

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DMBA İLE OLUŞTURULAN RAT
KARACİĞER HASARINDA RESVERATROL
VE PEKMEZİN KARACİĞER ENZİMLERİ
VE OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Nejla BOZKURT
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Aysun BAY KARABULUT**

MALATYA – 2014

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DMBA İLE OLUŞTURULAN RAT
KARACİĞER HASARINDA RESVERATROL
VE PEKMEZİN KARACİĞER ENZİMLERİ
VE OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

NEJLA BOZKURT

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Aysun BAY KARABULUT

**Bu araştırma, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından 2012/88 proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA-2014

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Tıbbi Biyokimya Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ

Danışman

Prof. Dr. Aysun BAY KARABULUT

Üye

Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR

ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu...../...../2014 tarih ve 2014/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ

Enstitü Müdür

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşip desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Aysun BAY KARABULUT'a, tez çalışmamda büyük emeği geçen, tecrübeleri ve manevi destekleriyle yanımda olan Değerli Dr. Fatma ÖZYALIN'a, çalışmamın her aşamasında yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen araştırma görevlileri Değerli Gül ve Önder OTLU' ya teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan ve beni destekleyen sevgili aileme teşekkürü borç bilirim.

Çalışmamızın istatistik analizleri için Sayın Yrd. Doç. Dr. Harika GÖZÜKARA'ya, histopatolojik incelemelerde yardımcı olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Nurhan ŞAHİN' e teşekkür ederim.

Bu çalışma 2012/88 proje numarası ile İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Adı geçen kuruma teşekkür ederim.

ÖZET

Resveratrol, güçlü bir antioksidan olup, siyah üzüm, yer fıstığı, ananas vs gibi meyvelerde bulunan antioksidan bir maddedir. Çalışmamızda, 7,12-dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) ile oluşturulan karaciğer hasarı üzerine pekmezin antioksidan etkisini incelemek ve bunu resveratrolle kıyaslamak amacıyla karaciğer enzimleri ve oksidatif stres parametreleri üzerine etkisi araştırıldı.

Çalışmada 18 haftalık, 42 adet dişi Wistar Albino ratlar kullanıldı. Ratlar, 6 gruba ayrıldı. **1.** Kontrol Grubu, 2:3 oranında susam yağı+DMSO karışımından günlük 10 mg/kg subkutan (sk); **2.** DMBA Grubu, sadece 0. ve 7. gün subkutan 10 mg/kg DMBA; **3.** DMBA+Pekmez Grubu, DMBA uygulaması ile birlikte % 20 pekmezli yem; **4.** DMBA+Resveratrol Grubu, DMBA uygulaması ile birlikte günlük 10 mg/kg resveratrol subkutan; **5.** Pekmez Grubu, sadece % 20 pekmez içeren yem; **6.** Resveratrol Grubu, günlük 10 mg/kg resveratrol subkutan uygulandı. Ratlar 10.günde karaciğer dokuları ve kanları alınarak sakrifiye edildi.

Serumda; ALT, AST, GGT ve karaciğer dokusunda ise; 5'-Nükleotidaz, total antioksidan seviye (TAS) ve total oksidan seviye (TOS) biyokimyasal ölçümler için kullanıldı.

DMBA+Resveratrol ve DMBA+Pekmez gruplarında ALT, AST ve GGT seviyelerinde yalnız DMBA verilen gruba göre anlamlı bir düşüş görüldü ($p<0,05$). Ancak bu düşüş DMBA+Pekmez grubunda DMBA+Resveratrol grubuna göre daha belirgindi. DMBA grubunda 5'-Nükleotidaz seviyesi artarken, DMBA+Resveratrol ve DMBA+Pekmez gruplarında bu artış baskılanmıştır ($p<0,05$). Resveratrol ve pekmezin karaciğer hücre harabiyeti üzerinde iyileştirici etkisi olduğu görüldü.

DMBA ile oluşturulan karaciğer hasarında TAS seviyeleri kontrol grubuna göre düşük bulundu. DMBA+Resveratrol ve DMBA+Pekmez gruplarında TAS seviyeleri, DMBA verilen gruba göre anlamlı ölçüde artmış olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). Çalışmamızda DMBA+Resveratrol ve DMBA+Pekmez gruplarında TOS seviyesinin, DMBA verilen gruba göre azaldığı görüldü ($p<0,05$). DMBA ile birlikte verilen Resveratrol ve Pekmez grupları arasında TOS seviyeleri bakımından anlamlı

fark bulundu. Sonuç olarak, pekmez ve resveratrolün karaciğerde oksidatif stres seviyesini düşürdüğü ve antioksidan sistemleri aktive ettiğini söyleyebiliriz.

Anahtar kelimeler: DMBA (7,12-dimetilbenz[a]antrasen), resveratrol, üzüm pekmezi, oksidatif stres, karaciğer enzimleri

ABSTRACT

INVESTIGATION OF EFFECTS OF THE RESVERATROL AND GRAPE MOLASSES ON HEPATIC ENZYMES AND OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN THE RAT HEPATIC INJURY INDUCED BY DMBA

Resveratrol is a potent antioxidant and some fruits such as black grapes, peanut and ananas have great amount of resveratrol. Our experiments aim to investigate the antioxidant effects of grape mollasses on DMBA induced hepatic injury in terms of hepatic enzymes and oxidative stress parameters. We also want to compare the antioxidant effects of grape mollasses and resveratrol in hepatic injury.

42 female (18 weeks) Wistar Rats were used in this experiment. Rats were distributed to 6 groups as follow. **1.** Sussame oil plus DMSO (2:3 portionally) were enjected 10 mg/kg subcutaneously (sc per day), in the control group; **2.** 10 mg/kg DMBA enjected subcutane only on first and 7th days, in the DMBA group; **3.** 20 % percent molassas feeding and DMBA injection, in the DMBA+Molasses Group; **4.** DMBA injection subcutane only on the first and 7th days; 10 mg/kg resveratrol subcutane per day, in the DMBA+ Resveratrol group; **5.** only 20 % percent molassas feeding, in the Molasses Gruop; **6.** 10 mg/kg resveratrol was enjected subcutane per day, in the Resveratrol group. Rats were sacrificed after the taking liver tissue and blood sample on the 10th day .

ALT, AST and GGT levels were measured in serum samples and liver tissues used for measurement of total antioxidant capacity (TAS), total oxidant capacity (TOS) and 5'Nucleotidase levels.

The comparision of ALT, AST and GGT levels, a significant decrease were detected in the DMBA+Resveratrol and DMBA+Molasses groups comparing to DMBA group. Beside, this decrease is more prominent in DMBA+Molasses group according to DMBA+Resveratrol group.

However we found 5'Nucleotidase enzyme activity was suppressed this increasing in DMBA group DMBA+ Molasses and DMBA+Resveratrol groups. According to these results, we can claim that both resveratrol and grape mollasses have beneficial effects on hepatic injury.

In this study we observed that liver TAS levels was decreased in DMBA group compared with the control group. But DMBA+Resveratrol and DMBA+ Molasses groups have a significant increase in liver TAS compared with only DMBA injected group. We also observed a decrease in liver TOS levels in DMBA+Resveratrol and DMBA+ Molasses groups compared with DMBA injected group.

As a conclusion, we concluded that Molasses and Resveratrol can supress for oxidative stress levels and activate the antioxidant system in DMBA induced liver injury.

Key Words: 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), resveratrol, grape mollasses, oxidative stress, liver enzymes

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
TABLolar DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH) Genel Bilgiler	3
2.1. 2 PAH Metabolizması	4
2. 2. DMSO (dimetilsülfoksit)	7
2.3. Resveratrol	8
2.3.1. Resveratrol Hakkında Genel Bilgiler	8
2.3.2. Resveratrolun Kimyasal Yapısı	8
2.3.3. Resveratrolün Biyosentezi	9
2.3.4. Resveratrolün Hücre İçine Alınması	10
2.3.5. Resveratrolün Hücre İçi Reseptörlere Bağlanması	11
2.3.6. Resveratrolün Dolaşımında Taşınması ve Dokulara Transportu	11
2.3.7. Resveratrolun Etkileri	12

2.3.7.1. Resveratrolün Düz Kas ve Endotel Üzerine Etkileri	12
2.3.7.2. Resveratrolün Antioksidan Etkisi	12
2.3.7.3. Resveratrolün Prooksidan Özelliği	13
2.3.7.4. Resveratrolün Damar Genişletici Etkisi	13
2.3.7.5. Anti-İnflamatuar Etkisi	14
2.3.7.6. Yaşlanma	14
2.4. Pekmez	14
2.4.1. Geleneksel Üzüm Pekmezinin Üretim Tekniği	16
2.4.2. Üzüm Pekmezinin Bileşimi	17
2.4.2.1. Pekmez ve vitaminler	17
2.4.2.2. Aminoasit Dengesi Bakımından Üzüm ve Pekmez	17
2.4.2.3. Pekmez Ve Mineral Maddeler	17
2.4.2.4. Fosfor	18
2.4.2.5. Potasyum	18
2.4.2.6. Kalsiyum	18
2.4.3. Pekmez ve Kanser	19
2.5. Karaciğer	19
2.5. 1. Karaciğerin Kan Dolaşımı ve Damarlanması	19
2.5. 2. Karaciğerin Fizyolojisi ve Fonksiyonları	20
2.5. 3. Hepatosit Hasarını Gösteren Enzimlerin Değerlendirilmesi	21
2.5. 4. Hepatosellüler Hasarın Tanısında Yardımcı Testler	22
2.5. 4.1. Aminotransferazlar (Transaminazlar)	22

2.5. 4.1.1. Alanin Aminotransfer (ALT)	22
2.5. 4.1.2. Aspartat Aminotransferaz (AST)	23
2.5.4.1.3. Gama Glutamil Transferaz (GGT)	24
2.6. Serbest Radikaller	25
2.6.1. Reaktif Oksijen Türleri	27
2.6.1.1. Süperoksit Radikali	29
2.6.1.2. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	29
2.6.1.3. Hidroksil Radikali	30
2.6.1.4. Singlet Oksijen	31
2.6.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri	31
2.6.2.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri	33
2.6.2.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri	33
2.6.2.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere Etkileri	33
2.6.2.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri	34
2.6.3. Serbest Radikallerin Zararları	34
2.7. Antioksidanlar	34
2.7.1. Antioksidanların Sınıflandırılması	35
2.7.2. Enzimatik Antioksidanlar	37
2.7.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	37
2.7.2.2. Katalaz (CAT)	37
2.7.2.3. Glutatyon Peroksidaz (GPx)	37
2.7.2.4. Glutatyon-S-Transferaz (GST)	38

2.7.2.5. Glutasyon Redüktaz (GRx)	38
2.7.3. Nonenzimatik (Organik) Antioksidanlar	39
2.7.3.1. Redükte Glutasyon (GSH)	39
2.7.3.2. Flavonoidler	39
2.8. Oksidatif Stres	39
2.8.1. Oksidatif Stres Parametreleri	40
2.8.1.1. Nitrik Oksit (NO)	40
2.8.1.2. Malondialdehid (MDA)	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1. Ratların Temini	43
3.2. Deney Grupları	43
3.3 Resveratrol, Pekmez ve DMBA' nın Hazırlanması	44
3.4. Pekmezin Hazırlanması	44
3.5. Kan ve Karaciğer Dokularının Elde Edilmesi ve Analizlere Hazırlanması	44
3.5.1. Doku Homojenizasyonu ve Tamponları	44
3.5.2. Serumda AST, ALT, GGT Tayini	45
3.5.2.1. Aspartat Aminotransferaz (AST, SGOT) Tayini	45
3.5.2.2. Alanin Aminotransferaz (ALT, SGPT) Tayini	45
3.5.2.3. Gama-Glutamil Transferaz (GGT) Tayini	45
3.5.3. Karaciğer Dokusunda TAS, TOS, OSİ ve 5'-Nükleotidaz	45
3.5.3.1. Total Antioksidan Status (TAS) ve Total Oksidan Status (TOS)	46
3.5.5.2. Total Oksidan Status (TOS) Aktivitesi Tayini	46

3.5.3.3. Total Antioksidan Status (TAS) Aktivitesi Tayini	47
3.5.3.4. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)	48
3.5.3.5. 5'-Nükleotidaz (5'NT) Tayini	48
3.6.1. Protein Miktar Tayini	49
3.7. Karaciğer Dokusunda Histopatolojik Analizler	50
4. BULGULAR	51
4.1. Serum Değerleri	51
4.1.1. Serum ALT Düzeyleri	52
4.1.2. Serum AST Düzeyleri	53
4.1.3. Serum GGT Düzeyleri	54
4.2. Karaciğer Dokusu Değerleri	55
4.2.1. Karaciğer Dokusu 5'-Nükleotidaz Düzeyleri	56
4.2.2. Karaciğer Dokusu TAS Düzeyleri	57
4.2.3. Karaciğer Dokusu TOS Düzeyleri	58
4.2.4. Karaciğer Dokusu OSİ Değerleri	59
4.3. Karaciğer Dokusunun Histopatolojik Bulguları.....	60
5. TARTIŞMA.....	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
7. KAYNAKLAR	68
8. EKLER	
8.1. EK.1. Etik Kurul Onay Belgesi	83
8.2. EK.2. Etik Kurul Onay Belgesi	84
8. ÖZGEÇMİŞ	85

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AhR	: Aryl hidrokarbon reseptörü
ALT	: Alanin Aminotransfer
AST	: Aspartat Aminotransferaz
ATP	: Adenozin trifosfat
BaP	: benzo(a)piren
CAT	: Katalaz
CMI	: Cell mediated immunity
CYP1A1	: Faz I enzimi
DMBA	: 7,12-dimetilbenz[a]antrasen
DMSO	: Dimetil sülfoksit
ELISA	: Enzym-linked immuno sorbant assay
GGT	: Gama Glutamil Transferaz
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GRx	: Glutasyon Redüktaz
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
HES	: Hidroksietil starch
HKH	: Hematopoetik kök hücreleri
HMF	: Hidroksi Metil Furfural
HMPA	: Hekzametilen fosfor amit
İNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
3-MC	: 3-metilkolantren
L-NAME	: Nitro-L-arjinin metil esteri
NO	: Nitrik oksit
5'-NT	: 5'-Nükleotidaz
PAC	: Polisiklik aromatik bileşikler
PAH	: Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
Pek	: Pekmez
PGC-1α	: Peroxisome-proliferator activated receptor- γ co-activator1 α
PNH	: Polinükleer aromatik hidrokarbonlar

RNS	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
Rsv	: Resveratrol
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
TAS	: Total antioksidan seviye
TCDD	: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör alfa
TOS	: Total oksidan seviye
μg	: Mikrogram
IU/L	: İnternasyonel Ünite/Litre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. 7,12-Dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) molekülü	4
Şekil 2.2. Benzo[a]piren' in bazı konjuge biçimlerinin kimyasal yapısı.....	4
Şekil 2.3. Benzo[a]piren'in metabolizması ve olası etkileri.....	6
Şekil 2.4. 7,12-Dimetilbenz[a]antrasen'in olası metabolik aktivasyon yolları.....	7
Şekil 2.5. DMSO' nun kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2.6. Resveratrolün kimyasal yapısı.....	8
Şekil 2.7. Resveratrolün trans ve cis kimyasal yapısı.....	9
Şekil 2.8. Resveratrolün Biyosentezi.....	9
Şekil 2.9. Resveratrolün hücre içine alınması, hücre yüzeyi ve hücre içindeki reseptörlerine bağlanması.....	10
Şekil 2.10. Resveratrolün Peroksidatif Metabolizması.....	13
Şekil 2.11. Moleküler oksijenden reaktif ara ürünlerin oluşumu.....	28
Şekil 2.12. Hücrenin mitokondri fraksiyonunda radikal oluşumu.....	31
Şekil 2.13. Glutatyon redoks döngüsü.....	38
Şekil 2.14. GSH'ın moleküler yapısı.....	39
Şekil 2.15. ROS üretiminin ve antioksidatif sistemlerin dengesi.....	42
Şekil 4.1. Serum ALT düzeylerinin karşılaştırılması.....	52
Şekil 4.2. Serum AST düzeylerinin karşılaştırılması.....	53
Şekil 4.3. Serum GGT düzeylerinin karşılaştırılması.....	54
Şekil 4.4. Karaciğer dokusu 5'-Nükleotidaz düzeylerinin karşılaştırılması.....	56
Şekil 4.5. Karaciğer dokusu TAS düzeylerinin karşılaştırılması.....	57

Şekil 4.6. Karaciğer dokusu TOS düzeylerinin karşılaştırılması.....	58
Şekil 4.7. Karaciğer dokusu OSİ düzeylerinin karşılaştırılması.....	59
Resim 4.1 Kontrol Karaciğer Dokusu	60
Resim 4.2: DMBA Grubunda santral venlerde yaygın konjesyon ve sinüzoidal dilatasyon	60
Resim 4.3: DMBA Grubunda santral vende konjesyon yanısıra parenkimde lenfoid topluluklar	60
Resim 4.4: DMBA+Rsv Grubunda minimal konjesyon	61
Resim 4.5: DMBA+Pek Grubunda minimal konjesyon ve sinüzoidal dilatasyon...	61

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Yaş üzüm ve bazı üzüm mamullerinin 100 gramındaki besin değerleri.....	15
Tablo 2.2. Üzüm pekmezinin bileşimi.....	17
Tablo 2.3. Taze ve kuru üzüm ile pekmezde bulunan vitaminler.....	18
Tablo 2.4. Serbest radikallerin oluşumunu artıran nedenler.....	26
Tablo 2.5. Reaktif oksijen ve azot türleri.....	27
Tablo 2.6. Hüresel serbest radikallerin etkilediği moleküller.....	32
Tablo 2.7. Organizmada antioksidan sistem elemanları.....	36
Tablo 2.8. Doğal (endojen) antioksidanlar.....	36
Tablo 4.1. Kontrol ve deney gruplarının ALT, AST ve GGT değerleri.....	51
Tablo 4.2. Kontrol ve deney gruplarının 5' Nükleotidaz, TAS, TOS ve OSİ değerleri.....	57

1. GİRİŞ

Canlılar, doku hasarı veya toksik etkiler gösteren çok sayıda kimyasala sürekli olarak maruz kalırlar. Bu maruziyet gıda, hava ya da su içerisinde bulunan bileşiklere bağlı olarak dış kaynaklı olabilir. Metabolizma sonucu veya iltihaplanma gibi patofizyolojik basamaklarda oluşan ürünler olmaları durumunda ise iç kaynaklı olabilir. Bu tip kimyasallara etki süresinin artması durumunda doku hasarı ve sonrasında kanserojenik sonuçlar ortaya çıkabilir. Bu sonuçların görülme sıklığının yüksek olması önemli bir sağlık sorunudur. Yapılan çalışmalar, yeşil sebze ve taze meyvelerin içerdikleri bileşiklerinden dolayı oluşabilecek toksik etkilere karşı organizmayı koruduğunu göstermektedir. Bu nedenle resveratrol ve pekmezin toksisiteye karşı etkileri araştırılarak kanser oluşumunu engelleyecek alternatif yöntemlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bilinen en güçlü potansiyel karsinojen olan polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH), hayvan dokularında tümör oluşturabilecek potansiyele sahiptir (1). Bu etkilerini immün sistemi inhibe ederek (2), immün sistemi baskılayarak (3), immünotoksik etki göstererek (4) ve serbest radikalleri oluşturarak yapabilmektedirler (5). Bu grupta sık kullanılan kimyasal karsinojenler arasında dibenzantrasen, 3-metilkolantren ve 7,12-dimetilbenz[a]ntrasen (DMBA) sayılabilir (6). Bu çalışmada geçmiş dönemlerde yapılan araştırmalar göz önünde bulundurularak karsinojenik ajan olarak DMBA seçilmiştir.

