T.C.
Sağlık Bakanlığı
Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü
Şef: Uzm.Dr. Nezaket Eren

SIÇANLARDAKİ KRONİK ALKOLİK KARACİĞER HASARINA LİKOPENİN ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Yasemin Tuba AŞICIOĞLU

İstanbul-2005

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince gösterdikleri yakın ilgi ve destekten dolayı Biyokimya ve Klinik Biyokimya Şefi Sayın Dr. Nezaket Eren'e, Şef Yardımcımız Sayın Dr. Fatma Turgay'a, uzmanlarımız Sayın Başasistan Dr. Şebnem Ciğerli, Sayın Başasistan Dr. Bahar Türkmen, Sayın Dr. Nihal Yücel, Sayın Dr. Berna Aslan'a, yapmış olduğum deneysel çalışmamda doku incelenmesi aşamasında yardımlarını esirgemeyen Patoloji Şefi Sayın Dr. Fevziye Kabukçuoğlu'na, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma ve Üretim Laboratuarı'nda deneysel çalışmamı yürütebilmem için her türlü imkanı sağlayan Sayın Prof.Dr. Tuncay Altuğ'a, deneysel çalışmamdaki yardımlarından dolayı Sayın Tıbbi Biyolog Çetin Karaca ve Sayın Tıbbi Biyolog İbrahim Bayrak'a, ayrıca tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Yasemin Tuba Aşıcıoğlu

KISALTMALAR

MDA : Malondialdehit
SOD : Superoksit Dismutaz
GPx : Glutatyon Peroksidaz
ROS : Reaktif Oksijen Türleri
ADH : Alkol Dehidrogenaz
MEOS : Mikrozomal Etanol Okside Edici Sistem
ALDH : Asetaldehit Dehidrogenaz
ALT : Alanin Aminotransferaz
AST : Aspartat Aminotransferaz
MDH : Malat Dehidrogenaz
LDH : Laktat Dehidrogenaz
NADP : Nikotin amid adenin dinükleotid fosfat
NSAID : Non-steroid antiinflamatuar ilaçlar
TNF-α : Tümör nekrozitan faktör
TGF-β : Doku büyüme faktörü-beta
IL-6 : İnterlökin-6

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1- GİRİŞ ve AMAÇ…….. 1

2- GENEL BİLGİLER……. 4

Serbest Radikaller……..... 4

Alkole Bağlı Karaciğer Hastalığı……..... 17

Likopen ve Özellikleri……..... 23

3- MATERYAL METOD…… 28

4- BULGULAR……. 30

5- TARTIŞMA ……. 42

6-SONUÇ…….. 47

7- ÖZET……. 48

8-SUMMARY..... 50

8-KAYNAKLAR……... 52

GİRİŞ ve AMAÇ

Yaşamın sürekliliğinin sağlanması, hareket, iş yapabilme ve büyüme gibi bütün fizyolojik olaylar, enerji tarafından sağlanır. Tüm diğer aerobik canlılar gibi, yaşamak için oksijene ihtiyaç duyan insanlar da, enerji gereksinimini, oksidatif metabolizma yani aerobik metabolizma tarafından kontrol edilen reaksiyonlar sonucu elde eder. Aerobik metabolizma, karbon ve hidrojen içeren metabolitlerin, karbondioksit ve suya tamamen yükseltgenmesini kapsar (1). Oksijen, oksidatif metabolizma sırasında enerji eldesi için suya indirgenirken çok az bir kısmı da "serbest radikaller" adı verilen, elektronlarını kaybetmiş zararlı maddelere dönüşür. Serbest radikaller, tek elektron eksiklikleri nedeniyle başka moleküllerle kolayca elektron alışverişi yapabilir veya onlarla birleşebilirler. Böylece diğer molekülerin yapı ve fonksiyonlarını değiştirebilir, hatta pekçok dokuda hücre hasarı meydana getirebilirler. Serbest radikaller, organizmada, diğer metabolik yolların işleyişi sırasında da oluşabilmekte veya çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de meydana gelebilmektedir. Birçok hastalığın oluşması ve patolojik durumun ortaya çıkmasında serbest radikallerin rolü vardır (2, 3, 4). Bunun yanısıra, bu molekülleri yakalayıp etkisiz hale getiren, "antioksidan" adı verilen maddeler bulunur. Antioksidanlar, bu moleküllerin doku savaşlarında etkisiz hale gelmesini sağlayabilirler. Normal koşullarda vücut, doğal antioksidan sistemleriyle serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Vücudun antioksidan savunması ile serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik sonucu, hücrelerin lipid tabakası peroksidasyona uğrayarak, oksidatif stres diye adlandırılan hücre hasarları meydana gelir. Çevreden ve besinlerle, oksidan etkili zararlı maddelerin vücuda alınmasının yanı sıra, yaşın ilerlemesiyle ortaya çıkan azalan enzim aktivitesine bağlı olarak da vücudun antioksidan savunma mekanizması yetersiz kalabilmektedir. Neyse ki, antioksidan görevleri olan çeşitli vitaminler, minareller ve belirli enzimlerin dışarıdan vücuda alınabilmesi yanında, beslenme de iyi bir antioksidan savunma aracı olabilmektedir (4, 5, 6).

Gelişen dünyamızda, beslenme imkanlarının artması ile insanlar, coğrafi koşullar, iklim şartları gibi engelleri aşarak, yeni beslenme alışkanlıkları edinmişlerdir. Yanlış beslenme alışkanlıkları ve bunların ortaya çıkardığı tıbbi problemler arttıkça, sağlıklı yaşamanın ve hastalıklarla mücadelenin en temel kurallarından birinin sağlıklı beslenme olduğu ortaya çıkmıştır. Böylece besinler ve vücuda etkileri, en önemli araştırma konularından biri haline gelmiştir. Bir yandan ideal diyetler ve mutfak kültürleri, diğer yandan kalori hesapları ve tabii ki tedavi edici veya hastalıkları önleyici etkileri olan gıda maddeleri, birçok bilim dalı ve adamı tarafından araştırılmıştır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda domates ve domates ürünlerinin, antioksidan olarak kabul edilen yüksek likopen içerikleri nedeniyle beslenme ve sağlık üzerine yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir (7).

Likopen, sebze ve meyvelerde doğal olarak bulunan karoten (*carotenoid*) ailesine ait bir pigmenttir. Domatese ek olarak domates ürünleri de likopen açısından zengindir. Likopen, aynı zamanda antioksidan bir maddedir. Likopen, hücreleri serbest radikal hasarından korumasının yanı sıra, hücreler arasındaki bağları güçlendirmekte ve hücre metabolizmasını geliştirmektedir. Yağda çözünen, yağ miktarı fazla doku ve organlarda etkinliği artan likopenin, yağ içeriği oldukça fazla bir organ olan ciltte de antioksidan-koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır. Likopen, cilt hücreleri arasındaki bağları da kuvvetlendirmektedir. Diğer bir yararlı etkisi, ultraviyole ışınlarına karşı koruma sağlamasıdır. Likopen aynı zamanda kolesterol düşürücü özelliğe de sahiptir. Göğüs, rahim, karaciğer, prostat kanserlerinden koruyan, Alzheimer hastalığını önleyen, kalp damar hastalıkları, kemik ve cilt sağlığı açısından koruyucu etkisi bulunan likopen, antioksidan özelliğiyle yaşlanma sürecini yavaşlatmaktadır (8, 9, 10).

Karotenoidlerin antioksidan özellikleri, onların kimyasal yapılarının tekli ve konjuge çift bağlı bir sistemle 40C ünitinin kuyruk kuruğa bağlanması ile şekillenen tetraterpen yapısında uzamalarının bir sonucudur. Bu yapının sağladığı radikal toplama özelliği, çoğu epidemiyolojik olmak üzere, yapılan araştırmalarda bazı kanser tipleri, kalp rahatsızlıkları ve dejeneratif göz hastalıklarında koruyucu etkisinin tespitiyle ortaya konmuştur (11, 12).

Karotenoidler grubundan likopenle yapılan bazı çalışmalarda, likopenin, oksidatif hasarla korelasyon gösterdiği bilinen ve yağ asidi oksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeyini düşürdüğü, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) gibi endojen antioksidanların aktivitelerini ise artırdığı gösterilmiştir (11, 13, 14). Oksidatif stres oluşumunda rol alan ve birçok araştırıcı tarafından deneysel olarak karaciğer hasarı oluşturduğu tespit edilen kimyasallardan biri alkoldür (15).

Alkol kullanımı, derecesine ve sıklığına bağlı olarak, karaciğerde anlamlı, yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olmaktadır (16, 17). Bu patolojiler arasında yağlı karaciğer, alkolik hepatit, hepatik fibrozis ve siroz sayılabilir. Akut ve kronik alkol kullanımının oluşturduğu karaciğer doku hasarını izlemede alanin amino transferaz (serum glutamat – piruvat amino transferaz) ve aspartat amino transferaz (serum glutamat – oksaloasetat amino transferaz) tayininin yaralı olduğu gösterilmiştir (18, 19).

Alkol, etkisini, yıkım ürünü asetaldehite bağlı olarak, çeşitli mekanizmalarla ve önemli olarak da lipit peroksidasyonu ve serbest radikal artışı yaparak gösterir. Serbest radikaller ile lipit peroksidasyonu, hücre hasarı ve hücre zar yapısı bozulmasında birincil mekanizma olarak rol oynar (17, 20, 21).

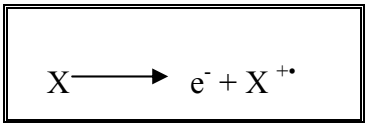
Biz de çalışmamızda, oksidatif stres ile açıklanan alkolik karaciğer hastalıklarının gelişim sürecinde, deneysel olarak antioksidan özellikleri bilinen likopenin koruyucu etkisini araştırdık.

GENEL BİLGİLER

SERBEST RADİKALLER

Canlı hücrelerin yapıtaşlarını oluşturan moleküllerin atomları, kovalan bağlarla birbirine bağlıdır. Bu tip bağlar paralel olmayan yörüngelere sahip iki komşu atomun arasındaki elektronun ortaklaşa kullanılmasına dayanmaktadır. Yeterli bir enerji kaynağı ile (radian ısı veya çoğu kez kimyasal etkiler) bu bağ kopabilir. Bu tip bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, kimyasal reaktiviteleri yüksek molekül veya atomlar "serbest radikal" olarak adlandırılırlar (22, 23). Radikal, eşleşmemiş elektronun atomik yada moleküler orbitali kendi başına işgal etmesidir. Sembolün üzerine bir nokta konur, bu serbest radikal türlerine özgü bir işarettir (24).

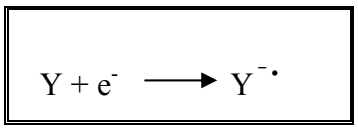
Radikaller; ya, radikal olmayan atom veya molekülden bir elektron kaybıyla oluşabilir (Reaksiyon-1),



Reaksiyon-1

Ya da radikal olmayan atom veya molekülün bir elektron kazanması ile oluşur

(Reaksiyon-2).



Reaksiyon-2

SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen (O_2), elektron alıcısı olarak, aerob organizmaların yaşamı için gerekli bir maddedir. Memeliler hücrelerindeki ATP üretiminin büyük bir kısmını mitokondrial elektron transport sisteminde, oksijenin dört elektronunun su (H_2O)

oluşturmak üzere indirgenmesiyle elde ederler. Fakat bu süreçte oksijenin %1-3'ü tam olarak suya dönüşemez ve ara ürün olarak serbest oksijen radikalleri ve bunların da çeşitli reaksiyonları ile reaktif oksijen türleri (ROS) meydana gelir (Tablo 1) (24, 25).

Tablo 1:Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Süperoksit radikali ($O_2^{-\bullet}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$)	Lipit hidroperoksit (LOOH)
Hidroperoksil radikali ($HO_2^{\bullet}$)	Hipokloröz asid (HOCL)
Alkosil radikali ($LO^{\bullet}$)	Singlet oksijen ($^1\Delta gO_2$)
Peroksil radikali ($LOO^{\bullet}$)	Ozon (O_3)
Thiyl radikali ($LS^{\bullet}$)	Peroksinitrit ($ONOO^-$)
Nitrik oksit ($NO^{\bullet}$)	

SÜPEROKSİT RADİKALİ: Soluduğumuz oksijen iki radikalli, iki tek elektron içeren ve çok stabil olan bir moleküldür, bir dış enerji kaynağı sayesinde bir elektron kazanmakla serbest elektronlarından birisini negatif yük elde ederek çift konuma getirebilir. Bu molekül süperoksid anyonudur ($O_2^{-\cdot}$) (Reaksiyon-3) (22).

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{-\bullet}$$

Reaksiyon-3

Yalnızca bir eşleşmemiş elektronlu superoksit, O_2'in isminin süper olmasına rağmen kendisinden daha az radikaldir. Sitoplazmadaki $O_2^{-\cdot}$ nin başlıca kaynağı endoplazmik retikulumdaki sitokrom P450 sistemidir (26).

Basit ancak spontan olarak, reaktif bir radikal olan superoksit anyonu organik moleküllerin çeşitli yıkım reaksiyonlarında rol oynayabilir. Superoksit anyonu genellikle zararlı oksidatif bir faktör olarak kabul edilmesine rağmen, aslında direkt olarak sadece nükleofilik özelliklerine dayanarak etki yapar ve aktivitesi sadece proton (H^+) bulunmayan ortamlarda ortaya çıkar. Böyle ortamlarla iki fosfolipidik kattan oluşan hücre membranında karşılaşmak mümkündür. Burada $O_2^{-\bullet}$, deesterifikasyon ile fosfolipid moleküllerinin yağ asitlerini serbestleştirmek suratiyle fosfolipoproteinli yapının stabilitesini bozar. Ama proton içeren ortamlarda $O_2^{-\bullet}$ molekülünün ömrü kısadır, $O_2^{-\bullet}$ molekülü tekrar O_2 molekülü olabilmek için kendi elektronunu başka bir superoksit anyona transfer eder. Böylelikle, O_2 molekülü ve hidrojen peroksit (H_2O_2) molekülü oluşmaktadır (Reaksiyon 4).

$$O_2 + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$$

Reaksiyon-4

Genellikle, $O_2^{-\bullet}$ molekünün, fazla toksik olamadığı ancak daha reaktif oksijen kökenli metabolitler için prekürsör olduğu kanısı mevcuttur (3, 4, 26).

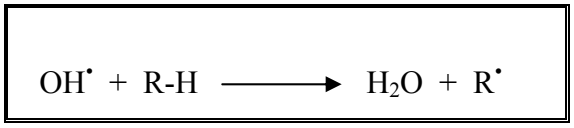
HİDROJEN PEROKSİT: Oksidandır ama reaktif değildir. Geçiş metalleri varlığında, hidroksil radikali için bir kaynak oluşturur (26).

HİDROKSİL RADİKALİ: Hidrojen peroksit, demirin ferro iyonu (Fe^{2+}) varlığında "fenton reaksiyonu" na girerek bir hidroksil iyonu (OH^-) ve stabil organik yapıların çoğuna hücum edebilecek, en güçlü oksitleyici madde olan bir hidroksil radikaline ($OH^{-\bullet}$) ayrışır (Reaksiyon 5).

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{+3} + OH + OH^{\bullet}$$

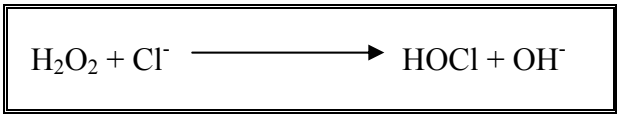
Reaksiyon-5

Bu hidroksil radikalleri, çok hızlı olarak komşu moleküllerle reaksiyona girerler, yarı ömürleri çok kısadır. Bunun sonucunda stabil, yarı ömürleri daha uzun ve daha az reaktif radikaller oluşur (24, 26) (Reaksiyon-6).



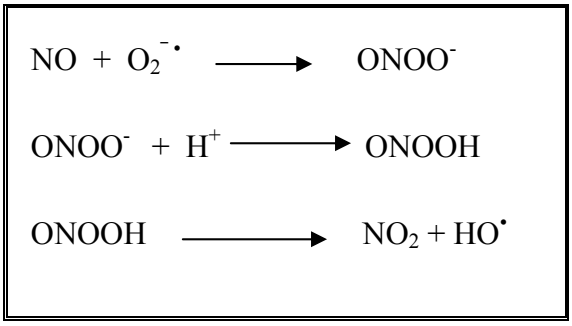
Reaksiyon-6

HİPOKLORÖZ ASİD: Enzimatik olarak, nötrofiller tarafından üretilir, güçlü bir oksidandır. Fagositik hücrelerce bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynar. Aktive olan nötrofiller, makrofajlar ve eozinofiller, $O_2^{-\bullet}$ üretirler. Özellikle nötrofiller, içerdikleri myeloperoksidaz enzimi aracılığıyla, $O_2^{-\bullet}$'in dismutasyonuyla oluşan hidrojen peroksiti, klorür iyonuyla birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl (hipokloröz asit)'e dönüştürür (4) (Reaksiyon-7).



Reaksiyon-7

NİTRİK OKSİT: Bu lipofilik serbest radikal, damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla L-arjininden sentezlenir. Kolayca düz kasa geçerek guanilat siklaz enziminin "hem" demirine bağlanır ve cGMP sentezini uyarıp damar gevşemesini uyarır. NO, aynı zamanda tiyol gruplarını S-nitrozilasyona uğratarak protein ve reseptör fonksiyonlarını da değiştirir. NO, oluşmuş olan ROS'ları ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOOH) oluşturmakta ve bunun da ileri dekompozisyonla $HO^{\bullet}$ radikali oluşumuna yol açmaktadır (4, 5) (Reaksiyon-8).

