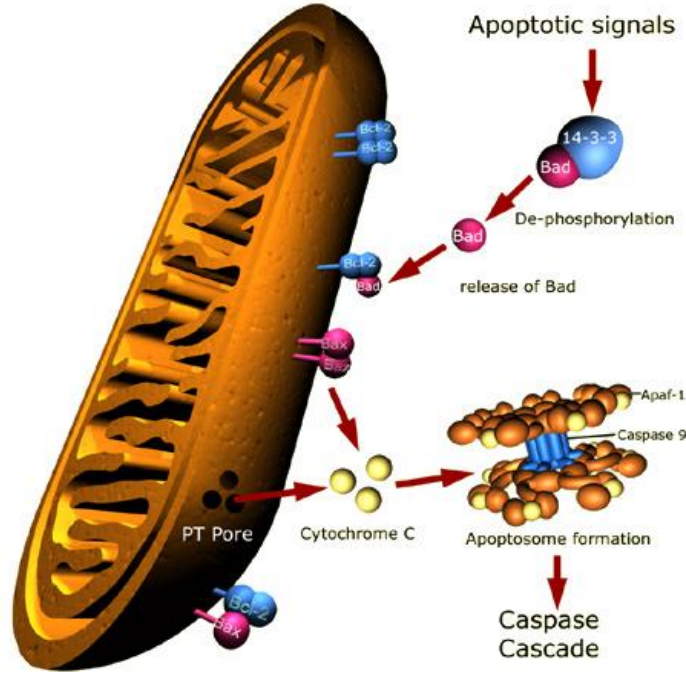
oligomerizasyonu prokaspaz 9'un bu komplekse katılmasına olanak vererek apoptozomu oluşturur. Kaspaz 9'un bu yolla aktivasyonu proteolitik değil, kompleksin biçim değiştirmesiyle sağlanır (Yıldırım, vd., 2007).

Bazı Bcl-2 ailesi üyeleri, mitokondrilerin bütünlüğünü korurken bazı üyeler bozar. Bu şekilde **sitokrom c** gibi bazı mitokondrial proteinlerin sitozole geçişini kontrol ederler. Sağlıklı hücrelerde sitokrom c, mitokondrinin zarlar arası alanında yer alır, sitokrom c'nin bu kısmından sitozole geçişini engellerken, pro-apoptotik düzenleyici olan Bax, sitokrom c'nin sitozole geçişine katkıda bulunur (Güneş, 2006).

Apoptozun uyarıldığı yolakta; hücrenin çeşitli görevleri yapmasını sağlayan faktörlerin ortamda bulunmamasına karşılık hücre içinde radikallerin birikmesi, stres gibi çeşitli etkiler sonucu, çözünebilir karakterde pro-apoptotik bir protein olan Bad, mitokondri dış zarında yer alan ve anti-apoptotik bir düzenleyiciler olan **Bcl-2/Bcl-xl** ye bağlanır. (Şekil 2.8.). Bad'ın bağlanması anti apoptotik protein olan **Bcl-2/Bcl-xl** kompleksinin pro-apoptotik protein olan Bax ile ilişki kurmasını engeller. Böylece mitokondri dış zarında bir kanal oluşturan bax homodimeri veya Bcl-2/bax heterodimeri, çeşitli iyonların mitokondrial zarları geçerek mitokondriye girişine izin verir, bu durum mitokondri bütünlüğünü etkiler ve sonuçta sitokrom c sitozole bırakılır. Sitozolda; sitokrom c, aracı protein olan **Apaf-1 (Apoptosis protease activating factor)**'e bağlanır. Apaf-1 de hücreyi apoptoza götürecektir olan kaspaz yolağını faaliyete geçirir ve sonuçta hücre ölümü gerçekleşir (Güneş, 2006).

Kaspazlar, inaktif öncülleri olarak sentezlenir, genellikle diğer kaspazlar tarafından katalizlenen proteolitik kesim ile aktif şekle dönüştürülür. Başlatıcı kaspazın aktivasyonu böylece aşağı yöndeki zincirleme reaksiyonunu başlatır. Bu nedenle kaspazların düzenlenmesi, hücre sağ kalınımının belirlenmesi için yaşamsaldır. Apaf 1 kaspazlara bağlanır ve onların aktivasyonunu baskılar (Cooper and Hausman, 2006).

Eğer ortamda NGF (nerve growth factor) gibi faktör varsa; bu faktörün hücre zarındaki reseptörüne bağlanması **fosfatidil inositol-3 kinaz (PI-3 kinaz)** yolağını uyarır. Bu uyarılma sonucu **Akt kinaz** aktifleşir. Aktifleşen Akt kinaz, Bad'ı fosforlar, Fosforlanan Bad, Bcl-2/Bcl-x1 ye bağlanamaz ve sitozolde bulunan **protein 14-3-3** ile kompleks oluşturur. Bad'a bağlanmayan Bcl-2/Bcl-x1, pro-apoptotik protein olan Bax ile ilişki kurarak Bax'ın zarda kanal oluşturmasını önler. Bunun sonucu sitokrom c sitozole geçemez, hücreyi apoptoza götürecek olan kaspaz yolağı aktifleşemez ve hücre yaşamaya devam eder (Güneş, 2006).



Şekil 2.8 Mitokondri içeren ana apoptotik sinyal yolu (Yıldırım, vd., 2007) .

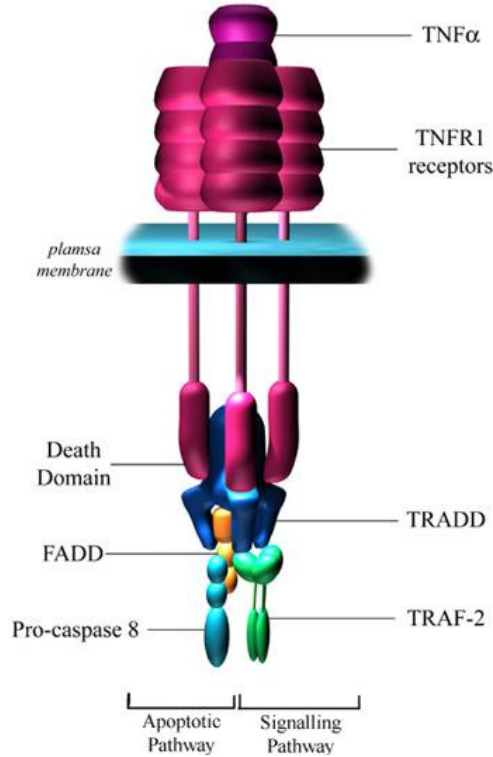
#### 2.4.5. Ölüm Sinyalleri Aracılığıyla Hücre Ölümü

Her ne kadar hücre ölümü, yaşam sinyalleri yokluğunda ortaya çıkıyorsa olsa da apoptoz ölüm sinyalleri varlığında da ortaya çıkabilir. Örneğin, **Tümör nekroz faktör**

(**TNF**) makrofajlardan salınır. Hücre ölümü ve bazı kronik inflamatuvar hastalıklarda doku yıkımını başlatır. Hücre ölümü oluşturan diğer bir sinyal **Fas ligandı**dır. Fas ligandı, sitotoksik T lenfositlerinde sentezlenen bir hücre yüzey proteini'dir. Bu ligand, virüs tarafından enfekte edilen hücrelerin, bazı tümör hücrelerinin, yabancı graft hücrelerinin ölümünü sağlar.

Gerek TNF gerekse Fas ligandı, hedef hücre zarında bulunan **ölüm reseptörleri** aracılığıyla görev yaparlar. Bu ligandların reseptöre bağlanması reseptörleri aktifleştirir. Aktifleşen Fas reseptörü **FADD (Fas associated death domain)** olarak, aktifleşen TNF reseptörü **TRADD (TNF receptor associated death domain)** olarak adlandırılan bir hücre içi proteini kendisine çeker (Şekil 2.9). FADD, kaspaz 8'i aktifleştiren bir aracı proteindir. Gerek ölüm reseptörleri adı da verilen TNF ve FAS reseptörleri, gerekse FADD ve TRADD gibi bazı sitozolik proteinler ölüm sinyalini ileten yaklaşık 80 aminoasitlik **ölüm bölgesi** adı verilen bir kısım taşırlar. FADD aracı proteini tarafından aktifleştirilen kaspaz 8, kendi proenzim şeklini kendi kendine parçalayarak daha da aktifleşir. Kaspaz 8'in hedefi mitokondrilerdir. Kaspaz 8, mitokondriden sitokrom c'nin sitozole salınmasına neden olur. Sitokrom c' de proenzim halindeki etkili kaspazlara bağlanır ve kaspaz 8 varlığında etkili olan kaspazların aktifleşmesine neden olur. Aktifleşen kaspazlar da hücreyi ölüme götürür (Güneş, 2006).





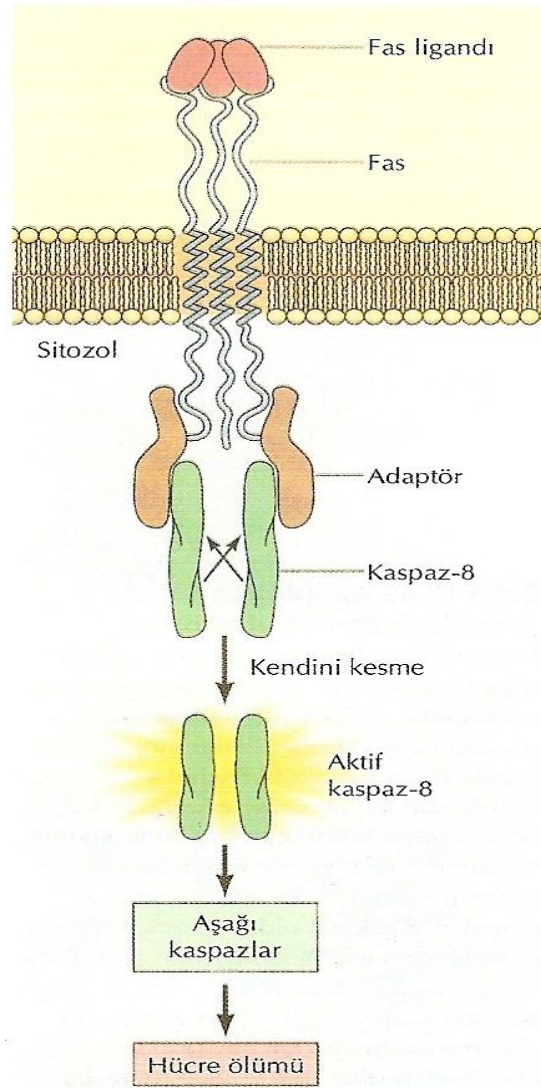
Şekil 2.9 Ana TNF reseptörünün sinyal yolları (Yıldırım, vd., 2007).

Aktive edilmiş reseptörler tarafından salgılanan, hedef hücrelerde apoptozu direkt olarak uyarıcı bazı polipeptidler, programlanmış hücre ölümü sinyalleridir. Bu hücre ölümü sinyalleri **tümör nekroz faktör** (TNF) ailesine ait polipeptidlerdir. Bunlar, TNF reseptör ailesi üyelerine bağlanırlar ve çok çeşitli hücre tiplerinde apoptozu uyarabilirler. Bu ailenin en iyi tanımlanmış üyelerinden birisi, bağışıklık sisteminde hücre ölümünü kontrol eden, Fas denilen hücre yüzey reseptörüdür. Örneğin, Fas aktivasyonu ile uyarılan apoptoz, bağışıklık yanıtının sonunda artı kalan lenfositlerin ortadan kaldırılmasından, kanser hücreleri veya virüs ile enfekte hücrelerin ölümüne kadar, bağışıklık sistemi hedef hücrelerinin ölümünden sorumludur (Cooper and Hausman, 2006).

Hücre ölüm reseptörleri kaspazları direkt aktive ederek apoptozu uyarırlar. TNF ve ilgili aile üyeleri, üç benzer polipeptid zincir içerirler ve bağlanmaları reseptör

üçlemesini uyarır. Reseptörlerin sitoplâzma bölümü, kaspaz 8 denilen yukarı yöndeki bir kaspaza bağlanmayı sağlayacak olan adaptör moleküllerle bağlanır. Bu kaspaz 8'in kendi kendini kesmesi sonucunda aktivasyonuna yol açar ve aktif kaspaz 8 aşağı yöndeki diğer kaspazları aktive edebilir, böylece hücre ölümü ile sonuçlanacak olan bir kaspaz yolağı başlar (Cooper and Hausman, 2006).

Kaspaz 8 yalnızca diğer kaspazları kesmekle kalmaz, Bcl-2 ailesinin de Bid denilen bir üyesini de keser. Bid, Bcl-2 ailesinin, apoptoza karşı koruyucu değil, apoptozu uyaran bir üyesidir. Normalde sitozolde inaktif formda kalır. Ancak, kaspaz 8 tarafından kesimi Bid'in mitokondriye geçişine ve zarı parçalayarak sitozole sitokrom c salınmasına olanak sağlar. Bu kaspaz 9 aktivasyonuna yol açar, kaspaz yolağının daha da kuvvetlenmesi hücre ölüm reseptörlerinin kaspaz 8'i direkt olarak aktive etmesi ile başlatılır (Şekil 2.10) (Cooper and Hausman, 2006).



**Şekil 2.10 Fas reseptörünün ligandına bağlanması direkt kaspaz 8 aktivasyonu ile apoptozu uyarır (Cooper and Hausman, 2006).**

#### 2.4.6. Sitokinler

Sitokinler, uzun süre alkol tüketimi nedeniyle oluşan karaciğer hastalığının belirteçidir. Alkolle ilgili bazı modellerde, karaciğer hasarının sitokinlerin üretiminin artışıyla ilgili olduğu bilinmektedir (Yuan, 2007). Çeşitli olaylar karşısında sitokinler komşu hücrelerin bazı biyokimyasal süreçlerini düzenlerler. Örneğin, bir

enfeksiyon durumunda bu dokular enflamatuvar yanıtı tetikleyerek beyaz kan hücrelerini buraya çekerler. Salınan sitokinler, fonksiyonları modifiye edilmiş hücrelerle etkileşime girer (hedef hücre gibi). Bu hedef hücreler başlangıçta sitokinlerle aynı olabilir bu otokrin etkidir; ayrıca sitokinler komşu hücrelerle etkileşime girebilir, bu da parakrin etkidir.

Bir sitokinin hedef hücresi ne olursa olsun, bir ya da daha fazla proteinden meydana gelen özel bir molekülle (reseptör gibi) etkileşime girer. Sitokin ve reseptörün yapısındaki hafif değişiklikler biyokimyasal tepkimelerin başlattığı hücrenin içine taşınan bu haber sinyalini oluşturarak hücrenin faaliyetlerini değiştirir. Birçok sitokin birden çok etkiye sahiptir. Birden fazla hücre tipini de etkileyebilir. Aynı zamanda birçok sitokinlerin etkileşimleri çakışmaktadır. Karaciğer normal koşullar altında sitokinleri minimal düzeyde üreten birçok hücre tipinden oluşur. Karaciğer hücreleri aktive oldukları zaman sitokin üretimi artar. Karaciğer hasara uğradığı zaman sitokin aracılı karaciğer rejenerasyonu olur. Kupffer hücreleri mikroorganizmalarla ya da patojenlerin neden olduğu hastalıklarla da aktive olabilir. Bu durumda Kupffer hücreleri tarafından üretilen ve salınan sitokinler iyileştirme sürecini başlatmak için gerekli olan bir enflamatuvar yanıtı neden olur. Yine de eğer inflamasyon kısa bir süre sonra azalmazsa bu durum sitokinlerin ısrarlı üretimi ile siroza dönüşebilir, böylece sitokin üretimi hem yararlı hem zararlı etkilere neden olabilir. Kupffer hücreleri inflamasyon yanıtında önemli rolü olan makrofaj olarak tanımlanan ve yabancı patojenleri ve zararlı maddeleri parçalayan immün hücrelerdir. Zarar verilen ya da anormal karaciğer hücrelerinin yanında Kupffer hücreleri karaciğere giren bakteri ya da virüsleri çıkararak inflamasyonun bir yanıtı olarak hücreyi apoptoza götürür. Patojen ve toksik bileşiklere yanıt olarak diğer bağışıklık hücrelerinin eylemlerini koordine etmeye yardımcı olan makrofajlar pek çok sitokinleri de salgırlar. Makrofajlar birçok dokuda bulunmasına karşın en çok karaciğerde bulunur. Diğer bağışıklık hücreleriyle birlikte Kupffer hücreleri gibi makrofajlarda vücudun ilk savunma hattını oluştururlar (Neuman, 2003). Sitokinler ayrıca karaciğer dokusunda alkol kaynaklı programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozu da düzenler. İki sitokin; tümör nekroz faktör  $\alpha$  ve transforming

growth factor beta apoptoz da önemli rol oynar. Alkolik hepatitis hastalarında serum konsantrasyonlarında **TNF  $\alpha$** 'nın arttığı bulunmuştur. Yüksek doz da serumda TNF $\alpha$ 'nın bulunması karaciğer hasarıyla ilişkilendirilir (Neuman, 2003).

## 2.5. Ekzopolisakkaritler ve Özellikleri

Günümüzde birçok hastalığın tedavisinde sentetik ilaçlar kullanılmaktadır. Son yıllarda, yan etkilerinin olmaması ya da bertaraf edilebilecek kadar az olması nedeniyle doğal kaynaklı preparatlar tercih edilmektedir (Kızılcık, 2004). Makrofunguslar da uzun zamandan beri bu amaçla kullanılan kaynaklardan biridir. Makrofungusların halk tıbbındaki kullanımlarına ilişkin ilk kayıtlar, eski Roma ve Yunan medeniyetlerine dek uzanmaktadır. M.Ö. 400-470 yıllarında yaşamış olan Hipokrat, mantarların tıbbi açıdan faydalarından bahseden ilk kişidir (Altınay, 2008). Özellikle Çin ve Japonya başta olmak üzere birçok Uzak Doğu ülkesinde çeşitli hastalıklara karşı bazı makrofungusların halk tarafından ilaç olarak kullanıldığı bilinmektedir (Mizuno, et al., 1990). Bazı türlerin ise Çin halkı tarafından diüretik ve laksatif olarak kullanıldığı bilinmektedir (Tamer, et al., 1990).

Ülkemizde son yıllarda makrofungus florasına yönelik çalışmaların artmasına rağmen makrofungusların medikal etkileri ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır (Kızılcık, 2004). Literatür incelemeleri sonucunda, tıbbi amaçlarla kullanılan makrofungusların daha çok yenilebilen türler olduğu anlaşılmaktadır (Altınay, 2008). Son yıllarda yapılan çalışmalar, makrofunguslar tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin bir çok biyolojik aktiviteye sahip olduklarını göstermektedir (Yang, et al., 2002a; Ding, et al., 2004). Bu tip makrofunguslar ile yapılan son çalışmalarda, mantarların tıbbi açıdan; antitümör, antimikrobiyal, hipoglisemik, hipolipidemik, karaciğeri koruyucu, antialerjik ve bağışıklık sistemini güçlendirici etki mekanizmalarının olduğunu göstermektedir (Kızılcık, 2004).

Mantarların immünolojik ve antikanser özelliklerinin yanı sıra antioksidan, antihipertansif, kolesterol düşürücü, karaciğer koruyucu, antifibrotik, antiinflamasyon, antidiyabetik, antiviral ve antimikrobiyal etkilerinin de olduğu bilinmektedir (Kızılcık, 2004). Sınırlı sayıda da olsa bazı polisakkaritlerin antitümör aktivitesi gösterdiği klinik araştırmalarla kanıtlanmıştır. Günümüzde Kore ve Çin’de kemoterapi ve radyoterapiye ek olarak kullanılmaktadırlar (Smith, Rowan and Sullivan, 2002). Japonya’da yapılan araştırmalarda ise tıbbi mantarların karışımlarından meydana gelen ekstraktlarla kanser hastalarında iyileşmeler gözlenmiştir (Kızılcık, 2004).

Çok önemli potansiyele sahip olduğu görülen eksopolisakkarit üretimi konusunda, çalışılan makrofungusların sayısı oldukça azdır. Sonuç olarak, Dünya çapında makrofungusların yapay besi ortamlarında kültüre alınmaları ve ekzopolisakkarit üretim potansiyellerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların eksikliği hissedilmekte olduğu gibi ülkemizde şimdiye dek bu konuda yapılmış çalışma sayısı oldukça azdır (Kızılcık, 2004).

### **2.5.1. Polisakkaritler**

Polisakkaritler monosakkarit polimerlerinin birbirlerine glikozidik bağla bağlanmalarıyla oluşmaktadırlar. Bazen kovalent zincirler ve aralarında pek çok çift karbon atomlarından meydana gelmektedir. Bu moleküllerin yapısı da oldukça karmaşıktır (Daba and Ezereonye, 2003). Polisakkaritler; birçok basit şeker yapı taşının uzun zincirler halinde bağlanmasından oluşan karmaşık karbonhidratlardır (Kızılcık, 2004). Birçok prokaryotik mikroorganizma hücre yüzeylerine cıvık ya da yapışkan materyal salgılayabilir. Birçok farklı polisakkarit ve birçok proteinden meydana gelen bu yapılar kapsül “slime layer“ (cıvık tabaka) olarak isimlendirilir. Daha genel bir

terim olarak, “glikokaliks” terimi de kullanılmaktadır, hücre dışında polisakkarit içeren materyal, glikokaliks olarak isimlendirilir (Kızılcık, 2004).