Resveratrol (3,4',5-trihidroksistilbene) stilbenlerin alt grubu olup üzüm, şarap, yer fıstığı ve yaban mersininde bulunan polifenolik bir bileşiktir (7). Resveratrol 1976 yılında üzümde fitoaleksinin olarak keşfedilmiştir. Resveratrol'un doğal antioksidan rolü üç farklı antioksidan mekanizma ile açıklanmaktadır. Bunlardan biri, koenzim Q ile yarışmak ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşum reaksiyonlarını azaltmaktır. Bir diğer mekanizma, mitokondride oluşan süperoksit radikalini yakalamak; son olarak da fenton reaksiyonu ürünleri tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunun inhibisyonudur. Birçok çalışmada resveratrolün hem süperoksit hem de hidroksil radikalini yakalama yeteneğinin olduğu gösterilmiştir. Resveratrol *in vitro* koşullarda ROS'un zayıf yakalayıcısı olmasına rağmen *in vivo* olarak güçlü bir antioksidan işlevini görür. Resveratrolün *in vivo* antioksidan özelliği

nitrik oksit sentezini arttırma yeteneği ile güç kazanmaktadır. Burada *in vivo* antioksidan olarak, nitrik oksit süperoksidi yakalama yeteneğine sahiptir. Resveratrol biyolojik sistemlerde bulunan antioksidanların hücre içi konsantrasyonlarının sürdürülmesini de sağlamaktadır (8). Yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda resveratrolün trombosit agregasyonunu engellediği (9), dokuları iskeminin zararlı etkilerinden koruduğu ortaya konmuştur (10).

Üzüm pekmezi hemen hemen yurdumuzun her yerinde üretilmektedir. Pekmezin içerdđi karbonhidratlar, glukoz ve fruktoz monosakkaritleridir. Pekmez beslenme açısından önemli bir besindir. Bu önemi içerdđi mineral maddelerden, resveratroidan ve karbonhidrattan kaynaklanmaktadır. Pekmezin fosfor, potasyum, kalsiyum, magnezyum gibi mineral maddeler bakımından da zengin olduğu bilinmektedir. Pekmezler flavonoidler, polifenoller, doğal antioksidanlar içerir ve ROS aracılığı ile oluşan doku hasarına karşı olası koruyucu etkileri vardır. Siyah üzüm, vişne, böğürtlen, karadut, erik gibi mor ve siyah tonlardaki meyveler fenolik maddeler bakımından oldukça zengindir. Siyah üzüm ve pekmezde bulunan antioksidanlar önemli hastalıkların ve yaşlanmanın tetikleyicisi olan serbest radikallerin olası zararlarını önlemektedir. Pekmezin antioksidan özelliği resveratrol adlı bileşikden kaynaklanmaktadır (11). Bu durum pekmezin beslenme açısından önemli bir mineral ve antioksidan madde kaynağı olduğunu göstermektedir (12).

Bir antioksidan olan resveratrolün ve pekmezin kanseri önleyici veya geciktirici etkisinin karşılaştırılarak, biyokimyasal olarak incelenmesi planlanmıştır. Bunların etki mekanizmaları karaciğer enzimleri (AST, ALT, GGT), oksidatif stres parametreleri ve 5'-Nükleotidaz (5'-NT) ile araştırılması amaçlanmıştır. Antioksidan, antikanserojen olan resveratrolün ve bu maddeyi içeren pekmezin bu anlamda etkisi olup olmadığını, olumlu bir etki var ise bunun düzeyini araştırılması hedeflenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH)

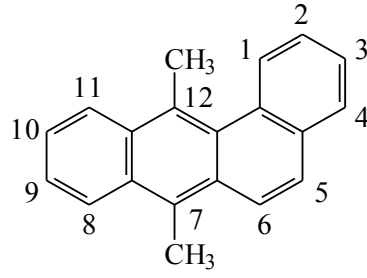
Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), çevrede yaygın olarak bulunan kimyasal gruplardandır. Karbon ve hidrojen içeren organik maddelerin tam veya tam olmayan yanmaları sonucu meydana gelen üç veya daha fazla aromatik halkalı bileşiklerdir (Şekil 2.1.). PAH'lar tümör başlatıcı, geliştirici ve ilerletici özellikleri olan karsinojenlerdir (13).

PAH'ların atmosferdeki ana kaynağı tam yanmamış organik moleküllerdir (14). Çevremizdeki PAH'lar genelde otomobil egzozlarında, dizel motorların emisyonlarında ve kömürle pişirilmiş yiyeceklerde bulunur (15). Endüstriyel atıklara rağmen, kişisel alışkanlıklar da (mesela sigara gibi) bireylerin PAH' lara maruz kalmasını ciddi bir şekilde etkiler (16).

PAH'lar hücrel ve humoral immüniteyi inhibe ederler. Özellikle BaP (benzo[a]piren) ve DMBA (7,12-dimetilbenz[a]antrasen)'nin, in vivo olarak yüksek derecede immünotoksik olduğu saptanmıştır (13).

DMBA, PAH' lara ait çevresel toksik bir maddedir. DMBA, kimyasal yapısında dört halka ve iki metil grubu içerir (14).

DMBA kanserojendir. DMBA' da genetik mutasyona sebep olan yapı, DMBA metabolizmasından meydana gelen ara ürünlerin DNA' ya bağlanmasıdır (16). DMBA, DNA'nın yapısını bozar ve lipid peroksidasyonuna neden olur. Hücrede hidroksil ve süperoksit anyon radikalleri gibi radikallerin oluşmasına neden olur (17). DMBA'nın hücrelerde serbest radikalleri arttırarak kanserojen etki yaptığı belirtilmiştir (18). Serbest radikaller; hücredeki doymamış yağ asitleri, DNA molekülleri ve protein moleküllerindeki sülfhidril bağlarıyla reaksiyona girerek hücre ve dokuları zarara uğratırlar (19).

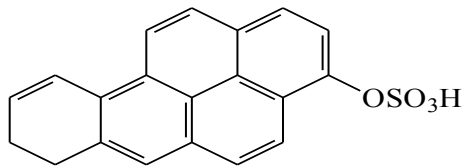


Şekil 2.1. 7,12-Dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) molekülü

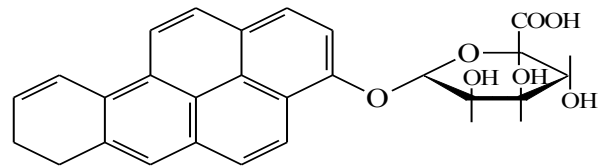
Molekül Formülü : $C_{20}H_{16}$
 Molar kütle : 256.34
 Erime Sıcaklığı : 122-123 °C

2.1.2 PAH Metabolizması

Bu bileşikler hidrofobik olmalarından dolayı yağlı dokularda, böbrekte ve karaciğerde depolanırlar. PAH'lar tek başlarına oldukça düşük toksikliğe sahiptirler (pro-karsinojen). PAH'ların tümör ve mutajen etki göstermeleri için metabolik aktivasyona uğramaları gerekmektedir. Memelilerdeki PAH metabolizması esas olarak karaciğerde olur. Sitokrom P450 enzimleri ile katalizlenir. PAH'lar daha polar ve suda çözünen yapıya dönüşerek vücuttan dışarı atılırlar. Bu işleme "detoksifikasyon" denir (20). Benzo[a]piren'in bazı konjuge biçimlerinin kimyasal yapıları Şekil 2.2.'de verilmiştir.



Sülfat ester



Glukoronit



Konjuge glutatyon

Şekil 2.2. Benzo[a]piren' in bazı konjuge biçimlerinin kimyasal yapısı (20).

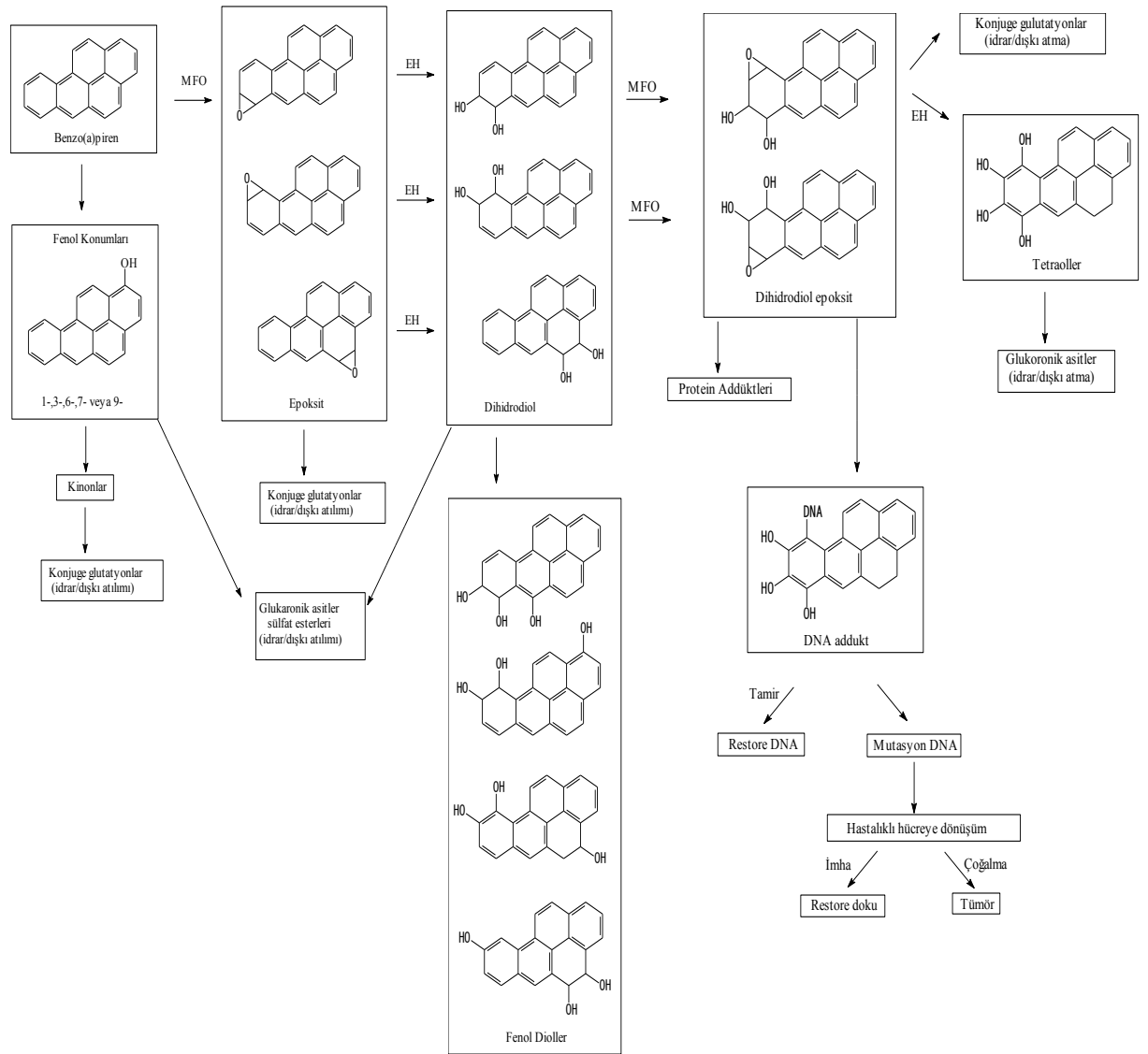
PAH bileşiminin çeşitli konjuge bileşikleri (sülfat ester, glukoronit, konjuge glutatyaon) Şekil 2.2.'de verilmiştir.

PAH'ların metabolik dönüşümü, BaP'ın hem aktivasyon hem detoksifikasyon içeren metabolik yolağı üzerinden Şekil 2.3.'de gösterilmiştir. PAH'ların biyolojik dönüşümü sitokrom P450 enzimi tarafından molekülün epoksidasyonu ile başlar.

İlk epoksidasyon "kompleks enzim" olarak adlandırılan ve endoplazmik retikulumda bulunan karışık fonksiyonlu oksidaz (MFO) tarafından yapılır. İkinci basamak diollerin oluştuğı hidrosilasyon adımıdır. Bu basamak MFO enzim kompleksine bağlanmış olan epoksit hidrataz (EH) enzimlerince katalizlenir. Hidrataz içeren enzim kompleksi yerine aril-hidrokarbon-hidroksilaz (AHH) da kullanılır (20).

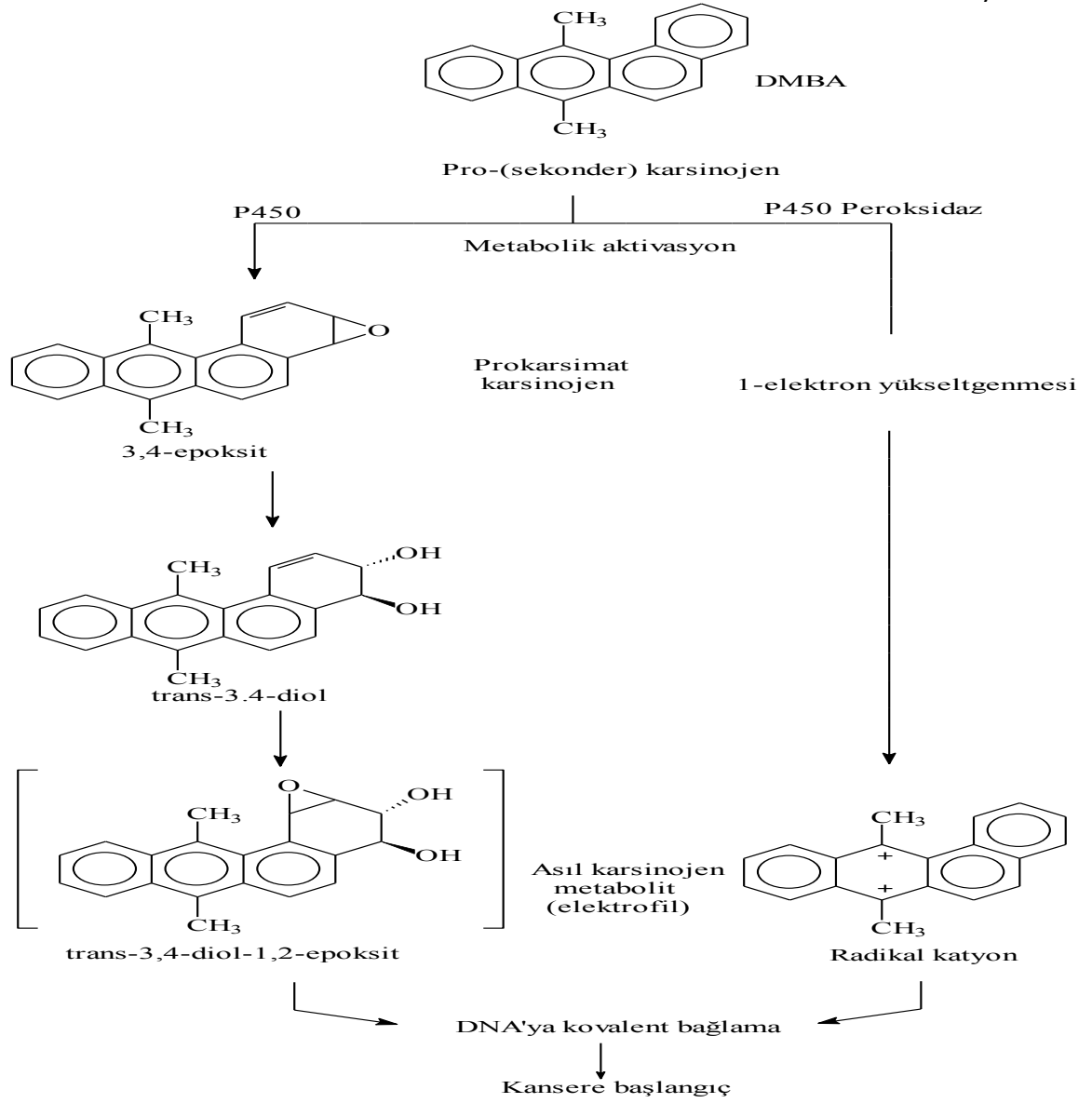
Meydana gelen dioller daha sonra dihidrodiol epoksitlerine dönüşebilir. Kimyasal ve fiziksel olarak dihidrodiol epoksitler, DNA'daki nükleofilik bölgelerce nükleofilik saldırılara uğrayacak kadar reaktiftir (21).