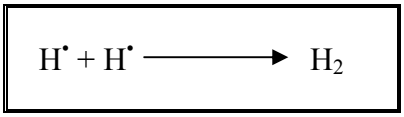


Reaksiyon-8

SİNGLET OKSİJEN: Enerji verilmek suretiyle meydana gelebilen oksijenin oldukça reaktif şekli singlet oksijen ($O_2^{\uparrow\downarrow}$) olarak bilinmektedir. Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmaması nedeniyle serbest radikal olmadığı halde ROS'ları arasında yer alan $O_2^{\uparrow\downarrow}$ serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olması açısından önem taşımaktadır. Vücutta deri ve retina gibi gün ışığına maruz kalan bölgelerde sıkça oluştuğu tespit edilmiştir (26).

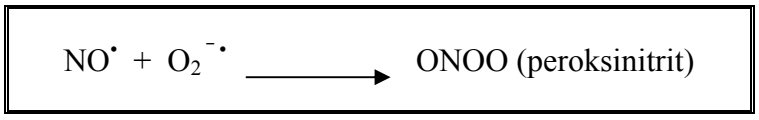
RADİKALLER NASIL REAKSİYON YAPARLAR?

Eğer iki serbest radikal karşılaşırlarsa, eşleşmemiş elektronları kovalent bir bağ kurarak birleşirler. Örneğin; Atomik hidrojen diatomik hidrojen olur (Reaksiyon-9).



Reaksiyon-9

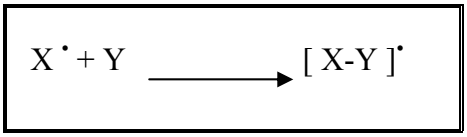
Nitrik oksit radikali ($NO^{\cdot}$) ve $O_2^{-\cdot}$ radikalinin çok hızlı reaksiyona girerek radikal olmayan bir ürün (peroksinitrit) şekline dönüşmesi biyolojide oldukça geçerli bir örnektir (5) (Reaksiyon-10).



Reaksiyon-10

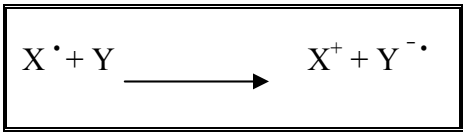
Bununla birlikte ne zaman serbest radikaller bir radikal olmayanla reaksiyona girse sonuç olarak yeni bir radikal ve zincir reaksiyonu kurulabilir (27).

1- Bir radikal başka bir moleküle eklenebilir, ancak hala eşleşmemiş bir elektrona sahiptir (Reaksiyon-11)



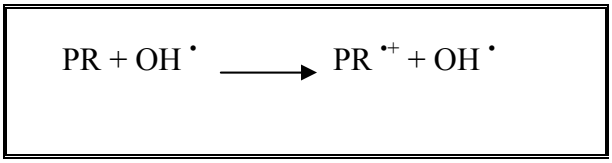
Reaksiyon-11

2- Radikal indirgenmiş bir ajan olabilir (radikal olmayana bir elektron bağışlamış). Bu, alıcının eşleşmemiş bir elektrona sahip olması demektir (Reaksiyon-12).



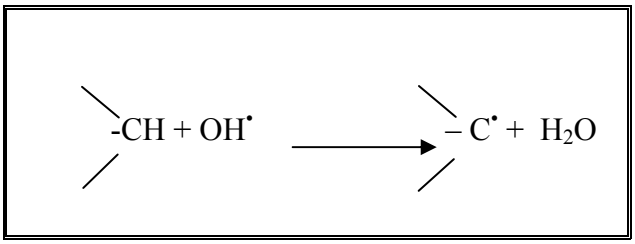
Reaksiyon-12

3- Radikal, radikal olmayandan tek bir elektron alarak oksitlenmiş bir ajan olabilir. Radikal olmayan daha sonra eşleşmemiş elektronu bırakmalıdır (Reaksiyon-13).



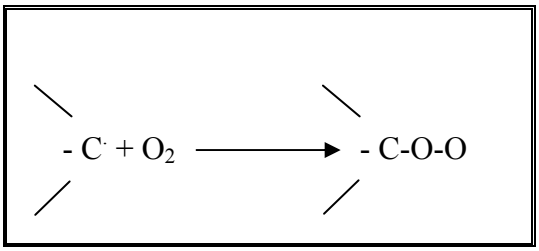
Reaksiyon-13

4- Radikal bir C-H bağından bir hidrojen atomu çalabilir. Hidrojen atom olarak yalnızca bir elektrona sahiptir, eşleşmemiş bir elektron karbondan koparılmalıdır (Reaksiyon-14).



Reaksiyon-14

5- Karbon merkezli radikaller genellikle lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu çoğaltan peroksil radikaller yapmak için O_2 ile reaksiyon yaparlar (Reaksiyon-15).



Reaksiyon-15

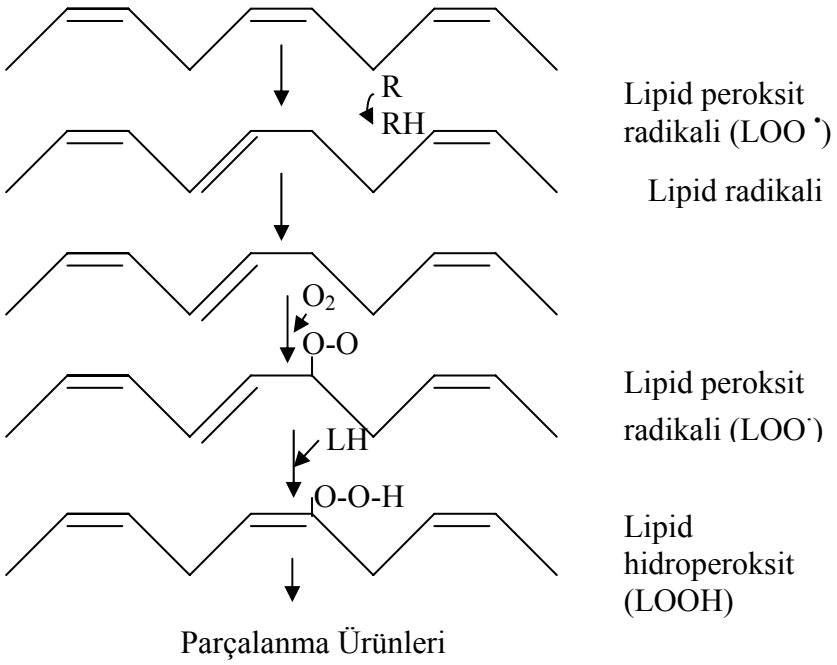
Çeşitli patolojik durumlarda, normalden fazla miktarda serbest oksijen radikali oluşmasıyla veya organizmanın antioksidan sisteminin yetersiz kalmasıyla artan serbest radikaller hücrenin çeşitli bileşenleri ile etkileşerek hücrede yapısal ve fonksiyonel bozukluğa neden olurlar.

Oksijen radikallerinden etkilenebilecek başlıca vücut kimyasal maddeleri arasında proteinler (enzimler ve kollajen), nörotransmitterler, nükleik asitler sayılabilir. DNA ve hücre membranlarının başlıca bileşenleri olan yağ asitleri de radikallerden etkilenirler (2).

LİPİD PEROKSİDASYONU

Lipit peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan, membran fosfolipitlerindeki çok doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece membran lipit yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan kimyasal bir olaydır (28).

Lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli bir radikal etkisi ile membran yapısında bulunan konjuge olmayan çok doymamış yağ asidi zincirindeki metilen gruplarından, bir hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlamaktadır. Bu olay, yağ asidi zincirinin radikalleşmesine neden olur. Oluşan lipid radikali ($L^{\bullet}$) dayanıksızdır ve bir dizi spontan değişikliğe uğrayarak oluşan konjuge dienler daha stabildir. Lipit radikalinin moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu lipit peroksit radikali ($LOO^{\bullet}$) meydana gelmektedir. Bu radikaller de membran yapısındaki diğer çok doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumunu sağlamakta, kendileri de açığa çıkan H_2 atomlarını alarak Lipit Hidroperoksitler'ine (LOOH) dönüşmektedir (Şekil 1). Lipid hidroperoksitlerden, Fenton tipi bir reaksiyonla aldehit ve alkanlar oluşur. Üretilen hidroperoksitler daha fazla radikali yıkarak, lipit peroksit, etan ve pentan gibi uçucu gazlar oluşur. Aldehitler en toksik ürünlerdir. Plazma MDA konsantrasyonu non-enzimatik lipit peroksit oluşumunun bir sonucudur (29).



Şekil 1: Çoklu Doymamış Yağ asitlerinin Peroksidasyonu (29)

LİPİD PEROKSİDASYONU NASIL BAŞLAR?

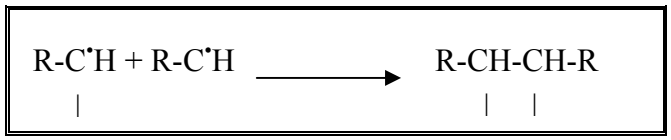
Lipid peroksidasyonu, bir metilen grubundan ($-CH_2-$) hidrojen atomu kopartabilecek reaktiviteye sahip herhangi bir ROS'un lipit molekülüne saldırısıyla başlar. Hiç çift bağ içermeyen veya bir çift bağı olan yağ asitleri oksidatif hasara çok doymamış yağ asitlerinden daha dirençlidirler. Birçok membran ve lipoproteinlerde ise bu çok doymamış yağ asitleri bulunur (29).

Hidroksil radikalleri eğer hidrokarbon yan zincirlere ulaşabilmişlerse peroksidasyonu başlatabilirler. Hücre dışında oluşmuş $OH^{\bullet}$ ayrıca ekstrinsik proteinlere ve fosfolipitlerin baş gruplarına saldırabilirler. Akışkan solusyonların radyolizi $OH^{\bullet}$ üretir. Bu $OH^{\bullet}$ da ortamdaki tüm lipitlerin peroksidasyonunu stimüle eder. Bu olay sadece biyolojik membran ve yağ asitlerinde gösterilmekle kalmamış ayrıca yiyecek lipitlerinde de gösterilmiştir. Tersine $O_2^{-\bullet}$, lipitlerden H koparacak kadar reaktif değildir ve yükü zaten onun membrandan geçmesini engelleyecektir. Bu nedenle $O_2^{-\bullet}$ biyolojik membranları geçemez, ancak tek istisna eritrosit membranıdır. Burada $O_2^{-\bullet}$, Cl^- ve bikarbonatın (HCO_3^-)

geçişini sağlayan bir iyon kanalı vasıtasıyla içeri girebilir. $O_2^{-\bullet}$ nin protonlanmış formu olan $HO_2^{\bullet}$ daha reaktiftir ve izole yağ asitlerinden, örneğin; Linoleik, linolenik ve araşidonik asitten $H^{\bullet}$ koparabilirler. $RO^{\bullet}$, $RO_2^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$ ve $HO_2^{\bullet}$ kadar çeşitli demir-oksijen kompleksleri de H koparabilme ve peroksidasyonu başlatabilme yeteneğine sahiptirler (29).

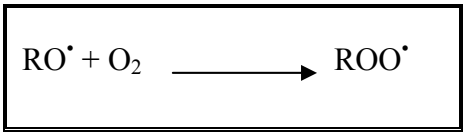
LİPİD PEROKSİDASYONUNUN İLERLEMESİ

Hidrojen atomu yalnızca bir elektrona sahip olduğundan metilen ($-C^{\bullet}H_2-$) grubundan hidrojen radikali koparılması, arkasında, karbon üzerinde eşleşmemiş bir elektron bırakır. Karbon radikalleri çeşitli reaksiyonlara uğrayabilir. Örnek olarak iki tanesi membran içinde karşılaşırlarsa yağ asidi yağ zincirleri ile çapraz bağ yapabilirler (Reaksiyon-16).



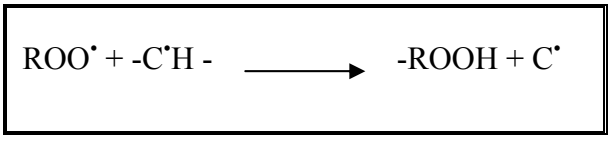
Reaksiyon-16

Bununla birlikte oldukça muhtemeldir ki aerobik şartlar altında karbon radikalinin bağı özellikle membranın içine doğru konsantre olan hidrofobik molekül O_2 ile birleşir. O_2 ile reaksiyon bir peroksil radikali (ROO^{-} veya $RO_2^{\bullet}$) verir (Reaksiyon-17).



Reaksiyon-17

Peroksil radikallerinin komşu yağ asidi yan zincirleri gibi başka lipit moleküllerinden H koparabilme yetenekleri vardır (Reaksiyon-18).



Reaksiyon-18

Peroksil radikali lipit peroksit (LOOH) oluşturmak için koparılan hidrojen atomu ile birleşir veya oluşan karbon radikali başka bir peroksil radikali oluşturmak için O_2 ile reaksiyona girebilir ve böylece lipit peroksidasyonunun uzun zincir reaksiyonu devam edebilir (3, 29).

PROTEİN OKSİDASYONU

Protein oksidasyonu, proteinlerin ROS veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu meydana gelir (26). Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları, enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir (22, 24, 30).

DNA OKSİDASYONU

Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir. Oksidatif modifikasyon sonucunda DNA antijenik karakter kazanmakta ve anti DNA antikorları oluşmaktadır (30, 31).

KARBONHİDRAT OKSİDASYONU

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu; Hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehidler meydana gelir. Bağ dokunun önemli bir mukopolisakkariti olan hiyaluronik asidin, inflamatuar eklem hastalıklarında sinovial sıvıda artmış olan H_2O_2 ve $O_2^{-\bullet}$ ile parçalandığı gösterilmiştir (28).

SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNE KARŞI ANTİOKSİDAN SAVUNMA

Organizmada, ROS'ların hasar oluşturucu etkilerine karşı antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Normal koşullarda bu toksik türlerin hasar oluşturucu etkileri antioksidanlarla sınırlanmaktadır (Tablo 2 ve Tablo 3). Böylece oksidatif hasara bağlı

olarak ortaya çıkan doku hasarı en aza indirilmektedir. Serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki hassas denge korunmadığı takdirde, hücre hasarına kadar giden bir çok patolojik değişiklik ortaya çıkar (Tablo 4). Antioksidanlar doğrudan etkiyle oksidanları inaktif hale getirebilirler (30, 32, 33).

Tablo 2: Bilinen Farmakolojik (Eksojen) Antioksidanlar (33)

Antioksidan Sınıfı	Spesifik Tipi	İşlevi
Ksantin oksidaz inhibitörleri	Allopurinol, Oksipurinol, Pterin aldehit, Tungsten	Süperoksit üretimini inhibe eder
Proteaz İnhibitörleri	Soya tripsin inhitör, Serin proteaz inhibitör	Ksantin dehidrogenazdan oksidaz oluşumunu bloke eder
NADPH oksidaz inhibitörleri	Fenilmetilsülfonil , Adenozin, Lokal anestezikler, Ca^{++} kanal blokerleri, NSAID, Cetiedil	Makrofajlarda NADPH oksidaz ile süperoksit inhibisyonu
SOD	IgA bağımlı, Polietilen glikol SOD, Ginko Biloba (Egb 761)	Süperoksitten hidrojen peroksit dismütasyonunu katalizler
Katalazlar	Polietilen glikol Katalaz Lipozom kapsüllü katalaz	H_2O_2'nin oksijen ve suya indirgenmesi
Nonenzimatik toplayıcılar	Mannitol Albumin Dimetil sülfoksit 17-aminosteroit lazoroitler Glutatyon Ürik asit Spin tuzakları	Hidroksil radikal giderici Geniş çaplı oksidan toplayıcı Fe, Süperoksit ve hidroksil toplayıcı H_2O_2 ve hidroksil giderici Süperoksit giderici Süperoksit ve hidroksil giderici Tüm radikalleri toplar
Demir redoks zinciri inhibitör	Bilirubin Desferoksamin, Apotransferrin, Seruloplazmin	Peroksidasyon zincirini bozar Serbest Fe^{+3} atomlarını bağlayarak radikal reak. önler
Endojen savunma artıran ajan	Antinötrofil serumu Monoklonal antibodiler Platelet aktive edici faktör	Hücresel glutatyon peroksidaz enzim aktivitesini artırır Nötrofillerin endotele adezyonunu inhibe eder Nötrofillerin adezyonunu inhibe eder

Tablo 3: Bilinen Doğal (Endojen) Antioksidanlar (33)

Antioksidanlar	**Yapısı**	**Yerleşimi**	**İşlevi**
Sitokrom oksidaz	Tetramerik protein	Plazma	Süperoksit nötralizanı
SOD	CuZn, Mn SOD	Mitokondri, serum	Süperoksiti H_2O_2'ye çevirir
Katalaz	Hemoprotein	Peroksizomlar	Peroksit nötralizanı
GPx	Selonoprotein	Sitosol, mitokondri	Lipit peroksidasyon ürünlerini indirger
GSH-redüktaz	Dimerik protein	Sitosol, mitokondri	Disülfitleri indirger
α- tokoferol	Yağda çözünen vitamin	Membranlar, ekstrasellüler ortam	Peroksidasyonu azaltır
β- karoten	Vit-A prekürsörü	Hücre membranları	Peroksil temizleyicisi
Glutatyon	Tripeptit	İntrasellüler ortam, alveoller	Rredoks substratı
Ürik asit	Okside pürin bazı	Geniş bir dağılım gösterir	Hidroksil toplar, Vit C'yi korur
Sistein	Amino asit	Geniş bir dağılım gösterir	Organik bileşikleri indirger
Albumin	Protein	Plazma, serum	Serbest radikal giderici
Bilirubin	Hemoprotein ürün	Dolaşım kanı, dokular	Zincir kırıcı antioksidan
Seruloplazmin	Protein	Dolaşım kanı, dokular	Süperoksiti H_2O_2'ye çevirir
Transferrin	Glikoprotein	Plazma	Demir iyonlarını bağlar
Laktoferrin	Protein	Plazma	Demir iyonlarını bağlar
Ferritin	Glikoprotein	Dolaşım kanı, dokular	Doku demiri bağlayıcısı
Askorbik asit	Suda çöz. vitamin	Hücre içi ve dışı sıvıları	Vit E'yi rejenere eder