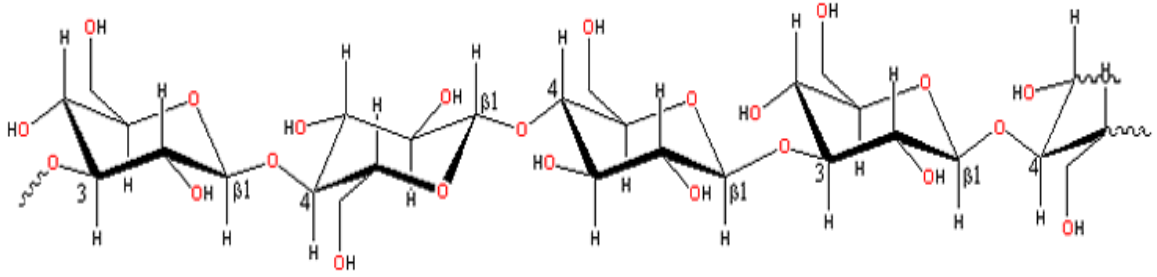
Doğada yaygın olarak bulunan polisakkaritler, yapı bakımından farklı makromoleküllerden oluşmaktadırlar. Monosakkarit polimerlerinin artıkları olan ve tekrarlayan birimler içeren birbirinden farklı proteinler ve nükleik asitler birbirlerine glikozidik bağlarla bağlanır. Makromoleküller arasında polisakkaritler biyolojik potansiyeli en yüksek olanlardır. Yapısal değişkenlik açısından mükemmel bir potansiyele sahiptirler. Nükleotidlerdeki, nükleik asitler ve proteindeki aminoasitler birbirine sadece tek bir yolla bağlanabilirken oligosakkaritlerdeki monosakkarit üniteleri ve polisakkaritler çok sayıda farklı formlarda bağlardan ya da düz yapılardan oluşmaktadırlar. Polisakkaritler aynı zamanda ikincil yapıları, şeker artıklarının konformasyonundan ya da moleküller inter ve intra-hidrojen zincir bağlarından oluşmaktadır. Örneğin, farklı dört monomer şeker 35560’a kadar değişik permütasyon oluşturarak tetrasakkaritler ile eşsiz bir şekilde bağlanabilirken, buna karşın dört aminoasit sadece 24 farklı permütasyon ile birbirine bağlanabilir. Polisakkarit yapılarındaki bu değişkenlik potansiyeli yüksek organizmalardaki çeşitli hücre-hücre interaksiyonlarını kusursuz düzenleyici mekanizma için gerekli olan esnekliği sağlamaktadır (Kızılcık, 2004).

#### **2.5.1.1. Fungal Polisakkaritler**

Son yıllarda yapılan çalışmalar mikroorganizmaların özellikle de mantarların ürettiği polisakkaritlere dikkat çekmiştir. Bunun önemli nedenlerinden bazıları, bağışıklığı güçlendirici, antitümör, ve hipolipidemik aktivite gösteren değişik biyolojik ve farmakolojik aktiviteye sahip olmalarıdır. *Lentinus edodes* tarafından Lentinan, *Schizophyllum commune* tarafından Schizophyllan ve *Trametes versicolor* tarafından üretilen Krestin ticari değere sahiptir (Kızılcık, 2004).

### 2.5.2. Makrofungusların Ürettiği Ekzopolisakkaritler ve Kullanım Alanları

Mantarlardaki polisakkaritler çoğunlukla glukandan meydana gelmektedir. Bazıları,  $\beta$ -(1-3), (1-6) glikozidik zincirlerinden ve alfa-(1-3) glikozidik zincirlerin birbirine bağlanmasından ama çoğunluğu asıl heteroglikonlardan oluşmaktadır (Anonim, 2006). Şekil 2.12’de  $\beta$ -(1-3),  $\beta$ -(1-4) glukana sahip polisakkarit gösterilmektedir (Kızılıcık, 2004).



Şekil 2.11  $\beta$ -(1-3),  $\beta$ -(1-4)-glukan zincire sahip polisakkarit (Anonim, 2006).

En çok ana zincire her ikisinden biri ya  $\beta$ -(1-3),  $\beta$ -(1-4) ya karışık  $\beta$ -(1-3) ya da  $\beta$ -(1-4) ile  $\beta$ -(1-6) yan zincirleri bağlanmaktadır. Hetero-  $\beta$ -glukanlar, düz zincirli glikoz polimerlerinden bununla beraber D-monosakkaritlerin antitümör aktivitesi bulunurken mantarlardan elde edilen alfa-D-glukan ise antitümör aktivitesi bulunmamaktadır. Heteroglikonların yan zincirleri glukuronikasit, galaktoz, mannoz, arabinoz ya da ksiloz ya asıl bileşiminde ya da farklı kombinasyonlarda bulunmaktadır.

Mantarların büyük bir kısmı ekstrasellüler polisakkarit üretmektedir. Bu ekzopolisakkaritlerin, bir kısmı heteropolisakkarit yapılardan oluşurken, bir kısmı da homopolisakkarit yapılardan oluşmaktadır. Bu homopolisakkarit yapıları ise, farklı zincirlerle birbirlerine bağlanarak oluşan D-glukoz’dan meydana gelmektedir. Yapılan araştırmalarda, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium gluconicum*, *Schizophyllum commune*, *Monilinia fructigena* ve *Botrytis cinerea* miselyal gelişim gösteren ve moleküler



yapıları aynı formda olan  $\beta$ -glukan salgılayan mantarlar oldukları bildirilmiştir. Ancak bu polisakkaritler farklı moleküller ağırlıkta ve form olarakta mikrojel eğilimi göstermektedirler (Dülger ve Şen, 1999).

Polisakkaritlerdeki başlıca biyoaktif maddenin,  $\beta$ -glukan olduğu düşünülmektedir.  $\beta$ -glukan; beta- (1 $\rightarrow$ 3)-D-Glukan omurgası ile beta-(1 $\rightarrow$ 6) –Glukan yan zincirinden oluşmaktadır. Grifolan ve Schizophyllan’ da benzer yapıya sahiptir. Polisakkaritlerin, yapısında beta bulunduran hücreye ya da pankreasta bulunan başka bir hücreye bağlanarak insulin salınımını uyardığı ve glukagon salınımını engellediği düşünülmektedir. Ancak halen ekzopolisakkaritlerin çalışma mekanizması tam anlaşılabilmiş değildir. Polisakkaritlerin çok sayıda farklı glukanlara sahip olduğu tespit edilmiştir. Örneğin;  $\beta$ -1,6- ve  $\beta$ -1,3  $\beta$ -glukan’ların geniş uygulama alanları mevcuttur (Kızılcık, 2004).

Mikrobiyal ekzopolisakkaritlerin çok çeşitli kullanım alanları bulunmaktadır. Başlıca kimya endüstrisinde; koyulaştırma (thickening) ve stabilizasyon ajanı olarak, tıpta ise immunostimulant ve antitümör ajan olarak kullanılmaktadır (Lee, et al., 2003; Bae, et al., 2005).

### **2.5.2.1. Biyoteknolojide Kullanım Alanları**

Makrofunguslar tarafından üretilerek hücre dışına salınan ekzopolisakkaritlerin (EPS) yüksek değerde polimerize ve fizyolojik öneminin yanında, karakterize edilebiliniyor olması ve çalışılması pratik olması sebebiyle potansiyel olarak endüstriyel alanlarda kullanılabilir (Kızılcık, 2004) Bir *Basidiomycetes* türü olan *Schizophyllum commune*’nin ürettiği ekzopolisakkarit ticari alanda kullanılmaktadır (Maziero, et al., 1999).

### 2.5.2.2. Kozmetikte Kullanım Alanları

*Saccharomyces cerevisiae*'nin ürettiği  $\beta$ -glukan çeşitli kozmetiklerin bileşiminde, suda çözünebilir (particulate) olarak, karboksilmetil (carboxymethyl) veya (phospholyated) glukan olarak kullanılır (Kızılcık, 2004).

Son zamanlarda polisakkarit içeren alternatif karışımlarla yüze yapılan uygulamalarda yüzde bulunan hücrelerin kollajen biyosentezinin arttığı gözlemlenmiştir. Örneğin; *Schizophyllum commune*'nin ürettiği Schizophyllum derideki yaşlanma prosesini durdurmaya çok iyi bir adaydır (Kızılcık, 2004). *Schizophyllum commune*'den elde edilen  $\beta$ -glukan'nın % 0,04 (w/v) lük konsantrasyona sahip karışımın kollajen biyosentezini %32 oranında artırırken, *Saccharomyces cerevisiae*'den elde edilen  $\beta$ -glukan en fazla %10 oranında attırmaktadır. Bu da  $\beta$ -glukan'ların yüzün yaşlanma etkilerini engellemek için çok iyi bir aday olduklarını göstermektedir. Önemli bir nokta da mantarların misellerinden elde edilen polisakkaritlerin, polisakkarit üretebilen diğer mikroorganizmalardan daha yüksek kollajen biyosentez aktivitesine sahip olmalarıdır. Son yıllarda konu ile ilgili alınan bir patent varlığı da konunun önemini vurgulamaktadır (Kızılcık, 2004). Tek sorun kozmetik alanında kullanımının maliyetinin yüksek olmasıdır (Kızılcık, 2004). Bilinen başka bir özelliği de tıpta derideki yaraları doğal olarak iyileştirme ve bizzat enfeksiyondan korumasıdır (Lee, et al., 2003).

### 2.5.2.3. Gıda Sektöründe Kullanım Alanları

Mantarlardan elde edilen  $\beta$ -glukan'lar çok sıkı filmler oluşturdukları için oksijeni geçirmeme özelliklerine sahiptirler bu özellik sayesinde yiyeceklerin muhafaza edilmesinde kullanılabilirler (Kızılcık, 2004).

#### 2.5.2.4. Tıpta Kullanım Alanları

Mantarlar, geleneksel doğu halk tıbbında tarih boyunca tedavi amacı ile kullanılmıştır. Geleneksel Çin tıbbında ve bazı Asya ülkelerinde mantarlar insan hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır. Örneğin; kronik bronşit, hepatit, hipertansiyon, hiperkolesterol, tümör hastalıklarında ve bağışıklık sistemi ile ilgili hastalıklarda kullanmışlardır. Günümüzde de Japonya, Çin, Kore ve bazı Asya ülkelerin hastanelerinde mantarlardan elde edilen preparatlar kullanılmaktadır (Kızılcık, 2004).

Yapılan çalışmalarda, deney hayvanları kullanılarak, farelerde tümör metastaslarını indirgeyebileceği gösterilmiştir (Wang, et al., 1997). Yamaç ve arkadaşlarının (2009) yapmış olduğu çalışma da ülkemizden elde edilen yerel izolatlardan üç tanesinin streptozotocin ile diabet edilmiş sıçanlarda serum glukoz değerlerini %60 a varan oranlarda düşürdüğü belirlenmiştir (Yamaç et al., 2009). *Cordyceps sinensis*' mantarının antitümör aktivitesinin yanı sıra, hipoglisemik aktivitesinin olduğu da belirlenmiştir (Wang, et al., 1997). Wang, ve arkadaşlarının. (2002) yaptığı çalışmalarında karbon tetraklorit ile karaciğeri hasarı oluşturulmuş farelerde *Ganoderma lucidum* tarafından üretilen triterpenoidlerin olumlu etkisini vurgulamışlardır (Wang, et al., 2002). Başka bir çalışma da ise, diethylnitrosamin toksisitesine karşı fare karaciğerinin korunması bakımından *Agaricus blazei*'den elde edilen ekstraktların olumlu etkileri rapor edilmiştir (Barbisan, et al., 2002). Yapılan çalışmalar, makrofungus tür çeşitliliği açısından oldukça sınırlı görölmektedir. Ülkemizde ise bu konuda gerçekleştirilmiş bir çalışmaya henüz rastlanamamıştır.

### 2.5.3. *Coprinus comatus* Mantarının Makroskobik ve Mikroskobik Özellikleri

a) **Şapka:** 5-12 cm yüksekliğinde, 2-3 cm genişliğinde ve silindirik yapıda, üzerinde şapka derisinin parçalanmasıyla oluşmuş püskül şeklinde fibriller, kalkık pullar bulunmaktadır. Süt beyaz ancak merkezi açık kahverengidir. Gelişen mantarlarda şapka silindirik özelliğini kaybeder ve çandan şemsiye şekline döner. Gelişme ilerleyince mürekkep damlaları şeklinde eriyip dökülür, serbesttir (Şekil 2.12).

b) **Etli Kısım:** Beyaz, tadı güzel, toprak kokusunda ve çok çabuk erir.

c) **Lameller:** Kadifemsi, önce beyaz, sonra pembe-kahverengi ve nihayetinde siyaha dönerek mürekkep damlaları şeklinde eriyip dökülür. Lameller serbesttir.

d) **Sap:** 10-25 x 1-2 cm, silindirik, beyaz, içi boş, topraktaki kısmı hafif sivri, oldukça lifsi yapılı, annulus beyazdır.

e) **Spor Baskısı:** Siyahımsı kahverengidir. Sporlar: 10-12 x 6-8  $\mu$ , badem şeklinde, koyu kahverengidir (Merdan, 2007).

f) **Yetiştirme yeri özellikleri:** İlkbahar ve sonbahar aylarında, orman içinde, yol kenarlarında, gübreliklerde gruplar halinde yetişir (Merdan, 2007).

g) **Diğer özellikleri:** Mantar gençken yenir. Yöre halkı tarafından tanınmamaktadır (Merdan, 2007) (Şekil 2.13, Şekil 2.14).



Şekil 2.12 *Coprinus comatus* (Merdan, 2007).



Şekil 2.13 *Coprinus comatus* (Merdan, 2007).

### 2.5.3.1. *Coprinus comatus* mantarının şapka ve sapının antioksidan özellikleri

*Coprinus comatus* (Müll.) gri renkte, pürüzlü mürekkepli şapka, avukat peruğu ya da tüylü yele olarak bilinen Çin’de işlenmiş yenilebilir yeni bir mantardır. İyi besleyici özellikleri, lezzetli tadı ve özellikle şeklinden dolayı birçok insan bu mantarı yemektedir ve 2006 da Çin’de üretimi 382,000 ton olmuştur. Hipoglisemik, bağışıklığı düzenleme, hipolipidemik, antitümör ve antibakteriyal etkiler gibi *C. comatus*’un çeşitli biyoaktif işlevleri son yıllarda belirtilmiştir. Birçok çalışma göstermiştir ki bitkilerde doğal antioksidanlar, kronik hastalıkların azaltılması ve genellikle biyolojik sistemlerde serbest radikal yayılmasının sonucuyla ilişkili olan patojenik bakteri gelişmesinin engellenmesi gibi biyoaktiviteleriyle yakından ilişkilidir. Birkaç mantarın meyve gövdesi ve misellerinin antioksidan aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. 50 yıl önce, *C. comatus* ‘un antioksidan özellikli bir thiol bileşeni ergothionein içerdiği bulunmuştur. Antioksidan aktivite daha sonra 2003’te Badalyan ve arkadaşları tarafından doğrulanmıştır. *Coprinus comatus* meyve gövdesi, miselleri ve fermantasyon süzüntülerinin antioksidan özellikleri Tsai ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. *C. comatus*’un selenyumla zenginleştirilmiş misellerinden izole edilen selenyumlu polisakkarit malondialdehitin (MDA) seviyelerinde önemli derecede azalışa ve önemli derecede enzimik antioksidanların aktivitelerinde ve diyabetik farelerin karaciğer ve böbreklerinde enzimik olmayan antioksidanların seviyelerinde artışa sebep olmuştur. Fakat *C. comatus*’un şapka ve sapı arasındaki antioksidan özelliklerinin farklılığı şu ana kadar bildirilmemiştir. *C. comatus*’un şapka ve sapı kolaylıkla ayrılır. Şapka toplandıktan sonra hemen kendi kendini sindirdiği için, ayrılmış şapka ve sap, *C. comatus*’un işlenmesi ve kullanımında büyük ölçüde fayda sağlar (Li, et al., 2010).

### 3. MATERYAL METOT

Deneysel çalışmamız; Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü; Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı, Toksikoloji Araştırma Laboratuvarında ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Elektron Mikroskop Ünitesinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 179/2010 sayılı izni ile yapılmıştır.

#### 3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Deney Hayvanları Üretim Laboratuvarından getirtmiş olduğumuz her biri 200±20gr. ağırlıkta, sağlıklı, erkek *Wistar* cinsi albino sıçanlardan oluşan 5 grup oluşturuldu. Deney hayvanları deney süresince 12/12 aydınlık/ karanlık ışıklandırması olan, ısısı (22± 2 °C) ve nemi (%45- 50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatılarak bir hafta kadar laboratuvar adaptasyonu sağlandı. Bu süre içerisinde tüm sıçanlar polikarbonat şeffaf kafeslerde standart sıçan yemi ile beslendi ve sıçanlara çeşme suyu verildi.

#### 3.2. Ekzopolisakkarit Üretimi

*Coprinus comatus* türü mantardan elde edilen ekzopolisakkarit Dr. Leo van Griensven (Hollanda)' den alınmıştır. Özüt hazırlanması şu şekilde gerçekleştirilmiştir;

*Coprinus comatus* HORST 4030: korpoforlar hasat edilip 50 C° de kurutulur. Sonra öğütücü ile ince bir toz haline getirilir. 50 gr kuru toz halinde korpofor 1 lt suda süspanse edilir ve 120 C° de otoklavlanır. Oluşan süspanسیون soğultulduktan sonra katı materyallerin ayrılması için 7000 rpm de 15 dakika santrifüj edilir. Oluşan

süpernatant kaynatılarak 50 ml'e konsantre edilir. Polisakkaritlerin çökmesi için süpernatanta hacmin iki katı % 96'lık etanol ilave edilir ve 4 C° de 1 gece bekletilir. Oluşan çökelti santrifüjlenerek toplanır ve az bir hacim suda çözünür. Oluşan katı partiküller santrifüjleme ile uzaklaştırılır ve polisakkaritler 2 hacim % 96 lık etanol ilavesiyle tekrar çökertilir. Çökelti santrifüjleme ile toplanır ve vakum altında kurutulur.

### **3.3. Modifiye sıvı diyet (MSD) hazırlanması**

Altmış gün devam eden deneyler süresince oral olarak Lieber-DeCarli (1989) nin kalori ayarlı sıvı alkol diyeti modifiye edilerek kullanıldı. Uygulanan sıvı diyetin toplam kalori içeriğinin (takriben 1000 kcal.' e göre) %40' ı yağ, %36' sı alkol, %20' si protein ve geriye kalan %4' lük kısmı ise karbonhidrattan oluşturuldu. MSD kalori ayarlanması dekstrin kullanılarak yapıldı. MSD günlük taze olarak hazırlandı. Deney hayvanları laboratuvar koşullarında genel durumları ve gelişimleri yönünden düzenli olarak izlendi.

### **3.4. Deney Grupları ve EPS uygulamaları**

Deney gruplarının tamamında deneylere başlanma zamanı açısından birer gün ara verildi. Böylece deney süresince EPS uygulamalarının rahat yapılabilmesi, uygulamalar sonrasında meydana gelmesi muhtemel diseksiyon karışıklığı ve iş yoğunluğu azaltılmaya çalışıldı.

Her gruptaki sıçanların ortalama ağırlıklarının diğer bir gruba benzer olmasına dikkat edildi ve sıçanlar beş gruba ayrıldı. Aşağıda belirtilen sayılarda sıçan kullanılarak çalışmaya başlandı.



a. Grup I: Kontrol grubu (n=8) : Bu gruptaki hayvanlara, hiçbir uygulama yapılmamıştır.

b. Grup II: Alkollü MSD + SF grubu (n=8) : Bu gruptaki hayvanlara %96 saflıkta etil alkol *ad libitum* olarak verilmiştir.

c. Grup III: Alkollü MSD + SF + 50 mg/kg/gün EPS (n=8) : Bu gruptaki hayvanlara 50 mg/kg/gün EPS, SF ile birlikte intragastrik gavaj yoluyla verilmiştir.

d. Grup IV: Alkollü MSD + SF + 100 mg/kg/gün EPS (n=8) : Bu gruptaki hayvanlara 100 mg/kg/gün EPS, SF ile birlikte intragastrik gavaj yoluyla verilmiştir.

e. Grup V: Alkollü MSD + SF + 150 mg/kg/gün EPS (n=8) : Bu gruptaki hayvanlara 100 mg/kg/gün EPS, SF ile birlikte intragastrik gavaj yoluyla verilmiştir.

Etil alkol (yoğunluğu (d)= 0,81 gr/cm<sup>3</sup>) ilavesi yapılarak %2,4, %4,8 ve %7,2 oranında zamanla artan şekilde alıştırma yapıldı ve alkol oranı %7,2 olarak diseksiyona kadar devam etti.

Grup II, III, IV, V'de yer alan deney hayvanlarına %96'lık etanol ile MSD ayarlanarak *ad libitum* olarak verildi. 54. günden 60. güne kadar olan bir haftalık süreçte *Coprinus comatus* türü mantarından elde edilen EPS'nin üç dozu (50, 100 ve 150 mg/kg/gün) grup III,IV, V'de yer alan deney hayvanlarına oral olarak gavaj yoluyla verildi (Uzbay et al., 2006).

Bütün deney gruplarında hergün sabah 9:00 ile 10:00 arasında bir kez verilen alkollü ve alkolsüz MSD tüketimi ölçülerek kayıt altına alındı. Ayrıca deneklerin ağırlıkları da ölçülerek günlük alkol tüketiminin hesaplanması sağlandı. Alkol grubu hayvanlarının günlük alkol tüketimi  $A=dx[(Vx75)/W]$  formülüne göre yapıldı.

$A=gr/kg/gün$  alkol tüketimi

$d=\%96$  etil alkolün özgül ağırlığı (yoğunluğu; 25°C'da 0.81 gr/cm<sup>3</sup>)

$V=günlük$  tüketilen sıvı diyet miktarı (ml)

$W=d deney hayvanının ağırlığı (gr)$

### 3.5. Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi

Deney gruplarına ait hayvanlar, kas içi olarak 10 mg/kg ksilazin ve 70 mg/kg ketamin anestezisi altında, intrakardiyak olarak kalpten bütün kanın alınması yoluyla öldürüldü (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1 İntrakardiyak olarak kalpten kan alınması.**

### **3.5.1. Serum örnekleri**

Toplanan kan örnekleri alanine transaminaz (ALT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) enzimlerinin serum seviyelerinin belirlenmesi için derin dondurucuda koruma altına alındı. Tüm grup hayvanlarının diseksiyonları bittiğinde biyokimyasal olarak serum ALT ve LDH seviyeleri otoanalizörde (Roche/Hitachi MODULAR P analyzer) ticari kit (Roche) kullanılarak yapıldı.

### **3.5.2. Karaciğer doku örnekleri**

Tüm gruplarda sakrifikasyondan hemen sonra her bir hayvana ait tüm karaciğer alınarak (Resim 3.2), üç kısma ayrıldı; birinci kısım histolojik analizler için %10' luk nötral formaldehit fiksasyon sıvısına, ikinci kısım TEM için glutaraldehit fiksasyon sıvısına, üçüncü kısım ise biyokimyasal analizler için polietilen tüplerde  $-80^{\circ}\text{C}$  derin

dondurucuya koyuldu. Ayrıca, mitokondiyal analizler için taze çalışılmak üzere standart ağırlıkta karaciğer doku parçaları alındı.



Şekil 3.2 Alınan karaciğer örnekleri.