Aradaki dioller, glukoronik asit ya da glutatyon ile konjugasyona uğrayarak bir detoksifikasyon işlemi geçirerek böbrek ve safra kanalıyla dışarı atılan konjuge metabolitlerine dönüşürler. İki ve üç halkalı PAH metabolitleri idrarla ve daha yüksek moleköl ağırlıklı PAH metabolitleri dışkı yoluyla atılır.



Şekil 2.3. Benzo[a]piren'in metabolizması ve olası etkileri (22).

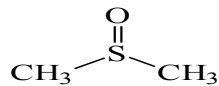
PAH' lar için ikinci önemli metabolik aktivasyon yolağı ise radikal kation oluşumuna dayalıdır. Bileşikler, bir elektron (e^-) kaybederek reaktif serbest radikal ara ürünlerine dönüşürler. Bu radikal kasyonlar ya direk DNA ile tepkimeye girerler ya da DNA tepkimesinden önce radikal ve karbokasyon ara ürünlerine dönüşürler. Bir e^- yükseltgenmesi ile oluşan oluşum, monooksijenasyon (diol epoksit oluşumu) ile oluşan yapıdan tamamen farklıdır. Ayrıca bir e^- yükseltgenmesiyle gözlenen addüktlerin PAH yapısında oksijenlenmesi yoktur. Şekil 2.4.'de DMBA bileşiğinin yukarıda sözü edilen mekanizma ile metabolik aktivasyon yolağı görülmektedir.



Şekil 2.4. 7,12-Dimetilbenz[*a*]antrasen'in olası metabolik aktivasyon yolları (20).

2. 2. Dimetilsülfoksit (DMSO)

DMSO, formülü $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ olan organo kükürt bileşimidir (Şekil 2.5.). Renksiz ve sıvı halde olan bu bileşik önemli bir polar çözücüdür. DMSO, polar aprotik bir çözücüdür.



Şekil 2.5. DMSO'nun kimyasal yapısı

Suda çözünemeyen ilaçlar için başka çözücülere ihtiyaç vardır. Yapısından dolayı DMSO bazı maddelerin çözücüsü olarak kullanılan kimyasal bir ajandır (23).

2.3. Resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben)

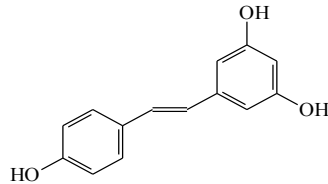
2.3.1. Resveratrol Hakkında Genel Bilgiler

Hintliler yaklaşık 4500 yıl önce “Ayurveda” isimli eski bir tıp kitabında kırmızı üzüm suyunu “darak chasava” olarak adlandırıp kardiyotonik olarak kullanmışlardır (24). Daha sonra bu bileşenin resveratrol olduğu öğrenilmiştir. Resveratrolün en zengin kaynağı Çin ve Japonya’ da yetiştirilen *Polygonum cuspidatum* bitkisinin kurutulmuş kökleridir (25). *Polygonum cuspidatum* Japon ve Çin tıbbında hiperlipidemi, ateroskleroz ve diğer inflamatuvar hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılmıştır (26).

İlk kez 1976 yılında resveratrol Langcake ve Pryce tarafından üzümde fitoaleksinin olarak bulunmuştur (27).

2.3.2. Resveratrolün Kimyasal Yapısı

Resveratrol bitkilerde; susuzluk, fungal enfeksiyonlar, ultraviyole ve ozon gibi çevresel stres ve mikrobik saldırılara karşı cevap olarak sentez edilir (28). Resveratrolün kimyasal yapısı Şekil 2.6’ de gösterilmiştir.

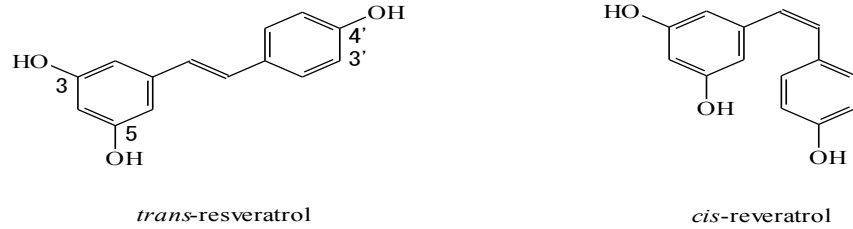


Şekil 2.6. Resveratrolün kimyasal yapısı

Resveratrol, üzümde bol miktarda bulunan polifenol yapısında doğal bir antioksidan maddedir (29).

Resveratrolün, trans- resveratrol ve cis-resveratrol olmak üzere iki izoformu (Şekil 2.7.) vardır. Düşük pH, yüksek ısı ve gün ışığı cis formundan trans formuna dönüşümü sağlar. Trans-resveratrol izomeri daha stabil bir formdur (30). Resveratrolün yaklaşık %20’ lik kısmı duodenumdan emilir ve bütün organlara yayılır. Duodenumdan emilen major form resveratrol-glukuronidtir (31).

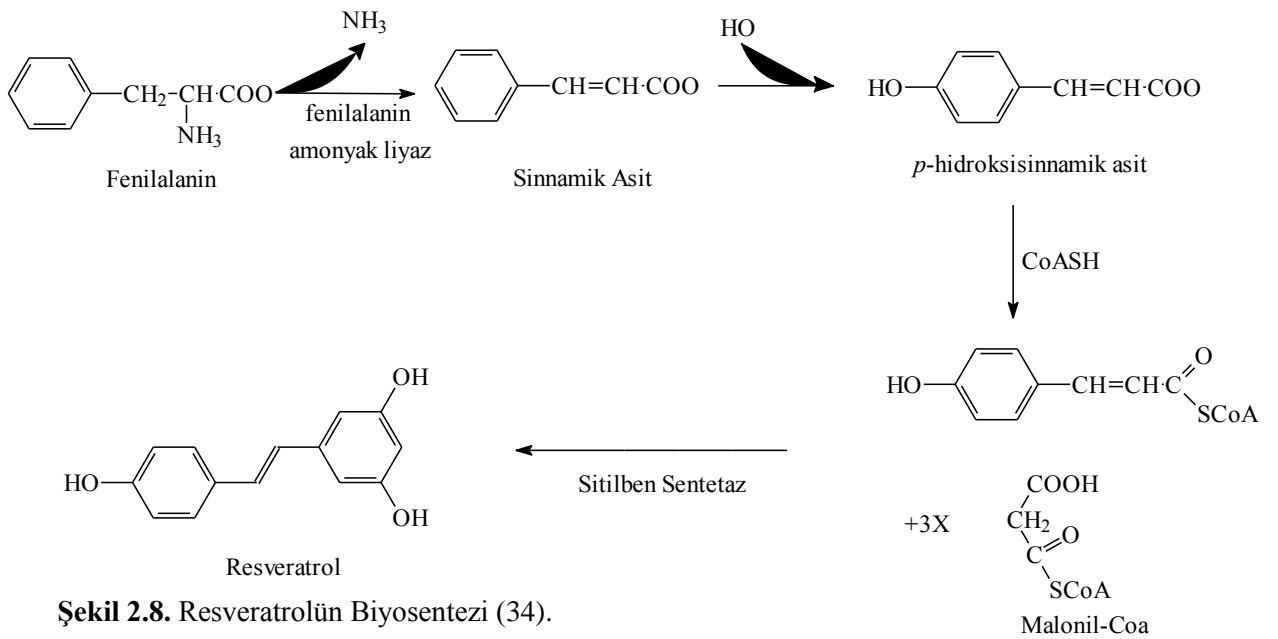
Resveratrolün glukuronizasyonu duodenum ve karaciğerde olur. Glukuronizasyonun major ürünü trans-resveratrol-3-O-glukuronid, trans-resveratrol-4-glukuronid ve trans-resveratrol-3-O-sulfattır (32). Serbest trans-resveratrol plazmada çok az miktarda bulunur ve yarı ömrü kısadır.



Şekil 2.7. Resveratrolün trans ve cis kimyasal yapısı

2.3.3. Resveratrolün Biyosentezi

Resveratrol sentezi, fenil alaninden çok basamaklı bir şekilde gerçekleşir. Fenilalanin amonyak liyaz enziminin deaminasyonu sonucu ilk basamakta sinnamik asit oluşur. Sinamat, 4-hidroksilazla, p-hidroksilasyon yoluyla 4-koumarik aside dönüşür. 4-koumaratla Co-A ester yapısına dönüşür. 4-koumaril Co-A, 3 malonil Co-A ile stilben sentaz enzimiyle birleşerek resveratrolü oluşturur (33). Resveratrol Biyosentezi Şekil 2.8.'de verilmiştir.



Şekil 2.8. Resveratrolün Biyosentezi (34).

Resveratrolün doğal antioksidan rolü üç farklı mekanizma ile açıklanır.

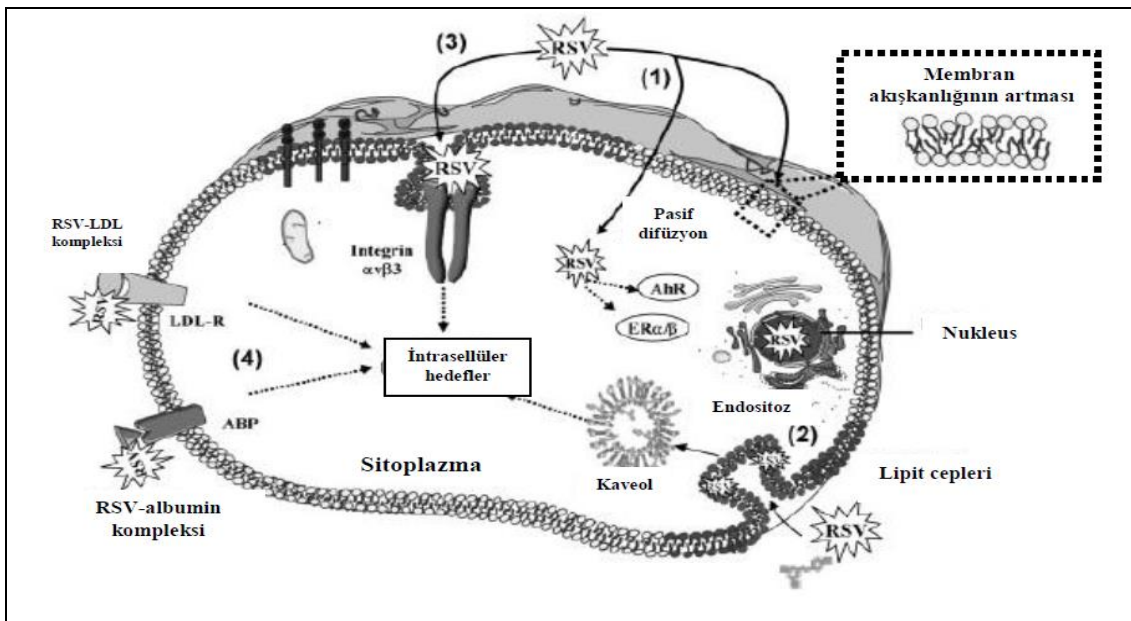
1. Koenzim Q ile yarışarak ROS oluşum yerinde oksidatif zincir kompleksini azaltır.
2. Mitokondride oluşan süperoksit radikalini yakalar.
3. Fenton reaksiyonu ürünleri tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunun inhibisyonudur (35).

2.3.4. Resveratrolün Hücre İçine Alınması

Hepatoblastoma HepG2 hücreleriyle yapılan incelemelerde resveratrolün karaciğere iki mekanizma ile taşındığı saptanmıştır:

1. Düşük konsantrasyonda aktif taşıyıcılarla,
2. Yüksek konsantrasyonda ise pasif difüzyon ile taşınırlar.

Pasif difüzyonun büyük oranda membranın lipid kompozisyonuna bağlı olduğu tahmin edilmektedir. Membranlardaki lipidlerin özellikleri membranın akışkanlığını belirlemektedir. Membran akışkanlığı, hücre zarının reseptör, transport, fagositoz ve hücre büyümesi gibi fonksiyonlarında önemli roller oynamaktadır. Yapılan in vitro çalışmalarda kültür ortamında etanol ile çözülmüş olan resveratrolün zar akışkanlığını etkilediği ve hücre içine alınmasının arttığı belirlenmiştir. Resveratrolün hücre içine alınma yolları Şekil 2.9'da verilmiştir.



Şekil 2.9. Resveratrolün hücre içine alınması, hücre yüzeyi ve hücre içindeki reseptörlerine bağlanması (36).

Resveratrolün hücre içine alınma yolları:

1. Pasif difüzyon
2. Lipid cepleri yoluyla endositoz
3. Lipid cepleri içinde integrin $\alpha\beta3$ gibi reseptörlere bağlanma
4. Resveratrolün albumin veya LDL ile bağlanması hem hücre içine alınmasında hem de dağılımında önemli rol oynar.

2.3.5. Resveratrolün Hücre İçi Reseptörlere Bağlanması

Resveratrolün hücre içinde taşınmasını sağlayan moleküllerden birisi AhR (aryl hydrocarbon receptor)'dir. Resveratrol, AhR'ye bağlanabilmek için digoksin ile yarışır. AhR'nin nukleusa translokasyonunu sağlar.

Ayrıca resveratrol yapısal olarak insan östrojen hormonuna benzer (fitoöstrojen). Bu yüzden hücre içi östrojen reseptörlerine (ER- α ve ER- β) bağlanabilir. Ancak, reseptöre afinitesi östradiolden 7000 kat daha düşüktür (37). Hambrook ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, resveratrolün sulfonilüre reseptörüne bağlandığını, bu bağlanma için glibenklamid ile yarıştığını saptamışlardır. Böylece apoptozu indüklediğini göstermişlerdir (38).

2.3.6. Resveratrolün Dolaşımında Taşınması ve Dokulara Transportu

Resveratrol, suda çözünürlüğü zayıf olan bir moleküldür. Bu yüzden hidrofilik konjugatlarına dönüşür. Hidrofilik konjugatlar, resveratrolün kana geçişini, vücutta dağılımını ve atılımını sağlar. Ayrıca plazmada yüksek konsantrasyonda kalmasını sağlar. Resveratrol serum proteinleri, yağ asitleri ve lipoproteinlere bağlanarak dolaşır (36). Resveratrol en çok lipoproteinlerle taşınır. LDL ile birleşen resveratrol (Resveratrol -LDL) karaciğerdeki LDL reseptörleri ile hücre içine alınır (39).

Resveratrol, albüminle hidrofobik bağla, hemoglobinle ise hidrojen bağıyla bağlanır (40). Resveratrolün kanda taşınması sırasında yağ asitlerinin albüminle bağlanmasında vektör görevi gördükleri tahmin edilmektedir. Resveratrol önce yağ asitleri ile birleşerek resveratrol-heksanoik asitleri oluşturur. Bu durum, resveratrolün albümine daha kolay bağlanmasını sağlar (41).

2.3.7. Resveratrolun Etkileri

2.3.7.1. Resveratrolün Düz Kas ve Endotel Üzerine Etkileri: Resveratrol kardiyovasküler sistemde hem akut hem de kronik etki gösterir (42). Resveratrol, iskemi reperfüzyon hasarına karşı kalbi korur (43). Resveratrolün, 21 günlük uygulamadan sonra, rat aortasında asetilkolin ile endotel bağımlı gevşemeyi geliştirdiği saptanmıştır (44). Resveratrol, endotel bağımlı gevşemeye yol açan etkisini önemli ölçüde NO yoluyla gerçekleştirir. NO sentaz inhibitörü olan nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) ile bu etkiyi tamamen ortadan kaldırır.

Resveratrol, Sirtuin 1 (SIRT1) aktivatörü olarak da bilinen bir deasetilaz proteindir. eNOS ekspresyonu üzerindeki etkisinin muhtemelen SIRT1 aktivasyonu ile olabileceği tahmin edilmektedir. SIRT1 aktivasyonu sonucu lizin rezidülerinde eNOS deasetile olur. Bunun sonucunda eNOS aktivitesi uyarılır. Resveratrol, NO arttırıcı etkisinden dolayı endotel ve vasküler sağlık arasında bir bağlantı sağlar (45).

2.3.7.2. Resveratrolün Antioksidan Etkisi: Oksidatif stres, antioksidan moleküllerle prooksidan moleküllerin arasındaki düzensizlik sonucu hücrelerin fazla miktarda reaktif oksijen ürünlerine (ROS) maruz kalmasıyla kendini gösterir. Süperoksit (O_2^-) reaktif oksijen ürünleri arasında en önemlilerinden biridir. Diğer önemli serbest radikaller hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asit (HOCl) ve peroksinitrit ($OONO^-$) gibi moleküllerdir. Bu serbest radikallerin en önemli yerleri vasküler endotelyumdur. Endotel hücreleri, devamlı olarak az miktarlarda açığa çıkan bu serbest radikallerden kendilerini süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerle korunabilmektedirler. ROS üretimi sürekli bir şekilde artış gösterirse artan oksidatif stres sonucunda hücre hasarı meydana gelir.