Tablo 4:Serbest Oksijen Radikallerinin Neden Olduğu Düşünülen Bazı Klinik Durumlar (33)

Olgu Grubu	Olgu Adı
Yaşlanma	Prematür yaşlanma hastalıkları
İyonize edici radyasyon	Nükleer patlamalar, Radyoterapi seansları Hipoksik hücre aktivatörleri, Solar radyasyon hasarı
Alkolizm	Alkol indüksiyonuna ilişkin aşırı demir yüklemesi Alkolik miyopati
Kan elemanları patolojileri	Fenilhidrazin primakin vb. ilaç toksikasyonları Kurşun zehirlenmesi, Favizim, Protoporfirin fotooksidasyonu Malarya, Orak hücre anemisi, Fanconi anemisi
İnflamatuvar-immun hasar	İdiyopatik ve membranöz glomeruloınefrit Vaskülit, Hepatit (B), Otoimmun hastalıklar, Romatoid artrit
İskemi-reperfüzyon hasarı	Felç, Miyokard enfarktüsü, Aritmiler, Transplantasyonlar, Donma
Akciğer pataolojileri	Sigara ve organik yanık dumanı inhalasyonu, Amfizem, Bronkopulmoner displazi, Fotokimyasal kirler, Oksidan kirleticiler (O_3, NO_2)
Kardiyovasküler patolojiler	Ateroskleroz, Adriyamisin toksisitesi, Keshan Hastalığı
Ürogenital patolojiler	Otoimmun nefrotik olgular ve Metal nefrotoksisistesi
Sinir sistemi bozuklukları	Hiperbarik oksijen, Nörotoksinler, Vit. E yetmezliği Alzheimer, Parkinson, steroit lipofusinozis, Alerjik ensefalomiyelit ve Demiyelizan hastalıklar, Multipl skleroz, Muskuler distrofi
Gastrointestinal patolojiler	Endotoksik karaciğer hasarı, Diabetes mellitus, Pankreatit Oral demir zehirlenmesi, Ülserler, Gastrointestinalkanserler, İnflamatuar barsak hastalıkları
Diğer patolojiler	Sistemik kanserler, Malnutrisyonlar, Kontakt dermatit, Porfiria, Termal haraplanma, Katarakt, Okluler kanamalar, Retrolental fibroplazi, Multipl Kan transfüzyonları gerektiren anemiler

ALKOLE BAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI

ALKOLE BAĞLI KARACİĞER HASTALIĞINDA PATOGENEZ

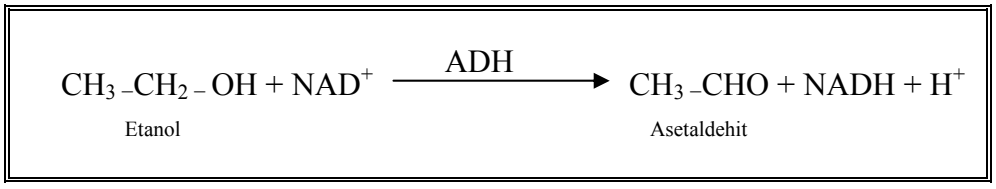
Alkolik karaciğer hastalığı, uzun süreli fazla miktarda alkol tüketimine bağlı, şiddeti değişik derecede olan karaciğer hasarı ile karakterize bir tablodur. Aşırı miktarda alkol tüketimi, kişilerde karaciğer yağlanması, alkolik hepatit ve alkolik siroza kadar giden bir klinik spektrum meydana getirir. Ciddi karaciğer hastalığı alkol kullananların yaklaşık %20'sinde gelişir. Yatkınlığı olan şahıslardaki hazırlayıcı faktörler kesin belli olmamakla birlikte, içilen alkolün miktarı ve süresi en önemli sebeptir (20, 34).

Alkolle indüklenen oksidatif stres karaciğerde çok daha fazla etkindir, çünkü alkol metabolizması başlıca karaciğerdedir.

Karaciğer hücresinde alkol metabolizması için üç ana yol bulunur ve bunların her biri farklı subsellüler bölümlerde yer alır. Alkol metabolizmasında rol oynayan enzimler;

1. Sitozolde yer alan alkol dehidrogenaz (ADH)
2. Endoplazmik retikulumda lokalize mikrozomal etanol okside edici sistem (MEOS)
3. Peroksizomlarda lokalize katalaz (34).

Stoplazmik bir enzim olan ADH, alkolün, karaciğer hepatositlerinde asetaldehite çevrilmesini katalize eder ve alkolün parçalanmasında en etkin rolü oynar (20).



Bu ADH aracılı oksidasyonda, NAD^+ redükte formu olan NADH'a çevrilir. Bunun sonucunda sitozolün redoks potansiyeli belirgin şekilde değişir.

NADH /NAD^+ oranındaki belirgin artış çok önemli metabolik sonuçlar doğurur. Laktat/Piruvat oranı artar. Bu durum laktik asidoza yol açar. Kandaki yüksek laktik asit düzeyi hiperürikasidemiye neden olur. Alkol tarafından indüklenmiş ketoz ve artmış purin yıkımı da hiperürisemiyi arttırabilir (35). Artan purin indirgenmesinin diğer bir olası sonucu, ksantin oksidaz (XO) tarafından ROS'ların üretimidir (34, 36). Artmış NADH / NAD^+ oranı lipogenezin artmasına ve hipoglisemiye neden olur. Sitrik asit siklusunun aktivitesi azalır. Yağ asidi oksidasyonunun azalmasına bağlı olarak trigliserid sentezi artar. Bu durumda karaciğer yağlanması ortaya çıkar.

Asetaldehit de primer olarak mitokondrial bir enzim olan asetaldehit dehidrogenaz (ALDH) tarafından oksidasyona uğratılarak asetat ile karbondioksit ve suya çevrilebildiği gibi, sitrik asit siklusuna girerek yağ asitleri gibi önemli biyokimyasal maddelere dönüşür. Bu sistemde kofaktör olarak NAD^+ kullanılır ve ortamda NADH miktarında artış görülür.

$$\underset{\text{Asetaldehit}}{CH_3-CHO} + NAD^+ + H_2O \xrightarrow{ALDH} \underset{\text{Asetat}}{CH_3-COO^-} + NADH + H^+$$

Asetaldehit, metabolik olarak son derece reaktif ve toksiktir. Proteinlere ve diğer makromoleküllere bağlanır ve bu bileşiklere karşı antikor oluşumuna neden olur. Dolayısıyla alkolik karaciğer hastalığı olanların serumlarında genellikle bu antikorlara rastlanır (34, 37). Hücrelerdeki mikrotubuler sistem asetaldehit tesiriyle bozulur ve protein atılımı durur. Tutulan proteine eş miktarda su da tutulur ve bundan dolayı karaciğer hücreleri şişer. Asetaldehit, glutatyonun 3 aminoasidinden biri olan L-sistein ile hemiasetal teşkil ederek, glutatyon kaybına yol açar. Ayrıca, aldehit oksidaz tarafından okside edilerek, demir varlığında serbest radikal oluşumuna neden olur. Yine, serbest radikallerin yol açtığı lipid peroksidasyon ürünleri olan, MDA ve hidroksinonenal (4-HNE) ile kompleksler teşkil ederek sitorom P 450 E2 sistemine bağlanır ve hücre yüzeyinde antijenik yapılar oluşturur (38, 39) (Tablo 5).

Tablo 5: Asetaldehitin Olası Toksik Etkileri (20)

1. Metabolik

- Mitokondrial oksidatif fosforilasyonun bozulması
- Lizil ve diğer serbest amino asitlere bağlanarak enzim inhibisyonu
- Mikrotubuler protein atılımında bozulma

2. Oksidatif

- Glutatyon ve antioksidan mekanizmalarda bozulma
- Lipid peroksidasyonu ve serbest radikal artışı
- Toksik lipid aldehitlerde birikim

3. İmmunotoksik

- Protein + asetaldehit antijenitesi

4. Proinflamatuar ve Profibrotik

- Liposit kollajen üretiminin aktivasyonu
- Sitokin salınımında artma

Alkol metabolizmasında rol alan diğer bir enzim sistemi MEOS, etanolü mikrozomal sitokrom P450 2E1 enzimi tarafından oksidasyona uğratır (20, 35).

$$\underset{\text{Etanol}}{CH_3-CH_2-OH} + NADPH + H^+ + 2O_2 \xrightarrow{MEOS} \underset{\text{Asetaldehit}}{CH_3-CHO} + NADP^+ + 2H_2O_2$$

Reaksiyon sonucu bir reaktif oksijen radikali olan H_2O_2 oluşur (35). Bu molekül glutatyon ile nötralize edilmediğinde lipit peroksidasyonuna yol açar. Lipid peroksidasyonu sonucu hücre membranının kalsiyuma geçirgenliği artar, hücre içinde kalsiyum birikimi olur ve bu olaylar sonucu yağlanmış karaciğerde inflamasyon ve fibroz başlar, sonuç siroza kadar gidebilir (20, 34).

MEOS, alkolün oksidasyonunda rolü çok az olup, ancak yüksek kan ve doku etanol düzeyinde devreye girer. Kronik alkol tüketimi enzimin upregulasyonuna sebep olur. Bu nedenle kronik alkol hastalarda etanol oksidasyonu hızlanmıştır. Bu sistemde ortaya

çıkan ROS'lar hepatosellüler hasara sebep olabilme ve/veya provake edebilme yeteneğindedir (20). Hücresel asetaldehit artışı sonucu bu yan ürünün albumin, kollajen ve lipoproteinlerce alkilasyonu hızlanır. Bu yeni kombinasyonlar, neoantijen olarak etki göstererek immun cevaba yol açar ve sonuçta inflamatuar mekanizmaları başlatır (40). Ayrıca, katalaz da alkolü okside eden ancak fizyolojik şartlarda alkol metabolizmasında önemli rolü olmayan peroksizomal bir enzimdir (20).

$$\underset{\text{Etanol}}{CH_3-CH_2-OH} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Katalaz}} \underset{\text{Asetaldehit}}{CH_3-CHO} + 2H_2O$$

Organizmada etanol metabolizması esnasında meydana gelen artmış lipid peroksidasyonu, ya karaciğerde oluşan peroksidatif sürece bağlı olarak indirek, ya da etanolün dolaşan lipidler ve hücre membranları üzerine direk etkisinden ileri gelebilir (41).

Aşırı NADH oluşumu, hipermetabolizmaya ve bu olayda doku hipoksisine neden olur. Hipoksinin en belirgin olduğu bölge Zone 3 yani perisentral bölgedir. Karaciğerin kan akımı periferden merkeze, yani portal alandan Zone 1'e sonra Zone 2'e sonra Zone 3'e ve sonra da santral vene doğrudur. Ortaya çıkan perisentral hipoksi hücre içi laktat miktarında artmaya yol açar ki, bu da fibrozisi tetikleyen bir olaydır (20, 34).

Non-parenkimal hücreler, örneğin kuppfer hücreleri, endotel ve yağ depolayan ıto hücreleri toksik süreçte ve fibrosiz gelişiminde devreye girerler. Alkol, kuppfer hücrelerinden TNF-alfa, TGF-beta ve IL-6 salınımına neden olur. TNF-alfa, direkt olarak karaciğer hücre nekrozuna neden olur, lökosit adherens ve aktivasyonunu provake eder, hepatosit ve kuppfer hücrelerinden IL-8 üretimini stimüle ederek, nötrofil kemotaksisine sebep olur. TGF-beta ve IL-6'da fibrozis gelişiminde rol alır. Asetaldehit, doğrudan ito hücrelerini aktive ederek kollajen artımına yol açar. İntestinal endotoksinler ve neo-antijen oluşumu kuppfer hücrelerini aktive ederek, kuppfer hücrelerinden salgılanan TGF-β ile ito hücrelerinin uyarılmasına neden olur. Diyetteki çoklu doymamış yağlar, lipid peroksidasyonu yaparak ve lipid aldehitleri oluşturarak sitokrom yoluyla serbest oksijen

radikallerini arttırır, bir yandan da ito hücrelerini aktive eder. Sonuçta hücresel toksisite, fibrosiz ve alkolik hepatit tablosu yani inflamasyon oluşur (16, 17, 20, 34, 42).

ALKOLE BAĞLI KARACİĞER HASTALIĞINDA AMİNOTRANSFERAZLAR

Karaciğer hasarının belirlenmesinde iki önemli enzim yer alır. Alanin amino transferaz (serum glutamat – pruvat amino transferaz) ve aspartat amino transferaz (serum glutamat – oxaloasetat amino transferaz). Adlarından da anlaşılacağı üzere alanin ve aspartik asidin amino gruplarını α- keto glutarata taşırlar. Böylece glutamat ve ALT ile pruvat ve AST ile oksalosetat oluşur. B_6 vitamini her iki enzimin de kofaktörüdür (18, 43, 44).

AST ve ALT karaciğer hasarını saptamada rutinde sık kullanılan belirliyicilerdir. AST karaciğerde olduğu kadar kalp, kas, beyin, pankreas, böbrek, akciğer, beyaz küre ve kırmızı kürelerde de yoğun olarak bulunmaktadır. Buna karşılık ALT yoğun olarak yalnızca karaciğerde bulunur. ALT ve AST kronik aşırı içme belirleyicisi olarak kullanılmaktadır (18). Yaklaşık olarak hepatositte bulunan AST'nin %80'i mitokondridedir. Oysa ALT'nin predominant formu non mitokondrial olanıdır. Bu nedenle hafif hepatosellüler hasarda, hepatosit membranı hasara uğramış ancak mitokondrial membranı sağlam ise sitoplazmik AST ve ALT seruma salınır (18, 19).

Her ne kadar bu enzimler karaciğer hücre harabiyeti için duyarlı belirteçler ise de, tek başlarına ideal marker özelliği taşımazlar (sensitivitesi yüksek ancak spesifitesi düşüktür). Alkolik olmayan karaciğer hastalıklarında AST ve ALT seviyeleri sağlıklı bireylere göre bir çok kat artış gösterir. Orta şiddette ve ağır alkolik karaciğer harabiyetinde de bu enzim miktarlarında artış olur ancak bu artış nonalkolik hastalıklara nisbeten oldukça azdır. Serum aminotransferazları kronik hepatitlerde ve akut viral hepatitlerinin hafif vakalarında ve ilaca bağlı hepatitlerde orta derecede artar (19, 45). Sirozda, nonalkolik hepatosteatozda kolestatik karaciğer hastalıklarında karaciğer yağlanmasında ve karaciğer tümörlerinde serum aminotransferazları hafifçe artar. Daha ciddi hepatosellüler hasarlarda mitokondri membranında da hasar olur ve mitokondrial AST salınımı ile sonuçlanır. Böylece AST/ALT oranı yükselir (19, 20).

AST/ALT oranı bazı karaciğer hastalıklarında tanıya yardımcı olabilir. Alkolik olmayan karaciğer hastalıklarında bu oranın azaldığı gözlenirken alkolik karaciğer hasarında AST/ALT oranı artar. Alkolik karaciğer hastalıklarında pridoksal-5-fosfat eksikliği olur. Bu vitamin her iki aminotransferazın yapımı için gereklidir, ancak hepatik ALT'i daha fazla düşürerek bu oranın yükselmesine neden olur (19, 43, 44, 45, 46).

Bazı araştırmalarda alkole bağlı olmayan karaciğer hastalıklarını alkole bağlı olan karaciğer hastalıklarından ayırmak için AST/ALT oranının kullanılması önerilmiştir. Alkole bağlı karaciğer hastalıklarında genellikle AST'nin ALT'ye göre biraz daha arttığı ileri sürülmüştür. Bu oran (AST/ALT) 1.5'tan büyük ise hasarın alkole bağlı olduğu, 1'den küçük ise alkol kullanımına bağlı olmadığı düşünülmelidir (18, 43, 44).