### 3.5.2.1. Histopatolojik İncelemeler

#### i. Karaciğer Doku Örneklerinde Işık Mikroskop Uygulamaları

Hızlı bir şekilde %10' luk nötral formaldehit tespit çözeltisine alınan karaciğer doku örneklerinin 24 saat süre ile fiksasyonu sağlandı. Tüm gruplarda kimyasal fiksasyonu tamamlanan karaciğer dokularına histolojik doku takibi işlemleri uygulandı ve parafin blokları hazırlandı. Etil alkol serisinde sırasıyla 1'er saat %70, %80, %90-1, %90-2, %96-1, %96-2 ve 30 dakika absölu etil alkolden (%100'lük) geçirilerek dehidratasyon sağlandı. 30'ar dakika 2 kez ksilol uygulamasıyla dokuların şeffaflanması sağlandı. Dokular parafinizasyon için 57 °C etüvdeki 3 ayrı parafinde (paraplast plus Sigma P3683) değiştirmeli olarak sırasıyla 30, 60, 60 dakika sürelerle bekletilerek bloklandı. Bu bloklardan standart H&E boyama uygulaması yapılmak

üzere mikrotom (Leica RM 2025) kullanılarak 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak Poly-L-Lysine kaplı lamalar üzerine tespit edildi. Kesitlerin bir kısmı 37 °C etüvde 1 gece bekletildi ve daha sonra ksilolde deparafinize edildi. Derecesi azalan etil alkol serilerinde hidrasyonu sağlanarak H&E boyamaları yapıldı. H&E boyanmış karaciğer preparatları ışık mikroskop düzeyde histopatolojik olarak incelendi.

Hazırlanan tüm doku kesitleri Olympus marka, CH40 model ışık mikroskopunda incelenerek Spot Insight marka, 3.2.0. model dijital kamera ve Spot advanced, 4.0.6 version program yardımıyla fotoğraflandırıldı.

## **ii. Karaciğer Doku Örneklerinde Elektron Mikroskop Uygulamaları**

İkinci kısım karaciğer dokularına, Bayram ve arkadaşları (2005), Bashir ve arkadaşları (2006) ile Eagles ve Chapman (2007)'in yapmış oldukları çalışmalar doğrultusunda TEM doku takibi uygulandı. Buna göre doku diseksiyonları pH: 7,4' de 0,1 M Fosfat tamponu ile %4'lük Glutaraldehit (pH:7,2) solüsyonu içerisinde gerçekleştirildi. %4'lük Glutaraldehit içerisinde 24 saat boyunca ilk fiksasyon yapıldıktan sonra 3 kere 15 ' er dakikada bir değiştirilmek suretiyle pH: 7,4' de 0,1 M Fosfat tamponu ile yıkandı. İkinci fiksasyon Osmium tetroksitle içerisinde 2 saat rotatorda döndürülerek oda sıcaklığında yapıldıktan sonra 3 kez 15'er dakika fosfat tamponunda dokuların yıkanması sağlandı. Dehidratasyon işlemi +4°C' de %50, %70, %90 lık etilalkol de 2 şer kez 15'er dakika; %96, %100'lük etil alkol de 2'şer kez 30 dakika olarak uygulandı. Dokular propilen oksitte 2 kez 30'ar dakika, rotatorda da 1:1 oranındaki propilen oksit ve araldit karışımı içinde 2 saat bekletildi. Dokular saf araldit içerisinde rotatorda bir gece bekletildikten sonra gömme işlemi yapıldı. Polimerizasyon işlemi 2 gün boyunca 60 °C lik etüvde gerçekleştirildi. Karaciğer doku örnekleri ultramikrotomda yarı ince kesitler alınmak üzere bloklar haline getirildi. Hazırlanmış bloklardan ESOGÜ Elektron Mikroskop Görüntü Analiz Biriminde ultramikrotomda

800 µ'luk yarı ince kesitler alınarak toluidin blue boyası içinde 7 dakika kadar bekletildi. Distile su içinde de 2-3 dakika bekletildikten sonra lamlara alınarak kurutuldu. Bu aşamadan itibaren ışık mikroskobunda incelenerek ince kesitler için bölge seçimi yapıldı. Bölgelerin belirlenmesinden sonra 70-100 µ kalınlığındaki ince kesitler 300 mesh bakır gridler üzerine alınıp %2'lik uranil asetat içinde 1 saat süresince boyandı. Gridler fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra 15 dakika kurşun asetat ile muamele edilip tekrar yıkandı. İnce kesitler JEOL-JEM-1220 marka Transmisyon Elektron Mikroskopta incelenerek Olympus marka ve megaview G2 model kamera yardımıyla fotoğraflandırıldı.

### **3.5.2.2. Karaciğer Doku Örneklerinde Biyokimyasal Uygulamalar**

#### **i. Kaspaz 3 Aktivitesinin Araştırılması**

Karaciğer dokularındaki kaspaz 3 aktiviteleri kolorimetrik kaspaz 3 ölçüm kiti (SIGMA) ile taze olarak çalışılarak tespit edildi. Doku örnekleri lizis tamponunda (250 mM HEPES, pH:7,4, %1 CHAPS, 50 mM DTT, 10 mM EDTA) homojenize (1/10) edilerek 3000 rpm'de +4 °C'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant 14000 rpm' de 15 dakika iki tekrarlı santrifüj edildi. Süpernatant fraksiyonunda kaspaz 3 aktivitesi belirlendi (Zovein, et al., 2004). Kaspaz ölçüm kiti, asetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilidin (AC-DEVD-pNA), p-nitroanilin (pNA) oluşacak şekilde kaspaz-3 tarafından hidrolizi ile oluşan pNA'nın absorbansının 405 nm' de spektrofotometrede (SCHIMADZU UV 1601) ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. P-nitroanilidin kullanılarak kalibrasyon grafiği çizildi. Bu şekilde kaspaz 3 aktivitesi hesaplandı. Sonuçlar, doku protein miktarına oranlandıktan sonra µmol pNA / mg protein / dakika olarak ifade edildi.

## ii. Mitokondri Membran Bütünlüğünün Araştırılması

Karaciğer doku örneklerinde mitokondrial membran bütünlüklerinin ölçümleri için mitokondrial fraksiyonlar elde edildi. Karaciğer dokusundan mitokondrilerin izole edilmesi ve mitokondri iç ve dış membran bütünlüğünün tayinleri mitokondri izolasyon kiti ve sitokrom oksidaz kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

### a. Mitokondri İzolasyonu

Mitokondri izolasyonu ticari kit (SIGMA) kullanılarak yapıldı. İzole edilen mitokondrilerde iç membran ve dış membran yükü yine ticari kit (SIGMA) kullanılarak yapıldı. Karaciğer dokularından mitokondriler homojenizasyon ve sonrasında da önce düşük (600 g) ardından yüksek hızlı santrifüj (11.000 g) ile ayrılabilirler. Son elde edilen pellet daha sonraki araştırmalar için kullanılacak ham bir mitokondriyal fraksiyon oluşturur. Bu temel bilgiler doğrultusunda mitokondriyal fraksiyon eldeleri için şu sıra takip edildi:

- Buz üstünde muhafaza edilen, fakat dondurulmayan taze bir doku örneği (sakrifikasyondan itibaren 1 saat içinde elde edilmiş) kullanıldı.
- Doku örneği 2 hacim 1x özütleme tamponu A ile iki kere yıkandı.
- Doku küçük parçalara (yaklaşık 50-100 mg) bölündü.
- Doku parçaları bistüri ve soğutulmuş cam levha yardımıyla daha da küçük parçalara bölündü.

- Örnekler ayrı ayrı 2 mg/mL albümin içeren 10 hacim 1 x özütleme tamponu içinde homojenize edildi. Homojenat 5 dakika boyunca 600 g'de santrifüj edildi.
- Homojenat 2 mL' lik bir eppendorf tübüne nakledilip ve 5 dakika boyunca 600 g'de santrifüj edildi.
- Süpernatant 10 dakika boyunca 11.000 g'de santrifüj edildi.
- Süpernatant atılıp kalan pellet 10 hacim 1x Özütleme Tamponu A' da resüspanse edildi ve 7. basamaklar tekrar edildi.
- Pellet 1x Depolama Tamponunda süspanse edildi (her 100 mg doku başına yaklaşık 40 µL).

İç mitokondriyal membranın bütünlüğü (mitokondride JC-1 Emilimi), bu membrandaki potansiyel gradiyent gözlemlenerek ölçüldü (Çizelge 3.1). Bu, prensip olarak matrikse katyonik bir karbosiyanin boyası olan JC-1 (5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolkarbosiyanin iyodid) geçişinin ölçülmesiyle iç membran boyunca var olan mitokondriyal membran potansiyelinin bu boyanın dağılımını kontrol etmesi prensibine göre yapıldı.

**Çizelge 3.1 Mitokondri membran gradiyetinin ölçülmesi.**

Numune	Analiz Tamponu	Depolama tamponu	Numune	JC-1 Boyası
Kör	1.9 mL	100µL	-----	2 µL
Mitokondriyal fraksiyon	1.9 mL	100-x µL	x µl	2 µL



- 2 µl JC-1 boyası eklenerek reaksiyon başlatıldı.
- Tüpler karanlıkta oda sıcaklığında 7 dakika bırakılarak boyanın mitokondri tarafından tamamen emilmesi sağlandı.
- Numunedeki floresansı aşağıdaki ayarlara göre spektrofotometrede (JASCO) okutuldu: Eksitasyon dalgaboyu = 490 nm; slit = 5 nm
- Emisyon dalgaboyu = 590 nm; slit= 7,2 nm
- Mitokondri süspansiyonunda üretilen floresansı mg mitokondriyal protein başına floresans birimi şeklinde (FLU/mgP) hesaplandı.

#### **b. Mitokondriyal Dış Membran Bütünlüğünün Araştırılması ve Sitokrom c Oksidaz Analizi**

Mitokondriyal dış membran bütünlüğünün ve subselüler fraksiyonlarda mitokondrilerin belirlenmesi için ticari kit (SIGMA) kullanılarak Sitokrom c oksidaz analizi yapıldı. Sitokrom c oksidaz analizi, çözünmüş ve membrana bağlı mitokondriyal örneklerde sitokrom c oksidaz aktivitesinin ölçülmesi için geliştirilmiştir. Sitokrom c oksidaz bütün hayvanların, mayaların ve bazı bakterilerin aerobik metabolizmasının temel oksidaz enzimidir. Sitokrom c oksidaz iç mitokondri membranında yerleşmiştir ve bu membran için bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Ölçümlerdeki kolorimetrik analiz, ferrositokrom c'nin ferrisitokrom c'ye oksidasyonu sırasında 550 nm'deki absorbansında meydana gelen düşmeye dayanmaktadır. Sitokrom c'nin 550 nm'deki absorpsiyonu oksidasyon durumuna göre değişir. Sitokrom c DTT ile indirgenir ve sitokrom c oksidaz ile tekrar yükseltgenir. Yöntemsel olarak spektrofotometrede (SCHIMADZU UV 1601) kinetik bir program kullanılarak oda sıcaklığında 550 nm' deki absorbans düşüşü takip edildi. Buna göre;

- Bir küvete 0,95 mL. 1x analiz tamponu koyulur ve spektrofotometre sıfırlandı.
- Küvete uygun hacimde mitokondriyal süspansiyonu eklendi ve sonra 1x enzim dilüsyon tamponunu da eklenerek reaksiyon hacmi 1,05 mL' ye çıkarıldı.
- 50 µL ferrokrom-c Substrat çözeltisi ekleyerek reaksiyonu başlatıldı.
- Bu enzimin yüksek reaksiyon hızından dolayı A<sub>550</sub>/dakika değeri okutuldu.
- Arka plan değerleri 0,001 ve 0,005 A<sub>550</sub>/dakika değerleri arasında beklendi.

$$\text{Ünite /mL} = \frac{\text{gA / dk x dil x 1,1}}{\text{Enzim hacmi x 21.84}}$$

$$\Delta A/\text{dak} = A/\text{dakika}_{(\text{örnek})} - A/\text{dakika}_{(\text{kör})}$$

dil= enzim yada örneğin dilüsyon faktörü

1,1= reaksiyon hacmi (mL)

Enzim hacmi= enzim yada örneğin hacmi (mL)

21,84= ferrokrom-c ve ferrikrom-c arasındaki 550 nm' deki ekstinksiyon katsayısı

Ünite: Optimal şartlarda (optimal ısı ve optimal pH) 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim aktivitesidir.

Mitokondri dış membranının bütünlüğü bir deterjan olan n-Dodesil-β-D Maltozid'in varlığında ya da yokluğunda mitokondriyal membranlardaki sitokrom c oksidaz aktivitesinin ölçülmesiyle saptandı. n-Dodesil-β-D Maltozid, düşük deterjan konsantrasyonlarında çözeltideki sitokrom c oksidaz dimerini muhafaza eder. n-Dodesil-β-D Maltozid varlığındaki ve yokluğundaki sitokrom c oksidaz aktiviteleri arasındaki oran dış membranın bütünlüğünü gösterir, çünkü membran sitokrom c'nin organelle girmesi için bir bariyer teşkil eder. Bu prensibe dayanılarak çalışmamızda da

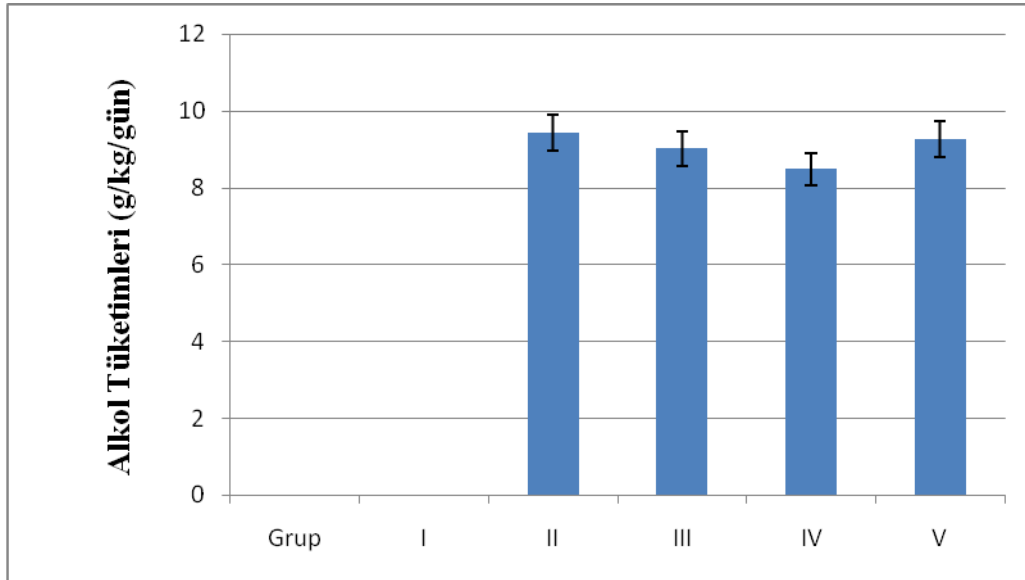
sitokrom c oksidaz aktiviteleri hem totalde hem de tüm mitokondrilerde olmak üzere ölçülmüştür. Doku protein ölçümleri biüret yöntemi ile yapıldı (Layne, 1957).

### **3.6. İstatistiksel Değerlendirmeler**

Çalışmalarımız sonucunda elde edilen biyokimya verilerinin değerlendirilmesinde “SPSS 12.0 for windows” versiyonu bilgisayar paket programı kullanıldı. Kan serumlarında ve karaciğer doku örneklerinde analizi yapılmış olan parametreler açısından gruplar arasındaki farklılık durumları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi, gruplar arası karşılaştırmalarda ise LSD metod kullanıldı. Tüm istatistik uygulamalar sonucunda sayısal değer (P) olarak ortaya çıkan deney grupları arasındaki farklar,  $P < 0.05$  olduğunda anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. SONUÇLAR

Alkollü MSD uygulanan Grup II, III, IV, V de ki deney hayvanlarının deneysel çalışmamız süresince almış oldukları etilalkol miktarları günlük olarak ölçüldü ve elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri yapıldı (Şekil 4.1). Bu değerlendirmelerde etilalkol tüketimleri açısından deney grupları arasında fark olmaması kayda değer bulundu.



Şekil 4.1 Grup II, III, IV, V 'e ait hayvanların etil alkol tüketim seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.

### 4.1. Biyokimyasal Analizler

#### 4.1.1. Serum örneklerinde biyokimyasal analizler

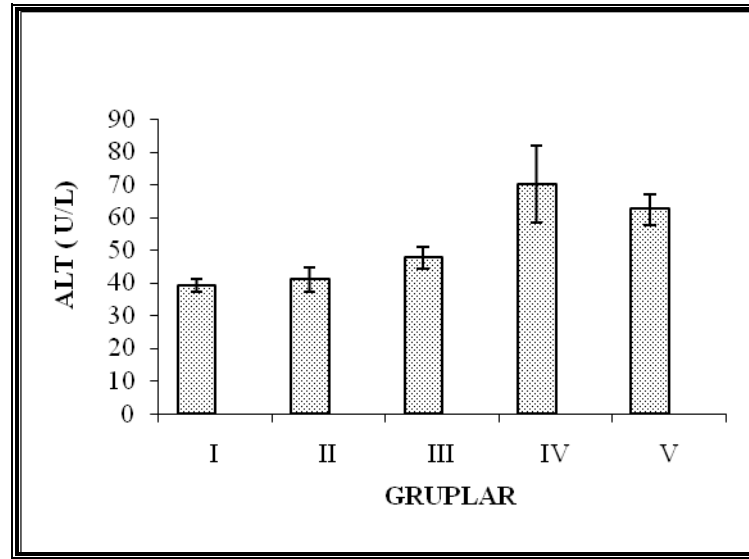
Grup I, II, III, IV ve V' teki deney hayvanlarına ait kan serumlarının biyokimyasal analizlerinden elde edilen ALT ve LDH miktarları gruplar arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

**Çizelge 4.1** Deney gruplarına ait hayvanların kan serum örneklerinde belirlenen ALT ve LDH aktivitelerinin ortalama ve standart hata değerleri (n=8).

GRUPLAR	ALT(U/L)	LDH (U/L)
I	39,25 ± 1,83	750,00 ± 128,22
II	40,88 ± 3,72	455,50 ± 26,99 <sup>a</sup>
III	47,63 ± 3,23	682,13 ± 80,80 <sup>b</sup>
IV	70,13 ± 11,79 <sup>ab</sup>	443,88 ± 31,87 <sup>a</sup>
V	62,38 ± 4,66 <sup>ab</sup>	502,38 ± 49,56 <sup>a</sup>

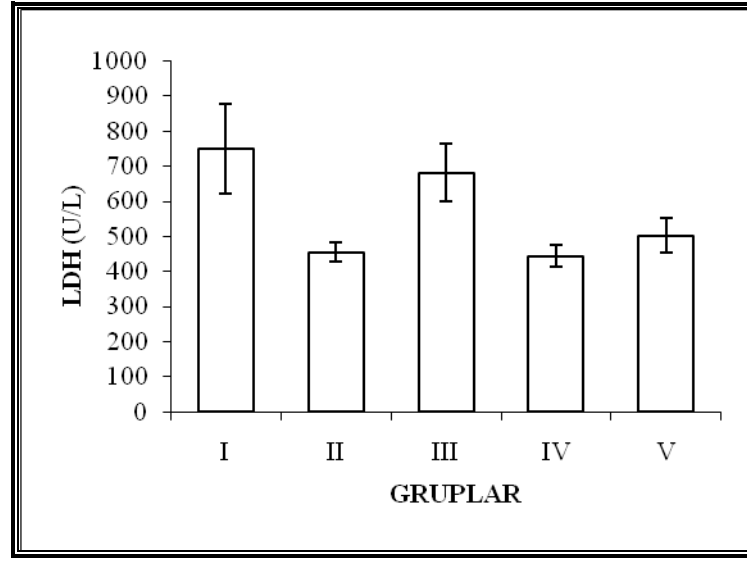
P < 0.05 a: Grup I' den; b: Grup II' den anlamlı fark vardır.

Serum ALT aktiviteleri değerlendirildiğinde, kontrol grubu olan Grup I, alkollü MSD + SF grubu olan Grup II ve 50 mg/kg EPS uygulanan Grup III benzer bulunurken, 100 mg/kg EPS uygulanan Grup IV ve 150 mg/kg EPS uygulanan Grup V, Grup I ile istatistiksel olarak az anlamlı fark olduğu bulundu (P < 0.05). Benzer şekilde Grup IV ve Grup V'in de Grup II' den farklı olduğu tespit edildi (P < 0.05). Grup I ile Grup IV arasında ise istatistiksel olarak önemli derecede fark bulundu (P < 0.001) (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2 Grup I, II, III, IV ve V' e ait serum ALT seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.

Serum LDH aktiviteleri değerlendirildiğinde, alkollü MSD  $\pm$  SF grubu olan Grup II, 100 mg/kg EPS uygulanan Grup IV ve 150 mg/kg EPS uygulanan Grup V in Grup I' den istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edildi ( $P < 0.05$ ). 50 mg/kg EPS uygulanan Grup III ile Grup II arasında da daha anlamlı fark bulunmuştur ( $P < 0.01$ ) (Şekil 4.3).



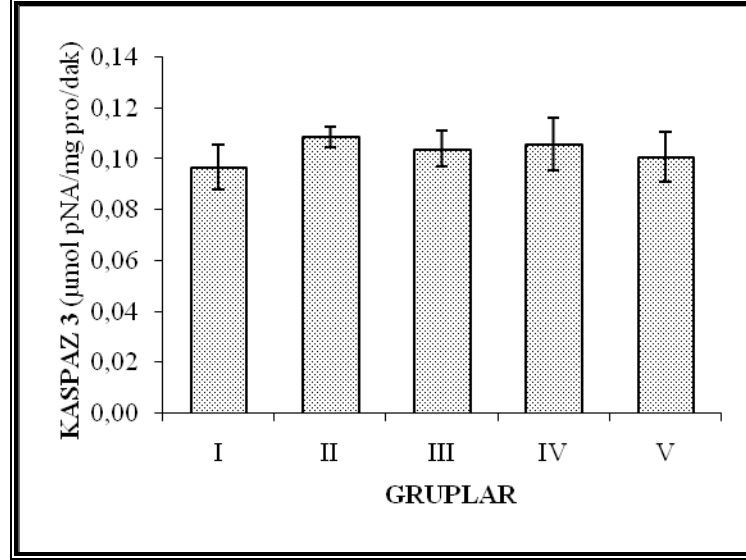
Şekil 4.3 Grup I, II, III, IV ve V' e ait serum LDH seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.