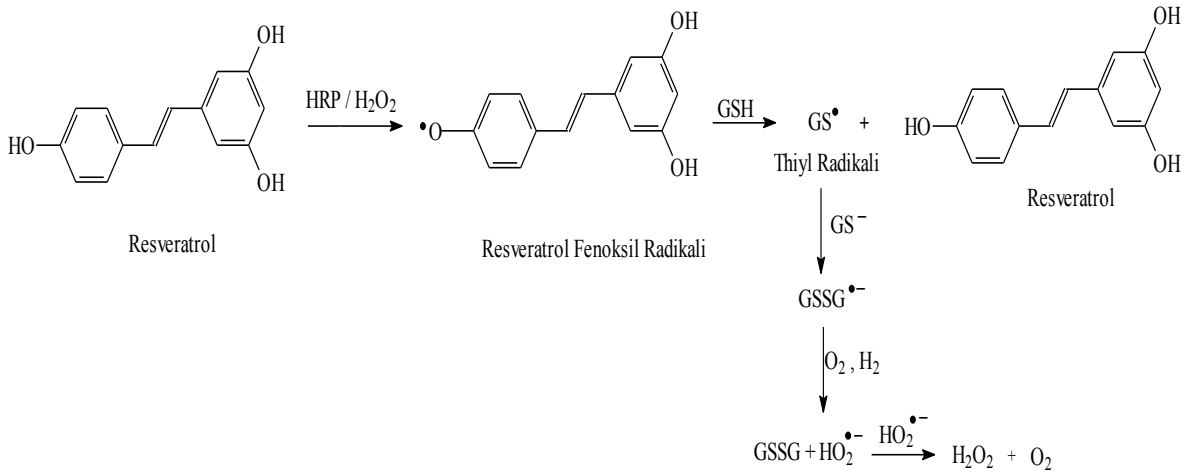
NADPH oksidaz dolaşımdaki ROS' un ana kaynağıdır. Resveratrolün rat aortasında NADPH oksidaza bağlı oluşan süperoksit üretimini düşürdüğü saptanmıştır. Resveratrolün, antioksidan enzimlerin düzenleyicisi ve oksidatif stresi azaltıcı etkisi olduğu tahmin edilmektedir. Hücre içi sitoprotektif enzim olan hemoksijenaz-1 ve redoks düzenleyicisi thioeredoksin-1 resveratrole cevap olarak hücre kültüründe doza bağımlı bir şekilde upregüle olduğu belirtilmiştir.

Resveratrol in vivo ve in vitro olarak güçlü antioksidan özelliğe sahiptir. Bakır selasyon kapasitesinin yüksekliği ve antioksidan özelliği resveratrolün serbest radikal süpürücü özelliğinden kaynaklanmaktadır (45).

2.3.7.3. Resveratrolün Prooksidan Özelliği: Resveratrolün, LDL oksidasyonunun önlenmesinde C ve E vitamininden daha güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada resveratrolün kolesterol sentezini, squalen monoksijenaz enzimini inhibe ederek azalttığı gösterilmiştir.

Her antioksidan, bazı durumlarda serbest radikallere karşı koruyuculuğu olan ve serbest radikal oluşumunu geliştiren, antioksidan vitaminleri de kapsayan bir redoks ajanı olarak görev yapar (45).

Resveratrol gibi fenol halkası içeren besinsel polifenolikler, H_2O_2 tarafından fenoksil radikallerine okside edilirler. Resveratrol fenoksil radikaller, kaybettiği elektronu GSH'dan alırlar ve glutatyonu bir tiol radikali şekline dönüştürürler. Darbe radyoliz çalışmaları, disülfid radikal anyonu O_2 'i hızla süperoksit radikal anyonu ve GSSG formuna Şekil 2.10' da indirgediğini belirtmiştir (46,47).



Şekil 2.10. Resveratrolün Peroksidatif Metabolizması (46).

2.3.7.4. Resveratrolün Damar Genişletici Etkisi: Damar duvarındaki cGMP miktarını artırır. NO-cGMP yolu damar gevşemesine sebep olur ve NOS etkinliğini artırır (48). Resveratrolün endotel bağımlı gevşetici etkisi, dokuda süperoksit

oluşumunun ana kaynaklarından biri olan vasküler NAD(P)H oksidaz üzerindeki inhibitör etkisine bağlı olduğu düşünülmektedir (49).

2.3.7.5. Anti-İnflamatuar Etkisi: Çalışmalar NO blokeri nitro-L-arjinin metil esterinin (L-NAME), resveratrolün yararlı etkilerini ortadan kaldırdığını göstermiştir. Bu etki resveratrolün antiinflamatuvar etkisinin NO' ya bağlı olduğunu gösterir (50).

2.3.7.6. Yaşlanma: Resveratrol, sirtuinleri ve PGC-1 α (peroxisome-proliferator activated receptor co-activator)'yı aktive ederek moleküller mitokondrileri aktifleştirerek genel hücre metabolizmasını etkiler. Bu da farelerin yaşamını uzatır (51).

Resveratrolün biyolojik etkilerini kısaca aşağıdaki şekilde sıralayabiliriz;

- DNA sentezinin inhibisyonu
- Apoptozis indüksiyonu
- Anjiogenezis inhibisyonu
- Antiinflamatuvar etki
- Aromataz inhibisyonu ile antiöstrojenik etki
- Trombosit agregasyonunun inhibisyonu
- Aterosklerozdan koruyucu etki
- Antioksidan etki
- Kanserden koruyucu etki
- Bakır şelasyonunu sağlama etkisi.

2.4. Pekmez

Meyvelerden pekmez üretilmesi, ülkemize özgü bir yapım şeklidir. Her meyveden pekmez yapılır. Ancak en yaygın olanı, üzüm pekmezdır. Çünkü ülkemiz bağcılık ve üzüm üretimi bakımından dünyanın önde gelen ülkelerinden birisidir. Geleneksel bir gıda olmasına karşın, ülkemizde pekmez üretiminin giderek azaldığı görülmektedir. Ancak son yıllarda pekmezin beslenme açısından önemi biraz daha kavranmış olduğundan üretim artmıştır.

Üzüm pekmezi yurdumuzun birçok yerinde yapılmaktadır. Üretim kırsal alanlarda daha yaygın olup, çok eski bir geçmişe sahiptir. Pekmezin içerdiği karbonhidratlar, glukoz ve fruktoz yapısındadırlar. Bu yapılarından dolayı sindirilmeden kolayca kana karışırlar. Bu durum özellikle bebekler, çocuklar ve spor yapanlar gibi acil enerji ihtiyacı olan kişiler için çok önemlidir (52).

Pekmez beslenme açısından önemli bir besindir. Bu önemi içerdiği mineral maddelerden ve karbonhidrattan kaynaklanmaktadır. Üzüm pekmezinin iyi bir demir kaynağı olduğu belirtilmektedir. Ayrıca fosfor, potasyum, kalsiyum, magnezyum gibi mineral maddeler bakımından da zengin olduğu bilinmektedir (53). Pekmez, şeker veya katkı maddeleri eklenmeden kaynatılıp, konsantre edilerek üretilir. Bundan dolayı doğal bir besin olarak kabul edilir (54).

Tablo 2.1. de yaş üzüm ve bazı üzüm ürünlerinin enerji, yağ, su, karbonhidrat, protein, kül (mineral) ve vitamin içerikleri bakımından değerleri verilmiştir (55).

Tablo 2.1. Yaş üzüm ve bazı üzüm mamullerinin 100 gramındaki besin değerleri (55).

Ürün	Su (g)	Enerji (kalori)	Protein (g)	Yağ (g)	Karbonhidrat (g)	Kül (g)	A(I:U)	B ₆ (mg)	B ₁ (mg)	B ₂ (mg)	Niasin (mg)	C (mg)
Taze üzüm	81.40	67.00	0.60	0.30	17.30	0.40	100.00	0.20	0.05	0.03	0.30	4.00
Kuru üzüm	18.00	289.00	2.50	0.20	77.40	1.90	20.00	0.30	0.11	0.08	0.50	1.00
Üzüm suyu	82.90	66.00	0.60	Eser	16.60	0.30	-	0.20	0.04	0.02	0.20	Eser
pekmez	21.20	293.00	0.60	0.10	70.60	-	-	-	0.04	0.15	1.40	-

İnsan organizması için yapıtaşı olarak kullanılan esansiyel aminoasitlerin dengesi çok önemlidir. Bu denge anne sütünden sonra en iyi şekilde pekmezde ve kuru üzüm de bulunmaktadır (56).

Pekmez potasyum, sodyum, demir, kalsiyum, fosforik asit, organik asitler, formik asit ve bazı vitaminler bakımından önemli bir kaynak olduğu bilinir (57).

2.4.1. Geleneksel Üzüm Pekmezinin Üretim Tekniği

Geleneksel yolla pekmez yapmak için üzümder toplanır ve yıkanır. Üzümler şırayı posasından ayırmak için ince delikli torbalara bırakılır. Sonra ayağa temiz bir çizme giyen kişi tarafından üzümder ezilir ve şırası çıkartılır. Şıra süzölür ve kaynama kazanına boşaltılır. Kazan ateşin üzerine konulur ve kaynatılır. Kaynama sırasında pekmezin dip tutup yanmaması için devamlı olarak karıştırılır. Kaynama sırasında kabın kenarında ve şıranın üzerinde toplanan kirli köpükler bir kepe ile alınır. Pekmez kıvamına ulaştığında pekmezde kırmızı köpük oluşur. Ağdalaşma dediğimiz durum meydana gelir. Ekşi pekmez yapımının tatlı pekmez yapımında ki fark üzüm ve şıraya pekmez toprağı yani ekşilik (asitlik) giderici bir madde eklenmesidir. Bu madde özel olarak seçilen yerlerde toplanan pekmez toprağı olabileceği gibi sönmüş kireç (Ca(OH)_2), karbonat veya odun külü de olabilir. Toprak eklendikten sonra şıra ocağa konur. Bir taşım kaynatılır ve ocaktan alınır. Bir kaba aktarılarak 5-6 saat veya bir gün bırakılarak, dinlendirilir. Bu dinlenme sırasında tortu yapan maddeler dibe çöker ve şıranın rengi berraklaşır. Berrak şıra, kabın dibindeki tortu kaynatma kazanına geçmeyecek şekilde kaynatma kazanına aktarılır. Kaynatma kazanına alınan şıra kaynatılır. Pekmezin kıvama geldiği anlaşılınca kadar kaynatma işlemleri yapılır. Kıvamına gelince ateşten alınır. Saklama kaplarına boşaltılır. Serin ve kuru yere bırakılır (58). Koyulaştırma işlemleri, güneşi bol ve kurak bölgelerde güneş enerjisinden faydanılarak da yapılır. Şıra geniş kaplara konur ve güneşte bekletilerek koyulaştırılır. Bu şekilde yapılan pekmez “*günbalı*” olarak adlandırılır (53).

2.4.2. Üzüm Pekmezinin Bileşimi

Üzüm pekmezinin bileşimi Tablo 2.2. de gösterilmektedir.

Tablo 2.2. Üzüm pekmezinin bileşimi (59)

Bileşim Ögesi	Suda çözünür kuru madde(%)	74.32
	Toplam kuru madde (%)	77.12
	pH	5.26
	Titrasyon asitliği(%)	0.74
	HMF (mg/kg)	2.11
	Toplam şeker (%)	64.13
	Glukoz (%)	32.38
	Fruktoz (%)	31.75
	Sakkaroz (%)	0
	Protein (%) (F=6.25)	0
	Toplam kül (%)	1.5
	Mineral Maddeler	Fosfor (P)
Demir (Fe)		1.45
Bakır (Cu)		0.39
Çinko(Zn)		0.12
Potasyum (K)		929
Sodyum (Na)		33
Magnezyum (Mg)		73
Kalsiyum (Ca)		132

2.4.2.1. Pekmez ve vitaminler: Pekmez bazı vitaminler bakımından zengindir. Pekmezde tiamin ve piridoksin (B6) vitaminleri yeterli miktarda bulunmaktadır. Piridoksin kan hücrelerinin yapımında, sinir sistemi, cilt sağlığında, vücuttaki yağ ve kolesterol kontrolünde görevlidir. B6 vitamininin günlük ihtiyacının %15'i pekmez ile karşılanabilir.

2.4.2.2. Aminoasit Dengesi Bakımından Üzüm ve Pekmez: Üzüm ve pekmez proteince zengin olmamasına rağmen, iyi bir besin gıdasıdır. Çünkü Dünya Sağlık Teşkilâtı ve FAO tarafından pekmez üretiminde kullanılan üzümün aminoasitler yönünden yeterli dengede olduğu kabul edilir.

2.4.2.3. Pekmez ve Mineral Maddeler: Üzüm ve pekmez birçok mineral madde içerir. Bunların en önemlilerinden biri, kanda oksijen taşınmasını yapan, hemoglobinin içinde bulunan demir elementidir. Günümüzde ülkelerin en önemli beslenme sorunlarından birisi de demir eksikliğidir. Pekmezdeki demir, insan

vücudunun çok rahat bir şekilde kullanabileceği (+2) değerli demirdir. Fe⁺² değerli demir, hemoglobinin yapımında kullanılmasından başka, kemik iliğinde de önemli bir faktör olarak görev alır. Taze ve kuru üzüm ile pekmezde bulunan vitaminler ve miktarları Tablo 2.3.'de verilmiştir.

Tablo 2.3. Taze ve kuru üzüm ile pekmezde bulunan vitaminler (59).

Vitaminler (mg/100g' da)	Taze Üzüm	GTGM*	Kuru Üzüm	GTGM	Pekmez	GTGM
A vitamini	100.0	2.0	15.8-77.8	1.6	0	0
Tiamin	0.06	4.1	0.1-0.15	12.8	0.04	3.3
Ribofilamin	0.04	2.1	0.02-0.08	5.7	0.15	10.7
Niasin	0.2-0.3	1.7	0.5-0.8	4.5	1.4	7.8
C vitamini	1.0-18.0	8.0	0.8-1.3	2.6	0	0
Piridoksin	0.0-0.2	9.0	0.3	15	0	0

*GTGM : Günlük tüketilmesi gereken miktarın karşılanan kısmı (%)

Günlük iki yemek kaşığı (20 g) pekmez tüketmekle günlük demir ihtiyacının %35'i karşılanır. Pekmez çinko bakımından da zengindir.

2.4.2.4. Fosfor: Kan hücrelerinde glukozun enerjiye çevrilme metabolizmasında önemli görevi vardır. Ayrıca çocuğun kemik ve diş gelişmesinde kalsiyum ile fosforun arasındaki oranın normalde 1,2-2 arasında olmalıdır. Pekmezde bu değerler 2-2,7 arasındadır.

2.4.2.5. Potasyum: sodyumla birlikte osmotik basınç, pH dengesinin ayarlanması, kas kasılması, protein sentezi ve hücre içi enzimlerin fonksiyonlarında rol oynar. Potasyum açısından zengin olan pekmez, vücutta oluşan toksik maddelerin atılması ve alkali-asit dengesinin sağlanmasında kullanılabilir.

2.4.2.6. Kalsiyum: Kalsiyum büyüme ve gelişmede, dolaşım ve sinir sisteminde, kan pıhtılaşmasında, kalp kaslarının çalışmasında önemlidir. Kalsiyum eksikliği kemik ve diş hastalıklarına neden olur. Günlük yaklaşık 50 g pekmez tüketilmesi sırasında, vücudun ihtiyacı olan kalsiyum karşılanır. Kalsiyum; potasyum ve magnezyum ile aktifleşir. Pekmezde bu üç mineral birlikte yer alır. Fosfor ve kalsiyum pek çok besinde bulunur. Pekmezde kalsiyum/fosfor oranında fosfor oranının düşük olması kalsiyumun kuvvetle alınımı sağlandığı için, pekmez önemli bir besin maddesidir.

2.4.3. Pekmez ve Kanser

Pekmezler flavonoidler, polifenoller, doğal antioksidanlar içerir ve reaktif oksijen türleri (ROS) aracılığı ile oluşan doku hasarına karşı olası koruyucu etkileri vardır. Elektron kaybetmiş ve dolayısıyla elektron koparmaya eğilimli moleküller serbest radikaller olarak adlandırılır. Serbest radikaller, vücutta metabolik yollarla oluşabileceği gibi, hava kirliliği, UV ışınlar, sigara ve egzoz dumanına maruz kalma, alkol ve bazı ilaçların alımı gibi etkilere maruz kalmayla oluşabilir. Siyah üzüm, vişne, böğürtlen, karadut ve erik gibi mor ve siyah tonlardaki meyveler fenolik maddeler bakımından oldukça zengindir. Siyah üzüm ve pekmezde bulunan antioksidanlar önemli hastalıkların ve yaşlanmanın tetikleyicisi olan serbest radikallerin olası zararlarını önlemektedir. Antioksidanların, bağışıklık sisteminin fonksiyonlarını güçlendirici etkileri de vardır. Pekmezin antioksidan özelliği resveratrol adlı bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Siyah üzümünden yapılmış pekmezin antioksidan madde içeriği, resveratrol bakımından, oldukça önemlidir. Bu nedenle sofralarımızda pekmez ve pekmezden üretilmiş pekmez şerbeti bulunması sağlıklı beslenme bakımından oldukça önemlidir (59).

Pekmezin beslenme açısından önemli bir mineral madde kaynağı olduğu da söylenebilir (12).

2.5. Karaciğer

2.5. 1. Karaciğerin Kan Dolaşımı ve Damarlanması

Karaciğer, kanı iki kaynaktan alır.

1. Portal venden; %80'i abdominal organlardan gelen oksijenden fakir, besinden zengin kan taşınır,
2. Hepatik arterden; %20'si oksijenden zengin kan taşınır.

Karaciğer lobülünde kan, çevreden merkeze doğru akar. Oksijen ve metabolitleri ile bağırsaklardan emilen diğer maddeler önce lobülün çevresindeki hücrelere, daha sonra merkezindeki hücrelere taşınır (60).

Arteriyel Sistem: Hepatik arter defalarca dallanır ve lobüller arası arterleri meydana getirir (60). Hepatik arter, sistemik arteriyel kan taşır. Karaciğer kanlanmasının %25'ini, oksijenizasyonunun ise %30 – 50'sini karşılar. Ayrıca gastrodüodenal arterden ve inferior frenik arterden de arteriyel beslenme olur (61).