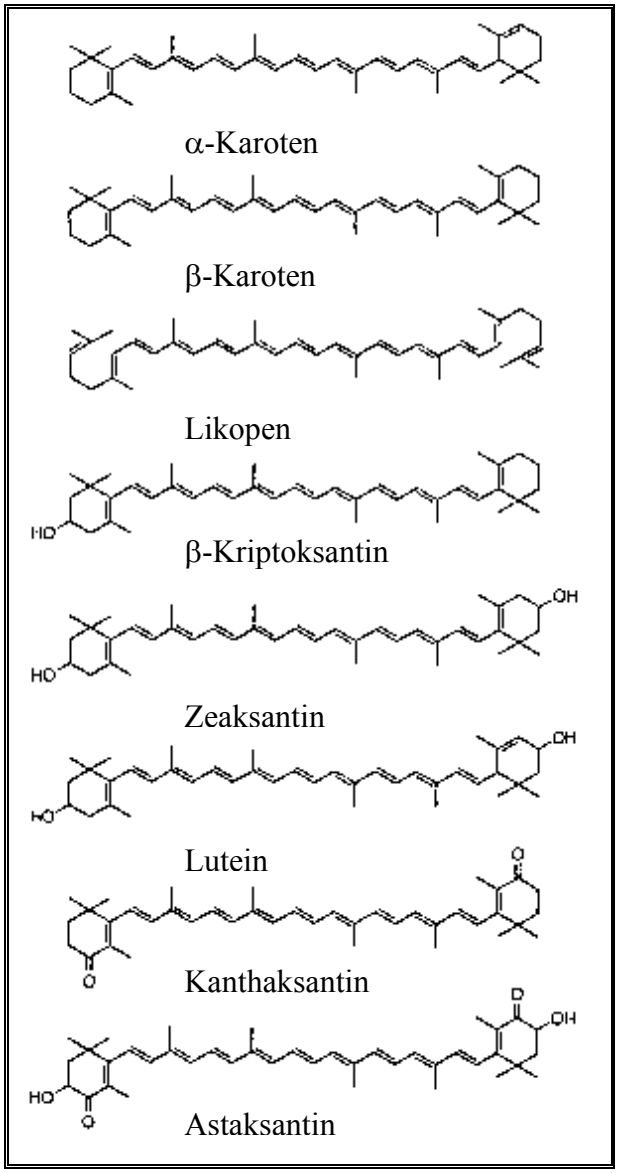
Mitokondrial AST / Total AST oranı alkolik hepatiti diğer karaciğer hastalarından ayırmada kullanılabilir. AST nin ALT ye oranına DeRitis oranı denir. Normalde AST/ALT=1 dir. Bazen hafifçe yüksek olabilir. Alkolik karaciğer hastalığında tanı amaçlı kullanılabilir. ALT normal iken veya normale yakın iken oranın 3 ile l arasında olması diagnostiktir. Alkolik hepatitde AST ve ALT'de ılımlı bir artış görülür (19, 44, 46).

LİKOPEN ve ÖZELLİKLERİ

Önemli bir karotenoid olan likopen en fazla domates (Lycopersicum esculentum)'de olmak üzere karpuz, pembe greyfurt gibi meyve ve sebzelerde bulunur ve onlara kırmızı rengini verir (47, 48). Karotenoidler ise en önemli kaynağı bitkiler olan doğal olarak görülen pigmentlerin geniş oranda dağılmış bir grubudur. Genellikle kırmızı, sarı ve turuncu renklidir. Parlak renkleri, yeşil sebze ve yapraklarda olduğu gibi klorofilik pigmentlerce maskelenmiştir. Olgun bitkilerde klorofil içeriğinin azalması sonucu domates, portakal, karpuz gibi çoğu meyvenin güzel renkleri ortaya çıkar. Karotenoidler, bitkilerin fotosentezi için ışık toplama, özellikle de yıkıcı fotooksidasyona karşı koruyucu olarak gereklidir. Karotenoidler çoğu ticari gıda maddesine kimyasal sentezle üretilen saf bileşikler ya da doğal ekstraktlar şeklinde renklendirici olarak ilave edilir (14).

İnsanlar tarafından bitkisel besinlerle alınan karotenoidler, A-Vitamini prekürsörü olarak görev yaparlar, bunların başlıcaları α-karoten, β-karoten ve β-kriptoksantindir. En fazla bulunan ve en etkili olanı β-karotendir. β-karoten A vitamin prekürsörü olma özelliği yanında biyolojik önemi lipit antioksidanı olması ve özellikle singlet oksijen olmak üzere serbest radikalleri nötralize etmesidir (Şekil 2) (49).

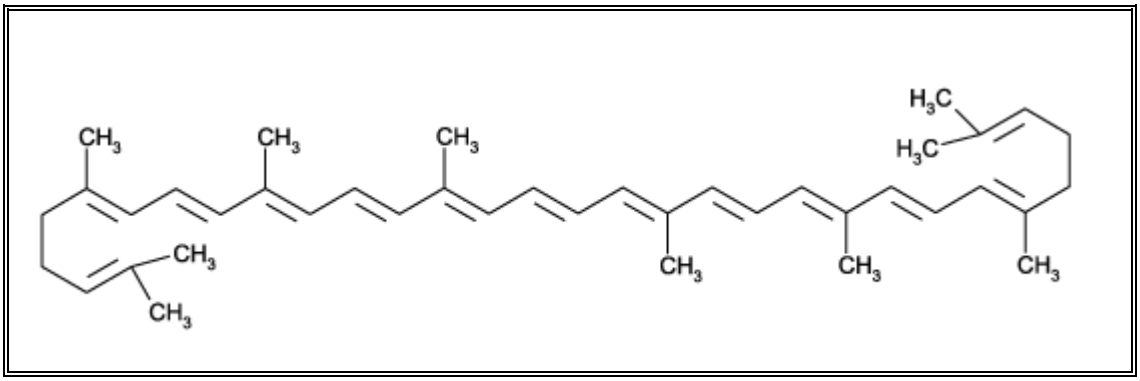
Karotenoidler insan sağlığı için önemli bileşiklerdir (50). Karotenoidlerin özellikleri ve fonksiyonları onların kimyasal yapısına bağlıdır. Fotosentezde olduğu gibi enerji transfer reaksiyonlarında en önemli faktörün özellikle tekli ve konjuge çift bağlı bir sistemle 40 C ünitinin (C=C) kuyruk kuyruğa bağlanması ile şekillenen tetraterpen yapısında uzamalarının bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Molekülün bu özelliği singlet oksijen ($^1O_2^{\bullet}$) toplamalarına izin verir. Karotenoidlein bu radikal toplama özellikleri sayesinde, çoğu epidemiyolojik olan çalışmalarla, kanser, kalp rahatsızlıkları, dejeneratif göz hastalıkları gibi ciddi rahatsızlıklara karşı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (47, 51, 52, 53, 54, 55).



Şekil 2: Aktif oksijen toplama yetenekleri çalışılmış bazı karotenoidlerin kimyasal yapıları (53).

Likopen tüm karotenoidlerde olduğu gibi asiklik $C_{40}H_{56}$ yapısından türemiştir. 11 konjuge ve 2 konjuge olmayan çift bağlı açık zincirli bir hidrokarbondur (Şekil 3) (11, 12). Likopen pro-vitamin A aktivitesine sahip değildir, insan serumunda da bulunur.

Likopen β-karotene göre in-vitro sistemlerde antioksidan olarak daha büyük radikal toplama aktivitesine sahiptir (56).

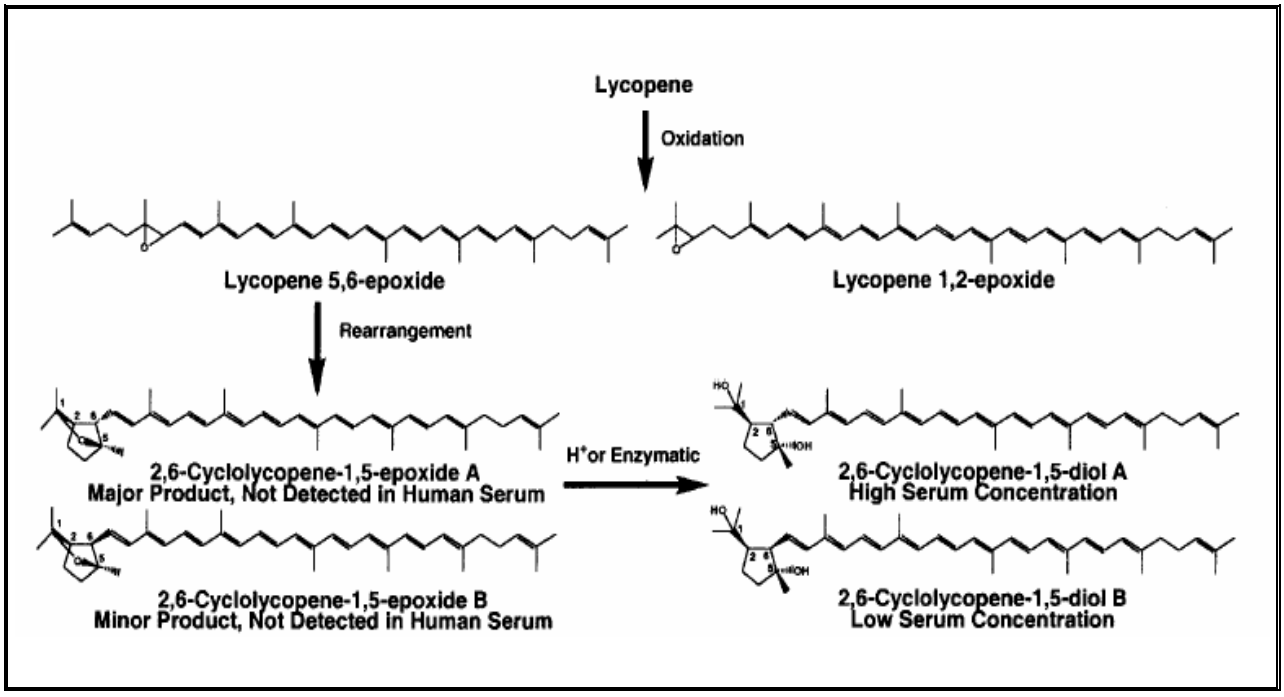


Şekil 3- Likopen kimyasal yapısı (11)

Son yıllarda deneysel verilerden sağlanan delillere göre insanlar 50 den fazla diyete bağlı karotenoidi absorbe ve metabolize edebilme yeteneğindedir. α-karoten, β-karoten, β-kriptoksantin, lutein ve likopen insan kanında en bol bulunan karotenoidler arasındadır. Epidemiyolojik çalışmalardan sağlanan delillere göre yüksek oranda karotenoidce zengin sebze ve meyve alınımı insanları en yaygın görülen, kolon, mide ve prostat kanserine karşı korur (7, 13, 57).

Karotenoidlerin antioksidan aktiviteleri multilamellar lipozomlarda lipit peroksidasyonun ölçülmesi ile belirlenmiştir. Etki oranları likopen> α-tokoferol> α-karoten> β-kriptoksantin> zeaksantin = β-karoten> lutein şeklinde sıralanabilir (47, 51).

Bu güne kadar insan serumu ve sütünde 25 karotenoid ve dokuz metaboliti saptanmış ve tanımlanmıştır. İnsan karaciğeri, akciğerleri, meme, göz ve serviks gibi organları ve derisinde miktarları belirlenmiş, buralarda depolandığı gösterilmiştir (58).



Şekil 4 :İnsanlarda Likopen Oksidasyonun Olası Metabolik Yolları (12)

İnsanlarda likopenin olası metabolik dönüşümü Şekil 4'de gösterilmiştir. Likopenle m- kloroperbenzoik asid oksidatif reaksiyonları ile ilk ürünün 1,2 ve 5,6 pozisyonlarında okside olduğu saptanmıştır. Likopen 1,2-epoksit oldukça stabil özellikte iken 5,6 epoksit türevi anstabildir ve kolayca siklize olarak 2,6 siklolikopen-1,5-epoksit A ve B karışımları haline gelir. Her ne kadar insan serumunda bu ilk türevler saptanamamışsa da uygun olan siklik dioller 2,6-siklolikopen1,5-diolleri tesbit edilmiştir. Bu likopen metabolitleri domates kökenli ürünlere bağlı olabilir. Ancak serumdaki bu metabolitlerin miktarı sadece çiğ domates ve domates kökenli ürünlerdeki düşük miktarlarla açıklanamaz. Bu nedenle şu anda insan serumundaki likopen metabolitlerinin kaynağı çok iyi anlaşılamamaktadır (59, 60, 61, 62).

Domates salçası, domates suyu gibi sıklıkla tüketilen yiyeceklerde yüksek oranda likopen bulunur (Tablo 6) (50).

Tablo 6: Domates, Domates Kaynaklı Gıda Ürünleri ve Bazı Meyva ve Sebzelerdeki Karotenoid Profilleri Miktarları (12, 58)

KAROTENOİD KONSANTRASYONLARI (MG/100G)*										
Gıdalar	likopen	α–karoten	β–karoten	γ–karoten	nörosporen	ζ–karoten	fitofluen	fitoten	lutein	Zeakksantin
Salça	55,45	0	1,27	9,98	6,95	0,84	3,63	8,36	0,34	0
Domates sosu	17,98	0	0,45	3,17	2,48	0,29	1,27	2,95	eser	0
Ketçap	17,23	0	0,59	3,03	2,63	0,33	1,54	3,39	0	0
Domates püresi	16,67	0	0,41	2,94	2,11	0,25	1,08	2,40	0,09	0
Makarna sosu	15,99	0	0,44	3,02	3,15	0,34	1,56	2,77	0,16	0
Domates suyu	10,77	0	0,27	1,74	1,23	0,18	0,83	1,90	0,06	0
Domates	9,27	0	0,23	1,50	1,11	0,21	0,82	1,86	0,08	0
Greyfurt	3,36	0	2,34	1,38	0,38	0	0,01	0,02	0	0
Papaya	2,52	0,02	0,22	0,01	0,05	0,19	0,44	0,68	0,02	0,02
Kayısı	0,01	0,02	1,59	0,08	0	0,04	0,36	0,59	0,09	0
Kuru Kayısı	0,86	1,60	8,56	0,13	0	0,14	2	2,27	0,36	0
Portakal	0	0,02	0,06	0,004	0,01	0,1	0,06	0,08	0,35	0,25

* Likopen oranı iklim şartları, toprak yapısı ve ürünün çeşidine göre de değişiklik göstermektedir.

Domates; domates suyu, sos, salça veya ketçap şeklinde işlendiği zaman, likopenin, kimyasal yapısı ısıya bağlı olarak değişmekte, bu da vücut tarafından daha kolay absorbe edilmesini sağlamaktadır. Buna göre işlenmiş yada pişirilmiş domates ürünlerindeki likopenin biyoyararlılığı, ham domates ürünlerinden daha fazladır (50, 56).

Likopenin de dahil olduğu diyete bağlı antioksidanların reaktif oksijen türlerini inaktive ettiği ve oksidatif hasara karşı koruma sağlayarak, prostat kanserinin önlenmesinde potansiyel moleküller olabilecekleri düşünülmektedir (63). Yine domates ve domates ürünlerinin, bazı kanser tiplerinin ve plazma lipit peroksidasyonun gelişimi ile ters bir ilişki göstermesi de likopenin antioksidan özelliklerine bağlanmıştır (47, 64).

MATERYAL METOD

Çalışmada, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma ve Üretim Laboratuarı'ndan temin ettiğimiz Wistar- albino türü 200-250 g ağırlığında 30 erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar üç eşit gruba ayrıldı. 1. grup kontrol grubu, 2. grup alkol grubu, 3. grup alkol+likopen grubu olarak belirlendi.

Sıçanların beslenmesi ve bakımı yine aynı laboratuarda, günlük olarak sağlandı. Kafes bakımları düzenli olarak iki günde bir şeklinde yapıldı. Ayrıca, sıçanların gelişimlerinin kontrolü ve sağlıksız sıçanların ayrımı için, haftada bir olmak üzere, düzenli olarak sıçanların tartımı gerçekleştirildi. Deneye başlamadan önce sıçanların ağırlıkları tespit edilip her üç gruptaki ortalama sıçan ağırlığının yaklaşık aynı olması sağlandı.

Üç gruba ayırdığımız sıçanların hepsi deney süresince pellet fare yemi ile ad libidum beslendi. Bir grup sıçana kronik alkolizm oluşturmak amacıyla 10 hafta süreyle likit olarak, günde 500 ml %20'lik etanol verildi. Bu sıvı 400 ml çeşme suyu + 100 ml saf alkol şeklinde hazırlandı. Bu grup 2. Grup olarak belirlendi ve alkol grubu adı verildi. 3.Grup alkol + likopen grubu olarak adlandırıldı. Bu gruba da 10 hafta süreyle günde yine 500ml sıvı verildi, sıvının %20'si etanol, %50'si domates suyu ve %30'u çeşme suyu olarak belirlendi. Bu sıvı da 100ml saf alkol + 250 ml domates suyu (27 mg likopen - Tablo 6) + 150 ml çeşme suyu şeklinde hazırlandı. 1. Grubumuz kontrol grubu oldu ve gruba 10 hafta süreyle günde 500 ml çeşme suyu verildi (12, 65, 66, 67).

Son uygulamadan sonraki 24. saatte tüm hayvanlardan eter anestezisi altında uygun teknikler kullanılarak kan ve karaciğer örnekleri alındı. Kalp apekslerinden enjektör yardımıyla alınan kanlarda, serum AST ve ALT değerleri enzimatik-kinetik olarak (Abbott kiti kullanılarak Abbott-Aeroset otoanalizöründe) tayin edildi. Rutin takip yöntemiyle hazırlanan karaciğer doku kesitleri %10 formaldehit içinde tespit edildi. Hastanemiz patoloji laboratuarında hemotoksilen-eozin ile boyanıp ışık mikroskobunda incelendi.