Çizelge 4.2 Grup I, II, III, IV, V 'e ait karaciğer dokularında kaspaz 3 aktivitesi mitokondri iç zar ve dış zar bütünlüğü ortalama ve standart hata (n=8).

GRUPLAR	Kaspaz 3 Aktivitesi ( $\mu\text{mol pNA/mg pro/dk}$ )	Mitokondri iç zar Bütünlüğü (U/mg protein)	Mitokondri dış zar Bütünlüğü (%)
<b>I</b>	0,0969 + 0,008	8113,88 + 826,316	73,5537 + 2,106
<b>II</b>	0,1087 + 0,004	2872,13 + 408,251 <sup>a</sup>	76,4188 + 1,653
<b>III</b>	0,1039 + 0,007	3856,13 + 347,823 <sup>a</sup>	75,6787 + 2,766
<b>IV</b>	0,1059 + 0,010	4079,38 + 248,779 <sup>a</sup>	67,5175 + 1,517 <sup>b</sup>
<b>V</b>	0,1008 + 0,009	3314,50 + 351,796 <sup>a</sup>	66,2850 + 2,311 <sup>ab</sup>

**P < 0 .05 a: Grup I' den; b: Grup II' den anlamlı fark vardır.**

Kaspaz 3 aktivite değerleri gruplar arasında değerlendirildiğinde (Şekil 4.4), Gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır.

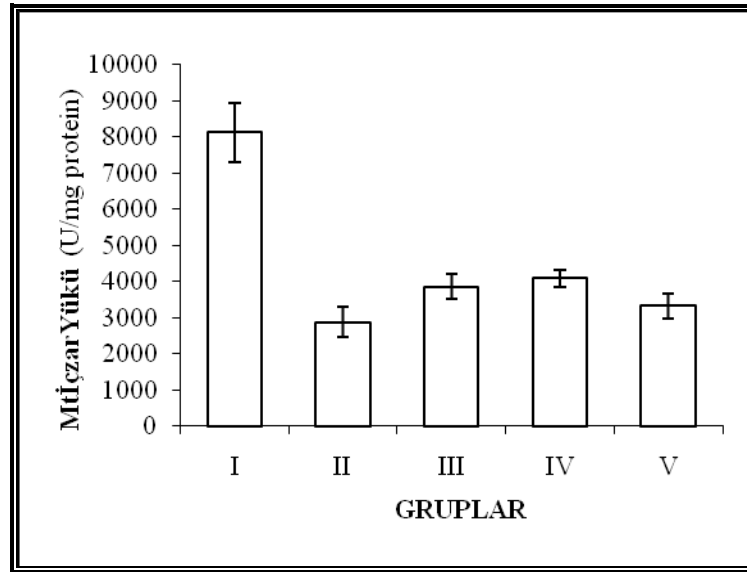


**Şekil 4.4** Grup I, II, III, IV, V ‘e ait karaciğer dokularında kaspaz-3 aktivite değerlerinin ortalama ve standart hata grafiği.

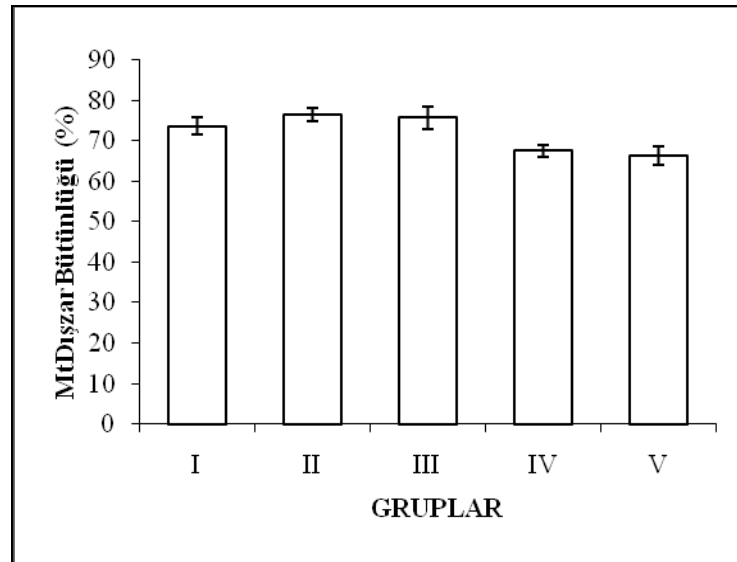
Deney gruplarında yer alan hayvanlarına ait karaciğer dokularından izole edilen mitokondrilerin iç zar bütünlüklerinin sayısal değerleri Çizelge 4.2’ de verilmiştir. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar yapıldığında 50 mg/kg EPS uygulanan Grup III, 100 mg/kg EPS uygulanan Grup IV ve 150 mg/kg EPS uygulanan Grup V, kontrol grubu olan Grup I’ e göre farklı ( $P<0.05$ ) olduğu tespit edildi, Grup I de, alkollü MSD + SF grubu olan Grup II’ e göre anlamlı derecede fark vardır ( $P<0.001$ ) (Şekil 4.5.).

Deney gruplarında yer alan hayvanlarına ait karaciğer dokularından izole edilen mitokondrilerin dış zar bütünlüklerinin sayısal değerleri Çizelge 4.2’ de verilmiştir. Gruplar arası istatistiksel olarak karşılaştırmalar yapıldığında, Grup IV, Grup II’ den farklı, Grup V ise Grup I ve Grup II den farklı bulunmuştur ( $P<0.05$ ) (Şekil 4.6.).





Şekil 4.5 Grup I, II, III, IV, V 'e ait karaciğer dokularında mitokondri iç zar yükü değerlerinin ortalama ve standart hata grafiği.



Şekil 4.6 Grup I, II, III, IV, V 'e ait karaciğer dokularında mitokondri dış zar yükü ve dış zar bütünlüğü değerlerinin ortalama ve standart hata grafiği.

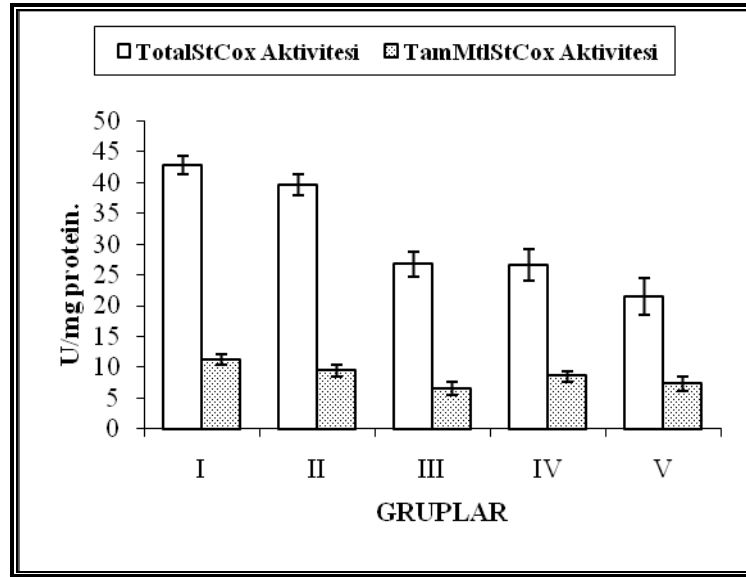
**Çizelge 4.3 Grup I, II, III, IV, V 'e ait karaciğer dokularında total stokrom-c oksidaz ve tam mitokondriyal stokrom-c oksidaz aktivite değerleri (ortalama ve standart hata).**

<b>Gruplar</b>	<b>TotalStCox Aktivitesi (U/mg protein)</b>	<b>TamMtStCox Aktivitesi (U/mg protein)</b>
<b>I</b>	42,8963± 1,50	11,2425 ± 0,77003
<b>II</b>	39,6325 ± 1,65	9,4525 ± 0,91684
<b>III</b>	26,7425 ± 2,07 <sup>ab</sup>	6,5400 ± 0,98995 <sup>ab</sup>
<b>IV</b>	26,5525 ± 2,60 <sup>ab</sup>	8,5375 ± 0,8197 <sup>a</sup>
<b>V</b>	21,4375 ± 2,99 <sup>ab</sup>	7,3113 ± 1,16203 <sup>a</sup>

**P< 0.05 a: Grup I' den; b: Grup II' den anlamlı fark vardır.**

Deney gruplarında yer alan hayvanlarına ait TotalStCox Aktiviteleri ve TamMtStCox Aktiviteleri sayısal değerleri Çizelge 4.3' de verilmiştir. TotalStCox Aktivitesi 50 mg/kg EPS uygulanan Grup III, 100 mg/kg EPS uygulanan Grup IV ve 150 mg/kg EPS uygulanan Grup V, kontrol grubu olan Grup I' den anlamlı derecede farklıdır (P<0.001). Grup III, Grup IV ve Grup V ise alkollü MSD + SF grubu olan Grup II' den anlamlı derecede farklıdır (P<0.001) (Şekil 4.7).

TamMtStCox Aktivitesi Grup IV ve Grup V, Grup I' den farklıdır (P<0.05). Grup III ise, Grup I ve Grup II' den anlamlı derecede farklı olduğu bulunmuştur (P<0.001) (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7 Grup I, II, III, IV, V 'e ait karaciğer dokularında total stokrom c oksidaz ve tam mitokondriyal stokrom c oksidaz aktivite değerlerinin ortalama ve standart hata grafiği.

## 4.2. Karaciğer Doku Örneklerinin Histolojik Analizleri

### 4.2.1. Histopatolojik Değerlendirmeler

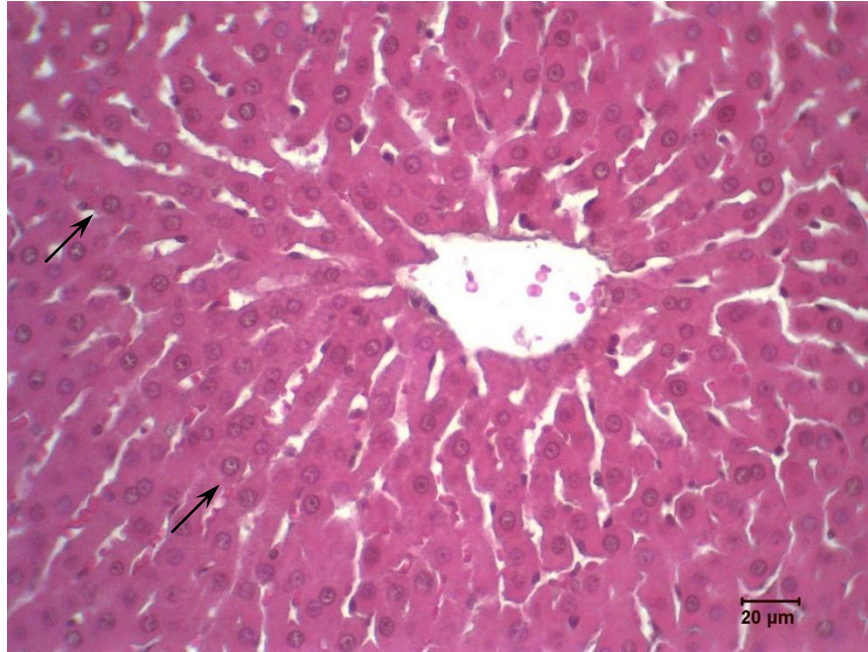
Çizelge 4.4 Tüm deney gruplarındaki hayvanlara ait karaciğer doku kesitlerinde histopatolojik değerlendirmeler.

Grup	Sinusoidal Genişleme	PMNL İnfiltrasyonu	Nekroz	Vakuolizasyon	Kanama
I	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
II	3,6 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	3,5 <sup>a</sup>	3,5 <sup>a</sup>	2,8 <sup>a</sup>
III	1,7 <sup>ab</sup>	2 <sup>ab</sup>	1,2 <sup>b</sup>	1,2 <sup>ab</sup>	2,1 <sup>ab</sup>
IV	3,2 <sup>ab</sup>	2,1 <sup>ab</sup>	2,1 <sup>ab</sup>	2,1 <sup>ab</sup>	3,7 <sup>ab</sup>
V	3,7 <sup>ab</sup>	3,2 <sup>ab</sup>	2,2 <sup>ab</sup>	2,2 <sup>ab</sup>	3,6 <sup>ab</sup>

P<0.05 a: Grup I'den; b: Grup II'den anlamlı fark vardır.

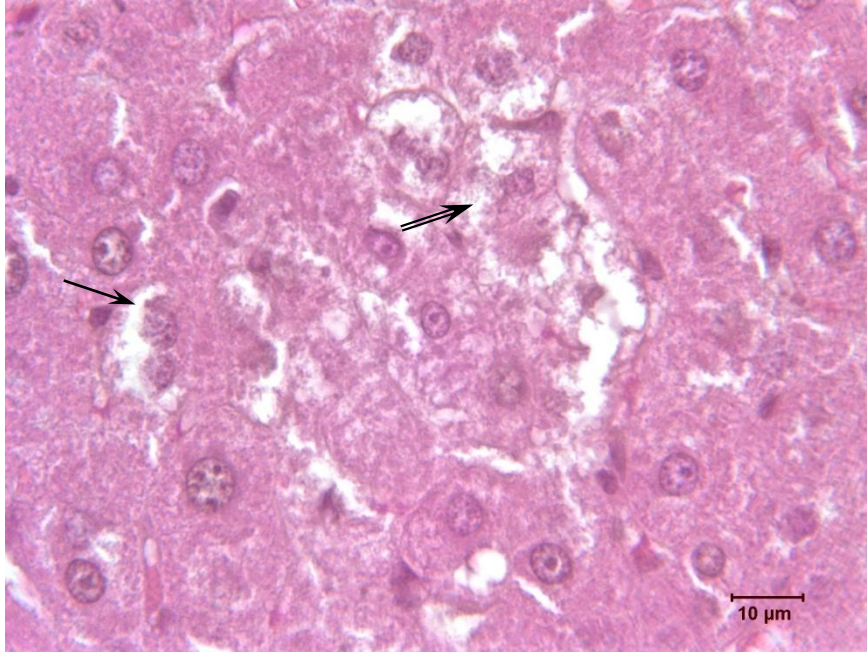
Tüm deney gruplarındaki hayvanlara ait karaciğer doku kesitlerinin her birinde rastgele seçilmiş 20 farklı kesit alanından ışık mikroskobu kullanılarak yapılan incelemeler sonucunda gözlenen histopatolojik bulgular “1; yok, 2; az var, 3; var ve 4; çok var” biçiminde skorlanarak istatistiksel değerlendirme yapıldı (Çizelge 4.4).

Çalışmamızda kontrol grubuna (Grup I) ait karaciğer doku kesitleri incelendiğinde vena sentralis çevresinde yer alan hepatositlerin ışımsal tarzda düzenlenmesi gözlenmektedir (Şekil 4.8). Karaciğer hepatositlerinde normal sitoplazmik ve nükleus boyanması görüldü (H&E).

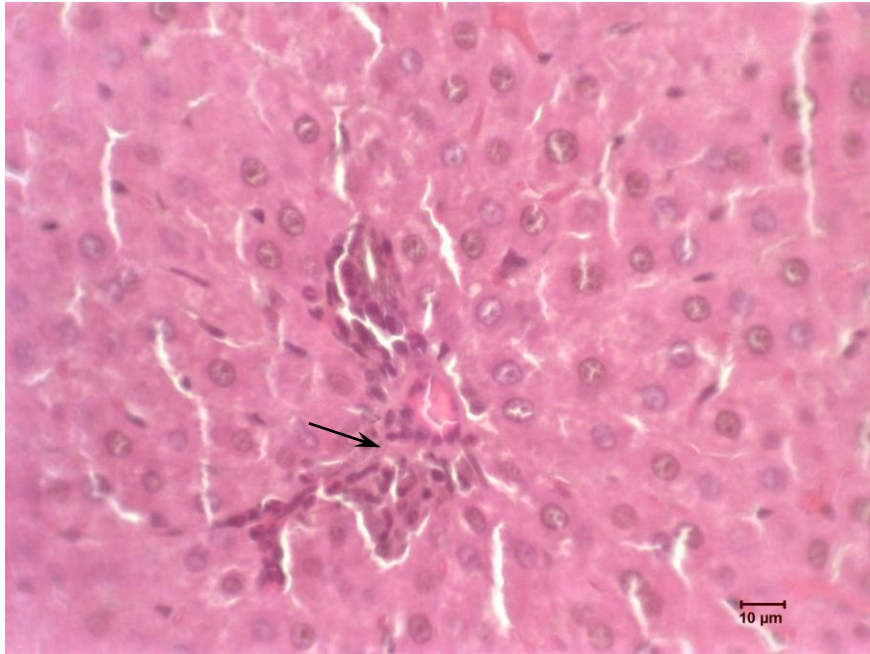


**Şekil 4.8 Kontrol grubuna ait karaciğer kesiti. Sentralis ven ve çevresinde normal görünümlü hepatositler (↗ ) (H&E).**

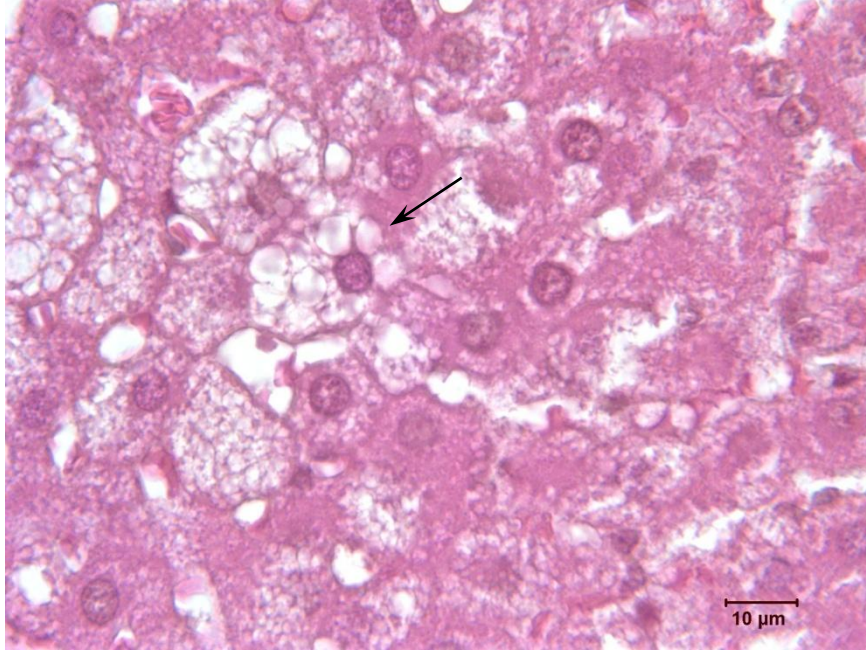
Alkollü MSD + SF grubu olan Grup II' ye ait karaciğer kesitleri genel olarak değerlendirildiğinde, klasik karaciğer lobül yapısı korunurken, sinusoidlerde genişlemeler gözlemlendi. Buna paralel olarak, Şekil 4.9' de görüldüğü gibi hepatositlerde ileri dejenerasyon ve PMNL infiltrasyonunun arttığı gözlemlendi. (Şekil 4.10). Ayrıca, vakuollerin karaciğer parankiminde yaygın ve büyük çaplarda olduğu görüldü (Şekil 4.11).



Şekil 4.9 Alkol grubuna ait karaciğer kesitindeki hepatositlerde dejenerasyon (↗) nekrotik alan (↘) (H&E).



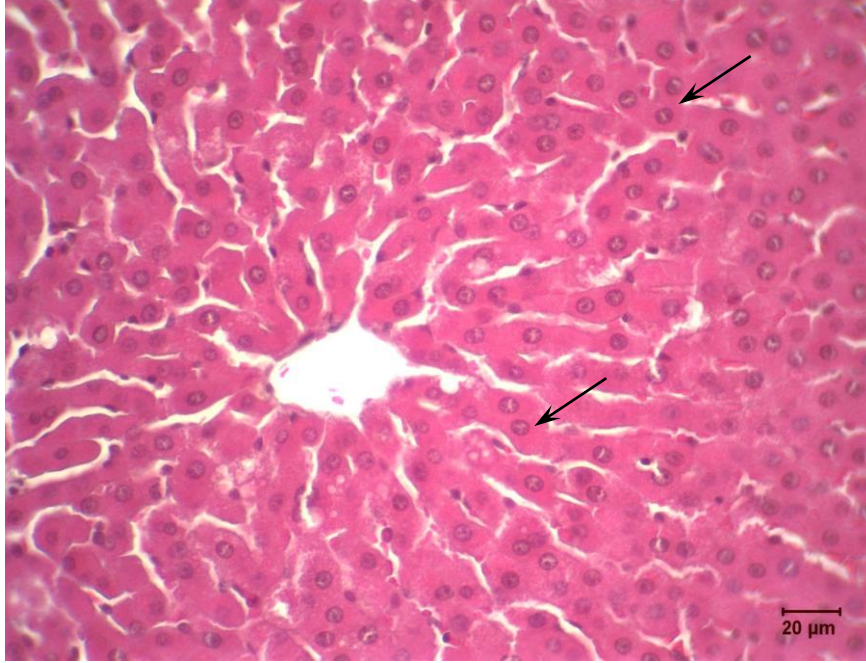
Şekil 4.10 Alkol grubuna ait karaciğer kesitindeki sinüzoidal alanda PMNL infiltrasyonu (↗) (H&E)



**Şekil 4.11 Alkol grubuna ait karaciğer kesitindeki hepatositlerde gözlenen sitoplazmik vakuolizasyon (↗) (H&E).**

50 mg/kg/gün EPS uygulanan alkollü MSD + SF grubu olan Grup III hayvanlarına ait karaciğer kesitlerinde yapılan ışık mikroskobu incelemelerinde histolojik yapının Grup I' e oldukça yakın olduğu, Grup II' ye göre hepatosit sitoplazmasında ve karaciğer parakiminde ise vakuolizasyonun azalmış olduğu görüldü. PMNL infiltrasyonu ve genişlemiş sinusoidlere bu grubun karaciğer kesitlerinde rastlanmadı (Şekil 4.11).