Portal Ven Sistemi: Portal ven defalarca dallanarak portal alanlarda küçük portal venüller oluşturur. Portal venüller dallanarak dağıtıcı venleri oluşturur. Dağıtıcı venlerden çıkan giriş (inlet) venülleri, sinüzoidlere ulaşır. Sinüzoidler ışımsal olarak ilerler ve birleşerek lobülün merkezinde santral ya da santrallobüler veni oluştururlar. Santral ven lopçuk boyunca ilerledikçe daha fazla sinüzoid alır ve çapı giderek büyür. Sonra lobülü terk eder ve daha büyük olan lopçuk altı venle birleşir. Lopçuk altı venler giderek birbirlerine yaklaşarak kaynaşır. Sonunda iki ya da daha fazla sayıdaki büyük hepatik venler meydana gelir. Bu venlerin hepsi vena kava inferiora açılır.

Portal sistem pankreas ve dalaktan gelen kan ile bağırsaklardan emilen kanı taşır (60).

2.5. 2. Karaciğerin Fizyolojisi ve Fonksiyonları

Karaciğerin, sistemleri ilgilendiren önemli görevleri vardır. Karaciğerin temel görevleri şunlardır:

- Filtre fonksiyonu: Portal sistemde bağırsaklardan gelen mikroorganizmalar hepatik sinüslerde bulunan makrofajlar (kuppfer hücreleri) aracılığı ile filtrelenmiş olur. Sonuç olarak kan yolu ile gelen bakteriler ortadan kaldırılır.
- Metabolik fonksiyonu: Karaciğer karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmalarında görev alır. Vitamin, mineral ve glikojen gibi maddelerin depolanmasında görev alır. Ayrıca koagülasyon faktörlerinin sentezinde de görevlidir (62).
- Detoksifikasyon fonksiyonu: Hidrofilik olmamaları nedeniyle böbrekten atılamayan zararlı ürünler hepatositlerde oksidasyon ve konjugasyon yolu ile zararsızlaştırılır. Bunun için gerekli enzimler agranüler endoplazma retikulum membranlarında vardır.
- Kolesterol ve yağ metabolizması: Kolesterol, safra tuzlarının oluşmasında ve VLDL sentezinde kullanılır.
- Üre sentezi: Üre, protein ve nükleik asitlerin yıkımı sonucu amonyumdan oluşan bir maddedir.

- Plazma proteinlerinin sentezi ve endokrin sekresyonu: Glikoproteinler, albumin, lipoproteinler, protrombin, fibrinojen ve non-immun globülinler hepatositlerde üretilirler.
- Pek çok hormonun modifikasyonu: Tiroksin, büyüme hormonu, insülin, glukagon gibi hormonların modifikasyonunun yapıldığı yerdir.
- D vitamini metabolizması.
- Safra yapımı ve ekzokrin sekresyonu: Safra, bağırsaklarda absorpsiyona yardımcı olmak üzere çeşitli maddeler içerir. Safra; su ve elektrolitler, safra tuzları ve safra pigmentlerinden oluşur. Safra tuzları bağırsaklarda lipidleri emulsiyon haline getirerek, kolesterol ve lipidleri solusyon halinde tutan maddelerdir (63).

2.5. 3. Hepatosit Hasarını Gösteren Enzimlerin Değerlendirilmesi:

Karaciğer değişik fonksiyonel ve anatomik yapılardan oluşmuş vücudumuzdaki en büyük ve en önemli organdır.

Başlıca karaciğer enzimleri:

- **Alanin aminotransferaz** (ALT, eski terminolojide serum glutamik pürivik transaminaz SGPT)
- **Aspartat aminotransferaz** (AST, eski terminoloji de serum glutamik oksaloasetik transaminaz SGOT)
- **Gama-glutamil transferaz** (GGT)
- Alkalin fosfataz (ALP)

İlk iki enzim hepatositlerde sentezlenirken, son iki enzim safra kanalı epitelyum hücrelerinde sentezlenirler. Bu enzimler sadece karaciğer ve safra yollarına özgü değildirler.

ALT ve özellikle AST iskelet kası ve kalp kasında, GGT böbreklerde sentezlenir (63).

Klinikte karaciğer testlerini dört başlık halinde incelemek mümkündür;

- 1.Hepatosellüler hasarı değerlendiren testler,
- 2.Kolestatik hasar sırasında kullanılan testler,
- 3.Karaciğerin atılım fonksiyonlarını (bilirubin) değerlendiren testler
- 4.Karaciğerin sentez fonksiyonlarını değerlendiren testler.

2.5. 4. Hepatosellüler Hasarın Tanısında Yardımcı Testler

Hepatosellüler hasarı belirlemek için birçok test kullanılır. Hepatosellüler hasarı tespit etmek için kullanılan testler;

- Aminotransferazlar (ALT, AST)
- Laktat dehidrogenaz (LDH)
- İsositrat dehidrogenaz
- Glutamat dehidrogenaz
- Sorbitol dehidrogenaz

2.5.4.1. Aminotransferazlar (Transaminazlar)

Amino asitlerin değişik ürünlere çevrilmesi yeniden sentezi veya yıkılması transaminasyonla olur. Transaminasyon reaksiyonları transaminazlar tarafından katalize edilirler. Aminotransferazlar, amino asit metabolizmasına katılan ve amino asitlerin amino gruplarının transferinde rol alan enzimlerdir. Amino grubunun alıcısı, α -ketoglutarat'tır. Aminotransferazlar amino vericisine göre (aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz) isimlendirilirler. Koenzimi olarak pridoksal 5 fosfata ihtiyaç duyarlar (61).

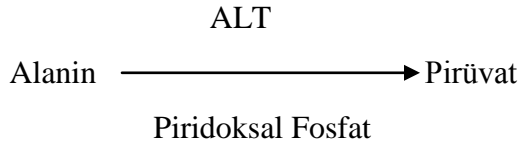
Aminotransferazlar, karaciğer hasarını ve nekrozunu belirlemede en fazla kullanılan enzimlerdir. İlk kez 1955 yılında, AST aktivitesi viral hepatitlerde araştırılmış ve arttığı görülmüştür. Daha sonra, diğer karaciğer hastalıklarında da bu enzimin yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Sonraki çalışmalarda ise, AST ile birlikte ALT yüksekliği de belirlenmiştir. Ancak bu testlerdeki yükseklik, birçok karaciğer hastalığında mevcuttur. Bu yüzden hastalıkların ayırıcı tanısında sınırlı bir değere sahiptir (61).

2.5.4.1.1. Alanin Aminotransfer (ALT)

Alanin aminotransferaz (ALT) önceleri glutamat pirüvik transaminaz (GPT) olarak anılırdı. Esas olarak karaciğerde bulunsa da kalp, iskelet kası ve böbrekte de

bulunur. ALT esas olarak bir karaciğer enzimi olup L-alanin ve glutamat arasında amino gruplarının transferini katalize eder (64).

ALT, aşağıdaki reaksiyonu katalizler.



ALT'nin serumdaki normal aktivitesi 5–55 IU/L sınırları arasındadır. NADH'nin oksidasyon hızı ALT'nin katalitik aktivitesiyle orantılıdır. Bu hız 340 nm'de absorbans azalmasının ölçümüyle saptanır. AST ve ALT ölçümleri için serum numunesi laboratuvar ısısında 48 saat, buzdolabında 2 hafta dayanıklılığını korur. Kaynağının karaciğer olmasından dolayı karaciğer hastalıklarında ALT, kalp hastalıklarında AST daha önemlidir (65).

2.5.4.1.2. Aspartat Aminotransferaz (AST)

AST hem sitozolik hem de mitokondriyal izoenzim olup karaciğerin yanı sıra çizgili kaslarda, beyin, pankreas ve kan hücrelerinde bulunur (66). AST aşağıdaki reaksiyonu katalizler.



NADH oksidasyon hızı, AST'nin katalitik aktivitesi ile orantılıdır. Bu hız 340 nm'de absorbans azalışı metoduyla belirlenir. Ciddi doku hasarlarında (akut hepatitis, ezilme ve doku hipoksiası gibi) çok yüksek değerlerine ulaşır (65).

ALT sitozolik ve göreceli olarak karaciğere spesifik olan bir enzimdir.

AST ise hem sitozolik hem de mitokondriyal izoenzimdir. Karaciğerden başka çizgili kaslarda, beyin, pankreas ve kan hücrelerinde de bulunur.

Serum aminotransferaz düzeyinin artması; hepatosellüler nekroz sonucu hücre içindeki enzimin seruma geçmesi veya nekrozla sonlanmayan bir hücre hasarında membran geçirgenliğinin artması şeklinde olabilir. Aminotranferazlar

idrarla atılmazlar. Safraya az miktarda geçebilirler. Eleminasyonu esas olarak retiküloendotelyal sistemde gerçekleşir. ALT'nin yarı ömrü 47 ± 10 saat ve AST'nin yarı ömrü 17 ± 5 saat olduğundan AST'nin eleminasyonu ALT'den daha hızlıdır.

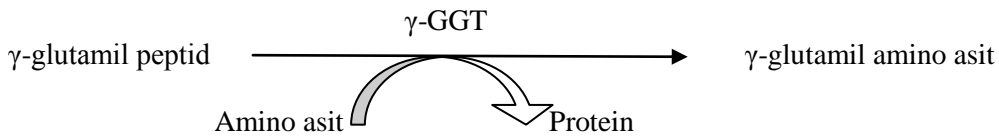
Aminotransferaz artışının önemi klinikte iyi bilinmelidir. Aminotransferaz artışı genellikle,

- Ciddi derecede artış; genellikle normal değerinin 15 katından fazla,
- Orta derecede artış; normal değerinin 5-15 kat arası
- Hafif derecede artış; normal değerinin 5 katından daha az artış olarak üç ayrı seviyede değerlendirilebilir.

İlaçların, bitkilerin veya toksinlerin aminotransferaz artışına neden olduğu bilinmektedir. İlaç, bitki veya toksin kullanımı sonucu gelişen aminotransferaz artışı hafif derecede olabileceği gibi karaciğer yetmezliğine kadar gidebilir. İlaç, bitki veya toksin alımından genellikle 1-2 ay içerisinde aminotransferaz artışı meydana gelebilir (66).

2.5.4.2. Gama Glutamil Transferaz (GGT)

GGT, C terminal glutamil gruplarına bağlanan bir karboksi peptidazdır. Enzim glutasyon metabolizmasında görev alır. Mikrozomal membranlar (% 95) ve sitozol (%5)' de bulunur. Serum GGT aktivitesi birincil olarak karaciğer orjinlidir (65). GGT, katalitik aktivitesini transfer ve hidroliz reaksiyonlarında gösterir:



Metastazlı ve primer karaciğer kanserlerinde GGT'de hızlı ve önemli bir artış görülür. GGT'nin serumdaki artışı, genellikle karaciğer metastazının ilk bulgusudur. GGT, aynı zamanda böbrekte ve pankreasta da yüksek konsantrasyonda bulunur (67).

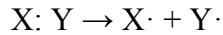
2.6. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir veya birden fazla paylaşılmamış (eşleşmemiş) elektron taşıyan atom veya moleküller olarak bilinir. Eşleşmemiş elektron içermelerinden dolayı stabil olmayan, oldukça reaktif, çok kısa yarı ömürlü maddelerdir. Bu özelliklerinden dolayı hücrenin tüm bileşenleri ile kolayca etkileşime girerler (68).

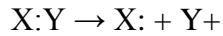
Demir, mangan, bakır, molibden gibi geçiş metalleri de dış yörüngelerinde birer elektron taşırlar. Buna rağmen radikal etki göstermezler. Çünkü serbest radikal kabul edilen atom ve moleküller, elektron dağılımlarının yanı sıra termodinamik yapıları ve lokal kinetik reaktiviteleri ile değerlendirilirler (69).

Serbest radikaller hücrede metabolik dengenin bir parçası olarak sürekli oluşurlar. Serbest radikaller 3 yolla oluşur:

1. Homolitik bölünme; kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir kısmında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi,

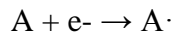


2. Heterolitik bölünme; normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi olayı,



Heterolitik bölünmede kovalent bağı meydana getiren her iki elektron atomların birinde kalır. Bunun sonucu serbest radikaller değil, iyonlar oluşur.

3. Bir moleküle tek bir elektronun katılması ile meydana gelir (70).



Serbest radikallerin oluşumun artıran ekzojen ve endojen faktörler Tablo 2.4.' de verilmiştir.

Tablo 2.4. Serbest radikallerin oluşumunu artıran nedenler (71).

Ekzojen faktörler	Çevresel (Sigara dumanı, hava kirliliği, radyasyon vb.)
	Diyetsel (Çok doymamış yağ asitlerince zengin beslenme, aşırı alkol, demir ve bakır alımı, fazla kalorili beslenme-obezite vb.)
	İlaçlar (Kanser ilaçları, glutatyon tüketen ilaçlar vb.)
	Diyet ile antioksidanların alımını etkileyen koşullar (İştahsızlık, kolestaz, malabsorbsiyon vb.)
Endojen faktörler	Doku hasarı ve kronik hastalıklar (Ateroskleroz, kanser, kronik inflamasyon vb.)
	Fiziksel egzersiz / sedanter yaşam
	Stres
	Yaşlılık

Organizmanın yaşamı, devamı ve bütünlüğü homeostatik dengenin devam etmesine bağlıdır. Homeostazis hem iç hem de dış etkenlerle sürekli olarak tehdit altındadır. Serbest radikallerin yıkıcı etkilerine karşı hücreler antioksidan sistemlere sahiptir (72). Hücre içerisinde ciddi ve çeşitli miktarlarda radikal üretimi söz konusudur. Radikaller; elektron transferinde, enerji üretimi sırasında ve diğer metabolik işlemlerde üretilmektedir (73). Hücrelere herhangi bir engelle karşılaşmadan giren ve hücre içerisinde en çok kullanılan molekül oksijendir. Bu yüzden serbest radikallerin en önemli kaynaklarından birisi oksijendir. Ancak canlı organizmasında oksijen türevlerinden de başka karbon ve kükürt merkezli radikaller oluşmaktadır.

Serbest radikallerin biyolojik ortamlardaki türleri Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Reaktif Azot Türleri (RAS)' dir. ROS; oksijen radikallerini ve radikal olmayan reaktif oksijen türevlerini içeren genel bir terimdir. RAS'lar de, fizyolojik öneme sahip olan serbest radikal türleridir (74). Yüksek konsantrasyonlarda serbest radikaller ve radikal olmayan reaktif türler, canlı organizmalar için tehlikelidir. Bu durum tüm hücre yapılarına zarar verir. Bununla birlikte, düşük konsantrasyonlarda nitrik oksit, süperoksit anyonu ve reaktif oksijen türleri sinyal iletiminde düzenleyici bir role sahiptirler. ROS'un yaptığı birçok cevap, aslında hücreleri oksidatif strese

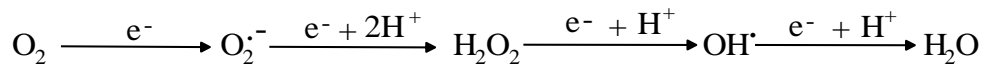
karşı korur ve redoks homeostazını yeniden oluştururlar (75). Tablo 2.5. de reaktif oksijen ve reaktif azot türleri bulunmaktadır.

Tablo 2.5. Reaktif oksijen ve azot türleri (76)

Reaktif oksijen türleri (ROS)	Radikaller	Non-radikaller
		Hidroksil (OH \cdot)
	Hidroperoksil (HO $_2$)	Hidrojen peroksit (H $_2$ O $_2$)
	Alkoksil (LO \cdot)	Lipit hidroperoksit (LOOH)
	Peroksil (LO $_2^{\cdot-}$)	Ozon (O $_3$)
	Süperoksit (O $_2^{\cdot-}$)	Singlet oksijen (O $_2$)
Reaktif azot türleri (RAS)	Nitrik oksit (NO \cdot)	Alkoksil peroksinitrit (LOONO)
		Dinitrojen tetroksit (N $_2$ O $_4$)
	Nitrojen dioksit (NO $_2^{\cdot}$)	Dinitrojen trioksit (N $_2$ O $_3$)
		Nitröz asit (HNO $_2$)
		Peroksinitrit (ONOO $^-$)

2.6.1. Reaktif Oksijen Türleri

Başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine giren moleküllere oksidan moleküller veya reaktif oksijen türleri (ROS) denir. Vücutta normal veya patolojik olarak serbest radikaller oluşur. Serbest radikaller hemen sentez edildikleri yerde detoksifiye edilmezler ise zararlı etkileri ortaya çıkar. Serbest radikallerin kaynağı moleküler oksijendir. Oksijen, yaşam için hem temel hem de toksik bir elementtir. Moleküler oksijenin indirgenmesiyle süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türleri oluşur (77, 78).



Şekil 2.11. Moleküler oksijenden reaktif ara ürünlerin oluşumu

Serbest radikaller, zarların enzim ve reseptörlerine kovalent bağlanarak onların antijenik ve taşıma özelliklerini bozarlar. Bu da poliansatüre yağ asidi/protein oranını etkiler. Serbest radikaller, lipid peroksidasyonu ile başlar ve zar yapısında yer alan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile sonuçlanır. Lipid peroksidasyonunda organellerde fonksiyon bozukluğu gözlenir ve sonuç olarak hücre ölümü gerçekleşir.

Serbest oksijen radikalleri öncelikle hücre zarında hasara yol açarak lipid geçirgenliğini artırır. Bu da lipoproteinlerin kana geçişine neden olur. Böylece monosit ve makrofajların damar duvarına geçişini artırarak aterogenezi hızlandırır (79,80). ROS'ların bulunma düzeyi, yaşlanma süreciyle paralel bir artış gösterir (79). Serbest oksijen radikallerinin kaynakları (80).