Aspartat Aminotransferaz (AST-SGOT) Aktivite Tayini

Serumda AST enzimi, reaksiyon sonunda meydana gelen oksaloasetatın NADH varlığında L-Malata dönüşmesi esnasında, NADH'ın NAD^+'ye okside olması ile absorbansta meydana gelen azalmanın ölçümüne dayanan metoda göre hazırlanmış kit ile ndirekt olarak tayin edilidi.

$$\text{L-Aspartat} + \text{2-Oksoglutarat} \xrightarrow{\text{AST}} \text{Oksaloasetat} + \text{L-Glutamat}$$

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

Alanin Aminotransferaz (ALT- SGPT) Aktivite Tayini

Serumda ALT enzimi, reaksiyon sonunda meydana gelen piruvatın, NADH varlığında laktata dönüşmesi esnasında, NADH'ın NAD^+'ye okside olması ile absorbansta meydana gelen azalmanın ölçümüne dayanan metoda göre hazırlanmış kitle indirekt olarak tayin edildi.

$$\text{L-Alanin} + \text{2-Oksaloglutarat} \xrightarrow{\text{ALT}} \text{L-Glutamat} + \text{Piruvat}$$

$$\text{Piruvat} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Laktat} + NAD^+$$

BULGULAR

Kontrol grubunda AST değerlerinin minimum-maximum aralığı ve ortalama ± standart sapma (min-max-ort ±SD) değerleri sırasıyla 26-53 U/L - 37±9 olarak bulunmuştur (Şekil 5, Tablo 7-8). Bu değerler alkol grubunda 157-358 U/L - 218 ± 66 şeklindedir (Şekil 5,6, Tablo 7-8). Alkol+likopen grubunda AST değerleri 109-173 U/L - 132 ± 17'dir (Şekil 5, 8, Tablo 7-8) Grupların ALT değerleri, kontrol grubunda 24-43 U/L - 32 ± 16 (Şekil 5, tablo 7-8), alkol grubunda, 44-81 U/L - 66 ± 12 (Şekil 5, 7, Tablo 7-8), alkol+ likopen grubunda ise, 54-76 U/L - 64 ±7 (Şekil 5, 7, 9, Tablo 7-8) şeklindedir. AST düzeyi, alkol grubunda en yüksek düzeyde ($p<0.05$), alkol + likopen grubunda ise en düşük ($p<0.05$) düzeydedir (Tablo 8). ALT düzeyi, alkol ve alkol+likopen grubunda, kontrol grubuna göre daha yüksek seyretmiştir ($p<0.05$) (Tablo 8). AST/ALT oranları, kontrol grubunda 0.65- 1.71 U/L - 1.19 ± 0.35 iken, alkol grubunda 2.23-6.02 U/L - 3.38 ± 1.15, alkol+likopen grubunda ise, 1.68-3.20 U/L - 2.10 ± 0.44'tür (Tablo 7-8, Şekil 5). AST/ALT oranı alkol alan grupta en yüksek düzeyde ($p<0.05$), alkol+likopen grubunda ise en düşük düzeyde seyretmiştir ($p<0.05$) (Tablo 8).

Tablo 7- Gruplarda Çalışılan Tüm Biyokimyasal Paremetrelerin Değerleri

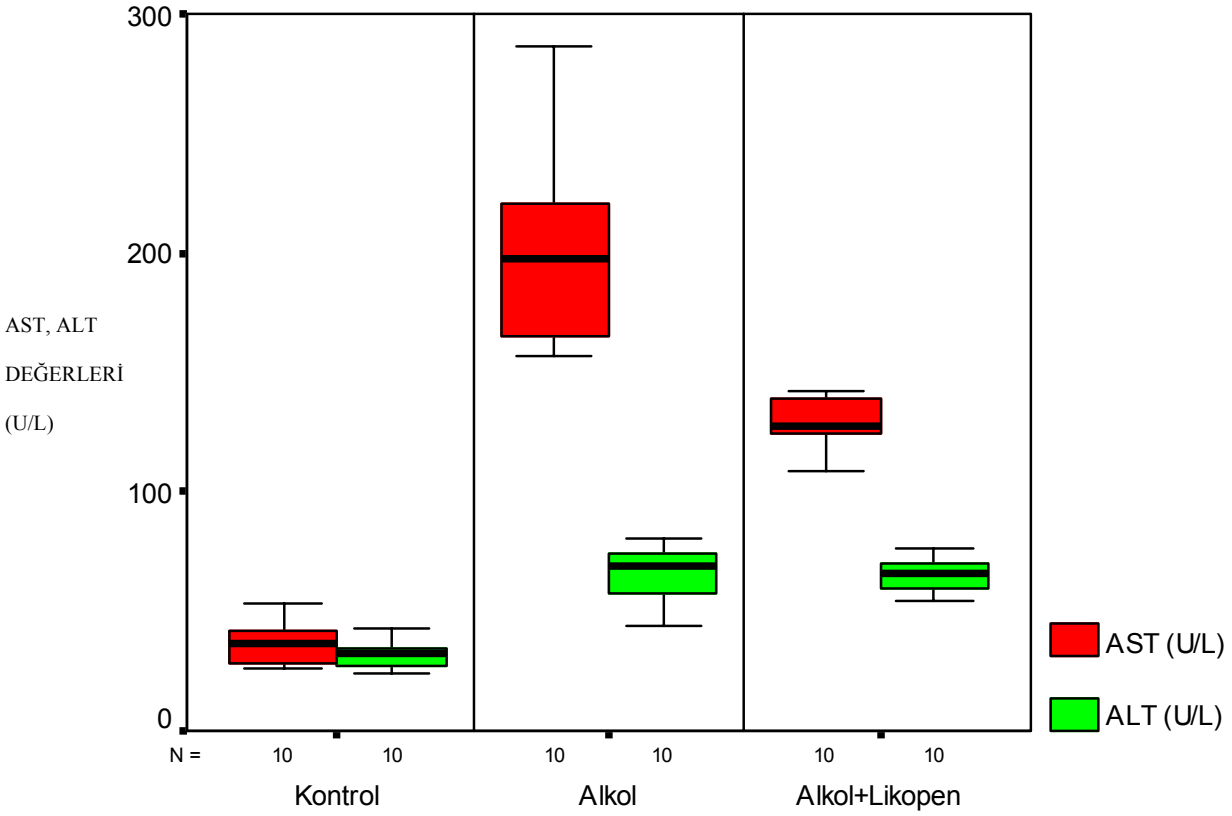
GRUPLAR	AST(U/L)	ALT(U/L)	AST/ALT
Kontrol Grubu			
1	35	27	1.3
2	42	36	1.17
3	41	24	1.71
4	28	43	0.65
5	47	34	1.38
6	33	28	1.18
7	53	32	1.66
8	26	27	0.96
9	39	33	1.18
10	26	35	0.74
Alkol Grubu			
1	265	44	6.02
2	358	81	4.42
3	157	57	2.75
4	286	73	3.92
5	181	67	2.7
6	221	71	3.11
7	165	74	2.23
8	203	60	3.38
9	192	79	2.43
10	158	56	2.82
Alkol+Likopen Grubu			
1	142	64	2.22
2	128	76	1.68
3	124	68	1.82
4	109	60	1.82
5	127	67	1.90
6	118	62	1.90
7	126	55	2.29
8	133	71	1.87
9	139	70	1.99
10	173	54	3.2

Tablo 8: Gruplardaki AST, ALT Değerleri ve AST/ALT Oranlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi

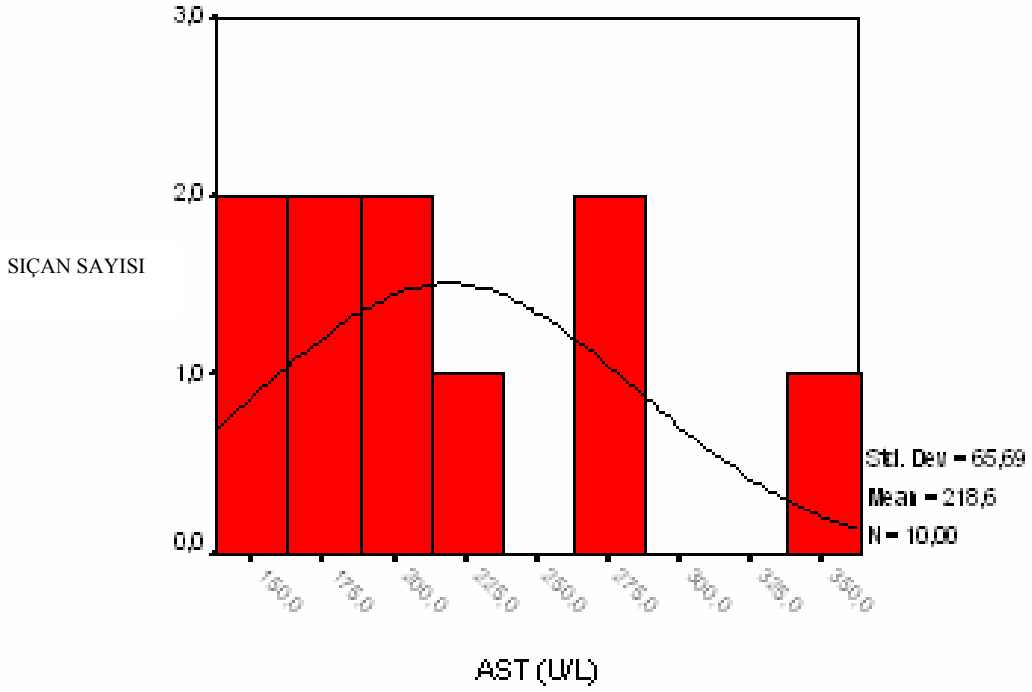
	Grup	Ortalama ± SD	Min-Max	Gruplar Arası	P
AST (U/L)	kontrol	37±9	26-53	kontrol-alkol	**0,000**
	alkol	218±66	157-358	kontrol-alkol+likopen	**0,000**
	alkol+likopen	132±17	109-173	alkol-alkol+likopen	**0,000**
ALT (U/L)	kontrol	32±6	24-43	kontrol-alkol	**0,000**
	alkol	66±12	44-81	kontrol-alkol+likopen	**0,000**
	alkol+likopen	64±7	54-76	alkol-alkol+likopen	0,919
AST/ALT	kontrol	1,19±0,35	0,65-1,71	kontrol-alkol	**0,000**
	alkol	3,38±1,15	2,23-6,02	kontrol-alkol+likopen	**0,033**
	alkol+likopen	2,10±0,44	1,68-3,20	alkol-alkol+likopen	**0,001**

AST düzeyi ve AST/ALT oranı alkol alan grupta alkol+likopen ve kontrol grubuna göre yüksek düzeyde ($p<0,05$) seyretmiş olup, alkol+likopen alan grupta en düşük

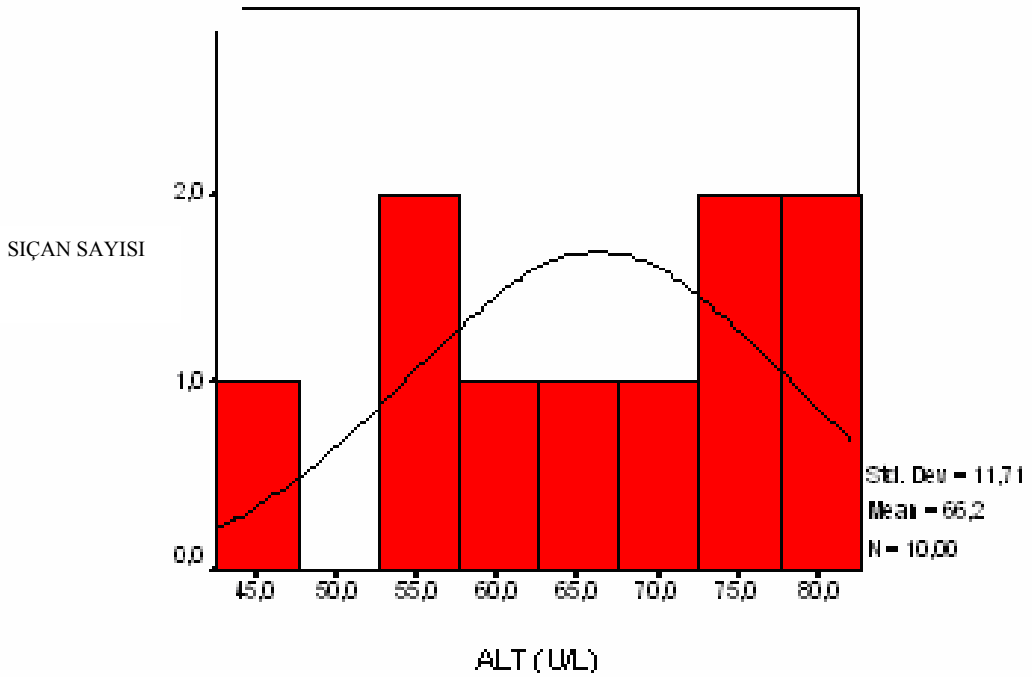
düzeyde seyretmiştir ($p<0,05$). ALT düzeyi ise, alkol ve alkol+likopen alan gruplara göre kontrol grubunda daha düşüktür ($p<0,05$) (Tablo 8, Şekil 5).



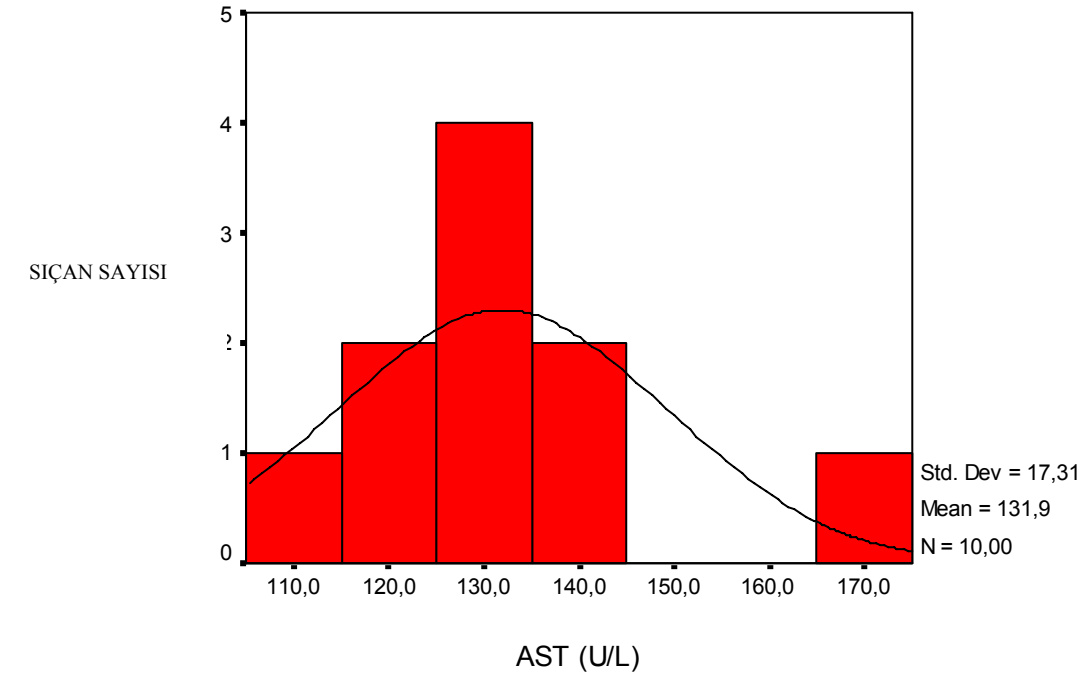
Şekil 5: Gruplardan Elde Edilen AST ve ALT Değerleinin Dağılımı



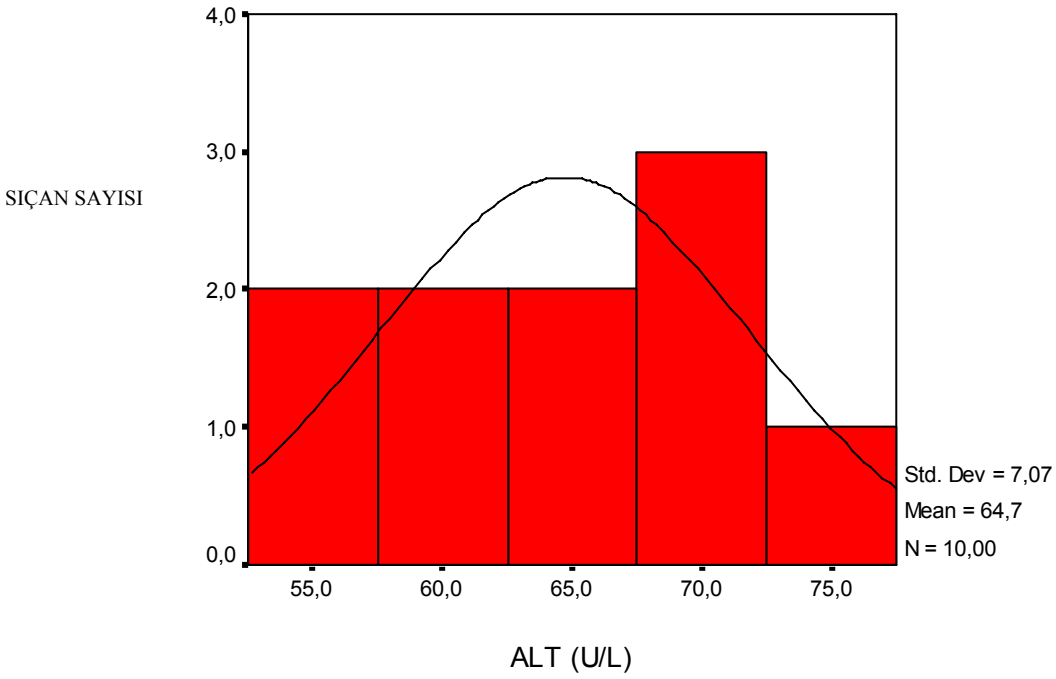
Şekil 6: Alkol alan grupta serum AST düzeyi Histogramı



Şekil 7: Alkol alan grupta serum ALT düzeyi histogramı



Şekil 8: Alkol+ Likopen Grubunda serum AST düzeyi Histogramı



Şekil 9: Alkol+Likopen grubunda serum ALT düzeyi Histogramı

PATOLOJİ LABORATUAR SONUÇLARI

Gruplardaki sıçanlar isimlendirilirken ilk önce grubunu simgeleyen rakam (1, 2, 3) gibi, daha sonra kaçıncı sıçan olduğu (A, B, C, ...J gibi) belirtildi. Her sıçandan alınan karaciğer biopsileri değerlendirilerek karaciğer hasarı miktarı saptandı ve gruplara göre kaydedildi.