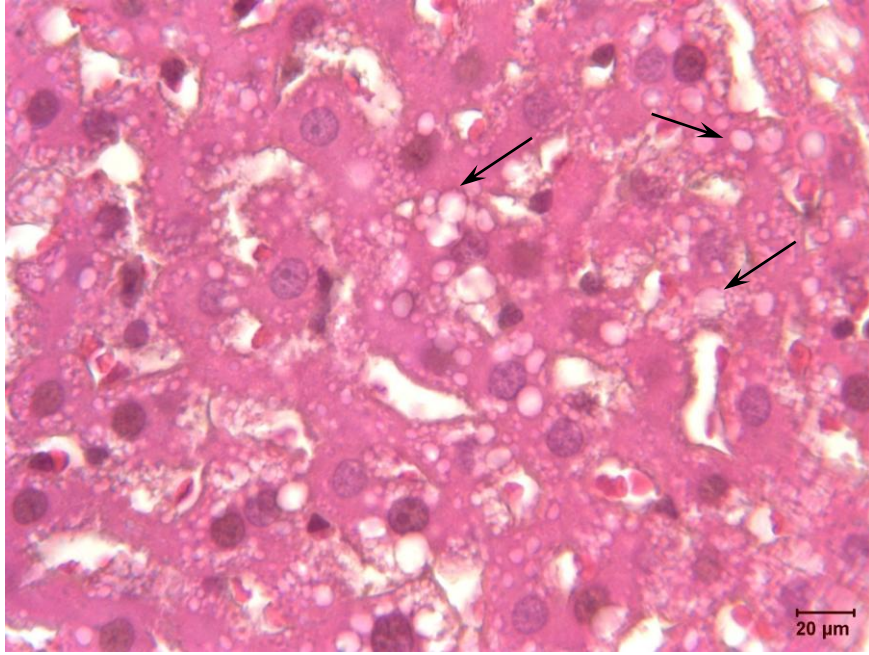




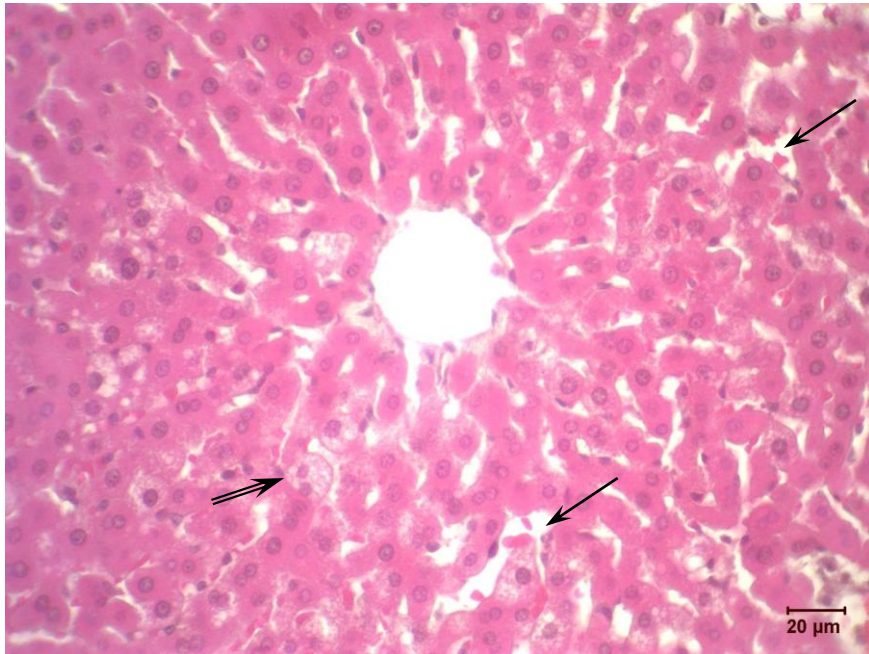
**Şekil 4.12** 50 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta normal görünümlü hepatositler (↗) (H&E).

100 mg/kg/gün EPS uygulanan alkollü MSD + SF grubu olan Grup IV hayvanlarına ait karaciğer kesitlerinde yapılan histolojik incelemelerde hepatosit sitoplazmasında karaciğer parakiminde gözlenen vakuolizasyonun yoğun olduğu (Şekil 4.12), buna karşın sinusoidal genişlemenin yaygın olduğu ve hepatositlerde dejenerasyon belirlendi (Şekil 4.13).



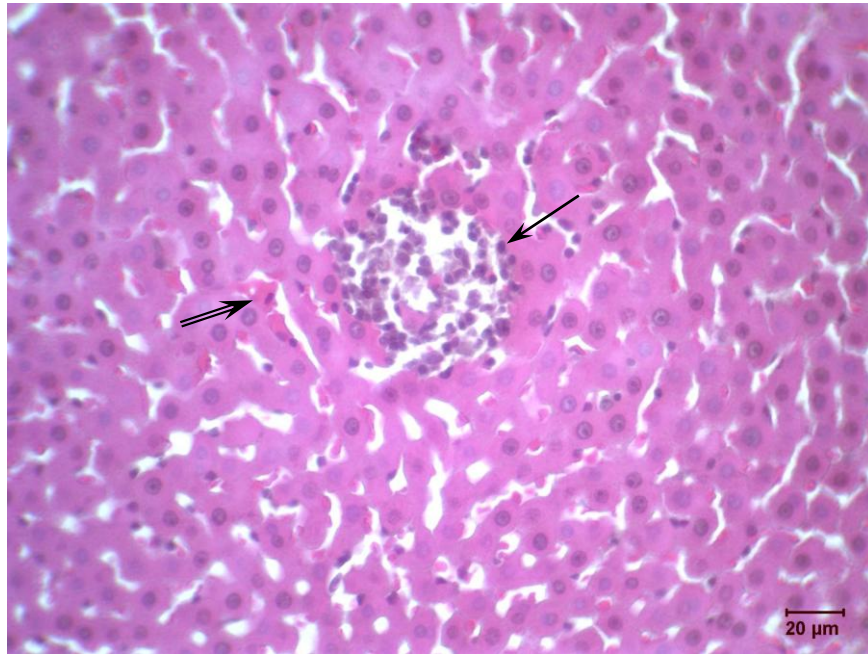


Şekil 4.13 100 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta karaciğer kesitindeki hepatositlerde gözlenen sitoplazmik vakuolizasyon (↗) (H&E).

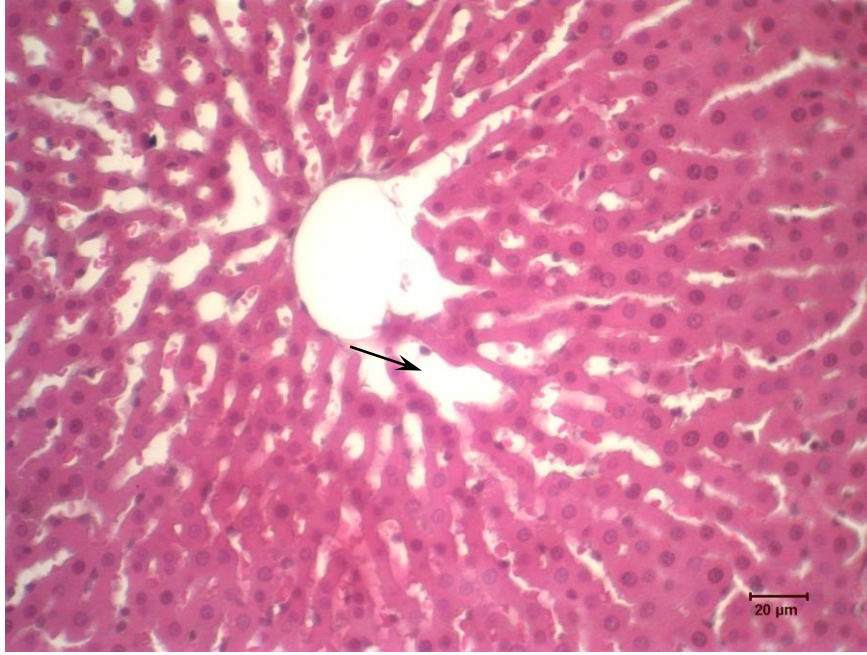


Şekil 4.14 100 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta karaciğer kesitindeki sinüzoidal alanda genişlemeler (↗) ve dejenere (↘) hepatositler (H&E).

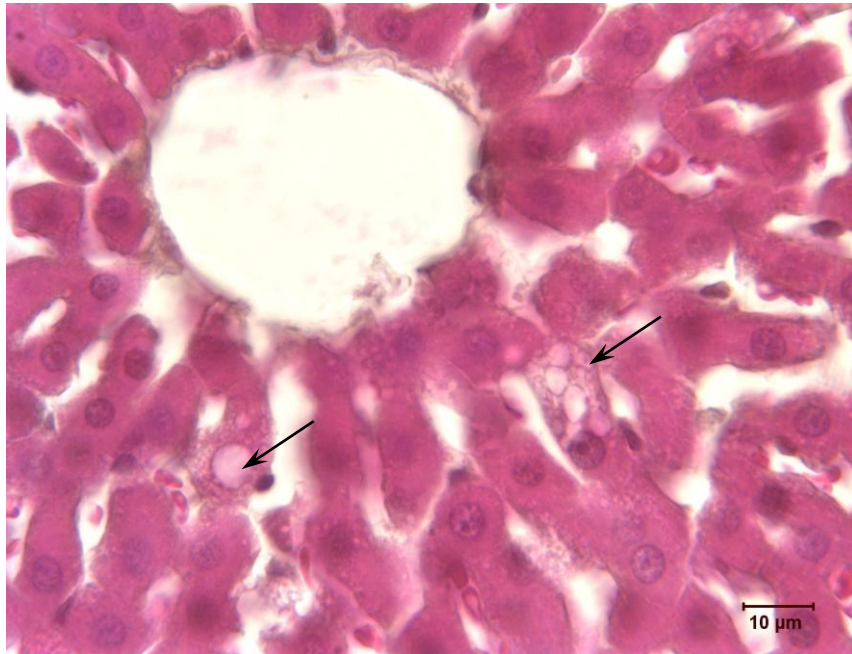
150 mg/kg/gün EPS uygulanan alkollü MSD + SF grubu olan Grup V hayvanlarına ait karaciğer kesitlerinde yapılan histolojik incelemelerde sinüzoidal alanda kanamalar ve PMNL infiltrasyonunun arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.14). Karaciğer kesitindeki vena sentral alanında sinüzoidal alanda genişlemeler (Şekil 4.15) ve dokuda nekrotik alanlar ve hepatositlerde vakuolasyon saptandı (Şekil 4.16).



**Şekil 4.15** 150 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta karaciğer kesitindeki sinüzoidal alanda kanamalar (↗ ) ve PMNL infiltrasyonu (↗ ) (H&E).



Şekil 4.16 150 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta karaciğer kesitindeki sentral ven alanındaki sinüzoidal alanda genişlemeler (↗) (H&E).

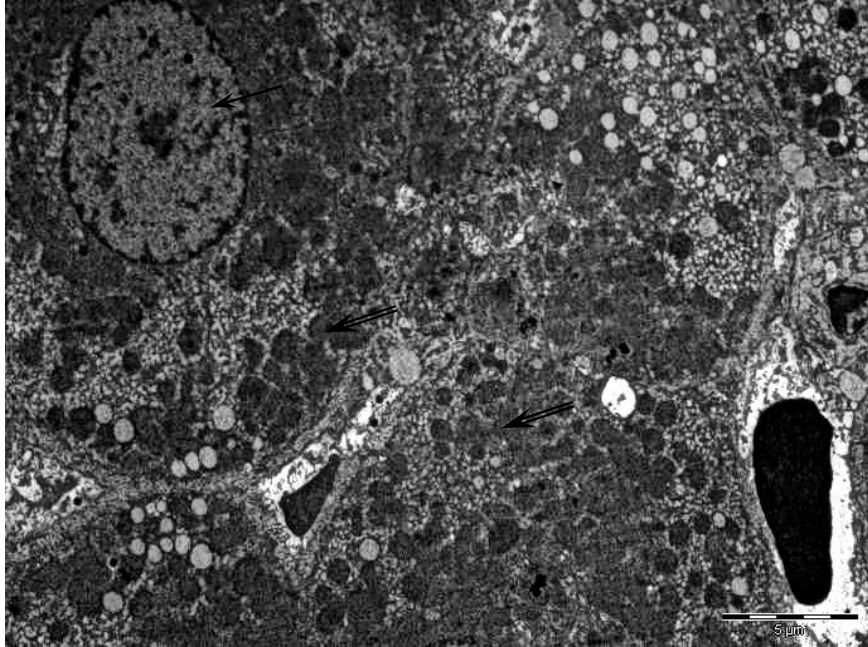


Şekil 4.17 150 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta karaciğer kesitindeki sentral ven alanında ki vakuolasyon (↗) (H&E).

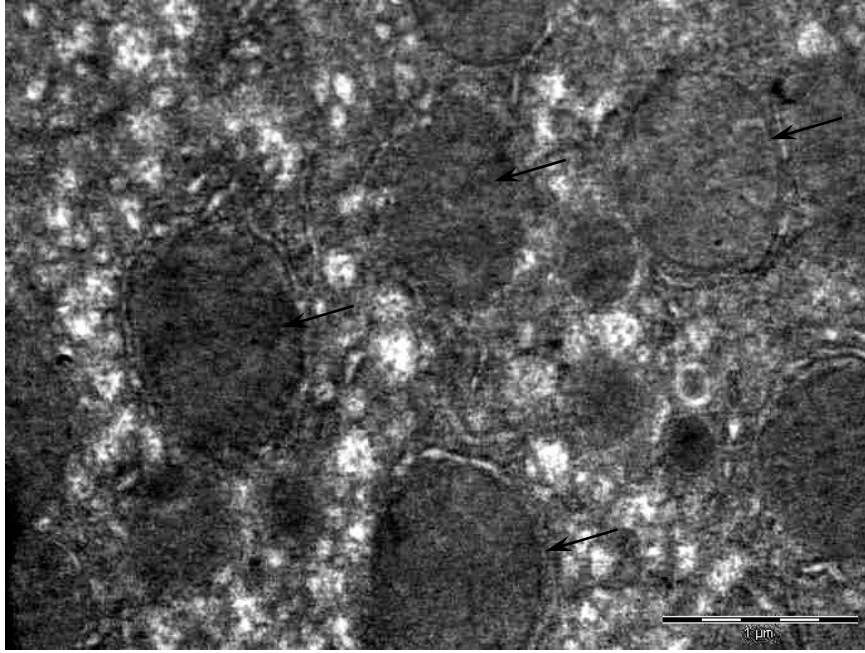


#### 4.2.2. Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) Değerlendirmeleri

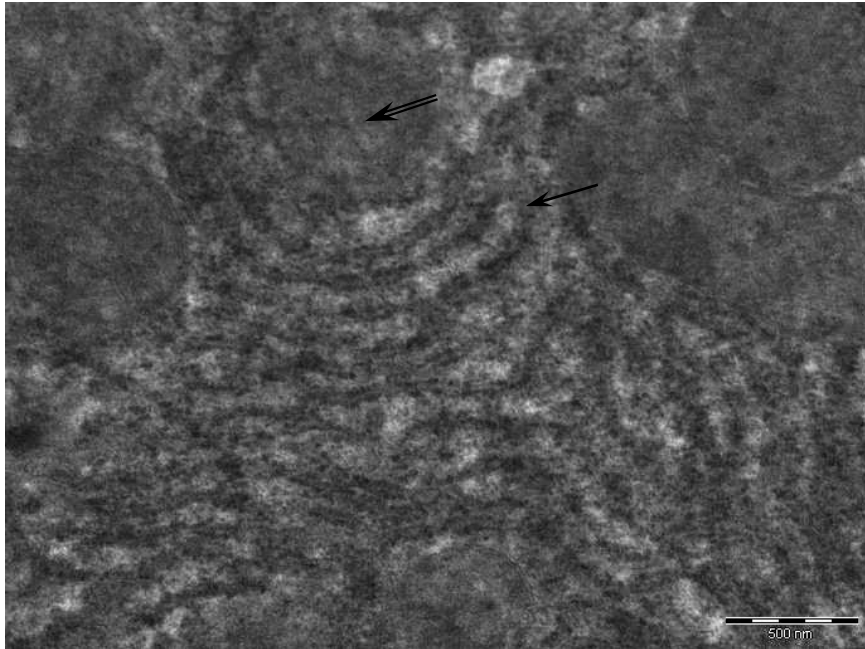
Kontrol grubu olan Grup I'e ait karaciğer dokularının ince kesitlerinde hepatosit sitoplazmasındaki organel yapılarının başta mitokondri ve düz endoplazmik retikulumlar olmak üzere normal oldukları gözlemlendi (Şekil 4.18; Şekil 4.19; Şekil 4.20).



Şekil 4.18 Kontrol grubuna ait karaciğer hepatosit hücresinde normal görünömlü mitokondriler (↗) ve çekirdek (↗).

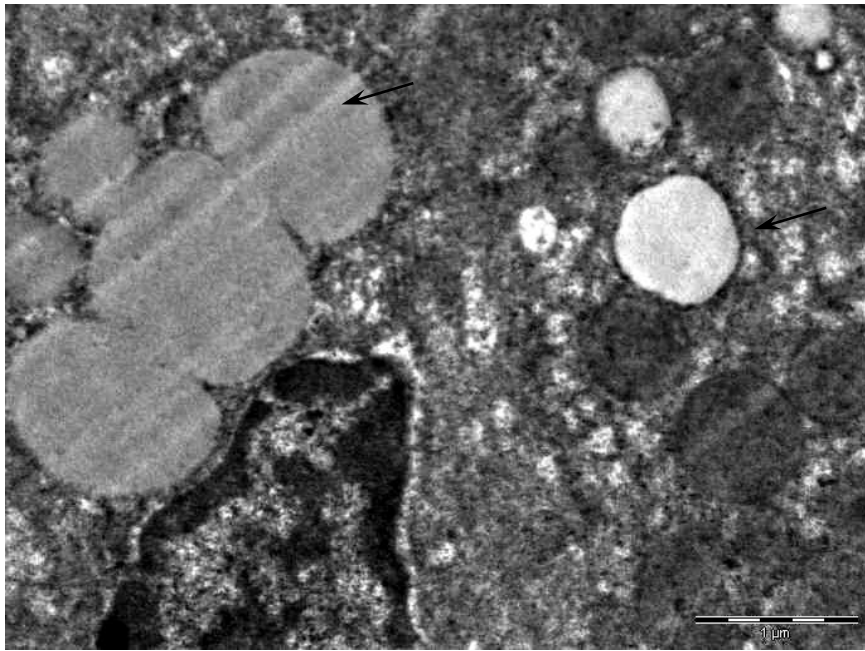


Şekil 4.19 Kontrol grubuna ait hepatositte normal görünümlü mitokondriler (↗).

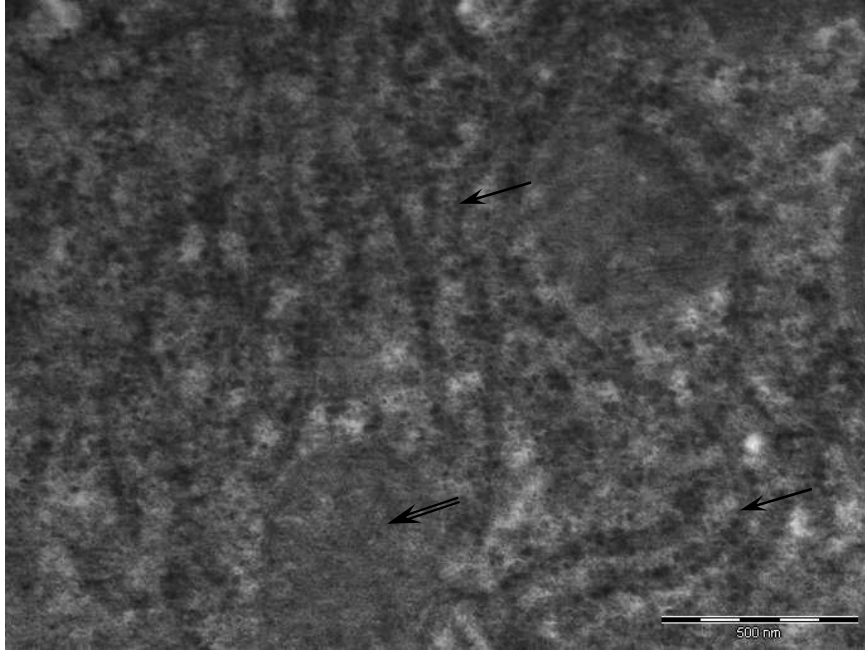


Şekil 4.20 Kontrol grubuna ait hepatositte normal görünümlü mitokondriler (↗) ve endoplazmik retikulumlar (↗).

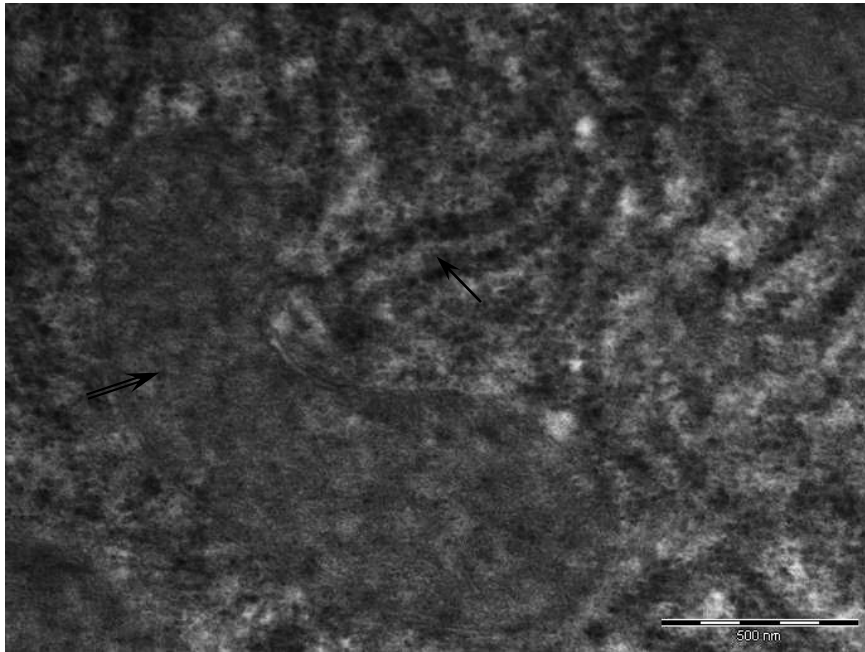
Alkollü MSD + SF grubu olan Grup II' ye ait hayvanların karaciğer ince kesitleri genel olarak değerlendirildiğinde, lipid damlacıklarında artarak kümeler oluşturması ve hücre ultrasüruktürel yapı bütünlüğünün kaybolduğu belirlendi (Şekil 4.21). Mitokondri morfolojisinde anormal değişiklik, genişlemeler, krista yapılarında erimeler saptandı. Bunlara ek olarak düz endoplazmik retikulumda şişme ve kırıklar tespit edildi. (Şekil 4.22 ; Şekil 4.23).