I. Normal biyolojik işlemler

- 1- Oksijenli solunum
- 2- Katabolik ve anabolik işlemler

II. Oksidatif stres yapıcı durumlar

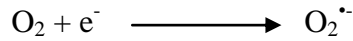
- 1- İskemi, hemoraji, travma, radyoaktivite, intoksikasyon
- 2- Ksenobiyotik maddelerin etkisi
 - a) İnhalasyon
 - b) İlaçlar
 - c) Alışkanlık yapan maddeler
- 3- Oksidan enzimler
 - a) Ksantin oksidaz
 - b) Triptofan dioksijenaz
 - c) İndolamin dioksijenaz
 - d) Galaktoz oksidaz
 - e) Siklooksijenaz
 - f) Monoaminoksidaz
 - g) Lipooksijenaz
- 4- Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu
- 5- Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma
- 6- Uzun süreli metabolik hastalıklar
- 7- Diğer nedenler: sıcak şoku, güneş ışını, sigara, fazla egzersiz

III. Yaşlanma süreci

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

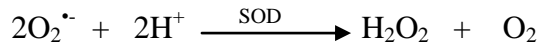
Oksijenli ortamda oksijene bir elektron eklenmesi ile süperoksit radikali oluşur (81). Süperoksit radikali, özellikle elektronca zengin bir ortam olan iç mitokondri zarında solunum zinciriyle beraber oluşur. Süperoksit ayrıca ksantin oksidaz gibi flavoenzimlerce endojen olarak da oluşur. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz diğer süperoksit oluşturan enzimlerdir (82,83).

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) aerobik hücrelerde moleküler O_2 'in bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. Oluşan süperoksit radikali, reaktif bir yapı meydana getirir. Süperoksit radikali H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi (Fenton reaksiyonu) olması açısından önem arzeder (84).



2.6.1.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

İki süperoksit, iki proton (H^+) alarak H_2O_2 ve moleküler oksijeni (O_2) oluşturur. Bu reaksiyon süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir (85).

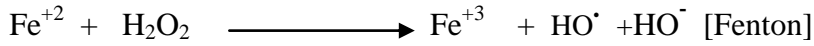
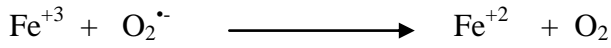
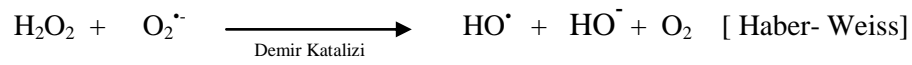


Vücutta oluşan ve istenmeyen hidrojen peroksitler katalaz, glutatyon peroksidaz ve diğer oksidazlar ile hücreden uzaklaştırılır (79).

H_2O_2 düşük toksisiteye sahip, oksidan ancak reaktif olmayan bir üründür. Özellikle demir, bakır gibi geçiş metal iyonlarının varlığında $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 ferrik demiri ferröz hale getirir. Serbest oksijen radikallerinden en reaktif ve en hasar verici özelliği olan OH radikalini oluşturmak için kolayca parçalanır. Bu reaksiyona "Fenton Reaksiyonu" denir (85).



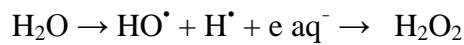
H_2O_2 tanım gereği serbest radikal değildir. Çünkü eşleşmemiş elektronu yoktur. Toksik olmasından ve HO^\bullet üretmesinden dolayı serbest radikal olarak değerlendirilir (84,86). Hidrojen peroksit, $O_2^{\bullet-}$ varlığında en reaktif ve zararlı olan serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini (HO^\bullet) oluşturur (Haber-Weiss reaksiyonu) (87). Bu tepkime katalizörsüz ortamda oldukça yavaşken, demirin katalizörlüğünde oldukça hızlıdır. Katalizörlü tepkimede, demir önce ferrik formdan (Fe^{+3}) süperoksit ile ferröz forma (Fe^{+2}) indirgenir (88,79).



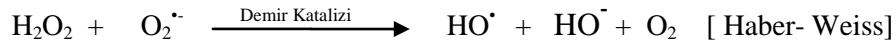
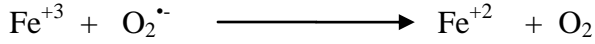
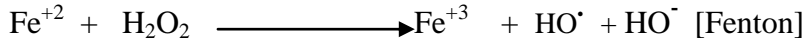
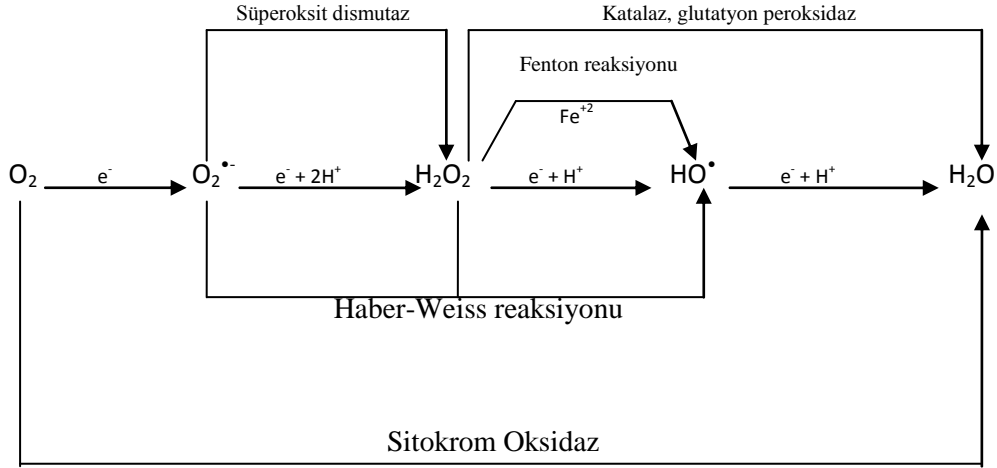
2.6.1.3. Hidroksil Radikali (HO^\bullet)

Hidroksil radikali, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarının en son ürünüdür. Hidroksil radikali çok reaktif ve zarar vericidir. Bu serbest radikale karşı özel bir antioksidan yoktur. Hidroksil radikali lipid peroksidasyonuna ve/veya protein oksidasyonuna neden olur (87).

Hidroksil radikalının en önemli oluşumu ise suyun yüksek enerji ile iyonizasyonudur.



Hücrenin mitokondrisinde radikal oluşumu Şekil 2.12.' de gösterilmiştir.



Şekil 2.12. Hücrenin mitokondri fraksiyonunda radikal oluşumu (89)

2.6.1.4. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Oksijenin uyarılmış formu ‘singlet oksijen’ olarak adlandırılır. Doymamış yağ asitleriyle direk tepkimeye girerek peroksil radikalini oluşturur. Hidroksil radikali kadar etkili olacak şekilde lipid peroksidasyonunu başlatır. Bilirubin, karotenler, histidin, metionin gibi kimyasal bileşikler singlet oksijeni temizlerler (90).

Singlet oksijen eşleşmemiş elektron içermez. Bu yüzden tanım gereği serbest radikal değildir (79).

2.6.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri

Serbest radikaller, normal koşullarda bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gereklidir. Ancak serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümüne neden olur.

Serbest radikaller, hücre içinde antioksidan kapasiteyi aşan konsantrasyonlarda buldukları zaman; başta lipitler olmak üzere, protein, DNA,

karbonhidratlar ve enzimler gibi birçok molekülle reaksiyona girdikleri saptanmıştır (91). Hücrel serbest radikallerin etkilediği moleküller Tablo 2.6.' da gösterilmiştir. Sonuç olarak enzimlerin normal fonksiyonlarını, aerobik solunumu, kapiller permeabiliteyi bozup, hücrenin potasyum kaybını artırır. Hücre içindeki birçok litik enzimi aktif hale getirip, savunma sistemlerini inaktive ederler. Trombosit agregasyonunu artırıp, dokularda fagosit toplanmasını sağlarlar (92). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun artmasının birçok hastalığın temelinde rol oynadığını gösterir. Serbest radikallerin damar endotel hücrelerinde hasar yaparak vasküler hastalıklara neden olduğu da saptanmıştır (93).

Miyokard enfarktüsü, bazı nörolojik hastalıklar, astım, romatoid artrit, kanser ve obezite gibi birçok hastalığın oksidatif stres ile ilişkisi gösterilmiştir (76).

Serbest radikallerin ayrıca yaşlanmada da rolü olduğu belirtilmektedir (94).

Tablo 2.6. Hücrel serbest radikallerin etkilediği moleküller (95)

Etkilenen Bileşikler	Sonuçlar
Doymamış amino asitler ve kükürt içeren amino asitler	Protein denatürasyonu Çapraz bağlanma Enzim inhibasyonu Organ ve hücre geçirgenliğinde değişimler
Nükleik asit bazları	Hücre gelişiminde değişimler Mutasyon
Karbonhidratlar	Hücre yüzey reseptörlerinde değişim
Doymamış lipidler	Kolesterol ve yağ asitlerinin oksidasyonu
Kofaktörler	Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerin aktifliğinde azalma Askorbat ve porfirin oksidasyonu
Antioksidanlar	α -tokoferol ve β -karoten gibi antioksidanların aktifliğinin azalması
Proteinler	Denatürasyon Peptid zincirlerinde kırılmalar
DNA	Baz modifikasyonları Zincirde kırılmalar
Hyaluronik asit	Sinovial sıvının vizkozitesinde değişim

2.6.2.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

Biyomoleküller içinde serbest radikallerden en çok etkilenen, lipitlerdir. Zarlar yapısında bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle çok hızlı bir şekilde reaksiyona girer. Doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak adlandırılır (96).

Radikallerin reaksiyonu sonucu, lipit peroksitler, lipit alkoller ve aldehit yapısında yan ürünler meydana gelir. Üç veya daha çok çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda, malondialdehit (MDA) meydana gelir. Küçük bir molekül olan MDA, rahat difüze edildiği için DNA bazları ile kolaylıkla reaksiyona girer. Bu olumsuz etkiler, malondialdehite mutajen, kanserojen ve genotoksik bir özellik sağlar (95).

2.6.2.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Serbest radikaller, proteinlerde serbest radikal birikimi yaparak etkilerini gösterirler. Doymamış bağ ve sülfüt içeren moleküllerin serbest radikaller ile etkileşimi fazladır. Bundan dolayı fenilalanin, tirozin, triptofan, histidin ve metionin gibi aminoasit içeren proteinler serbest radikallerden rahatlıkla etkilenirler. Sonuç olarak sülfür ve karbon merkezli radikaller oluştururlar (96).

Hücre proteinleri, çapraz bağlanma sonucu dimerleşirler. Çok aktif olan HO[•] iyonu, peptit ve aminoasitlerde hidroksilasyona neden olur. Proteinlerin yapı ve fonksiyonlarını bozar (95).

2.6.2.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere Etkileri

Ultraviyole, X-ışınları ve elektromanyetiğe maruz kalan hücrelerde DNA, hidroksil (HO[•]) radikallerine maruz kalır. DNA daki heterosiklik bazlarla ve deoksiriboz fosfatlarla reaksiyona girerler. ROS, DNA polimerazı inhibe ederek, karsinogenez, hücre yaşlanması ve ölümünü gerçekleştirir (97).

Çift zincirli DNA molekülünde, heterosiklik bazlar HO[•] radikallerine karşı çok iyi korunmuşlardır. Ayrıca, enzimatik radikal tutucular, öncü HO[•] radikallerinin konsantrasyonunu azaltarak DNA'yı korurlar (95).

2.6.2.4. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir. İnflamatuvar eklem hastalıklarında sinoviyal sıvıya geçen lökositlerden ekstrasellüler sıvıya salınan H_2O_2 ve O_2 , mukopolisakkarit olan hyalüronik asiti parçalar. Gözün vitröz sıvısında bol miktarda hyalüronik asit bulunduğundan bunun oksidatif hasarı, katarakt oluşumuna neden olur (98).

2.6.3. Serbest Radikallerin Zararları

Serbest radikaller hücre ve dokularda birçok zarara yol açar. Özetle:

- a) Lipid peroksidasyonu zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesine yol açarlar.
- d) Enzim aktivitelerinde ve lipit metabolizmasında ki değişikliklere neden olurlar.
- e) Protein ve lipitlerle kovalent bağlantılar yaparlar.
- f) Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulmasına neden olurlar.
- b) Nükleotid yapılı koenzimlerin yıkımını sağlarlar.
- c) DNA'yı tahrip ederler.
- g) Seroid ve yaş pigmenti denilen bazı maddelerin birikimini sağlarlar.
- h) Proteinlerin tahrip olması ve protein "turnover"nin artmasına neden olurlar.
- i) Tiollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarını bozarlar.
- j) Kollagen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapillerlerde aterosklerotik değişikliklerin oluşmasına neden olurlar.
- k) Mukopolisakkaritlerin yıkımına neden olurlar (71).

2.7. Antioksidanlar

Okside olabilen substrata göre, ortamda daha az derişimde bulunan ve bu substratın oksidasyonunu belirgin şekilde geciktiren veya engelleyen maddeye antioksidan denir (99). Antioksidanlar hem hücre içi sıvıda hem de hücre dışı sıvıda bulunarak serbest radikal hasarını önlerler. SOD, GPx ve CAT gibi enzimler mitokondride bulunurlar. Antioksidan savunma sistemleri birincil ve ikincil savunma sistemleri olarak ikiye ayrılırlar.

1. Birincil savunma sistemi: SOD, GPx, CAT gibi enzimler; A, C, E vitaminleri; glutatyon ve ürik asit gibi bileşikler birincil savunma sistemini oluşturur.

2. İkincil savunma sistemi: Lipolitik enzimler, peptidazlar, proteazlar, DNA onarım enzimleri, ekzonükleaz, endonükleaz ve ligaz ikincil savunma sistemini oluşturur (98).

Antioksidanların ilk gözlenen etkileri, zar yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu engellenmesi olmuştur. Antioksidanların, günümüzde lipitleri, proteinleri, nükleik asitleri ve diğer hedef makromolekülleri koruduğu bilinmektedir (100,101).

Antioksidanların etkileri başlıca iki şekilde gösterilir:

A) Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

- 1-Oksijeni uzaklaştırıcı veya azaltıcı etkiye sahiptir.
- 2-Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etkiye sahiptir.
- 3- Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etkiye sahiptir.

B) Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

1- **Toplayıcı (scavenging) etki:** Serbest oksijen radikallerini tutarlar veya daha az reaktif olan başka bir moleküle çevirirler (Ör: Enzimler).

2- **Bastırıcı (quencher) etki:** Serbest oksijen radikalleri ile etkileşip onlara bir proton (hidrojen) ekleyerek aktivite kaybına neden olurlar (Ör: Flavinoidler, vitaminler).

3-**Onarıcı (repair) etki:** Oksidatif hasar görmüş molekülü onarırlar.

4- **Zincir kırıcı (chain breaking) etki:** Serbest oksijen radikallerini ve zincirleme reaksiyonları başlatarak, diğer maddeleri kendilerine bağlayarak ve zincirlerini kırarak fonksiyonlarını önlerler (Ör: Hemoglobın, seruloplazmin, mineraller) (95).

2.7.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidan sistem; enzimler, suda çözünen radikal tutucuları, yağda çözünen radikal tutucuları ve metal iyonlarını bağlayan proteinler olarak gruplandırılır (Tablo 2.7.).

Antioksidanların sınıflandırılması, endojen kaynaklı (Tablo 2.8.) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir (88) gibi enzim ve enzim olmayan antioksidanlar şeklinde de sınıflandırmaları vardır.

Antioksidan sistem; radikal oluşumunu engeller, oksidatif hasarı onararak hasara uğramış molekülleri temizleyerek mutasyonları önler (101).

Tablo 2.7. Organizmada antioksidan sistem elemanları (101).

Enzimler	Süperoksit dismutaz Katalaz Glutasyon peroksidaz Glutasyon redüktaz Glutasyon transferaz
Suda çözünen Radikal tutucuları	Glutasyon Vitamin C Ürik asit Glukoz Sistein
Yağda çözünen radikal tutucuları	Vitamin E β-Karoten Bilirubin Ubikinol Flavonoidler
Metal iyonlarını bağlayan proteinler	Ferritin Transferrin Haptogloblin Seruloplazmin Albumin

Tablo 2.8. Doğal (endojen) antioksidanlar (102)

Antioksidanlar	Yapısı	Yerleşimi	İşlevi
Sitokrom oksidaz	Tetramerik protein	Plazma	Süperoksit nötralizanı
Süperoksit Dismutaz (SOD)	Cu,Zn, Mn SOD	Mitokondri, serum	Süperoksit'i H ₂ O ₂ 'ye çevirir
Katalaz (CAT)	Hemoprotein	Peroksizomlar	Peroksit nötralizanı
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Selonoprotein	Sitozol, mitokondri	Lipit peroksidasyonu ürünlerini indirger
Glutasyon redüktaz (GRx)	Dimerik protein	Sitozol, mitokondri	Disülfidleri indirger
α-tokoferol	Yağda çözünen vitamin	Membranlar, Ekstrasellüler ortam	Peroksidasyonu azalır
β-karoten	Vit-A prekürsörü	Hücre membranları	Peroksil temizleyicisi
Glutasyon (GSH)	Tripeptit	İntrasellüler ortam alveoller	Redoks substratı
Ürik asit	Okside pürin bazı	Geniş bir dağılım gösterir	Hidroksil toplar, Vitamin 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
Serüloplazmin	Protein	Dolaşım kanı, dokular	Süperoksiti H ₂ O 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 çözünen vitamin	Hücre içi ve dışı sıvıları	Vitamin E'yi rejenere eder

2.7.1.2 Enzimatik Antioksidanlar

2.7.2.1. Süperoksit Dismutaz

İnsanlarda iki adet süperoksit dismutaz (SOD) izoenzimi bulunur. Bunlardan biri bakır ve çinko içerir ve sitozolde bulunur (103). Diğeri ise mangan içerir ve mitokondride bulunur (104).

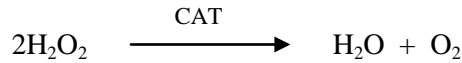
SOD enzimi, substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzimdir. Süperoksit radikalının, H_2O_2 ' ye ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar (105, 106).