Kontrol grubundaki karaciğer dokularında patolojik özellik görülmedi (Şekil 10, Şekil 11). Alkol grubunda alkol ve likopen verilenlere oranla hem nitelik hem de nicelik bakımından daha fazla karaciğer harabiyeti olduğu gözlendi (Şekil 10).

KONTROL GRUBU (GRUP 1)

1A- - 1J: Hiçbirinde patolojik özellik gözlenmedi (şekil 11).

ALKOL GRUBU (GRUP 2)

2B: İntrastoplazmik yağlanma (şekil 12),

2G: Çoğunlukta mikroveziküler olmak üzere, makro- mikroveziküler yağlanma (şekil 13),

2A, 2D: Mikroveziküler yağlanma (şekil 14),

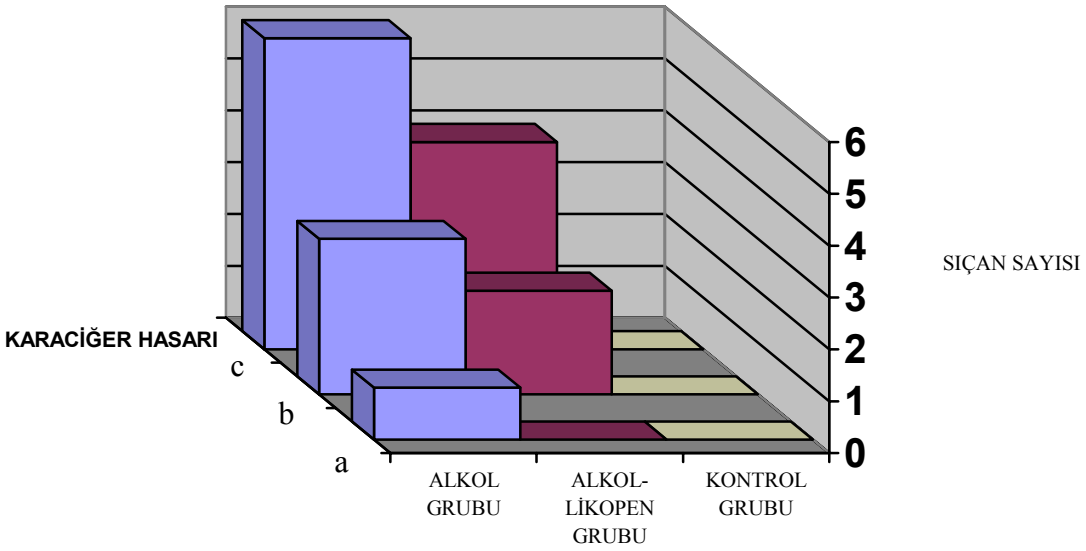
2C, 2E, 2F, 2H, 2I, 2J: Sinuzoidal ve parenkim hücrelerinde konjesyon ve şişme görüldü (şekil 15).

ALKOL+LİKOPEN GRUBU (GRUP 3)

3A, 3J: Fokal mikroveziküler yağlanma (şekil 16),

3B, 3C, 3E, 3G: Sinuzoidal ve parenkim hücrelerinde konjesyon ve şişme (şekil 17),

3D, 3F, 3H, 3I : Normal patolojik özellik gözlendi (şekil 18).

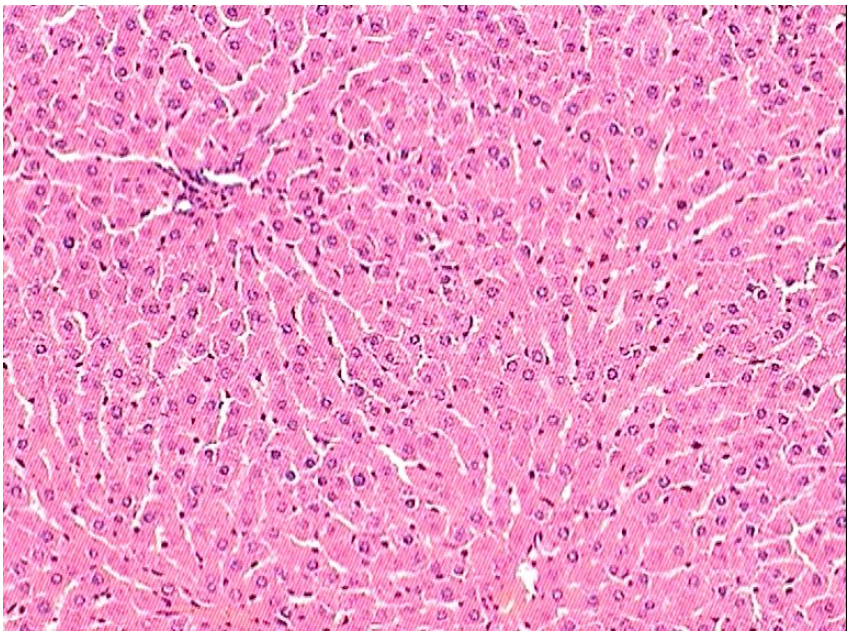


Şekil 10: Patolojik Verilerin Gruplara Göre Değişimi

a: İNTRASTOPLAZMİK YAĞLANMA

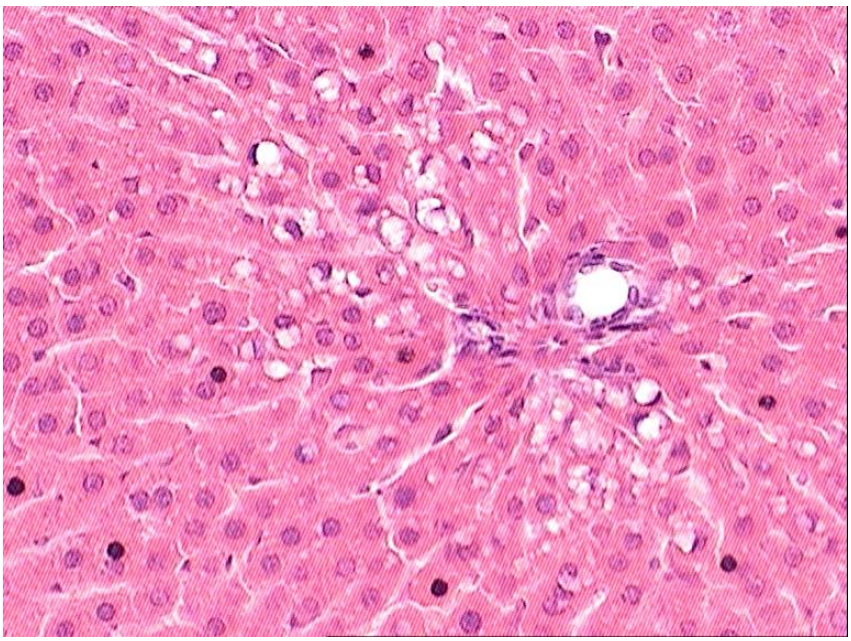
b: MİKROVEZİKÜLER YAĞLANMA

c: SİNUZOİDAL VE PARENKİM HÜCRELERİNDE KONJESYON VE ŞİŞME

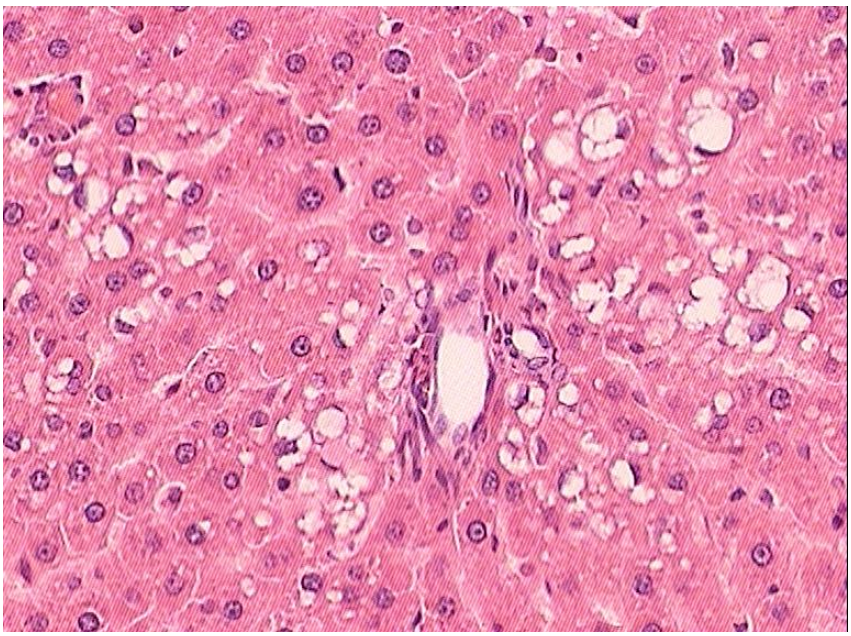


Şekil 11: Patolojik özellik görülmedi (100X)-1A

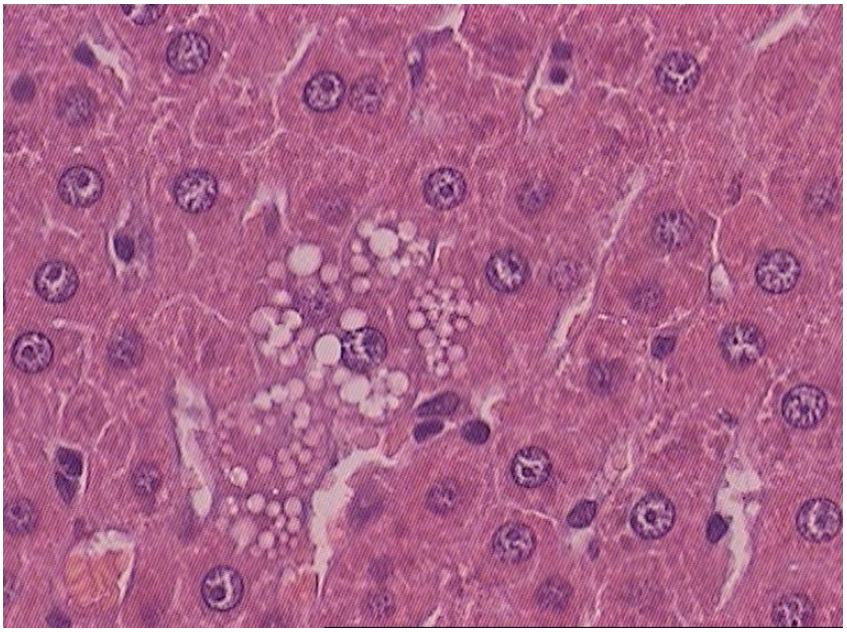
(B, C,...J'ye kadar tüm sıçanlarda benzer görünüm izlendi.)



Şekil 12: İntrastoplazmik yağlanma (200X)-2B

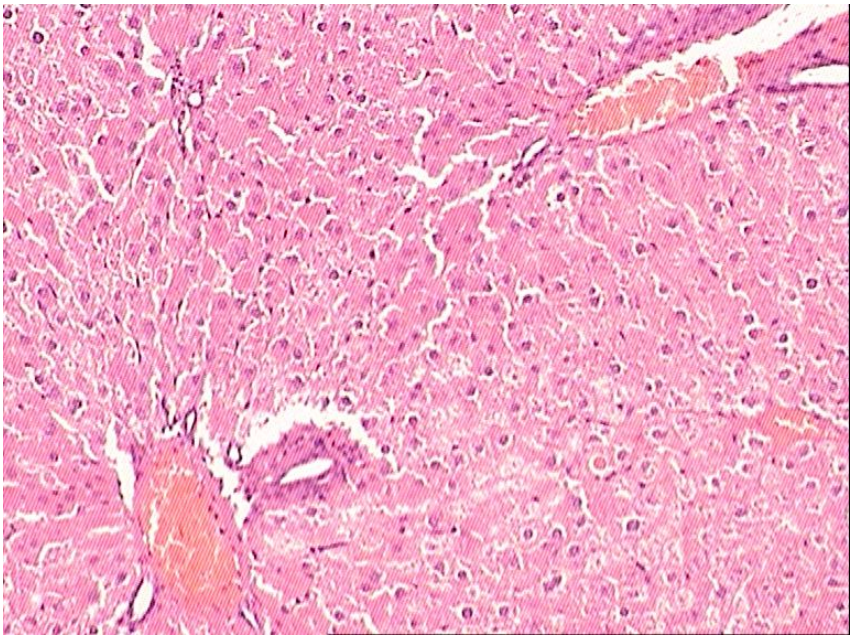


Şekil 13: Makro-mikro veziküler yağlanma (200X) - 2G



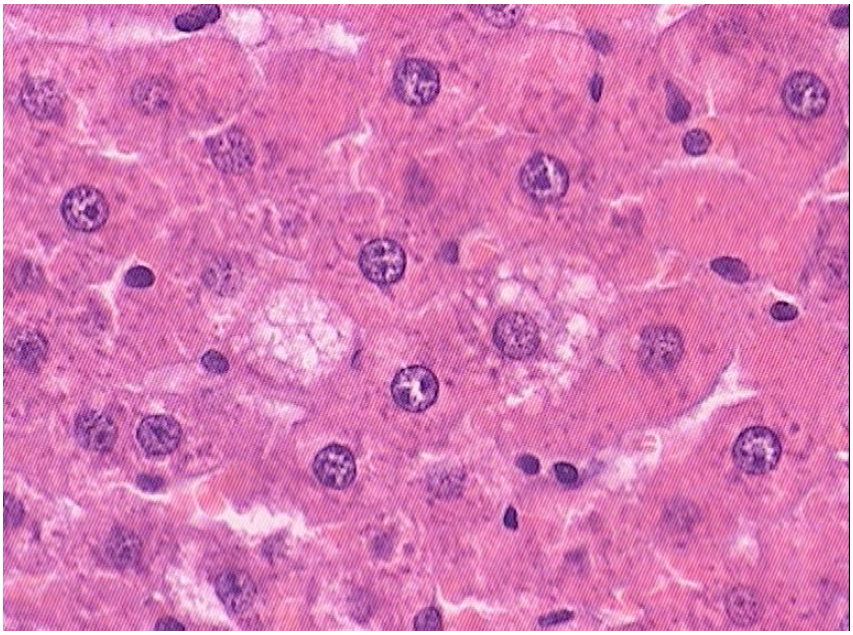
Şekil 14:Mikroveziküler yağlanma (400X) -2A

(2D'de de benzer görüntü izlendi.)



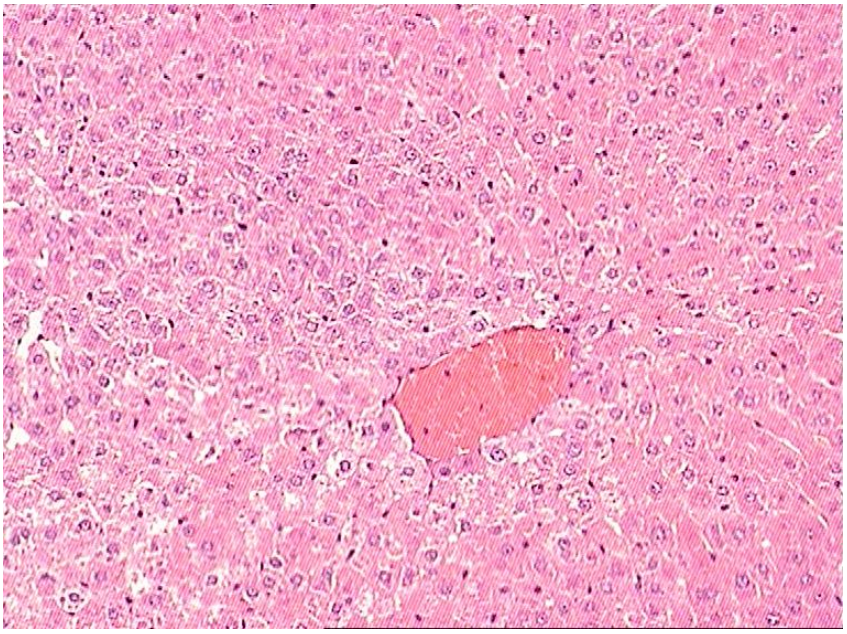
Şekil 15: Sinozoidal ve parenkim hücrelerde şişme-2E

(2C, 2F, 2H, 2I, 2J'de de benzer görünüm izlendi.)



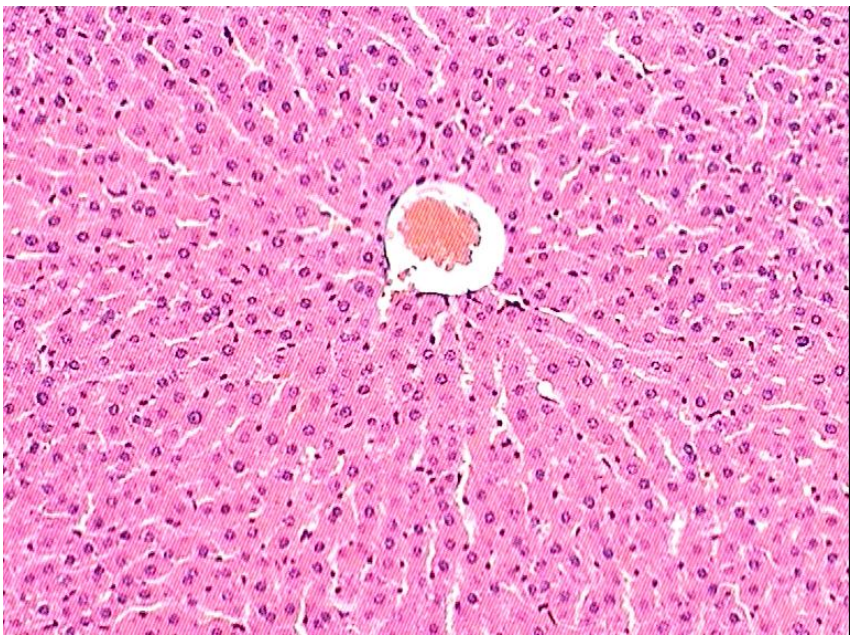
Şekil 16: Fokal mikrovezikül (400X) - 3A

(3J'de de benzer görünüm izlendi.)