Şekil 4.21 Alkol grubuna ait hepatositte kümeler oluşturmuş lipid damlacıkları (↗).

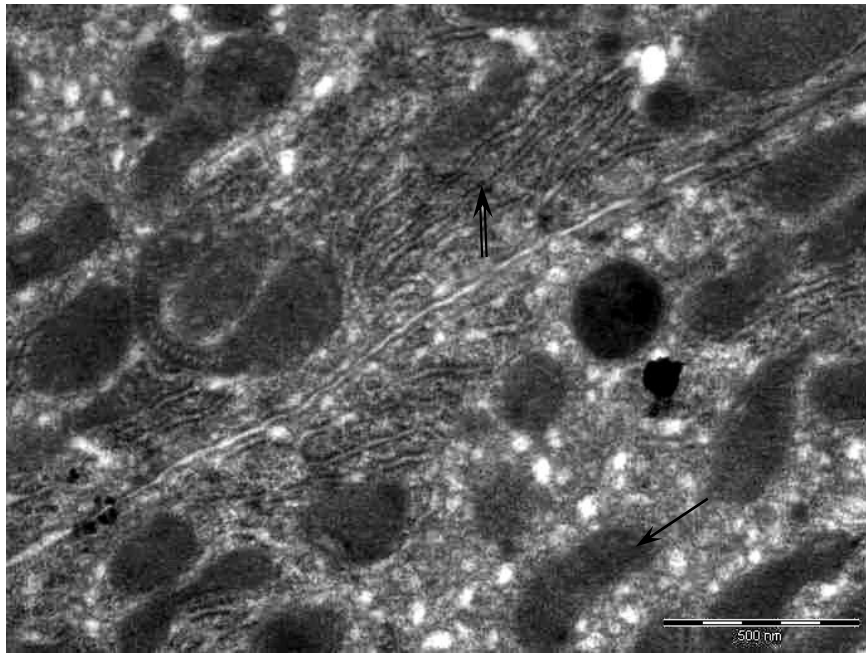


Şekil 4.22 Alkol grubuna ait hepatositte mitokondri yapısında bozulmalar (↗), endoplazmik retikulumda kırıklar (↗).



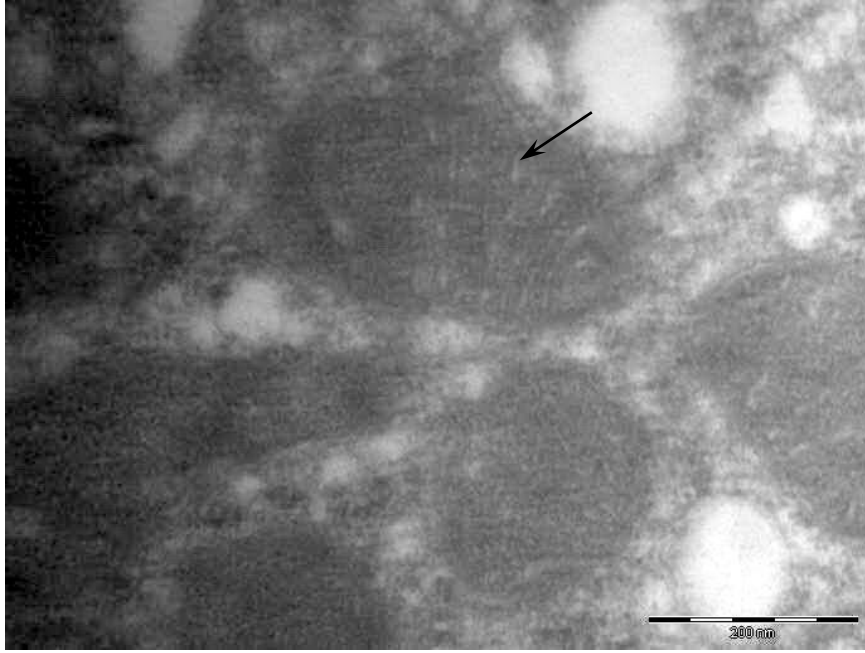
Şekil 4.23 Alkol grubuna ait hepatositte genişlemiş endoplazmik retikulumlar (↗), mitokondri yapısında bozulmalar (↗).

50 mg/kg/gün EPS uygulanan grup olan Grup III' e bakıldığında karaciğer ince yapısında iyileşme sağladığı ve kontrol grubuna (Grup I) yakın morfoloji gözlemlendi. Lipid damlacıklarına ise rastlanmadı (Şekil 4.24; Şekil 4.25; Şekil 4.26).

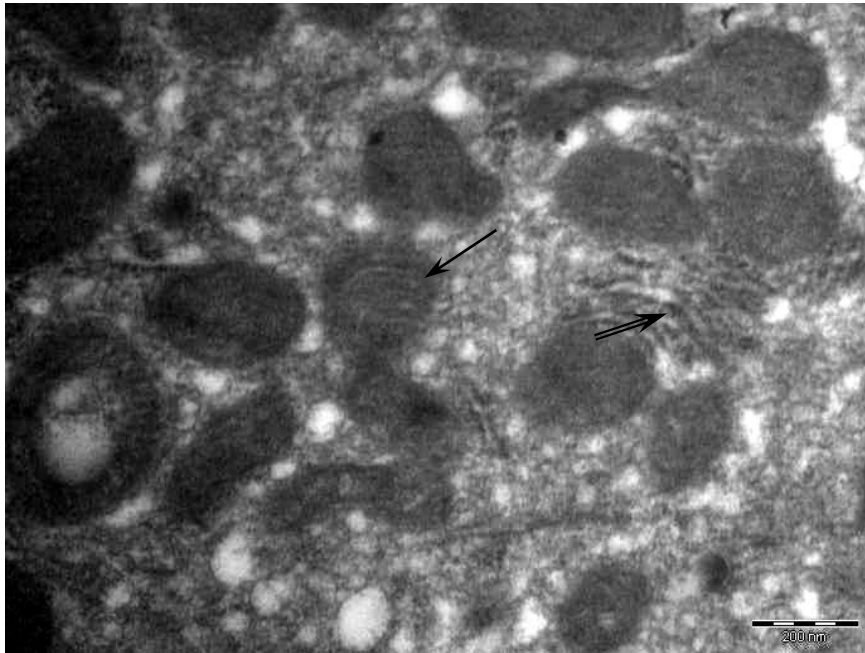


Şekil 4.24 50 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta normal görünümlü mitokondriler (↗) , endoplazmik retikulumlar (↘) lipid damlacıklarında azalma.



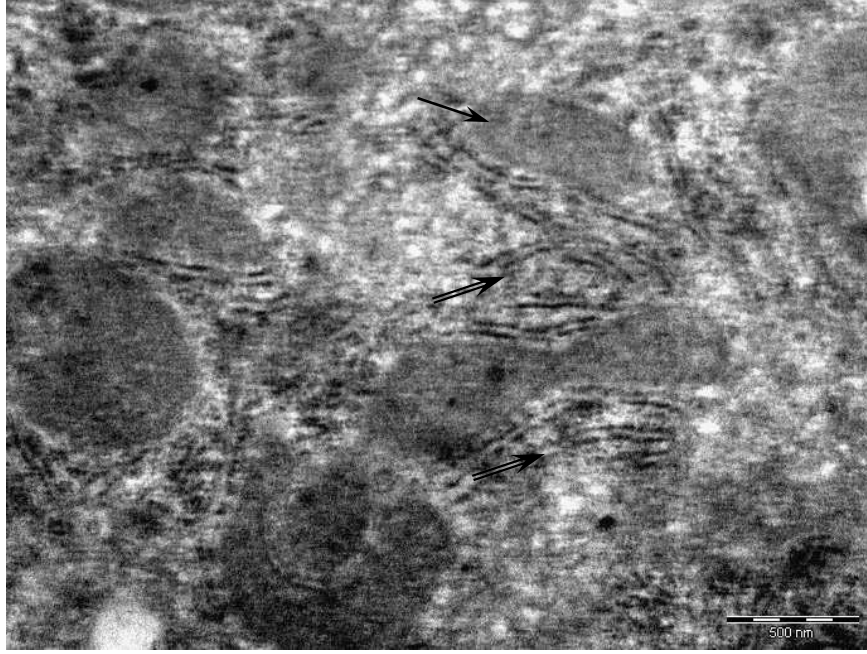


Şekil 4.25 50 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta normal görünümlü mitokondriler ve düzgün kristalar (↗).

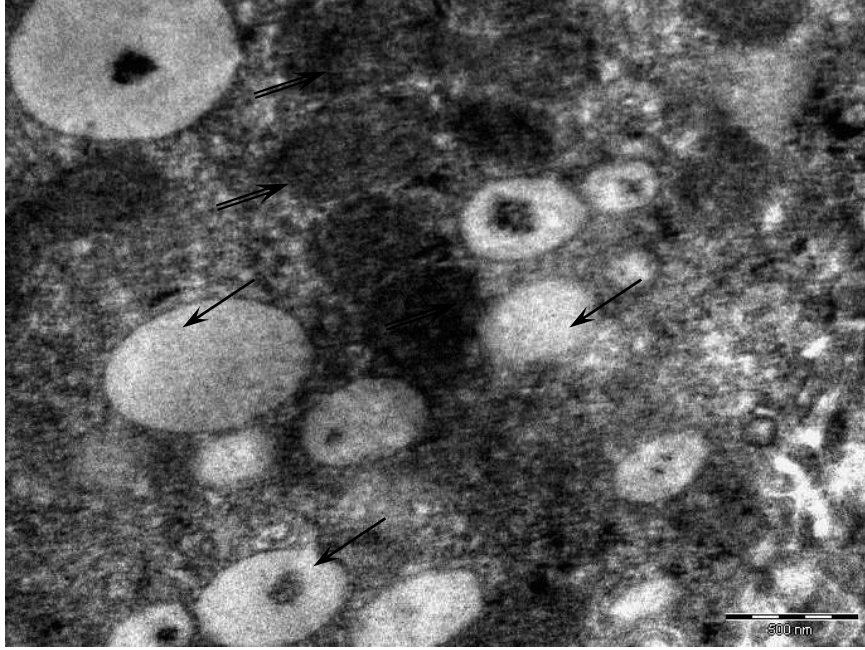


Şekil 4.26 50 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta normal görünümlü mitokondriler (↗) ve endoplazmik retikulumlar (↗).

100 mg/kg/gün EPS uygulanan grup olan Grup IV'e bakıldığında karaciğer ince yapısında endoplazmik retikulumlarda genişlemeler, mitokondri yapılarında ve kristalarında bozulmalar belirlendi. Lipid vakuollerinde artmalar tespit edildi (Şekil 4.27; Şekil 4.28; Şekil 4.29).

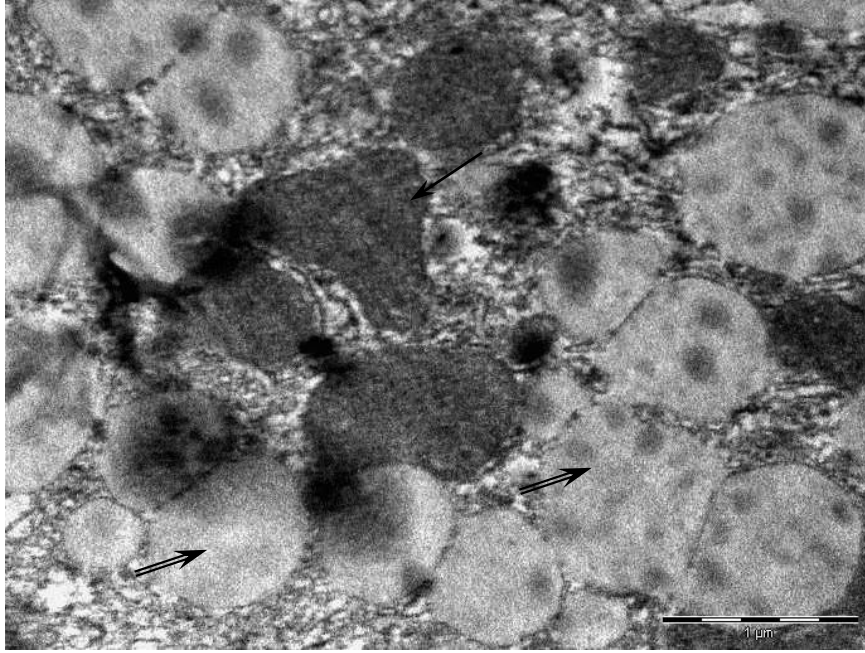


Şekil 4.27 100 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta endoplazmik retikulumlarda genişlemeler (↗), mitokondri yapılarında bozulmalar (↗).

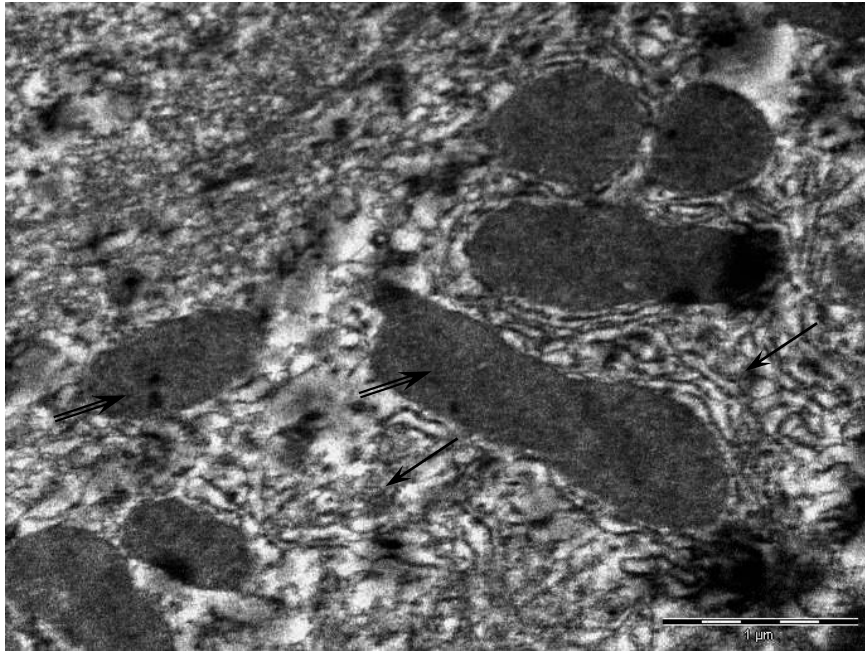


**Şekil 4.28 100 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta lipid vakuollerinde artış (↗), mitokondrilerin yapılarında bozulmalar (↗).**

150 mg/kg/gün EPS uygulanan grup olan Grup V'e bakıldığında karaciğer ince yapısında lipid damlacıklarında artmalar, mitokondrilerde genişlemeler ve krista yapılarında bozulmalar belirlendi. Endoplazmik retikulumda ise kırıklar tespit edildi (Şekil 4.29; Şekil 4.30; Şekil 4.31).



Şekil 4.29 150 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta lipid vakuollerinde artış (↔), mitokondrilerde genişleme ve yapılarında bozulmalar (↔).



Şekil 4.30 150 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta endoplazmik retikulumlarda (↔) kırıklar, mitokondrilerde genişleme (↔).



**Şekil 4.31 150 mg/kg/gün EPS uygulanan grupta mitokondrilerde genişleme kristalarında bozulmalar (↗).**

## 5. TARTIŞMA

Alkolik karaciğer hastalığı son yıllarda tüm dünya da önemli sağlık ve ekonomik sorunlarının başında gelmektedir. Uzun süre ve ağır alkol alınımı sonucunda, ölümcül karaciğer değişiklikleri olan, karaciğer yağlanması, hepatit ve karaciğer sirozu gibi hastalıkların geliştiği bilinmektedir (Bujanda, et al.,2006 ; Pramyothin, et al., 2006). Amerika da, her yıl yaklaşık 25.000 ölümün siroza bağlı olduğu, bunun yarısının ise alkol kullanımı kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Yuan, et al., 2007).

Alkol kullanımı, derecesine ve alma süresine bağlı olarak karaciğerde anlamlı yapısal ve fonksiyonel değişikliğe neden olmaktadır (Lieber, 2004). Alkole bağlı karaciğer hasarının, oksidatif stres ve serbest radikallerin üretimi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Alkolik karaciğer hastalığında; reaktif oksijen türlerinin üretimi, hepatositlerde CYP2E1 ve Kuppfer hücrelerinde NADPH oksidaz indüksiyonu olarak bilinmektedir (Kim, et al., 2009). Son yıllarda yapılan araştırmalara rağmen, alkolün hepatoksisitesinin patogenezi hakkında bilgilerimiz hala sınırlıdır. Yapılan bazı çalışmalarda karaciğer hasarında oksidatif stres ve enflamatuvar yanıtın rolü olduğu bildirilmiştir (Hu, et al., 1994). Oksidatif stres derecesinin tüketilen alkol miktarına bağlı olarak değişmekte olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Uzun, et al., 2005).

Günümüzde pek çok hastalığın tedavisinde sentetik ilaçlar kullanılmaktadır. Oysa son yıllarda, yan etkilerinin olmaması ya da bertaraf edilebilecek kadar az olması nedeniyle doğal kaynaklı preparatlar tercih edilmektedir. Geçtiğimiz on yıl boyunca mikroorganizmaların özellikle de mantarların ürettiği polisakkaritler çok dikkat çekmiştir. Bunun başlıca sebebi de bu preparatların, bağışıklığı güçlendirici, antitümör, ve hipolipidemik aktivite gösteren değişik biyolojik ve farmakolojik aktiviteye sahip olmalarıdır (Kızılcık, 2004; Hwang, et al., 2003). Literatür incelemeleri sonucunda, tıbbi amaçlarla kullanılan makrofungusların daha çok yenilebilen türler olduğu

anlaşılmaktadır. Bu tip makrofunguslar ile yapılan son çalışmalar, mantarların tıbbi açıdan başta antitümör, antimikrobiyal aktivitesinin yanı sıra hipoglisemik, hipolipidemik, karaciğeri koruyucu, antialerjik ve immun sistemi güçlendirici etki mekanizmalarının da olduğunu göstermektedir (Anke, et al., 1989; Bobek, et al., 1991; Suay, et al., 2000; Hatvani, 2001; Kim, et al., 2002; Yang, et al., 2002a ; Yang, et al., 2002b; Wasser, 2002; Yang, 2006).

Bu çalışmamızda, herhangi bir yan etkisinin saptanmaması ve besin değerinin yüksek olan yenilebilir mantarlardan birisi olan *Coprinus comatus* türü mantarlarından elde edilen ekzopolisakkaritin 3 farklı doz da alkolik karaciğer hasarı oluşturduğumuz sıçanlarda olası iyileştirici etkilerini araştırdık.

Karaciğer hücre bütünlüğünün bozulması ve hücrelerin dejenerasyonunu karaciğerde bulunan enzimlerin serum düzeylerini etkiler (Karayılanoglu, et al.1991; Kanbak, et al. 2001; Castilla, et al. 2004). Alkolik karaciğer hastalığında ALT seviyesinin artması karaciğerin alkolden etkilendiğinin belirtisidir (Gültekin, et al., 1998). ALT karaciğere spesifik sitoplazmik bir enzim olduğundan serumda düzeyinin yükselmesi hepatosit plazma membranının hasarının önemli bir göstergesidir (Champe, Harvey and Ferrier, 2007). Alkollü MSD grubu olan Grup II' ye ait serum ALT seviyesi, kontrol grubu olan Grup I' e göre daha yüksek düzeyde belirlendi. Fakat bu yükseklik anlamlı bulunmadı. EPS uygulanan gruplarda Grup IV (100 mg/kg EPS ) ve Grup V' de (150 mg/kg EPS ) kontrol grubuna göre ALT düzeyleri yükselmiş bulundu (  $p<0.05$  ). Grup IV'te ise bu artış anlamlı düzeyde değildi. Yapılan çeşitli klinik ve deneysel çalışmalarda alkolik karaciğer hastalığında alkole bağlı serum ALT düzeyleri artmış olarak bildirilmektedir (Zhou, et al., 2005; Saravanan and Nalini, 2006; Pramyothin, et al., 2006; Lu, et al., 2007; Pari and Suresh, 2008; Kim, et al., 2009). Yao ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada; 90 gün boyunca intragastrik gavaj yoluyla alkol verdikleri *Sprague-Dawley* sıçanlarının serum ALT düzeylerini kontrol

grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Yuan ve arkadaşlarının (2007) yaptıkları çalışmada ise 7 hafta boyunca intragastrik gavaj yoluyla alkol verdikleri *Sprague-Dawley* sıçanlarda serum ALT düzeylerini kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlardır.

Laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi glikolizin anahtar enzimidir ve laktat üretimini katalizler. LDH; kalp, kas, böbrek, karaciğer gibi birçok doku ve organlarda bulunan bir enzimdir. Bu doku ve organlarda hasar olduğu zaman LDH salınımı başlar (Yang, 2008). Bu nedenle hepatositlerden salınan serbest LDH ölçümü hücre nekrozu için bir belirleyicisidir.. Bu enzim tüm dokularda yaygın olduğundan klinik yönden LDH izoenzimlerinin aktivite ölçümleri total aktivite ölçümünden daha yararlıdır. LDH enziminin beş izoenzimi vardır. Kalp kası LDH1 ve karaciğer dokusu LDH5 yönünden daha zengindir ve bu nedenle LDH1 izoenzimi kalp patolojilerinde LDH5 izoenzimi ise karaciğer patolojilerinde daha çok etkilenirler. LDH enziminin tüm dokularda yaygın olması gerekçesiyle klinik yönünden LDH izoenzimlerinin aktivite ölçümlerinin total aktivite ölçülmesini önermişlerdir (Büyükbaş et al., 2006). Çalışmamızda serum total LDH seviyeleri açısından kontrol grubuna göre, Grup IV ve V de anlamlı fark bulundu ( $p < 0.05$ ). Grup III'de ise bu fark istatistiksel açıdan anlamsız olarak görüldü. EPS gruplarını, alkol grubu ile karşılaştırdığımız da, Grup IV ve Grup V de anlamlı fark bulunurken Grup III de ise bir fark görülmedi. Literatürde alkol kullanımının LDH izoenzimleri üzerine etkileri ile ilgili olarak Nemesanszky ve arkadaşlarının çalışmaları göze çarpmaktadır (Nemesanszky, et al.,1988). Bu araştırmacılara göre kronik içicilerde, içmeyenlere göre LDH-5 izoenzim seviyesinde ki artış ilgi çekicidir. Hücre kültüründe yapılan çalışmalarda ise düşük dozda alkol uyguladıklarında (0,2–5 mmol/l) LDH'ın salınımında bir azalma olurken, 10 mmol/l alkol uyguladıklarında hepatositlerden LDH salınımında keskin bir artış gözlemlemişlerdir, alkolün LDH' ın doza bağlı olarak etki gösterdiği sonucuna varmışlardır (Castilla, et al., 2004).