2.7.2.2. Katalaz (CAT)

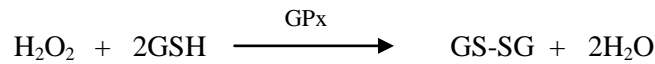
Katalaz enzimi (CAT) memeli eritrositlerinde çok miktarda bulunur. CAT, tetramerik yapıya sahiptir. Molekül ağırlığı 240.000' dir. Aktif merkezinde 4 tane "ferrihem" bulunduran bir hemoproteindir (107,108). CAT somatik bir oksidan koruyucusudur. CAT' ın H_2O_2 ye affinitesi GPx e göre daha çoktur. Katalaz eritrosit içerisinde sayıca çok fazla bulunur.

Katalaz; hidrojen peroksidi, su ve oksijene parçalar (108).



2.7.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon Peroksidaz, hücrelerin sitozollerinde bulunan bir enzimdir. Hidroperoksitlerin indirgenmesinde rol oynar. GPx, sitozol ve mitokondrilerde SOD tarafından oluşturulan H_2O_2 ve yağ asidi hidroperoksitlerini yok eder. GPx, düşük H_2O_2 konsantrasyonunda çalışır. Kofaktörü selenyum elementidir (90).

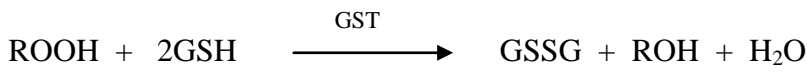


GPx, fagositik hücrelerde önemli işlevleri vardır. GPx ve diğeri antioksidanlar, solunum sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu, fagositik hücrelerin zarar görmesini engellerler. Glutasyon Peroksidaz, eritrositlerde oksidan strese karşı en etkili olan antioksidandır (109).

2.7.2.4. Glutatyon-S-Transferaz (GST)

Glutatyon; glutamik asit, glisin ve sisteinden oluşan bir tripeptiddir. Glutatyon, GSH olarak kısaltılır. SH, sisteinin sülfidril grubudur ve molekülün alışveriş yapan bölümüdür. Glutatyon ve ksenobiyotiklerin reaksiyonunu gerçekleştiren enzimlere “glutatyon- S- transferazlar” kısaca “GST” denir.

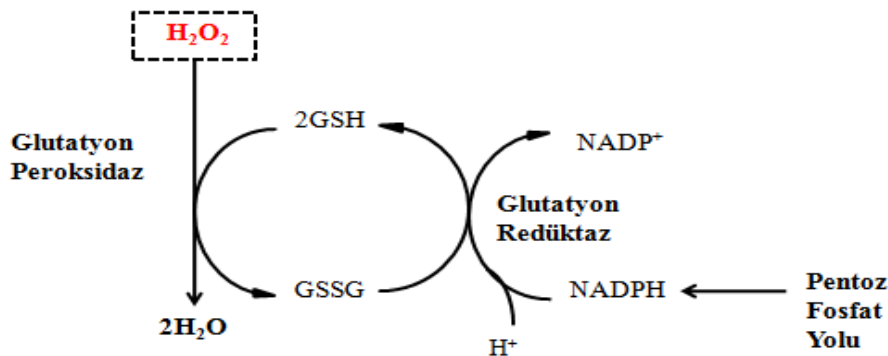
Ksenobiyotik metabolizmasında glutatyonun rolü, faz I enzimlerince oluşturulan reaktif ürünler glutatyon ile konjugasyona girer. Bunun sonucunda reaktif ürünler hücre makromoleküllerine (DNA, RNA, protein) bağlanamaz ve hücre hasarı oluşmaz (110).



2.7.2.5. Glutatyon Redüktaz (GRx)

Glutatyon redüktaz flavin adenin dinükleotid (FAD) içerir. NADPH’tan bir elektronun GSSG’nin disülfüd bağlarına aktarılmasında rol oynar. NADPH serbest radikal hasarına karşı koruyucu olduğu için önemlidir ve major kaynağı pentoz fosfat yoludur (111).

H₂O₂ indirgenmesiyle GSH oksitlenir. Glutatyon peroksidazın fonksiyonu için okside glutatyon tekrar indirgenir. Reaksiyon GSH redüktaz tarafından katalizlenir. Enzim NADPH bağımlı bir flavoproteindir (88). Glutatyon redoks döngüsü Şekil 2.13.’ de gösterilmiştir.

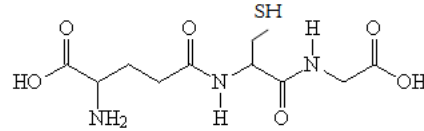


Şekil 2.13. Glutatyon redoks döngüsü (112).

2.7.3. Nonenzimatik (Organik) Antioksidanlar

2.7.3.1. Redükte Glutatyon (GSH)

Glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. Hücrede en fazla tiyol içeren yapıdır. GSH'nin moleküler yapısı Şekil 2.14.' da gösterilmiştir.



Şekil 2.14. GSH'nin moleküler yapısı (113).

GSH sentezinde kullanılan sisteinin kaynağı N-asetilsisteindir. Glutaminin glutaminaz ile hidrolizi glutamatın bir kaynağını oluştururken, diğer kaynağını ise α -ketoglutarat ile dallı zincirli aminoasitlerin transaminasyonu oluşturur. GSH'daki glutatyon radikali (GS-) bir prooksidandır. İki GS- birleşerek okside glutatyonu (GSSG) oluştururlar ve GSH redüktaz tarafından GSH'ya indirgenirler.

GSH doğrudan veya dolaylı olarak reaktif oksijen türlerini temizler. Hücresel oksidasyon-redüksiyonda önemli rol oynayan tiyol proteinleriyle etkileşir (114).

Bir nörotransmitter görevi üstlenerek endokrin sistem arasındaki etkileşimi sağlar (115).

2.7.3.2. Flavonoidler

Flavonoidler çeşitli sebze, meyve ve otlarda bulunan polifenol grubu doğal kimyasallardır. Antioksidan, antiinflamatuvar, antiarteriyosklerotik, antitümör, antiviral, antitrombojenik ve antialerjik etkileri vardır. Flavonoidler, önemli metal şelatörleri ve serbest radikal temizleyicisi gibi görev yaparlar (116).

2.8. Oksidatif Stres

Organizmada normal fizyolojik şartlarda veya herhangi bir patolojik olaylar sonucunda serbest radikaller oluşur. Bunların koruyucusu olan antioksidan savunma sistemi ile serbest radikaller arasındaki dengenin serbest radikaller lehine kayması oksidatif stresi oluşturur (117). Hücre zarındaki doymamış yağ asitlerinden, hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlayan lipid peroksidasyonu oksidatif stresin en tipik göstergesidir (118).

Serbest radikal reaksiyonları özetle aşağıdaki gibi sıralanır:

- 1.Hidrojen çıkarılması: $A + RH \rightarrow AH + R$
- 2.Elektron transferi: $X^- + Y \rightarrow X + Y^-$
- 3.Eklenme: $X + RCH = CHR \rightarrow XR_2$
- 4.Sonlandırma: $A^\cdot + A^\cdot \rightarrow A_2$
- 5.Oran bozulması: $CH_3CH_2 + CH_3CH_2 \rightarrow CH_3CH_3 + CH_2 = CH_2$ (119).

Serbest oksijen radikalleri normal hücre metabolizması süresince sürekli olarak üretilir ve antioksidan savunma sistemi tarafından etkisiz hale getirilir. Ancak antioksidan sistem baskılandığı zaman oksidatif stres ortaya çıkar.

Oksidatif stres; karsinojenezin başlamasında kritik rol oynayan DNA hasarına, tümör süpresör genlerde mutasyonlara, kromozomal sapmalara, kontrol edilmeyen hücre bölünmelerine neden olarak tümör gelişimine yol açar (120).

2.8.1. Oksidatif Stres Parametreleri

2.8.1.1. Nitrik Oksit (NO)

Nitrik Oksit, nitrik oksit sentaz enzimi tarafından L-arjinin'den sentezlenir.



NO^\cdot eşleşmemiş elektrona sahip olmasına rağmen birçok biyomolekül ile kolayca tepkimeye giremez. Diğer taraftan peroksil, alkil gibi serbest radikallerle kolayca tepkimeye girerek daha az reaktif moleküller oluşturur (121).

Nitrik oksit (NO^\cdot) sentezi insanda vasküler tonüsün düzenlenmesinde, kan basıncı ve böbrek fonksiyonunun kontrolünde rol oynar. Nitrik oksit (NO^\cdot) vasküler endotelial hücrelerde meydana gelen önemli bir vazodilatatördür (88).

NO^\cdot radikalinin son ürünleri nitrit (NO_2^-) ve nitrattır (NO_3^-). Plazma gibi vücut sıvısında nitritin çoğu nitrata dönüşür. Nitrik oksit, Fe-S proteinlerinden demiri çıkararak kendisi bağlanır ve Fenton reaksiyonu inhibe olur (122).

NO pek çok fizyolojik durumda ve hastalıkta kilit role sahiptir. NO, beyinde düşük miktarlarda faydalı, düzenleyici ve nöronal aktiviteyi koruyucu etki gösterir. Ancak yüksek miktarlarda, oksidatif stres ile hücre hasarına neden olarak öldürücü etki gösterir.

Santral sinir sisteminde NO ve glutamat yakın ilişki içindedir. İskemide glutamat artışı ile hücre içi kalsiyum düzeylerinde artış olurlar. Artan hücre içi kalsiyum, kalsiyuma bağımlı pek çok enzimin (fosfolipaz A₂, kalpain, proteazlar) aktivasyonuna neden olur. Aktive olan enzimler membran lipidlerinin peroksidasyonunu, proteinlerin lizisini gerçekleştirir.

NOS iki gruba ayrılır;

1. Yapısal NOS (cNOS)

a. Nöronal NOS (nNOS), kalsiyum bağımlı enzim

b. Endotelial NOS (eNOS), kalsiyum bağımlı enzim

2. Uyarılabilir NOS (iNOS)

eNOS vasküler tonusu düzenler. Trombosit agregasyonunu ve lökosit adezyonunu azaltarak mikrovasküler dolaşımı düzenler.

iNOS, kalsiyum bağımlı değildir. Makrofajlar, lökositler, damar düz kasları, damar endoteli ve astrositler tarafından üretilirler. Patolojik süreçlerde ortaya çıkan iNOS, iskemi sonrası 24-72 saatte inflamatuvar hücreler ile mikroglia NO üretimini artırır. nNOS ve eNOS iskemi başlangıcındaki artıştan hemen sonra azalır (123).

2.8.1.2. Malondialdehid (MDA)

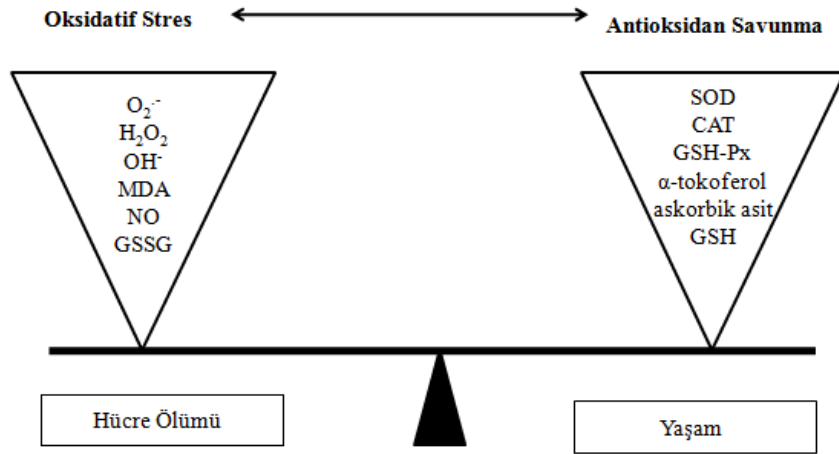
Lipitler biyomoleküller içinde serbest radikallerden en çok etkilenen yapılardır. Doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonudur. MDA, üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda meydana gelen, lipid peroksidasyonun en önemli ürünüdür.

MDA, kanda ve idrarda ortaya çıkar. Yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir göstergesi olmamasına rağmen, lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. MDA, bu nedenle lipid peroksidasyon seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır.

Malondialdehid sınıfından olan thiobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddeler (TBARS), lipid peroksidasyonunun önemli göstergelerinden biridir. Hücrelerde hidroksil radikal hasarının etkilerini ölçmek için kullanılan en yaygın testlerden biri, malondialdehiti tespit etmek için kullanılan thiobarbitürik asit testidir. MDA, hidroksil radikallerinin doymamış yağ asit zincirlerine etki etmesiyle

meydana gelir. Thiobarbitürük asit eklenerek ısıtıldığında pembe renge dönüşür (124).

ROS üretiminin ve antioksidatif sistemlerin dengesi özetle Şekil 2.15.' da gösterilmiştir.



Şekil 2.15. ROS üretiminin ve antioksidatif sistemlerin dengesi (125).

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Ratların Temini

Bu çalışmada kullanılan Wistar albino türü dişi ratlar, İnönü Üniversitesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Çalışma süresince İnönü Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu esaslarına uyuldu. 18 haftalık 205±13 gram ağırlığında dişi sıçanlar deney gününe kadar standart barınma kafeslerinde tutuldu. Deney boyunca içme suları günlük değiştirildi ve standart kafes temizliği yapıldı. Ratlar 24-27C° oda sıcaklığı arasında, havalandırması olan, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık aydınlatmalı odalarda barındırıldılar. Ratlar deney boyunca pekmezli gruplar hariç standart pellet yemle besletilip 6 gruba ayrıldı. İstatistik açıdan anlamlı sonuçlar elde edebilmek için her gruba 7 rat alındı.

3.2. Deneysel Grupları

1.Grup: Kontrol Grubu (n=7): Bu gruptaki ratlara 20 ml susam yağı ve 30 ml DMSO karışımından her gün 1ml subkutan enjeksiyon yapıldı. 10. günde karaciğer dokuları ve kanları alınarak sakrifiye edildi.

2.Grup: DMBA Grubu (n=7): DMBA10 mg/kg alınarak 0. gün ve 7. gün subkutan enjeksiyon yapıldı. 10. günde karaciğer dokuları ve kanları alınarak sakrifiye edildi.

3. Grup: DMBA + Pekmez Grubu (n=7): 10 mg/kg DMBA alınarak 0. gün ve 7. gün subkutan enjeksiyon yapıldı. % 20 pekmez içeren pekmezli yem her gün verildi. 10. günde karaciğer dokuları ve kanları alınarak sakrifiye edildi.

4. Grup: DMBA + Resveratrol Grubu (n=7): Resveratrol 10 mg/kg/gün subkutan enjeksiyon yapılarak uygulandı. 10 mg/kg DMBA alınarak 0. gün ve 7. gün subkutan enjeksiyon yapıldı. 10. günde karaciğer dokuları ve kanları alınarak sakrifiye edildi.

5. Grup: Pekmez Grubu (n=7): % 20 pekmez içeren pekmezli yem her gün verildi. 10. günde karaciğer dokuları ve kanları alınarak sakrifiye edildi.

6. Grup: Resveratrol Grubu (n=7): Resveratrol 10 mg/kg/gün subkutan enjeksiyon yapılarak uygulandı. 10. günde karaciğer dokuları ve kanları alınarak sakrifiye edildi.

3.3. Resveratrol, Pekmez ve DMBA' nın Hazırlanması

DMSO birçok kimyasal maddenin çözücüsü olarak kullanılan bir ajandır (23). Jennifer S.C.Lee çalışmasında kontrol grubuna DMSO ve zeytin yağı vermiştir (126). Nicolas Currier ve arkadaşları çalışmalarında DMBA' yı çözmek için susam yağı kullanmışlardır (127). Çalışmamızda 110 mg resveretrol 110 ml DMSO içinde çözdürüldü. 65 mg DMBA 65ml susam yağında çözdürüldü. % 20 pekmez içeren yem hazırlandı.

3.4. Pekmezin Hazırlanması

Hasat dönemi toplanan üzüm ayıklanır. Ezme ve sıkma işleminden sonra pekmez toprağı ilave edilerek asitliğı giderilir (şıranın kestirilmesi). Dinlendirme ve süzme işlemi uygulanır. Sonrada güneşte koyulaştırma işlemi yapılır ve ambalajlanır. Çalışmada kullanılan siyah üzüm pekmezi Malatya ilinin Arapgir ilçesinden temin edildi.

3.5. Kan ve Karaciğer Dokularının Elde Edilmesi ve Analizlere Hazırlanması

Çalışmanın 10. Gününde ratlar genel anestezi altında sakrifiye edildi. Bunun için ratlara 5 mg/kg xylasine ve 50 mg/ kg ketamin i.p. uygulanarak genel anestezi sağlandı. Ratların karın derisi ve deri altı dokuları bistüri ile açıldı. Barsaklar dışarı alınarak vena cava inferiordan 5 ml' lik enjektörlerle kan örnekleri alındı. Alınan kanların iğne ucu çıkartılarak kanlar biyokimya tüplerine boşaltıldı. Tüpler soğutmalı santrüfujde 3000 rpm' de 10 dakika santrüfuj edildi. Elde edilen serum numnelerinin bir kısmıyla ALT, AST ve GGT sonuçlarına bakıldı. Ratların alınan karaciğer dokusunun bir parçası patolojik inceleme için % 10' luk formaldehid içerisinde fikse edilerek saklandı. Karaciğer dokusunun geriye kalan parçaları ise ikiye ayrılarak grup numaraları belirtilmiş alüminyum folyoya sarılarak plastik poşetlere konuldu. Sonra serum ve doku numuneleri -70 C° de derin dondurucuda biyokimyasal testlerin yapılacağı güne kadar saklandı.

3.5.1. Doku Homojenizasyonu ve Tamponları

Derin dondurucudan bulunan karaciğer doku örnekleri dondurucudan çıkartılarak buzdolabı ortamına alındı. Alınan dokular yaklaşık 200 mg ağırlığında

küçük parçalara ayrıldı. Tartılan dokular, içi buz dolu taşıma kaplarına yerleştirilmiş numaralandırılmış cam tüplere bırakıldı. Doku bırakılan tüplerin her birine sırayla 1ml Tris-HCl tamponu eklenerek homojenizatörle 16000 devir/dakika hızda 2 dakika homojenize edildi. Sonra 1ml daha Tris-HCl tamponu eklendi 1 dakika daha homojenize edildi. Bu işlem her bir tüp için ayrı ayrı uygulandı. Homojenize işlemi bittikten sonra bütün tüpler 4000 rpm de +4°C 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra oluşan süpernatantlar çalışılacak parametreler için kullanıldı.