Şekil 17: Konjesyon ve şişkin görünüm (100X) -3B

(3C, 3E, 3G'de de benzer görünüm izlendi.)



Şekil 18: Patolojik özellik olmayan normal görünüm -3F

(3D, 3H, 3I'da da benzer görünüm izlendi.)

TARTIŞMA

Etanolün lipid peroksidasyonunu uyarmasını hidroksil radikalinin artışına bağlı olduğu, akut etanol uygulanmasından sonra NADPH oksidaz aktivitesinin de arttığı ve bunun da süperoksit radikali aracılığıyla hidroksil radikali oluşumuna katkıda bulundugu ileri sürülmüştür (68, 69). Alkolizmin çesitli sağlık ve sosyal problemlere neden olduğunu ileri süren araştırıcılar, alkol tüketiminin özellikle karaciğer dokusunda harabiyete ve birçok olumsuz metabolik değisime neden olduğunu bildirmislerdir (69).

Nishimura ve arkadaşları ile Teschke ve arkadaşları alkole bağlı olarak serum AST ve ALT aktivitesinde artış olduğunu (70, 71), Glinsukon ve arkadaşları Serum ALT aktivitesinde artış, serum AST aktivitesinde azalma (72), Ishii ve arkadaşları serum ALT aktivitesinde bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir (65). Bir hayli eski çalışmalara ait bu çelişkili yayınlara rağmen bugün artık AST ve ALT'nin karaciğer hücre harabiyetinin göstergesi olduğu kesindir (44).

Orta şiddette ve ağır alkolik karaciğer harabiyetinde bu enzim miktarlarında artış olur ancak bu artış nonalkolik hastalıklara göre daha azdır (44). Alkolik olmayan karaciğer hastalıklarında AST/ALT oranının azaldığı gözlenirken alkolik karaciğer hasarında AST/ALT oranı artar. Alkolik karaciğer hastalıklarında pridoksal-5-fosfat eksikliği olur. Bu enzim her iki aminotransferazın yapımı için gereklidir, ancak karaciğerdeki lokalizasyonu daha fazla olduğu için hepatik ALT'i daha fazla düşürerek bu oranın yükselmesine neden olur (20, 44, 46). Yaptığımız çalışmada, kronik alkolik hale getirilen sıçanların serum AST ve ALT ativitelerinde artış saptanmıştır ($p<0.05$).

AST/ALT oranı alkolik karaciğer hastalığında iyi bir markırdır. Bizim çalışmamızda da, alkol verilen hayvanlarda, aminotransferazların tek tek artışından daha fazla, AST/ALT oranındaki artış dikkat çekicidir ($p<0.05$).

1992 yılında Rousso ve arkadaşları oksijene bağlı sitotoksisite ve genotoksisisteye karşı karotenoidlerin etkisini araştırdılar. Bu sırada karotenoidlerin bir çoğunun β-karotenden daha aktif olduğunu ve likopenin bioaktivitesinin en fazla olduğunu saptadılar (73).

Okajima ve arkadaşları 1998 yılında kimyasal yolla mesane kanseri oluşturdukları sıçanlara verdikleri domates suyu ile likopenin karsinojenezise inhibitör etkilerini gösteren araştırmalarrında, 12 hafta boyunca dilue domates suyu verilen sıçan karaciğerlerinde likopen konsantrasyonunun arttığı, mesane değişken epitel karsinomlarının gelişmesini önlediğini göstermişlerdir (67).

1996 da Clinton ve arkadaşları domates ve domates ürünlerini bol alan insanlarda gözledikleri düşük prostat kanseri riskinden yola çıkarak prostatektomi yapılmış erkek hastalarında benign ve malign patolojiler gösterenleri ayırarak bunlardaki likopen ve diğer karotenoidlerin prostat dokusundaki konsantrasyonlarına baktılar, karotenoidler ve likopenin çeşitli izomerlerini inceleyip, domates ve domates bazlı gıdalar alanlarda likopenin prostat dokusunda arttığını göstermişlerdir ama tümörlerin malignitesi ile direkt bir ilişki saptayamamışlardır (61).

Leal ve arkadaşları 1999'da, bir mikotoksin olan T-2 toksininin tavuk karaciğerinde lipit peroksidasyon düzeyini arttırdığı, T-2 toksini ve likopen birlikte verildiğinde ise azalttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada likopen, GPx aktivitesini de artırmıştır (74).

Rao ve arkadaşları 1998'de, 20 sağlıklı insanda sigara içimi ve diyetin, serum likopen seviyesi ve lipit peroksidasyonu üzerine etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, likopenden eksik diyet uygulanan örneklerde lipit peroksidasyon seviyesinin %25 arttığı, likopen seviyesinin de %50 azaldığı tespit edilmiştir. Serum likopen seviyesi bakımından sigara tiryakileri ile sigara kullanmayanlar karşılaştırıldığında önemli bir farklılık bulunmazken, sigara içenlerde peşpeşe içilen 3 sigaradan önce ve son sigaradan hemen sonra alınana kan örnekleri karşılaştırıldığında, sigara sonrası serum likopen seviyesinin %40 azaldığı, lipit peroksidasyon seviyesinin ise %40 arttığı bildirilmiştir. Bu çalışmaya göre serum likopen seviyesi ile lipit peroksidasyon seviyesi arasındaki ters ilişki likopenin antioksidan özellikleri olduğunu vurgulamaktadır (75).

Agarwal ve arkadaşlarının 1998'de yaptığı çalışmada, domates ürünlerinden sağlanan günlük 40 mg'lık likopen tüketiminin koroner kalp hastalıkları ve

atherosklerozis'in gelişiminde önemli payı olan artan Low Density Lipoprotein (LDL) seviyesinin düştüğünü bildirilmişlerdir (76).

Astorg ve arkadaşları 1997'de, 3-4 hafta boyunca farklı diyet ekleri ile takip ettikleri ratlarda kimyasal uyarı ile karaciğerde preneoplastik alanlar oluşturmuş, likopen alanlarda bu alanların sayılarında değil ancak çaplarında azalma olduğu gösterilmiş, bu etkinin likopenin preneoplazi oluşması için verilen dietilnitrozamini yıkan karaciğer enzimlerini (sitokrom P450 2E1) aktifleyerek olduğunu ileri sürmüşlerdir (77).

Nagasava ve arkadaşları 1995'te, yüksek spontan meme tümörü oluşturan SHN virgin farelerde, saf likopen vererek meme tümörü gelişiminin likopenden zengin diyet sayesinde belirgin şekilde azaldığını göstermişlerdir (78).

1997'de yapılan bir araştırma ile Kolombiya ve Missuri eyaletinde (A:B:D) 1977-1987 arasında meme kanseri serum bankasına kan vermiş meme kanseri olmayan kadınlardan 10 yıl içinde meme kanseri gelişenlerin serumlarında beta-kriptoksantin, likopen ve lutein/zeaksantin düzeyleri incelenmiş, kanser olmayanlarda daha yüksek serum değerleri bulunmasıyla, meme kanseri açısından koruyucu olabilecekleri sonucuna varılmıştır (6).

2001 yılında, İsrailde yapılan bir araştırmada Wardi ve arkadaşları, tioasetamin verilerek siroz yapılan farelerde likopenin etkisini araştırmış, fibrozisin azaldığı gösterilmiş ancak marker olarak kullanılan hepatik hidroksiprolin seviyelerinde istatistiksel anlamlı bir sonuca ulaşılamamıştır (79).

Yaping ve arkadaşları 2002 yılında, yaptıkları bir çalışmada, insan ve hayvanlarda hepatotoksisite oluşturan bir ksenobiyotik olan CCl_4 metabolizmasında oksijen varlığında oluşan triklorometil peroksil radikaline ($CCl_3O_2^{\bullet}$) karşı likopenin antioksidan aktivitesini araştırmış. Çalışmada, likopenin absorbe edildiği yerde renginin açıldığı görülmüştür. Bu da likopenin $CCl_3O_2^{\bullet}$ ile kolayca reaksiyona girdiğini göstermektedir. Çalışmanın sonucunda CCl_4 ile hasar verilmiş sıçanlarda hayatta kalma süresinin artması üzerine, likopenin faydalı etkisi olduğu şeklinde yorumlanmıştır (48).

Velmurugan ve arkadaşlarının 2002'de yaptığı çalışmada, sodyum kloritin varlığında N-metil-N- nitro-N-nitrosoquanidin (MNNG) ile tümör geliştirdikleri sıçanların

kanında lipit peroksidasyonun seviyesinin arttığı, antioksidan bir enzim olan GPx aktivitesinin de düştüğü görülmüş, likopen verilmesinden sonra lipit peroksidasyon seviyesinin düştüğü, GPx enzim aktivitesinin de arttığı bulunmuştur (80).

Yine 2002'de, Polidori ve arkadaşları, sağlıklı kişiler ile orta derece konjestif kalp rahatsızlığı olan (sınıf II) ve ileri derece kalp rahatsızlığı olan (sınıf III) kişilere Vit- A ve çeşitli antioksidan maddeler (likopen, Vit-E, lutein, zeaksantin, β-kriptoksantin, α-karoten, β-karoten) verilerek bu bileşiklerin hasta plazmasındaki düzeyleri ile MDA düzeyleri karşılaştırılmıştır. Kontrollere göre hasta gruplarında, verilen bu maddelerin hepsinin plazmadaki seviyeleri önemli derecede düşük, MDA düzeyleri ise yüksek bulunmuştur. Yine bu çalışmada sınıf III hastalar göre sınıf II hastaların MDA düzeyinin önemli derecede düşük, Vit-A, Vit-E, lutein ve likopen seviyelerinin önemli derecede yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu bulgulara dayanarak bu tip bileşiklerin tüketilmesinin kardiyovasküler hastalıklara faydalı olacağı ileri sürülmüştür (81).

1997'de Fhurman ve arkadaşları, makrofajlarda, likopen veya β-karotenin, kolestrol metabolizması üzerine etkisi konulu yaptıkları çalışmada, zengin miktarda likopen veya β-karoten içeren makrofajlarda, hücresel kolesterol sentezinin engellenmesi ve LDL reseptör aktivitesinin yükseldiği açık bir şekilde gösterilmiştir (82). Bu da, karotenoidlerin, belki de hipokolestrolemik ajanlar olarak tanımlanabileceğini göstermesi açısından önemlidir.

Humberto ve arkadaşlarının 2001'de yaptığı bir çalışmada, ferrik-nitrilotriasetat'ın (Fe-NTA) sıçanlarda neden olduğu oksidatif strese karşı, likopenin koruyucu etkisine bakılmıştır. Sonuçta, kontrole göre sadece Fe-NTA ile verilen hayvanlarda MDA düzeyi %75 artarken, Fe-NTA uygulamadan 5 gün önce likopen verilen grupta MDA düzeyinin önemli derecede düştüğü belirlenmiştir. Histolojik olarak da yine likopenli grupta oksidatif hasarın engellendiği gösterilmiştir (83).

Breinholt ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları, sıçanlarda, PhIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazol piridin)'in neden olduğu plazma lipit peroksidasyonuna likopenin antioksidan enzim aktivitelerine etkisi konulu bir çalışmada, likopenin GPx ve SOD

aktivitesini arttırdığı, katalaz aktivitesinde herhangi bir değişiklik yapmadığı saptanmıştır (13).

Stahl ve arkadaşlarının1998'de yaptıkları bir çalışmada, diyetle sağlanan havuç suyu yada domatesin DNA tamir yeteneğini artırıcı etkisi bildirilmiştir (84).

Yaping ve arkadaşları'nın 2002'de yaptıkları çalışmaya göre, likopen singlet oksijen süpürücü, nitrojen dioksit, sülfonil serbest radikallerini toplayıcı, lenfosit DNA'sı ve hücre zarlarındaki oksidatif hasarı engelleyici özellikleri olduğu bildirilmiştir (48).

Yalnızca alkol vererek karaciğer hasarı oluşturduğumuz grubun AST, ALT değerleri alkol+likopen verilen gruptan yüksekti ($p<0.05$). Yine 1. grubun karaciğer dokularının histopatolojik incelenmesinde karaciğer hücre hasarı daha fazla idi. Bu bulgularımız yukarıdaki literatürlerle de uyumlu idi.

Tüm bu çalışmalarda olduğu gibi bizim araştırmamızda da, 10 hafta boyunca sıçanlara verilen domates suyu ve dolayısı ile likopen miktarı, ağırlıklar ile oranlandığında bizim diyet alışkanlıklarımız ne olursa olsun günlük alım oranlarımıza göre çok fazladır, bu dozlar ancak likopen tabletleri alındığında sağlanabilmektedir. Buna rağmen likopen kaynağı olarak domatesin tüketilmesi de araştırıcılar tarafından tavsiye edilmektedir (85).

SONUÇLAR

- Bir grup sıçanda kronik alkolizm oluşturuldu. AST ve ALT serum değerleri ve AST/ALT oranının alkolik karaciğer hasarının bir göstergesi olduğu görüldü. Karaciğer doku örneklerinin patolojik incelenmesi sonucu alkolün karaciğer hasarı yaptığı tespit edildi.

- Çalışmamızda alkol+likopen grubunda serum AST, ALT değerleri alkol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ve sonuçlar kontrol grubuyla yakınlık gösterdi. Karaciğer doku kesitlerinin patolojik incelenmesi sonucu bu gruptaki karaciğer hasarının alkol grubuna göre daha az olduğu ya da patolojik özellik göstermediği görüldü.

- Tüm bu sonuçlarla beraber oksidatif stres ile açıklanan alkolik karaciğer hastalıklarının gelişim sürecinde deneysel olarak antioksidan özellikleri bilinen likopenin koruyucu etkisi olduğu ortaya kondu.

ÖZET

Bu çalışmada deneysel olarak, sıçanlarda oksidatif stres oluşturan ve kronik kullanımda karaciğere toksik etkisi bilinen alkole karşı, antioksidan özellikleri bilinen likopenin ne derece koruyucu etkileri olduğu araştırıldı.

Çalışmada 30 adet 3 aylık Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar üç eşit gruba ayrıldı. Çalışmamızdaki bütün sıçanlara deney süresince, normal pellet fare yemi verildi. Bir grup sıçana kronik alkolizm oluşturmak amacıyla 10 hafta süreyle likit olarak, günde 500 ml %20'lik etanol verildi. Bu grup 2. Grup olarak belirlendi ve alkol grubu adı verildi. 3. Grup alkol+likopen grubu olarak adlandırıldı. Bu gruba da 10 hafta süreyle günde yine 500ml sıvı verildi, sıvının %20'si etanol, %50'si domates suyu ve %30'u çeşme suyu olarak belirlendi. Bu sıvı da 100ml saf alkol+ 250 ml domates suyu (27mg likopen-Tablo 6) + 150ml çeşme suyu şeklinde hazırlandı. 1. Grubumuz kontrol grubu oldu ve gruba 10 hafta süreyle günde 500 ml çeşme suyu verildi (12, 66, 67). Son uygulamadan sonraki 24. saatte tüm hayvanlardan eter anestezisi altında uygun teknikler kullanılarak kan ve karaciğer örnekleri alındı. Alınan kanlarda, serum AST ve ALT değerleri kinetik yöntemle Abbot Aeroset otoanalizöründe çalışıldı. Karaciğer dokuları da histopatolojik olarak incelendi. Etanolle beslenen grupta, serum AST ve ALT enzim düzeylerinin alkolik karaciğer hasarını yansıtacak şekilde yükseldiği gözlendi, kontrol grubu ve likopen alan grupla kıyaslandığında, AST, ALT serum düzeyleri ile AST/ALT oranları anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$). Kontrol grubundaki ve likopen + etanolle beslenen gruptaki sıçanların AST, ALT serum düzeyleri ve AST/ALT oranları arasında ise anlamlı bir fark olmadığı ($p <0.05$) görüldü. Rutin takip yöntemiyle hazırlanan karaciğer doku kesitleri %10 formaldehit içinde tespit edildi. Hastanemiz patoloji laboratuarında hemotoksilen-eozin ile boyanıp ışık mikroskobunda incelendi. Alınan karaciğer örneklerinin patolojik incelenmesi sonucu etanol alan grubun, %10'unda makroveziküler yağlanma, %30'unda mikroveziküer yağlanma, %60'ında sinozoidal hücrelerde artış ve parenkim hücrelerinde şişme görüldü. Alkol+likopen grubunun %40'ı normal parenkim yapısına sahipken, %20'sinde mikroveziküler yağlanma, % 40'ında hepatositlerde şişme tespit edildi. Kontrol grubundaki karaciğer örneklerinde ise normal parenkim yapı gözlendi.

Sonuç olarak hem serum AST, ALT düzeyleri göz önüne alındığında hem de karaciğer doku örneklerindeki patoloji sonuçları değerlendirildiğinde likopenin, alkolle oluşan oksidatif stresi önleyici etkisi olduğu ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: Alkol, likopen, AST, ALT, patoloji, sıçan

SUMMARY

It was investigated in this experiment how protective lycopene, with known antioxidant properties, was against alcohol which causes oxidative stress in rats and causes toxic effects in the liver with chronic use.