Büyükbaş (2006) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise kontrol grubuna kıyasla alkol grubunda LDH5 aktivitesi anlamlı artış gösterirken LDH1 ve LDH2 aktiviteleri ise anlamlı olarak azalmıştır. LDH3 ve LDH4 aktiviteleri her iki grup arasında önemli



bir fark göstermemiştir. Yasuda ve arkadaşlarının (1989) yaptıkları hayvan çalışmalarında ise, karaciğer konjesyonunda LDH3, LDH4 ve LDH5 aktivitelerinde artış, LDH1 aktivitesinde azalma tespit ederken karaciğer nekrozunda ise LDH3, LDH4 ve LDH5 aktivitelerinde artış ve LDH1 ile LDH2 aktivitelerinde azalma tespit etmişlerdir. Rotenberg ve arkadaşları (1990), çeşitli karaciğer hasarlarında LDH ve izoenzimlerini değerlendirmiş, LDH5'in kronik karaciğer bozukluklarından daha çok akut karaciğer bozukluklarında daha hassas olduğunu belirtmişlerdir. İlimli alkol alımının etkileriyle ilgili olarak çalışmalarda araştırmacılar total LDH aktivitesinde anlamlı bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir (Gill, 1982; Nemesanszky, et al.,1988). Nemesanszky ve arkadaşları (1988) ılımlı içicilere dört haftalık bir alkol perhizinden sonra yapılan alkol yüklemesinde 24 saat içinde LDH5 aktivitesinde belirgin artış gözlenirken total LDH aktivitesi normal bulunmuşlardır. Bu çalışmada LDH1, LDH2, LDH3 ve LDH4 ile ilgili herhangi bir değerlendirme yapılmamıştır. Yaptığımız çalışmanın LDH sonuçlarına baktığımızda uyguladığımız alkolün LDH seviyesini azalttığı ve dolayısıyla uygulanan alkol dozunun yeterli olmadığını söyleyebiliriz.

Uzun süre fazla miktarda alkol kullanımına bağlı olarak karaciğerde apoptozun arttığını gösteren çeşitli klinik ve deneysel çalışmalar mevcuttur (Ishii, et al., 2003; Han, et al., 2005). Kaspazlar hasarlı olan hücrelerin çevrelerine zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan programlanmış hücre ölümünü (apoptosis) uyaran proteazlardır (Yerlikaya ve Dokudur, 2009). Akut alkole maruz kalınması sonucu sitokrom c'nin salınımı kaspaz 9 ve kaspaz 3'ü aktive eder ve apoptozise yol açar (Ishii, et al., 2003; Han, et al., 2005). Çalışmamızda kaspaz 3 değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında Grup II ve III'te hiç fark olmaksızın benzerlik olduğu ayrıca, Grup I' den de istatistiksel olarak farksız olması dikkat çekicidir. İstatistiksel olarak gruplar arasında bir fark bulunamamıştır, ancak alkol uygulaması yapılan Grup II' de Kaspaz 3 aktivitesinin istatistiksel olarak fark olmamasına rağmen diğer gruplara göre yüksek olduğunu söylemek mümkündür. Bunun yanında kontrol grubu ile Grup V'e ait kaspaz 3 değerleri çok yakın bulunmuştur. Sonuç olarak Kaspaz 3 alkol alınımı sonucu hücre ölümünü indüklediğini doğrular niteliktedir. Dr Adachi ve arkadaşlarının (2001)

yaptıkları çalışmada akut alkol mitokondri aracılı apoptoza neden olduğunu göstermişlerdir. Zhou ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı çalışmada ise alkole bağlı karaciğer hücrelerinde görülen apoptoz süresince Fas/FasL sistemi aracılığı ile kaspaz 3 aktivasyonunda bir artmanın ve bu yolun alkole bağlı karaciğer hücre apoptozunda mitokondrial sitokrom c varlığında belirleyici olduğunu bildirmişlerdir (Zhou, et al., 2001).

Kronik alkol tüketiminin subseleler düzeyde deney hayvanlarında, mitokondri yapısı ve fonksiyonundaki değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (Ozata, 1989). Bu oluşan deformasyona, şişmiş organeller, membranın fiziksel özellikleri ve değişikliklerinin yanında, mitokondrial polipeptidlerin kodlanmış solunum komplekslerinin aktivitesinde ki azalması da bilinen bir gerçektir (Venkatraman et al., 2003). Alkol alınımı sonucu oluşan oksidatif stres; mitokondri permeabilitesini indükler, sitokrom c salınımı sonucu kaspaz aktivasyonu ve apoptoz mekanizmasının devreye girmesine neden olur (Ishii, et al., 2003). Sitokrom c oksidaz başta bütün hayvanların olmak üzere mayaların ve bazı bakterilerin aerobik metabolizmasında yer alan temel oksidaz enzimidir. Sitokrom c oksidaz iç mitokondri zarında yerleşmiş durumdadır. Çalışmamızda, mitokondri dış zar membran sağlamlığı sitokrom c oksidaz aktivitesi ölçülerek belirlendi. Alkollü MSD grubu olan Grup II' ye ait sitokrom c oksidaz aktivitesi, kontrol grubuna göre belirgin biçimde azalmıştır. EPS uygulanan gruplarda ise sitokrom c oksidaz aktivitesi Grup II' ye göre düşüş göstermekte bu düşüş ise EPS nin mitokondri üzerindeki koruyucu etkisini olduğunu gösterebilir nitelikte değildir. Grup III, IV ve V'e baktığımızda alkol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düştüğünü görmekteyiz. Kim ve arkadaşlarının (2001) yaptığı çalışmada, alkolün sitokrom c oksidaz'ın mRNA salınımını azalttığını belirtmişlerdir (Kim, et al., 2001).

Mitokondri membran potansiyeli (m) ve membran geçirgenliği gibi faktörlerin hücre canlılığının düzenlenmesinde oldukça önemli olduğu bilinmektedir.

Alkole maruz kalan sıçan hepatositlerinde mitokondriyal membran potansiyelindeki bozulma, buna ek olarak mitokondri membran geçirgenliğinde artış gözlenir. Mitokondri dış ve iç zarları farklı kimyasal kompozisyonlardaki enzimlere sahiptirler, bu farklılıklar da bu iki membranın ayırt edici özelliklerini ortaya koyar (Gear, 1970). Çalışmamızda alkol uygulaması yaptığımız Grup II'de mitokondriyal transmembran potansiyeli ( $\Delta\Psi_m$ ) kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). EPS uygulanan gruplarda ise mitokondriyal transmembran potansiyelinde görülen düzelme sonucunda iç zar yükünde, Grup II'ye göre anlamlı artmalar gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu bulgunun ışığında *Coprinus comatus* türü makrofungustan elde edilen 100 mg/kg/gün uygulanan EPS'nin, deneysel alkolik karaciğer hasarını azaltmak yönünde etkili olabileceğini destekler niteliktedir. Mitokondri dış zar bütünlüğüne ait parametrelere baktığımızda ise, 50 mg/kg/gün uygulanan EPS nin diğer uygulanan dozlara göre dış zar bütünlüğünü sağladığını söyleyebiliriz. Mitokondri zar potansiyeli üzerinde alkolün hiperpolarize edici etkisi olduğu ile ilgili çalışmalarda, bu hiperpolarizasyonun mitokondriyal F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPaz aktivitesi üzerinde baskı yaptığı ileri sürülmektedir (Mashimo and Ohno 2006). Alkol uygulaması yapılan çalışmalarda mitokondri harabiyetiyle ilgili benzer sonuçlar bulunmuştur (Svoboda, 1963; Lieber, 1984; Cameron, 1999; Ostrowska, 2004). Bu durum da çalışmamızı destekler niteliktedir.

Alkolik karaciğer hastalığına ilişkin olarak çok sayıda bilimsel araştırma yapılmış, bu araştırmaların çoğunda da karaciğer dokularında biyokimyasal testlerin yanı sıra histopatolojik ve ince yapı değerlendirmeleri yapılmıştır. Alkol toksisitesinde temel hedef karaciğerdir. Alkol kullanımına, derecesine ve sıklığına bağlı olarak, karaciğerde anlamlı, yapısal ve fonksiyonel değişiklikler meydana gelmektedir (Jaeschke, et al., 2002; Lieber, 2004). Alkolün, yağlı karaciğer, hepatit fibrozis ve siroza kadar birçok karaciğer hasarı yaptığı kanıtlanmıştır (Bujanda, et al., 2006). Genel olarak alkolün alma süresi ve miktarına bağlı olarak ilk verdiği zarar karaciğer yağlanması ve alkolik karaciğer hastalığında en çok görülen morfolojik değişikliğidir (Yang, 2008). Buna göre, hepatosit sitoplazmasında trigliseridlerin birikimi makrovesiküler yağlanma olarak tanımlanmıştır.

Çalışmamızın, histopatolojik değerlendirmelerinde; alkolik karaciğer de ilk göze çarpan belirti, alkol grubu olan Grup II'de yağ vakuollerinin oluşumları, nekrotik alanların oluşması ve hepatositler de dejenerasyonların görülmesi olmuştur. Yapılan benzer çalışmalar ile sonuçlarımızın uyumlu olması alkol modelimizin gerçekleştiğinin bir göstergesidir (Aşıcıoğlu, 2005; Aksoy, 2007). 50 mg/kg EPS uygulanan grupta karaciğer hepatositlerinde vakuolizasyonun azaldığı görülürken doza bağlı olarak 150 mg/kg dozunda arttığı tespit edildi. EPS'nin uygulanan bu dozunun alkolik karaciğer modelinde toksik etkili olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca uygulanan bu dozun, PMNL infiltrasyonunun görülmesi, inflamatuvar yanıtın artmasına ve bunun sonucu olarak da serbest oksijen radikallerin oluşumuna neden olabilir. Uzun süre alkol alınımının PMNL infiltrasyonunda bir artışa neden olduğu Kumar ve Vasudevan 2007 de yaptığı çalışmayla ortaya konulmuştur (Kumar and Vasudevan, 2007). Yine benzer çalışmalarda histopatolojik bulgu olarak yağlanmanın yanında PMNL infiltrasyonuna da dikkat çekmektedir (Hall, et al.,2001; Ronis, et al., 2004) Grissa ve arkadaşlarının (2007) yaptıkları çalışmada, alkol uyguladıkları grupta kontrol grubuna göre yağlanma, inflamasyon, fibrozis ve nekroz olduğu ortaya konmuştur (Grissa, et al., 2007). Pari ve Suresh'in (2008) alkol ile yaptıkları çalışmada ise alkol uyguladıkları grupta karaciğerde portal yolu ve damar tıkanıklığı etrafında dejenerasyon, yağlanma ve inflamatuvar hücreler görmüşlerdir. Bujanda ve arkadaşlarının (2006) yaptıkları çalışmada lenfosit monositik infiltrasyonlar ile beraber % 10 - % 15 arasında değişen karaciğer yağlanması gözlemlenmişlerdir. Başka bir çalışmada da 6 hafta süresince sıçanlara alkollü diyet uygulandıktan sonra karaciğer kesitleri incelenmiş, makro ve mikrovasküler yağlanmaların gözlemlendiği vurgulanmıştır (Jarvelainen, et al., 2000). Benzer şekilde Zhou ve arkadaşları (2005), 12 hafta süresince alkol diyeti uyguladıkları farelerin karaciğer biyopsi örneklerinde yağlanmanın yoğun olduğunu gözlemişlerdir (Zhou, et al., 2005).

Alkol alınımına bağlı olarak mitokondrial morfoloji ve fonksiyonlarında değişiklikler ilk önce ortaya çıkan hasardır. Alkolik karaciğer patogenezinin ilk evresi

oksidatif strese bağlı mitokondri fonksiyon kaybı olarak bilinir (Fukumura, et al., 2007). Mitokondriler sitozolik  $Ca^{++}$  artması, oksidatif stres, fosfolipidlerin parçalanması, lipid yıkımı ürünleriyle hasarlanabilir. Sonuçta ATP oluşamaz ve mitokondri hasarı ile sitozolün içine sitokrom c kaçışı görülebilir. Enerji üretimindeki değişiklikler, mitokondri kontraksiyonuna veya şişmesine neden olur. Uzun süreli kontraksiyon mitokondri iç membranı bozulması sonucu şişmeye neden olabilir. Alkole bağlı, mitokondri membranının bozulması sonucu dışarıdan aşırı kalsiyum ve fosfat girmesi ya da  $Ca^{++}$ 'un dışarıya atılamaması, mitokondrilerin kalsifikasyonuna neden olarak onların fonksiyonlarının kalıcı şekilde bozabilir. Mitokondri fonksiyonlarının bozulması, membran permeabilitesinde daha çok artışa neden olur. Mitokondrilerde permeabilitedeki artış apoptoz öncüsü moleküllerin sitozole geçmesine neden olur (Şen, 2005).

Alkolün karaciğer parankim hücrelerinde organellerin bozulmasına ve buna bağlı olarak hücrenin fizyolojik işlevlerinin aksamasına neden olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Yapılan bir çalışmada, alkol enjeksiyonundan 64 saat sonra farelerin hepatositlerinde, endoplazmik retikulum kanallarında genişleme, mitokondrilerde şişme, lizozom sayısında artma gözlenmiştir (Özata, 1989). Ayrıca inklüzyon içeren, membranla çevrili sitoplazmik dejenerasyon vakuelleri; otofajik vakuoller gözlenmiştir. Ortaya çıkan fonksiyon bozuklukları, karaciğer parankim hücrelerinde sentezlenen salgı proteinlerinin golgi kompleksinde ve endoplazmik retikulumda depolanması, karaciğer total alkalın fosfataz aktivitesinin azalması ve serum alkalın fosfataz düzeyinin artması, plazma lipoproteinlerinin yapısal bozukluğa uğrayarak aktivitelerini kaybetmesi şeklinde gözlenmektedir. Alkolün sebep olduğu karaciğer parankim hücrelerindeki yağlanmanın trigliseritlerin sentezi ve sekresyonu arasındaki dengenin bozulmasıyla ortaya çıktığı gösterilmiştir. Alkol karaciğer parankim hücrelerinde lipogenezin artmasına, yağ asidi oksidasyonunun azalmasına neden olmaktadır (Özata, 1989). Çalışmamızda 60 gün süren deneylerimiz sonucunda alkol uyguladığımız Grup II' de; karaciğer parankim hücrelerinde mitokondrilerin şiştiği ve kristalların eriyerek yok olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında yine alkol

grubunda düz endoplazmik retikulum hipertrofisi ve kırıklar tespit edildi. Bunu, karaciğerde düz endoplazmik retikulumda alkol indüksiyonuna bağlı olarak sitokrom P450 enzimlerinin aşırı miktarda üretimine bağlayabiliriz. EPS dozları açısından baktığımızda 50 mg /kg EPS dozunun mitokondri dış membran bütünlüğünü koruduğunu ve vakuollerin daha az olduğu tespit edildi. Mitokondrielerde gözlenen yapısal değişiklikler yağ asidi oksidasyonunun azalmasına ve hücrelerde yağ birikimine neden olabilir. Özata'nın 1989 yılında alkolle yaptığı çalışmada karaciğer parankima hücrelerinin sitoplazmalarında dejenerasyon vakuelleri ve otofajik vakuollerin oluşmasına paralel olarak lizozomların sayısında ve büyüklüğünde artma gözlenmiştir. Bu bulgular uzun süreli alkol alınımından sonra ortaya çıkmıştır.

Cameron ve Neuman'ın (1999) yaptıkları çalışmada, ito hücrelerinin lipid depolama kapasitesinde bir artış gözlemlenmişler ve ito hücrelerinde depolanan lipid vezikül sayısında kontrol grubuna göre yüz kat artış bulmuşlardır. Benzer bir çalışmada ise elektron mikroskopik değerlendirmelerde, alkol uygulaması yaptıkları grupta yer alan sıçanların karaciğer parankim hücrelerinin membranlarında bazı bozuklukları düşündürülen değişiklikler bulmuşlardır (Ostrowska, et al., 2004). Bu değişiklikler subelüler yapıların yanısıra plasmalemmada da görülmüştür. Kontrol grubu ile elde edilen bulgular ile alkol uygulaması yapılan grupta yer alan sıçanların karaciğerleri değerlendirildiğinde belirgin değişiklikler gözlemlenmiştir. Hepatosit yüzeyinde hücre zarına yönelik Disse's alanlarda, düzensiz ayrışma ve mikrovilluslarda atrofi gözlenmişlerdir. Buna ek olarak, belirgin perisinüsoid alanların da çeşitli içeriklerle dolu olduğu görülmüştür.

Yağlı değişme parankim hücrelerinde anormal yağ birikimini belirtir, hücre içindeki küçük yağ vakuelleri, hücre içi lipidlerin mutlak artışını gösterir. Bu, hücre öldürücü olmayan zedelenmenin indikatörü olmakla birlikte yağlı değişme bazen hücre ölümüne neden olur ve birçok durumda ölen hücrelerin çevresinde de görülebilmektedir. Yapılan bir çalışmada; karaciğerdeki yağlanmanın, gelişmiş

uluslarda en çok alkol bağımlılarında görüldüğü rapor edilmiştir (SriRajaskanthan and Preedy, 2006). Alkolün mitokondri ve mikrozoim fonksiyonlarını değiştiren hepatotoksin olduğu bilinmektedir. Artan serbest yağ asit yapımı, trigliserit kullanımının azalması, yağ asit oksidasyonu azalması, lipoprotein atılımının bloke edilmesi, lipozis artması alkole bağlı yağlı karaciğer oluşumunda sorumlu tutulmaktadır. Ama diğer yandan ki yağlı karaciğere protein malnutrisyonu, şeker hastalığı, obezite ve çeşitli karaciğer toksinleri de yağlanmaya neden olabilmektedir.

Sonuçlarımıza göre, *Coprinus comatus* makrofungusundan elde edilen ekzopolisakkaritin 50 mg/kg dozunun, alkolik karaciğer hasarında, hem elektron mikroskobu hem de ışık mikroskobu değerlendirme sonucuna göre kısmi düzelttiği fakat biyokimyasal sonuçlara bakıldığında alkol grubuna benzer şekilde yüksek olmasından dolayı uygulanan EPS dozunun 50 mg/kg'ın altında tutulmasının gerektiğini düşünmekteyiz. Bundan sonraki yapılacak çalışmalarda uygun doz aralığının tespit edilmesi gerekmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma da, herhangi bir yan etkisinin saptanmaması ve besin değerinin yüksek olan yenilebilir mantarlardan birisi olan *Coprinus comatus* türü mantarlarından elde edilen ekzopolisakkaritin 3 farklı doz da alkolik karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda olası iyileştirici etkilerini çalışılmıştır.

Çalışma sonunda biyokimyasal, sitolojik ve histolojik veriler değerlendirildi. Alanin transaminaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH) enzimlerinin serum seviyeleri ile karaciğer dokularında kaspaz 3 ve sitokrom c oksidaz aktiviteleri ile mitokondri iç ve dış zar bütünlükleri belirlendi.

Bu bulgular ışığında, histolojik, sitolojik ve biyokimyasal parametrelere bakıldığında, *Coprinus comatus* 'un 50 mg/kg dozunun uyguladığı grup ile alkol grubu karşılaştırıldığında, alkole bağlı karaciğer hasarını tedavi edici etkisi olduğunu söylemek mümkündür. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda EPS'nin uygun doz aralığının iyi belirlenmesi ve biyokimyasal parametrelerin genişletilmesi gerekmektedir.