30 3-month-old male Wistar male rats were used in the study. The rats were divided in three groups. All the rats in the study were fed with normal pellet Mouse food during the experiment. One group was given 500 ml of 20% ethanol daily for ten weeks in order to cause chronic alcholisim. This group was called group 2 , the alcohol group. The third group was called the alcohol+ lycopene group and the rats in this group were given 500 ml of liquid daily, which was 20% ethanol, 50% tomato juice and 30% tap water. Therefore they received 100 ml of pure alcohol, 250 ml of tomato juice and 150 ml of tap water daily. The first group was the control group which received 500 ml of tap water daily for ten weeks. At the end of ten weeks, within the first 24 hours, blood and liver species were obtained from the animals under ether anesthesia using appropriate techniqeus. In blood specimens, AST and ALT were measured in the Abbot Aeroset autoanalyzer using kinetic methods. The liver specimens were examined histopathologically. In group 2 , which was given ethanol only, serum AST and ALT levels were elevated reflecting the alcoholic liver damage , when compared to group 3 , the lycopene group, and group 1, the control group, the serum AST and ALT levels and the AST/ALT ratio were higher , reaching statistical significance ($p<0.05$) When group 3 , the lycopene group, and group 2, the control group were compared, the difference between serum AST and ALT levels and AST/ALT ratios didnot reach statistical significance.($p< 0.05$) The liver preparations were fixated in 10% formaldehyde. They were then stained with hemotoccilen-eocin and examined under the light microscope in the pathology department of our hospital. The pathological investigation of the second group of preparations showed that 10% had macrovesicular fat, 30% had microvesicular fat, and 60% had increased sinusoidal cells and swelling of the parenchymal cells. The preparations of the third group, the lycopene group, had 40% normal parenchymal cells, 20% microvesicular fat and 40 % had swelling of the hepatocytes. The liver parencymal cells of the control group were normal.

In conclusion, the evaluation of serum AST and ALT levels and the pathological examination of liver specimens in our study show that lycopene can protect against the oxidative stres of alcohol.

Key Words: Alcohol, lycopene, AST, ALT, pathology, rat

KAYNAKLAR

1.Montgomery R., Conway T., Spector A., Chappell D.: Biochemistry A Case-Oriented Approach, 6th edition. 5: p.140 Mosby- Year book, 1996.

2. Aruoma O., Kaur H., Halliwell B.: Oxygen free radicals and human diseases. J R Soc Health. 111(5):172-7. Review 1 1991.

3. Porter NA.: Chemistry of lipid peroxidation. Methods Enzymol.105:273-282, 1984.

4. Southorn PA., Powis G.: Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. Mayo Clin Proc.63(4):381-9. Review 1988.

5. Cochrane CG.: Cellular injury by oxidants. Am J Med. 30;91(3C):23-30, 1991.

6. Dorgan JF., Sowell A., Swanson CA., Potischman N., Miller R., Schussler N., Stephenson HE. Jr. : Relationships of serum carotenoids, retinol, alpha-tocopherol and selenium with breast cancer risk: results from a prospective study in Columbia, Missouri (United States). Cancer Causes Control. 9(1):89-97, 1998.

7. Giovannucci E.: Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: review of the epidemiologic literature. J Natl Cancer Inst. 17;91(4):317-31, 1999.

8. Mashima R., Witting PK., Stocker R.: Oxidants and antioxidants in atherosclerosis.Curr Opin Lipidol. 12(4):411-418, 2001.

9. Boileau TW., Clinton SK., Zaripheh S., Monaco MH., Donovan SM., Erdman JW. Jr.: Testosterone and food restriction modulate hepatic lycopene isomer concentrations in male F344 rats. J Nutr. 131(6):1746-52, 2001.

10. Rousseau EJ., Davison AJ., Dunn B.: Protection by beta-carotene and related compounds against oxygen-mediated cytotoxicity and genotoxicity: implications for carcinogenesis and anticarcinogenesis. Free Radic Biol Med. 13(4):407-433, Review 1992.

11. Bramley PM.: Is lycopene beneficial to human health. Phytochemistry. 54(3):233-6, Review 2000.

12. Khachik F., Carvalho L., Bernstein PS., Muir GJ., Zhao DY., Katz NB.: Chemistry, distribution and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. Exp Biol Med (Maywood). 227(10):845-51, Review 2002.

13. Dorgan JF., Sowell A., Swanson CA., Potischman N., Miller R., Schussler N., Stephenson HE. Jr. Dose-response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat. Cancer Lett. 30;154(2):201-10, 2000.

14. Cadenas E., Packer L.: Handbook of antioxidants. Marcel Dekker. İnc. New York, 1996

15. Lieber CS.: Alcohol and the liver: 1994 update. Gastroenterology. 106(4):1085-105, Review 1994.

16. Lieber CS.: Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. Alcohol. 34(1):9-19, Review 2004.

17. Jaeschke H., Gores GJ., Cederbaum AI., Hinson JA., Pessayre D., Lemasters JJ.: Mechanisms of hepatotoxicity. Toxicol Sci. 65(2):166-76, Review 2002.

18. Wallach J.: Interperatation of Diagnostic Tests., 8:199-235, 7th edition, Lippincott Williams Wilkins, 2000.

19. Fickert P., Zatloukal K.: Pathogenesis of alcoholic liver disease. In: Handbook of Alcoholism (Eds. G. Zernig, A. Saria, M. Kurz, and S.S. O'Malley) Boca Raton, FL: CRC Press, 317-323, 2000.

20. Dolar E.: Klinik Karaciğer Hastalıkları. Bölüm 4, s. 133-146, 1.Baskı, Nobel&Güneş Tıp Kitabevi, 2002.

21. Clot P., Tabone M., Arico S., Albano E.: Monitoring oxidative damage in patients with liver cirrhosis and different daily alcohol intake. Gut. 35(11):1637-43, 1994.

22. Deby C., Pincemail J.: Oxygen toxicity, free radicals and defense mechanisms. In: Rökan (Ginkgo Biloba). Recent result in pharmacology and clinic. Ed: Fünfgeld EW. Springer- Verlag, Berlin pp:57-70, 1988.

23. Murray RK. et al.: Harper's Biochemistry 13:110-5, 23 th ed. Appleton and Lange, 1990.

24. Akkuş İ.: Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. s. 3-10, 1. Baskı, Mimoza Yayınları, 1995.

25. Cheeseman KH., Slater TF.: An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull. 49(3):481-93, Review 1993.

26. Grisham MB., Mc Cord JM.: Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. In: Physiology of oxygen radicals. Ed: Taylor AE, Malton S, Ward PA. American Phsiology Society, Bethesda, Maryland, USA, pp: 1-18, 1986.

27. Sarti P., Giuffre A., Barone M., Forte E., Mastronicola, D. & Brunori, M.: Free Radical Biol. Med. 34**,** 509–520, 2003.

28. Halliwell B., Gutteridge JMC.: Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, 2001.

29. Halliwell B., Chirico S.: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. Am J Clin Nutr.; 57(5 Suppl): 715-724; discussion 724-725, 1993

30. Mathers J., Fraser JA., McMahon M., Saunders RD., Hayes JD., McLellan LI.: Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress. Biochem Soc Symp. (71):157-76, 2004.

31. Cooke MS., Evans MD., Dizdaroglu M., Lunec J.: Oxidative DNA damage mechanisms, mutation, and disease. FASEB J. 17(10):1195-214, Review 2003.

32. Fang YZ., Yang S., Wu G.: Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition. 18(10):872-9, Review 2002.

33. Aslan R.: Homeostatik mekanizmanın korunması ve sağaltımda antioksidanlar. İlaç ve Tedavi Dergisi, Cilt:12, sayı:8, 475-480, 1999.

34. You M., Crabb DW. : Recent advances in alcoholic liver disease II. Minireview: molecular mechanisms of alcoholic fatty liver. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 287(1):G1-6, Review 2004.

35. Montgomery R.: Biochemistry A case-oriented Approach 6th edition 5: p.203-204 Mosby- Year book, 1996

36. Janssen YMW., Houten BV., Borm PJA., Mossman BT. : Biology of disease, cell and tissue responses to oxidative damage. Lab. Invest., 69: 261-274. 1993

37. Hoerner M., Behrens UJ., Worner T., Lieber CS.: Humoral immune response to acetaldehyde adducts in alcoholic patients. Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 54(1):3-12, 1986.

38. Tuma DJ.: Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. Free Radic Biol Med. 15;32(4):303-8, Review 2002.

39. Albano E.:Free radical mechanisms in immune reactions associated with alcoholic liver disease.Free Radic Biol Med. 15;32(2):110-4, Review 2002.

40. Lumeng L., Crabb DW.: Genetic aspects and risk factors in alcoholism and alcoholic liver disease. Gastroenterology. 107(2):572-8, Review 1994.

41. Lindi C., Montorfano G., Marciani P.: Rat erythrocyte susceptibility to lipid peroxidation after chronic ethanol intake. Alcohol. 16(4):311-6.1998.

42. Lieber C.: Metabolism of alcohol: an update. In Alcoholic Liver Disease. Pathology and Pathogenesis, 2nd edn, Hall, P. ed., pp 17–40. Edward Arnold, London, 1995.

43. Li YM., Chen SH., Yu CH., Zhang Y., Xu GY.: Effect of acute alcoholism on hepatic enzymes and oxidation/antioxidation in rats. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 3(2):241-4, 2004

44. Samir P., Desai MD., Sana Isa-Pratt MD.: Clinician's Guide to Laboratory Medicine. Chapter 66, p.612- 613, Lexi-Comp Inc, 2004.

45. Tietz Fundamentales of Clinical Chemistry, p. 354-355, 5th.edition, Saunders Company, 2005.

46. Tietz Fundamentales of Clinical Chemistry, p.769, 5th.edition, Saunders Company, 2005.

47. Stahl W., Sies H .: Lycopene: a biologically important carotenoid for humans. Arch Biochem Biophys. 1;336(1):1-9, Review 1996.

48. Yaping Z., Suping Q., Wenli Y., Zheng X., Hong S., Side Y., Dapu W.: Antioxidant activity of lycopene extracted from tomato paste towards trichloromethyl peroxyl radical $CCl_3O_2^{\cdot}$. Food Chemistry, 77, 209-212, 2002.

49. Handelman GJ.: The evolving role of carotenoids in human biochemistry. Nutrition. 17(10):818-22, 2001.

50. Canene-Adams K., Campbell JK., Zaripheh S., Jeffery EH., Erdman JW. Jr.: The tomato as a functional food. J Nutr. 135(5):1226-30, 2005.

51. Stahl W., Sies H.: Bioactivity and protective effects of natural carotenoids BBA-Molecular basis of disease vol. 1740:2:101-107, 2005.

52. Kucuk O., Sarkar FH., Djuric Z., Sakr W., Pollak MN., Khachik F., Banerjee M., Bertram JS., Wood DP. Jr.: Effects of lycopene supplementation in patients with localized prostate cancer.Exp Biol Med (Maywood). 227(10):881-5, 2002.

53. Kozuki Y., Miura Y., Yagasaki K.: Inhibitory effects of carotenoids on the invasion of rat ascites hepatoma cells in culture. Cancer Lett. 3;151(1):111-5, 2000.

54. Young AJ., Lowe GM.: Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. Arch Biochem Biophys. 1;385(1):20-7, Review 2001.

55. Mannisto S., Smith-Warner SA., Spiegelman D., Albanes D., Anderson K., van den Brandt PA., Cerhan JR., Colditz G., Feskanich D., Freudenheim JL., Giovannucci E., Goldbohm RA., Graham S., Miller AB., Rohan TE., Virtamo J., Willett WC., Hunter DJ.: Dietary carotenoids and risk of lung cancer in a pooled analysis of seven cohort studies. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.13(1):40-8, Review 2004.

56. Stahl W., Sies H.: Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. J Nutr. 122(11):2161-6, 1992.

57. Erhardt JG., Meisner C., Bode JC.: Lycopene, beta-carotene and colorectal adenomas. Am J Clin Nutr. 78(6):1219-24, 2003.

58. Khachik F., Spangler CJ., Smith JC. Jr., Canfield LM., Steck A., Pfander H.: Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum.Anal Chem. 15;69(10):1873-81, 1997.

59. Tanumihardjo SA., Furr HC., Amedee-Manesme O., Olson JA.: Retinyl ester (vitamin A ester) and carotenoid composition in human liver. Int J Vitam Nutr Res. 60(4):307-13, 1990.

60. Kaplan LA., Lau JM., Stein EA.: Carotenoid composition, concentrations, and relationships in various human organs. Clin Physiol Biochem. 8(1):1-10.1990.

61. Clinton SK., Emenhiser C., Schwartz SJ., Bostwick DG., Williams AW., Moore BJ., Erdman JW. Jr.: cis-trans lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 5(10):823-33, 1996.

62. Khachik F., Askin FB., Lai K.: Distribution, bioavailability, and metabolism of carotenoids in humans. In: Bidlack WR, Omaye ST, Meskin MS, Jahner D. Eds. Phytochemicals, a New Paradigm. Lancaster, PA: Technomic Publishing, Chapter 5: pp77–96, 1998.

63. Rao AV., Fleshner N., Agarwal S.: Serum and tissue lycopene and biomarkers of oxidation in prostate cancer patients: a case-control study. Nutr Cancer. 33(2):159-64.1999

64. Pellegrini N., Riso P., Porrini M.: Tomato consumption does not affect the total antioxidant capacity of plasma. Nutrition. 16(4):268-71, 2000.

65. Ishii H., Watanabe Y., Okuno F., Takagi T., Munakata Y., Miura S., Shigeta Y., Tsuchiya M.: Alcohol-induced enhancement of intestinal gamma-glutamyl transpeptidase activity in rats and humans: a possible role in increased serum gamma-glutamyl transpeptidase activity in alcoholics. Alcohol Clin Exp Res. 12(1):111-5, 1998.

66. Orellana M., Valdes E., Fernandez J., Rodrigo R.: Effects of chronic ethanol consumption on extramitochondrial fatty acid oxidation and ethanol metabolism by rat kidney. Gen Pharmacol. 30(5):719-23, 1998.

67. Okajima E., Tsutsumi M., Ozono S., Akai H., Denda A., Nishino H., Oshima S., Sakamoto H., Konishi Y.: Inhibitory effect of tomato juice on rat urinary bladder carcinogenesis after N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine initiation. Jpn J Cancer Res. 89(1):22-6, 1998.

68. Matsumoto T., Moriguchi R., Yamada H.: Role of polymorphonuclear leucocytes and oxygen-derived free radicals in the formation of gastric lesions induced by HCl/ethanol, and a possible mechanism of protection by anti-ulcer polysaccharide. J Pharm Pharmacol. 45(6):535-9, 1993.

69. Koch OR., Galeotti T., Bartoli GM., Boveris A.: Alcohol-induced oxidative stress in rat liver.Xenobiotica.21(8):1077-84, 1991.

70. Nishimura M., Teschke R.: Effect of chronic alcohol concumption on the activites of liver plasma membrane enzymes. Biochem Pharmacol. 31 (3): 377-381, 1982.

71. Teschke R., Neuefeind M., Nishimura M., Strohmeyer G.: Hepatic gamma-gltamyltransferase activity in alcoholic fatty liver. Gut 24:625-630, 1983.

72. Glinsukon T., Taycharpipranai S., Toskulkao C.: Alphatoxin 1 hepatotoxicity in rats preated with ethanol. Experientia. 34(7): 869-870, 1977.

73. Rousseau EJ., Davison AJ., Dunn B.: Protection by beta-carotene and related compounds against oxygen-mediated cytotoxicity and genotoxicity: implications for carcinogenesis and anticarcinogenesis. Free Radic Biol Med. 13(4):407-33, Review 1992.

74. Leal M., Shimada A., Ruiz F., Gonzalez de mejia.: Effect of lycopene on lipid peroxidation and glutathione-dependent enzymes induced by T-2 toxin in vivo. Toxicol Lett. 20;109(1-2):1-10, 1999.

75. Rao A.V., Agarwal S.: Effect of diet and smoking on serum lycopene and lipid peroxidation, Nutrition Research, Vol:18, No:4, 713-721, 1998.

76. Agarwal S., Rao A.V.: Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. Lipids. 33(10):981-4, 1998.

77. Astorg P., Gradelet S., Berges R., Suschetet M.: Dietary lycopene decreases the initiation of liver preneoplastic foci by diethylnitrosamine in the rat. Nutr Cancer. 29(1):60-8, 1997.

78. Nagasawa H., Mitamura T., Sakamoto S., Yamamoto K.: Effects of lycopene on spontaneous mammary tumour development in SHN virgin mice. Anticancer Res. 15(4):1173-8, 1995

79. Wardi J., Reifen R., Aeed H., Zadel L., Avni Y., Bruck R.: Beta-carotene attenuates experimentally induced liver cirrhosis in rats. Isr Med Assoc J. 3(2):151-4, 2001.

80. Velmurugan B., Bhuvaneswari V., Balasenthil S., Nagini S.: Lycopene, an antioxidant carotenoid modulates glutatione-dependent hepatic biotransformation enzymes during experimental gastric carcinogenesis, Fitoterapia, 73, 604-611, 2002.

81. Polidori M.C., Savino K., Alunni G., Freddio M., Senin U., Sies H., Stahl W., Merocci P.: Plasma lipophilic antioxidants and malondialdehyde in congestive heart failure patients: relationship to disease severity. Free Radic Biol Med. 15;32(2):148-52, 2002.

82. Fuhrman B., Elis A., Aviram M.:Hypocholesterolemic effect of lycopene and beta-carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages.Biochem Biophys Res Commun. 28;233(3):658-62, 1997.

83. Matos HR., Capelozzi VL., Gomes OF., Mascio PD., Medeiros MH.: Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitrilotriacetate. Arch Biochem Biophys. 15;396(2):171-7, 2001.

84. Stahl W., Junghans A., de Boer B., Driomina ES., Briviba K., Sies H.: Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein. FEBS Lett. 1998 May 8;427(2):305-8, 1988.

85. Cohen LA.: A review of animal model studies of tomato carotenoids, lycopene, and cancer chemoprevention. Exp Biol Med (Maywood). 227(10):864-8, 2002.