## 7. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adachi, A. and Ishii, H., 2002, Role of mitochondria in alcoholic liver injury, *Free Radical Biology and Medicine*, 32, 6, 487-491 p.
- Akkuş, İ., 1995, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, 1. Baskı, Mimoza Yayınları, 32-37 s.
- Akşit H. ve Bildik, A., 2008, Apoptozis , *Yyü Vet Fak Derg* , 19(1): 55-63 s.
- Albano, E., French, S. and Ingelman-Sundberg, M., 1998, Cytochrome P4502E1, hydroxyethyl radicals and immune reactions associated with alcoholic liver injury, *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 22, 740-742 p.
- Altınay, B., 2008, *Cerrena Unicolor* (Bull.) Murrill tarafından eksopolisakkarit üretiminin optimizasyonu, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 62 s.
- Anke, H., Bergendorff, O. and Sterner, O., 1989, Assays of the biological activities of guanine sesquiterpenoids isolated from the fruit bodies of edible *lactarius species*. *Fd Chem. Toxic.*, 27(6),393-397p.
- Anonim, 2006, <http://www.lsbu.ac.uk/water/hygly.html>.
- Arthur, I. C., 2001, Alcohol, oxidative stress and cell injury, *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 31, No. 12, pp. 1524–1526 p.
- Badalyan, C.M., Gasparyan, A.V. and Garibyan, N.G, 2003, Investigation of the antioxidant activity of some basidial macromycetes. *Mikol. Fitopatol.*, 37, 63–68 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Bae, J. T., Sim, G. S., Lee, D. H., Lee, B. C., Pyo, H. B., Choe, T. B. and Yun, J. W., 2005, Production of exopolysaccharide from mycelial culture of *Griola frondosa* and its inhibitory effect on matrix metalloproteinase-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts, *FEMS Microbiology Letters*, 347-354 p .
- Barbisan, L.F., Miyamoto, M., Scolastici, C., Salvadori, D.M.F., Ribeiro, L.R., Eira, A.F. and de Camargo J.L.V., 2002, Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine, *J. Ethnopharmacol.*, 83, 25-32 p.
- Bashir, S., Sharma, Y., Irshad, M., Nag, T.C., Tiwari, M., Kabra, M., Dogra, T.D., 2006, Arsenic induced apoptosis in rat liver following repeated 60 days Exposure, *Toxicology*, 217, 63-70 p.
- Bayram, M., Ozogul, C., Dursun, A., Ercan, Z.S., Isik, I. and Dilekoz, E., 2005, Light and electron microscope examination of the effects of methotrexate on the endosalpinx, *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 120, 96-103 p.
- Bobek, P., Ginter, E., Jurcovicova, M. and Kuniak, L., 1991, Cholesterol-lowering effect of the mushroom *pleurotus ostreatus* pereditary hypercholesterolemic rats. *Ann. Nutr. Metab.*35, 191-195 p.
- Bujanda, L., García-Barcina, M., Gutiérrez-de Juan, V., Bidaurrazaga, J., Luco, M., Gutiérrez-Stampa, M., Larzabal, M., Hijona, E., Sarasqueta, C., Echenique-Elizondo M., and Arenas, J., 2006, Effect of resveratrol on alcohol-induced mortality and liver lesions in mice *BMC Gastroenterology*, 6:35 doi:10.1186/1471-230X-6-35p.
- Burtis, C. A. and Ashwood E. R., 2005, Klinik kimyada temel ilkeler, (Çev. D. Aslan), Palme yayıncılık, 747-756 s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Büyükbaş, S. ve İnal, A., 2006, İlimli alkol alan erkeklerde laktat dehidrogenaz izoenzim değişiklikleri, Van Tıp Dergisi, 13, 3, 85-89 s.
- Cameron, R.G. and Neuman, M.G.,1999, Novel morphologic findings in alcoholic liver disease, Clinical Biochemistry, 32, 7, 579-584 p.
- Castilla, R., González, R., Fouad, D., Fraga E. and Muntané, J., 2004, Dual effect of ethanol on cell death in primary culture of human and rat hepatocytes, Alcohol & Alcoholism Vol. 39, No. 4, pp. 290–296 p.
- Champe, R.A., Harvey R. A. and Ferrier D.R., 2007, Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri LTD.ŞTİ., 248-249 s.
- Charles, S. and Lieber, M.D., 2000, Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases, The Mount Sinai Journal Of Medicine, 67, 1, 84-94 p.
- Cooper, M. G. and Hausman, R. E., 2006, Hücre moleküler yaklaşım, (Çev. M. Sakızlı, N. Atabey), İzmir tıp kitabevi, 581-582 s.
- Daba , A.S. and Ezereonye, O.U., 2003, Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms, African Journal of Biotechnology, 2, 672-678 p.
- Das, S.K. and Vasudevani D.M., 2007, Alcohol-induced oxidative stress Life Sciences 81, 177–187 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Dilek, O. N., 2003, Karaciğer (cilt 1), Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, Yayın no: 58, 1-75 s.
- Dilek, O. N., 2003, Karaciğer (cilt II), Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, Yayın no: 58, 414-420 s.
- Ding, X.,Zhang, J., Jiang, P., Xu, X. and Liu, Z., 2004, Structural features and hypoglycaemic activity of on exopolysaccharide produced by *Sorangium cellulosum*, Letters in Applied Microbiology, 38, 223-228 p.
- Dülger,B., ve Şen, F., 1999, *Russula delica Fr.* makrofungusunun antimikrobiyal aktivitesi, Tr.J. of Biology,23,127-133 s.
- Eagles, D.A. and Chapman, G.B., 2007, A light and electron-microscope study of hepatocytes of rats fed different diets, C. R. Biologies, 330, 62-70 p.
- Erenoğlu E., 1980, Virüs, alkol ve ilaçla oluşan karaciğer hastalıkları kronikleşmede immünolojik mekanizma, Dizgi Baskı Eskişehir İktisadi ve Ticari İlimler Akademisi Basım Evi Esk, 273-284 s.
- Fausto, N. and Campbell, J. S., 2003, The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation, Mechanisms of Development, 120, 117-130 p.
- Fukumura, A., Tsutsumi, M., Tsuchishima, M., Hayashi, N., Fukura, M., Yano, H., Ozaki, K. and Takase, S., 2007, Effect of the inducer of interleukin-6 (ME3738) on rat liver treated wiht ethanol, Alcoholism Clinical and Experimental Research, 31, S1,49-53 p.
- Gear, A. R. L., 1970, İner- and outer-membrane enzymes of mitochondria during liver regeneration Biochem. J. ,120, 577-587 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Gill GV, Baylis PH, Flear CT, Skillen AW, Diggle PH. ,1982, Acute biochemical responses to moderate beer drinking. Br Med J.;285(6357):1770-3 p.
- Grissa, A.K., Mornagui, B., Aouani, E., Hammami, M., May, M. E., Gharbi, N., Kamoun, A. and El-Fazaâ, S., (2007), Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. Life Sci 80(11):1033-9 p.
- Gültekin, F., Gürbilek, M., Vatansev, H., Akkuş, İ., Karaeren, Z ve Kalak, S.,1998, Alkolün indüklediği oksidatif stresin bazı antioksidanlar üzerine etkileri, Genel Tıp Dergisi 8(3) : 105-9 s.
- Güneş, H.V., 2006, Moleküler Hücre Biyolojisi, Kaan Kitapevi, 389 s.
- Hall, P.M., Lieber, C.S., DeCarli, L.M., French, S.W., Lindros, K.O., Jarvelainen, H., Bode, C., Parlesak, A., Bode, J.C., 2001, Models of alcoholic liver disease in rodents: A critical evaluation, Alcoholism Clinical and Experimental Research, 25, 5, 254-261s.
- Hu S., ; Yin S., ; Jiang X.,; Huang D. and Shen G., 2009, Melatonin protects against alcoholic liver injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response and apoptosis ; European Journal of Pharmacology Volume 616, Issues 1-3, 287-29 p.
- İlter T. ve Tekin F., 2005, Alkol Metabolizması, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı, Güncel Gastroenteroloji; 9/1 İzmir, 58-62 s.
- Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pessayre, D. and Lemasters, J.J., 2002, Mechanisms of hepatotoxicity, Toxicol. Sci., 65, 2, 166-76 p.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Jarvelainen H, Fang C, Ingelman-Sundberg M, Lukkari TA, Sippel H, Lindros KO, 2000, Kupffer cell inactivation alleviates ethanol-induced steatosis and CYP2E1 induction but not inflammatory responses in rat liver. *J Hepatol* 32. 1900–1910 p.
- Han, J.Y. , Joo, Y. , Kim, Y. S., Lee, Y. K. , Kim, H. J. , Cho, G. J. , Choi, W. S. and Kang , S. S. , 2005, Ethanol Induces Cell Death by Activating Caspase-3 in the Rat Cerebral Cortex *Mol. Cells*, Vol. 20, No. 2, pp. 189-195 p.
- Hatvani, N., 2001, Antibacterial effect of the culture fluid of *lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17,71-74 p.
- Hu Y.,Mishin V., Johansson T., Von Bahr C., Cross A., Ronis Mjj., Badger TM. and Ingelman-Sundberg M., 1994, Chlormethiazole as an efficient inhibitor of cytochrome p450e1 expression in the rat liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269:1286-1291p.
- Hwang H., Kim S., Wonchoi J. and Wonyun J., 2003, Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinuslinteus*, *Enzyme and Microbial Technology* Volume 33, 309–319
- Kanbak, G., Inal, M. and Baycu, C., 2001, Ethanol-induced hepatotoxicity and protective effect of betaine, *Cell Biochem Funct*, 19, 4, 281-285 s.
- Karayılanoglu, T., Demirci, D. ve Karayılanoglu, V., 1991, Kronik alkoliklerde bazı biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi. *Biyokimya Derg*, 3, 51-56 s.
- Kawther M. S.,Manal A. H. and Sanaa A. A. , 2006, Hepatoprotective effect of carnosine on liver biochemical parameters in chronic ethanol intoxicated rat, *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences* 16:2, 77-86 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Kızılıcık M., 2004, Bazı makrofungus izolatlarının farklı besi ortamlarında eksopolisakkarit üretim potansiyeli üzerine çalışmalar, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 105 s.
- Kim, J.H., Kim, J.E., Kim, H.J., Roh, G.S., Yoo, J.M., Kang, S.S., Cho, Y.Y., Cho, G.J. and Choi, W.S., 2001, Ethanol decreases the expression of mitochondrial cytochrome c oxidase mRNA in the rat. *Neuroscience Letters*, 305, 2, 107-110 p.
- Kim, S.W., Hwang, H.,-J., Park, J. P., Cho, Y. J., Song, C. H. and Yun, J. W., 2002, Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media, *Letters in Applied Microbiology*, 34, 56-61p.
- Kim SJ, Lee JW, Jung YS, Kwon do Y, Park HK, Ryu CS, Kim SK, Oh GT and Kim YC , 2009, Ethanol-induced liver injury and changes in sulfur amino acid metabolomics in glutathione peroxidase and catalase double knockout mice. *J Hepatol.*, Jun;50(6):1184-91 p.
- Klein, R.F., 1999, Alcohol, Osteoporosis in Men, Chapter 21, 437-461p.
- Kunitoh, S., Imaoka, S., Hiroi, T., Yabusaki, Y., Monna, T. and Funae, Y., 1997, Acetaldehyde as well as ethanol is metabolized by human cyp2e1, the journal of pharmacology and experimental therapeutics 280:527-532 p.
- Layne, E., 1957, Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins, *methods in enzymology* 10, 447-455 p.
- Lee, B. C., Bae, J. T., Pyo, H. B., Choe, T. B., Kim, S. W., Hwang, H. J. and Yun, J. W., 2003, Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*, *Enzyme and Microbial Technology*, 6274, 1-8 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Li , B., Lu, F., Suo , X., Nan H and Li , B., 2010, Antioxidant properties of cap and stipe from *Coprinus comatus*, , *Molecules* , 15, 1473-1486 p.
- Lieber, C.S., 1984, Alcohol and the liver: Update, *Hepatology*, 4, 6, 1243-1260 p.
- Lieber, C.S., De Carli, L.M. and Sorrell, M.F., 1989, Experimental methods of ethanol administration, *Hepatology*, 10, 4, 501-510 p.
- Lieber, C.S., 2004, Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis, *Alcohol.*, 34, 1, 9-19 p.
- Loguercio C and Federico, A., 2003, Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 34, No. 1, pp. 1–10 p.
- Lu, Z.M., Tao, W.Y., Zou,X.L., Fu, H.Z. and Ao, Z.H., 2007, Protective effects of mycelia of *Antrodia camphorata* and *Armillarielle tabescens* in submerged culture against ethanol-induced hepatic toxicity in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 110 : 160-164 p.
- Marsano, L., Mendez, C., Bentley, F. and McClain, C.J., 2003, Advances in alcoholic liver disease, *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 17, 4, 625-647 p.
- Mashimo, K. and Ohno, Y., 2006, Ethanol hyperpolarizes mitochondrial membrane potential and increases mitochondrial fraction in cultured mouse myocardial cells. *Arch. Toxicol.*, 80,421–428 p.
- Maziero, R., Cavazzoni, V. and Bononi, V. 1999, Screening of Basidiomycetes for the Production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture, *Revista de Microbiologia*, 30, 77-84 p.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Merdan,O., 2007,Muğla Marmaris İlçesi (Muğla) Makrofungusları Üzerine Taksonomik Çalışmalar,Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 154 s.
- Mizuno, T., Inagaki, R., Kanao, T., Hagiwara, T., Nakamuro, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T. and Asakura, A., 1990, Antitumor activity and some properties of water-insoluble hetero-glycans from “himematsutake” the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. Agric. Biol. Chem., 54(11),2897-2905 p.
- Munusamy, S. and MacMillan-Crow, L.A., 2009, Mitochondrial superoxide plays a crucial role in the development of mitochondrial dysfunction during high glucose exposure in rat renal proximal tubular cells. Free Radical Biology and Medicine, 46, 1149-1157 p.
- Nemesanszky E, Lott JA, Arato M., 1988, Changes in serum enzymes in moderate drinkers after an alcohol challenge. Clin Chem.;34(3):525-7 p.
- Neuman, M.G., 2003, Cytokines-Central Factors in Alcoholic Liver Disease, Alcohol Research & Health, Vol. 27, No. 4, 307-316 p.
- Noyan A. , 2000, Yaşamda ve hekimlikte fizyoloji, Meteksan Anonim Şirketi, 882-883 p.
- Nuutinen HU., 1986, Activities of ethanol-metabolizing enzymes in liver diseases. Scand J Gastroenterol., 21(6):678-84 p.
- Ostrowskaa, J., Łuczaja, W., Kasackab, I., Ro'z'an'skic, A., and Skrzydlewskaa, E., 2004, Green tea protects against ethanol-induced lipid peroxidation in rat organs Alcohol 32 , 25–32 p.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Özata, A., 1989, Fare (*Mus musculus*) Karaciğer, ince bağırsak ve böbrek hücrelerinde alkolün neden olduğu ince yapı değişiklikleri, Doğa, Tu Biyol.(Genetik, mikrobiyoloji, Moleküler Biyoloji, Sitoloji) D.C. 13 S. 3 s.
- Özcan, A., ve Mengi, A., 1998, Ratlarda oral olarak verilen alkolün serum, karaciger ve böbrek ggt, alt ve ast aktiviteleri ile serum total kolesterol ve lipid düzeylerine etkileri, Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences, 22, 181-185 s.
- Paker, S., 1993, Histoloji, Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayınları, 32, 564 s.
- Pari, L. and Suresh, A., 2008, Effect of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf extract on alcohol induced oxidative stres in rats, Food and Chemical Toxicology 46: 1627-1634 p.
- Pramyothin, P., Samosorn, P., Pongshompoo, S. and Chaichantipyuth, C., 2006, The protective effects of *Phyllanthus emblica* Linn. extract on ethanol induced rat hepatic injury, Journal of Ethnopharmacology 107, 361–364 p.
- Rau, U., 2004, Glukans secreted by fungi, Turkish Electronic Journal of Biotechnology, 2, 30-36 p.
- Ronis, M.J.J., Hakkak, R., Korourian, S., Albano, E., Yoon, S., Ingelman- Sundberg, M., Lindros, K.O. and Badger, T.M., 2004, Alcoholic liver disease in rats fed ethanol as part of oral or intragastric low-carbohydrate liquid diets, Exp. Biol. Med., 229, 351-360 p.
- Rotenberg Z, Weinberger I, Davidson E, Fuchs J, Harell D and Agmon J., 1990, Alterations in total lactate dehydrogenase and its isoenzyme-5 in hepatic disorders. Ann Clin Lab Sci.;20(4):268-73 p.
- Saravan, N. and Nalini, N., 2007, Antioxidant effect of *hemidesmus indicus* on ethanol-induced hepatotoxicity in rats, Journal of Medical Food, 10 (4), 675-682 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Sherlock, S., 1975, Karaciğer safra yolları hastalıkları, (Çev Ş. Karacadağ, R. Güçalp, M. Bayık), Ankara Hacettepe Üniversitesi, 1-43 s.
- Siegmund, S., Haas, S., Schneider, A. and Singer, M.V., 2003, Animal models in gastrointestinal alcohol research a short appraisal of the different models and their results, *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* 17, 4, 519-542 p.
- Smith, Rowan and Sullivan, 2002, Medicinal Mushrooms, Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. University of Strathclyde, UK, 273p .
- Solomon, E.P, 2002, İnsan anatomisi ve fizyolojisine giriş, Birol Basın Yayın Dağıtım ve Ticaret LTD.STİ, 218 s.
- SriRajaskanthan, R. and Preedy, V., 2006, Diagnosis and management of alcoholic liver disease, a review, *Clinical Effectiveness in Nursing* 9S3, 286–294 p.
- Stewart, S., Jones, D. and Day, C. P., 2001, Alcoholic liver disease: new insights into mechanisms and preventative strategies. *Trends Mol Med.* , Sep;7(9):408-13 p.
- Suay, I., Arenal, F., Asensio, F.J., Basilio, A., Cabello, M.A., Diez, M.T., Garcia, J.B., Val, A.G., Gorrochategui, J., Hernandez, P., Pelaez, F. and Vicente M.F., 2000, Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78, 129-139 p.
- Svoboda, D.J. and Manning, R.T., 1964, Chronic alcoholism with fatty metamorphosis of the liver. Mitochondrial alterations in hepatic cells, *Am. J. Pathol.*, 44, 4, 645-662 p.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Şen S., 2005, Hücre zedelenmesi ders notları, , Ege Ü. Tıp Fak. Patoloji ABD, 1-15 s.
- Tamer, A.Ü., Gücin, F. ve Solak, M.H., 1990, *Ganoderma Lucidium* (Leys, Ex Fr.) Karst. makrofungusunun antimikrobiyal aktivitesi, X. Ulusal Biyoloji Kongresi, 18-20 Temmuz, Bildiriler Kitabı, Erzurum, 51-57 s.
- Tekin, F. ve İlter, T., 2005. “Alkol Metabolizması”. *Güncel Gastroenteroloji.*, 58- 62 s.
- Tsai, S. Y., Tsai, H. L. and Mau, J. L., 2009, Antioxidant properties of *Coprinus comatus*. *J. Food Biochem.*, 33, 368–389 p.
- Uzbay, T., Kayir, H., Çelik, T. and Yüksel, N., 2006, Acute and chronic tianeptine treatments attenuate ethanol withdrawal syndrome in rats, 30, 3, 478-485 p.
- Uzun, H., Simsek, G., Aydın, S., Unal, E., Karter, Y., Yelmen, NK., Vehid, S., Curgunlu, A. and Kaya, S., 2005, Potential effects of L-NAME on alcohol induced oxidative stres, *World J Gastroenterol*, 11, 4, 600-604 p.
- Vonghia, L., Leggio, L., Ferrulli, A., Bertini, M., Gasbarrini, G. and Addolorato, G., 2008, Alcoholism treatment study group, acute alcohol intoxication, *European Journal of Internal Medicine* 19 , 561–567 p.
- Yıldırım A., Bardakçı F., Karataş M., Tanyolaç B., 2007, moleküler biyoloji, Nobel yayın no : 1170 ,425, 437 s.
- Yamaç, M., Zeytinoglu, M., Kanbak, G., Bayramoglu, G. and Senturk, H., 2009, Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by *Cerrena unicolor*, *Coprinus comatus* and *Lenzites betulina* isolates in streptozotocininduced diabetic rats, *Pharmaceutical Biology*, 47, 2, 168-174 p.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Yang, B. K., Kim, D. H. and Song, C. H., 2002 a, Production of *Lentinus edodes* mycelia in submerged culture and its hypoglycemic effect in diabetic rats. Kor. J. Mycology, 30, 131-135 p.
- Yang, B. K., Ha, J.Y., Jeong, S.C. , Jeon, Y.J. , Ra, K.S, Das, S., Yun J.W. and Song, C. H. , 2002 b, Hypolipidemic effect of an exo-biopolymer produced from submerged mycelial culture of *Auricularia polytricha* in rats, Biotechnology Letters 24: 1319–1325 p.
- Yang, X.-J., Liu, J., Ye, L.-B., Yang, F., Ye, L., Gao, J.-R. and Wu, Z.-H., 2006, *In vitro* and *in vivo* protective effects of proteoglycan isolated from mycelia of *Ganoderma lucidum* on carbon tetrachloride induced liver injury, World Journal of Gastroenterology, 12(9):1379-1385 p.
- Yang, S.S., 2008, Alcoholic Liver Disease: Clinical and Sonographic Features, Med Ultrasound, 16(2):140–149 p.
- Yao, P., Li, K., Song, F., Zhou, S., Sun, X., Zhang, X., Nüssler, A.K. and Liu L., 2007, Heme oxygenase-1 upregulated by Ginkgo biloba extract: potential protection against ethanol-induced oxidative liver damage, Food Chem Toxicol. Aug;45(8):1333-42 p.
- Yasuda J, Syuto B, Too K, Ohfuji S., 1989, Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in bovine liver tissue, Nippon Juigaku Zasshi.;51(4):733-9 p.
- Yerlikaya A. Ve Dokudur, H., 2009, Protein yıkımının önemi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 35 (2) 93-99 s.
- Yuan, G., Gong, Z., Li, J and Li, X., 2007, *Ginkgo biloba* extract protects against alcohol-induced liver injury in rats, Phytotherapy Research *Phytother. Res.* 21, 234–238 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Venkatraman, A., Shiva, S., Davis, A. J., Bailey, S. M., Brookes, P. S. and Darley-Usmar, V. M., 2003, Chronic alcohol consumption increases the sensitivity of rat liver mitochondrial respiration to inhibition by nitric oxide, *Hepatology*; 38(1):141-7 p.
- Wang, S.Y., Hsu, M.L., Hsu, H.C., Tzeng, C.H., Lee, S.S., Shiao, M.S. and Ho, C.K., 1997, The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes, *International Journal of Cancer*, 70, 699-705 p.
- Wang, M.Y., Liu, Q., Che, Q.M. and Lin, Z.B., 2002, Effects of total triterpenoids extract from *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P.Karst. (Reishi Mushroom) on experimental liver injury models induced by carbon tetrachloride or dgalactosamine in mice, *Int. J. Med. Mushrooms*, 4, 337-342 p.
- Wasser, S.P., 2002, Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides, *Appl. Microbial. Biotechnol*, 60,258-274 p.
- Welbourn, C. R., Goldman, G., Paterson, I. S., Valeri, C. R., Shepro, D. and Hechtman, H. B., 1991, Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg*; 78: 651-5 p.
- Wheeler, M. D., 2003, Endotoxin and Kupffer cell activation in alcoholic liver disease, *Alcohol Res. Health*, 27, 4, 300-6 p.
- Wilhelm, J., 1990, Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation, *Acta Univ Carol Med Monogr*; 137:1-53 p.
- Zhou, Z., Wang, L., Song, Z., Saari, J. T., McClain, C. J. and Kang, Y. J., 2005, Zinc supplementation prevents alcoholic liver injury in mice through attenuation of oxidative stress, *American Journal of Pathology*, 166, 6, 1681-1690 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

Zovein, A., Flowers-Ziegler, J., Thamotharan, S., Shin, D., Sankar, R., Nguyen, K., Gambhir, S. and Devaskar, S.U., 2004, Postnatal hypoxic-ischemic brain injury alters mechanisms mediating neuronal glucose transport, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 286, 273-282 p.

<http://www.benbest.com/health/alcohol.html#liver>.

## ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Eskişehir de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Eskişehir 'de tamamladı. 2004 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü bitirdi. 2004 yılında Anadolu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Bilim Dalında yüksek lisansını tamamladı. 2007 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümün de doktora eğitimine başladı.