Tris-HCl Tamponu:

0,2 M Tris (A): 24,23 g Tris alınıp distile su ile 1 L' ye tamamlandı.

0,1 N HCl (B): 8,3 ml HCl alınıp bir miktar distile suyun içine bırakıldı. Sonra 1 L' ye tamamlanır. pH=7 olacak şekilde ayarlandı. 1 L' ye tamamlandı.

3.5.2. Serumda AST, ALT, GGT Tayini

3.5.2.1. Aspartat Aminotransferaz (AST, SGOT) Tayini

Serum AST düzeyleri tayini, kit kullanılarak (Architect/Aeroset Aspartate Aminotransferase Reagent Kit) enzimatik-kolorimetrik metodla, otoanalizörde (Architect C8000) tespit edildi. Otoanalizör, kabaca numune ve reaktifleri uygun ölçülerde alıp karıştıran, belirli bir süre ve ısıda inkübe eden, gerekli sürelerde optik okumaları yapıp sonunda ilgili analiz sonucunu hesaplamış olarak kullanıcıya sunan cihazdır (128).

3.5.2.2. Alanin Aminotransferaz (ALT, SGPT) Tayini

Serum ALT düzeyleri tayini, kit kullanılarak (Architect/Aeroset Alanine Aminotransferase Reagent Kit) enzimatik-kolorimetrik metodla, otoanalizörde (Architect C8000) tespit edildi

3.5.2.3. Gama-Glutamil Transferaz (GGT) Tayini

Serum GGT düzeyleri tayini, kit kullanılarak (Architect/Aeroset Gama Glutamil Transferase Reagent Kit) enzimatik-kolorimetrik metodla, otoanalizörde (Architect C8000) tespit edildi.

3.5.3. Karaciğer Dokusunda TAS, TOS, OSİ ve 5'-Nükleotidaz

3.5.3.1. Total Antioksidan Status (TAS) ve Total Oksidan Status (TOS)

Total Oksidan Status (TOS), Total Antioksidan Status (TAS) düzeyleri Synergy HT, Biotek otoanalizöründe çalışıldı. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ); TAS ve TOS sonuçları kullanılarak hesaplandı.

Canlılar, endojen veya eksojen nedenlerle oluşan serbest radikaller ve bunlara bağlı gelişen oksidatif stres ile mücadele eden savunma sistemine sahiptirler. Kan oluşan oksidan durumlara karşı redoks ayarının sürdürülebilmesinde çok önemlidir. Çünkü kan antioksidanların vücudun tüm bölümlerine taşınmasını ve dağıtımını gerçekleştirir. Total oksidan kapasiteye en büyük etkiyi endojen olarak vücutta sentezlenen serbest oksijen moleküllerinin yan ürünleri sağlar. Vücutta normal veya patolojik olarak serbest radikaller sentez edilir. Oluşan bu ürünler hemen sentez edildikleri yerde detoksifiye edilmezler ise zararlı etki oluştururlar. Total antioksidan kapasiteye en büyük katkıyı plazmadaki antioksidan moleküller sağlar.

Plazmada antioksidanlar etkileşim içindedirler. Genelde bu maddeler sinerjistik etki gösterirler. Bu etkileşimden dolayı, bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşur. Bu sinerjizme glutatyonun askorbatı, askorbatında tokoferolün yeniden aktifleşmesi örnek gösterilebilir. Ayrıca bir antioksidandaki azalma diğerindeki artış ile dengelenmektedir.

Vücuttaki oksidatif stresi ve antioksidan kapasiteyi belirlemek için oksidan ve antioksidan moleküllerin ayrı ölçümü yerine total olarak ölçümünü sağlayan yöntemler vardır. Total oksidan status (TOS) düzeyinin, total antioksidan status (TAS) düzeyine oranlanmasıyla oksidatif stres indeksi (OSİ) hesaplanmaktadır. OSİ vücudun oksidan antioksidan dengesinin yönünü belirtmede kullanılır (129).

3.5.3.2. Total Oksidan Status (TOS) Aktivitesi Tayini

Erel'in metoduna göre çalışıldı (130). Total Oksidan Status kiti (Rel Assay Diagnostics) Synergy HT, Biotek biyokimya otoanalizörüne uyarlanarak çalışıldı. Örnek içinde bulunan oksidanlar ferröz iyon şelatör komplekslerini ferrik iyonlara çevirir. Oluşan ferrik iyonlar kromojen solusyonu ile renkli bir kompleks oluşturur ve oluşan bu kompleks örneklerdeki oksidan miktarıyla doğru orantılı olarak 530 nm'de

spektrofotometrik olarak ölçüldü. Standart olarak 20 mikromol / L H₂O₂ solusyonu kullanıldı.

Reaktifler:

Ayraç 1(Assay Buffer) : 50 ml

Ayraç 2 (Prokromojen solüsyon) : 10 ml

Standart 1 (Blank solüsyon) : Solüsyon içermez veya dionize su kullanılır.

Standart 2 Solüsyon (SSSS) : 5 ml

Stabilize Standart Stok Solüsyon (SSSS) : 800 mM H₂O₂Equiv./L

Stabilize standart stok çözeltisi (SSSS)

- 1.SSSS, 40000 kez deiyonize su ile seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlandı.
2. 10 ml deiyonize suya SSSS' in 50 mikrolitre (µL) sıvısı eklendi ve vortekslendi (1. adım solüsyon).
3. Hazırlanan solüsyonun 50 µL sıvısına 10 ml deiyonize su eklenir ve vortekslenir (2. adım solüsyon).
4. Standart çalışmanın son konsantrasyonu 20 mikromol / L H₂O₂' dir.

Hücreye 500 µL reaktif 1 ve 75 µL standart (veya numune) konulur. İlk absorbans noktası için 530 nm dalga boyunda okunur. Daha sonra 25 microliter reaktif 2 eklenerek 10 dk. oda sıcaklığında inkübe edilerek 530 nm dalga boyunda 2. absorbans noktası olarak absorbans okunur. Sonuçlar µmol H₂O₂ Equiv./L olarak ifade edilir.

Sonuçların hesaplanması:

Sonuç= (ΔAbs numune / ΔAbs standart 2) X 20(Standart 2 değeri)

ΔNumune absorbans: (Numunenin 2. absorbansı- Numunenin 1. absorbansı)

ΔStandart 2 absorbans: (Standart 2' nin 2. absorbansı - Standart 2' nin 1. absorbansı)

Standart 2 değeri: 20 µmol H₂O₂ Equiv./L

3.5.3.3. Total Antioksidan Status (TAS) Aktivitesi Tayini

Erel'in metoduna göre çalışıldı (130). TAS düzeyi, REL ASSAY marka ticari kit kullanılarak ölçüldü. Ölçüm yöntemi örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalini antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına

dayanır (131). Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar, mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edildi.

Reaktifler:

Ayraç 1(Assay Buffer) 1× 50 ml

Ayraç 2 (ABTS Radikal solüsyon) 1× 10 ml

Standart 1 (0.0 mmol Trolox E Equiv./L) Solüsyon içermez veya dionize su kullanılır.

Standart 2 (1.0 mmol Trolox E Equiv./L) Solüsyon 1× 5 ml

1. 500 Regant 1' i hücrelere eklenir. Sonra 30 µl standart (veya numune) eklenir. İlk okumayı 660 nm' de yapılır.

2. 75 µl Regant 2'yi hücrelere eklenir ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilir veya 37°C' de 5 dk bekletilir. 660 nm' de okutulur.

Sonuçların hesaplanması:

$$\text{Sonuç} = [(\Delta\text{Abs Std1}) - \Delta\text{Abs Numune}] / [(\Delta\text{Abs Std1}) - (\Delta\text{Abs Std2})]$$

Δ Absorbans Standart 1: (Std 1' in ikinci absorbansı - Std 1' in birinci absorbansı)

Δ Absorbans Standart 2: (Std 2' nin ikinci absorbansı - Std 2' nin birinci absorbansı)

Δ Numune Absorbans = (Numunenin ikinci absorbansı - Numunenin birinci absorbansı)

3.5.3.4. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Total Oksidan Seviye (TOS) / Total Antioksidan Seviye (TAS) bölünerek Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) hesaplandı (132). OSİ birimi, AU (Arbitrary Unit) olarak ifade edildi.

Oksidatif stres indeksini (OSİ) hesaplamak için:

$$\text{OSİ} = \text{TOS} / (\text{TAS} \times 100) \text{ formülü kullanıldı.}$$

3.5.3.5. 5'-Nükleotidaz (5'NT) Tayini

5'NT öncelikle karaciğerde kanalikulus ve sinüzoidal mambranda yerleşmiş olup, barsak, kalp, beyin, pankreas, kan damarları, böbrek interstisyumunda, eritrositlerde, fibroblastlarda ve lökositlerde bulunan hepatobiliyer, hematolojik, immünolojik ve neoplastik hastalıkların teşhisinde önemli olan bir enzimdir. Bu

enzim, Eski adı “5’ ribonucleotide phosphohydrolase” şimdiki adı “5’ nükleotidaz”dır (5’NT). 5’NT hakkındaki ilk geniş çaptaki araştırmalar 1970’li yıllarda olmuştur. İlk araştırmalarda enzimin özellikleri, dağılımı, fonksiyonları analitik biyokimyasal yapısı araştırıldı. Sonraki araştırmalarda ise vücut sıvıları, hücre ve dokularda 5’NT aktivitesinin ölçümünün klinik tablosu araştırıldı. 5’NT, en çok hücre zarında yer alır. Bununla beraber daha az olarak da mitokondri ve mikrozoamlarda bulunur. 5’NT’nin 68.000 ve 70.000 dalton ağırlığında iki subüniti vardır. 6,5–8,4 pH’da optimal etki gösterir (133).



5’ NT, Pürin salvage yolu ve pürin yıkım yolu enzimi olarak kabul edilir. Riboz ve deoksiriboz şeker halkalarından 5’-Monofosfatların defosforilizasyonunu katalizleyen fosfatazdır. Pürin yıkım yolunda hız kısıtlayıcı basamaktır (134). 5’nükleotidaz florür, borat, arsenat, çinko, kobalt, bakır ve nikel gibi maddeler tarafından inhibe edilir (135) .

5’- Nükleotidaz aktivitesi hazır ticari Rat 5-Nucleotidase (5-NT) ELİSA Kit (Eastbiopharm) kullanılarak, Biotek ELx800 cihazında çalışıldı. Bu kit çift antikor sandviç enzim işaretli sistemle (ELİSA) çalışır. Rat 5-NT monoklonal antikorlarla kaplanmış kuyucuklara numune eklenir. İnkübasyondan sonra biotinle işaretlenmiş ve streptavidin-HPR ile birleştirilmiş 5-NT antikorlarına eklenir. Bağlanmayan enzimleri temizlemek için inkübasyon ve yıkama işlemleri tekrar edilir. Sonra Kromojen solüsyon A ve B eklenir. Sıvı mavi renge dönüştüğünde, stop solüsyonu eklenir. Stop solüsyonundaki asit sayesinde mavi renk sarıya dönüşecektir. Rengin koyuluğu ile Rat 5-NT seviyeleri doğru orantılıdır. Absorbans 450 nm’de ölçülür (136). Enzimin birimi ng/ml olarak ifade edildi.

3.6.1. Protein miktar tayini:

Dokuların protein içeriği, Lowry metoduna göre ölçüldü (137).

Reaktiflerin Hazırlanması

A reaktifi: 0.5g CuSO₄.5H₂O, 1g Na₃-Sitat (sodyum sitrat) bir miktar deiyonize suda çözüldükten sonra 100 ml’ye tamamlandı.

B reaktifi: 10 g Na₂CO₃ ve 2 g NaOH bir miktar deiyonize suda çözüldükten sonra 500 ml' ye tamamlanır.

C reaktifi: 50 ml B çözeltisine 1 ml A çözeltisi eklendi.

D reaktifi: 10 ml Folin-Ciocalto reaktifine 10 ml distile su ilave edildi.

BSA çözeltisi: Standart protein çözeltisi olarak kullanılan BSA 1 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltilerden 10,20,30,40,50, .. µg/ml' lik çözeltiler hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

Test ve standart tüplerine 490 µl, kör tüpüne 500 µl distile su kondu. 2.5 ml C reaktifi tüm tüplere ilave edildikten sonra, test tüplerine 10 µl numune; standart tüplerine de 10 µl her bir standarttan ilave edildi. İyiçe vortekslendikten sonra karanlıkta 25° C' de 30 dk bekletildikten sonra, karıştırarak tüm tüplere 250 µl D reaktifi eklendi. Spektrofotometrede 650 nm' de okuma yapıldı.

Protein Miktar Hesaplaması

Standart BSA çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak bulunan değer, standart hacmi / numune hacmi faktör olarak alındı ve bu faktör ile çarpıldı.

3.7. Karaciğer Dokusunun Histopatolojik Analizleri

Karaciğer dokuları %10'luk formaldehit içerisinde Turgut Özal Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı tarafından analiz edildi. Makroskop örneklemeinden ardından alınan örnekler Rutin doku takip işlemine tabi tutuldu. Ardından parafine gömülüp Rotary mikrotomunda 4 mikronluk kesitler alınarak rutin hematoxilen eozin boyası ile boyandıktan sonra ışık mikroskopunda incelendi.

4. BULGULAR.

Yapılan bu deneysel çalışmada 7,12-DMBA etkisine maruz bırakılan Wistar albino cinsi dişi ratların serum ve karaciğer dokularında ALT, AST, GGT, 5'Nükleotidaz, TAS, TOS düzeyleri üzerine resveratrol ve pekmezin etkisi araştırıldı.

Verilerin özetlenmesi için tanımlayıcı ölçü olarak ortanca minimum ve maksimum değerler kullanılmıştır. Grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis varyans analizi sonrasında ikili karşılaştırma yöntemi olarak Conover metodu kullanılmıştır. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi 0,005 olarak kabul edilmiştir.

4.1. Serum Değerleri

Kontrol ve deney gruplarında ALT, AST ve GGT değerleri Tablo 4.1.'de verilmiştir. Sonuçlar Ortalama \pm Ortalama standart sapma olarak verilmiştir.

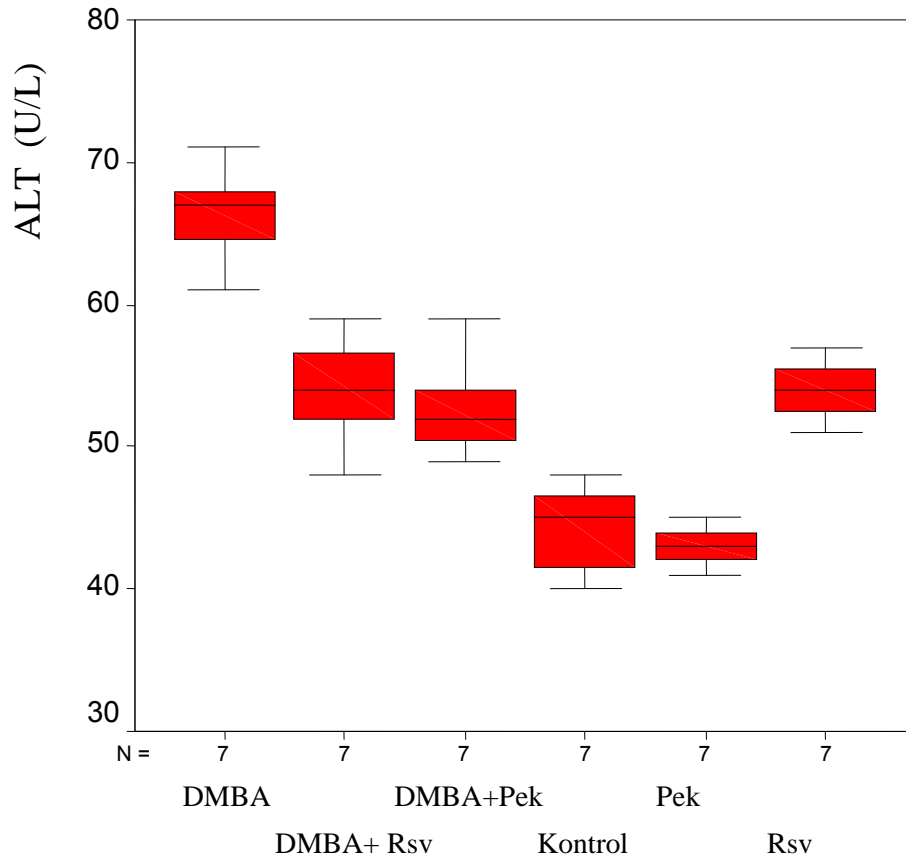
Tablo 4.1: Kontrol ve deney gruplarının ALT, AST ve GGT değerleri

GRUPLAR	ALT (U/L)	AST (U/L)	GGT (U/L)
Kontrol	44.14 \pm 3.13 ^{bd}	52.71 \pm 3.73 ^{bd}	4.53 \pm 0.54 ^{bcd}
Resveratrol(Rsv)	53.43 \pm 3.41 ^{acd}	59.43 \pm 3.87 ^{ad}	7.16 \pm 2.20 ^{acd}
Pekmez(Pek)	43 \pm 1.53 ^{bd}	56.43 \pm 13.31 ^d	4.33 \pm 0.46 ^b
DMBA	66.29 \pm 3.30 ^{abc}	112.57 \pm 5.09 ^{abc}	41.43 \pm 4.12 ^{ab}
DMBA+Resveratrol(Rsv)	54 \pm 30.74 ^{acd}	80.57 \pm 8.40 ^{abcd}	25.86 \pm 4.10 ^{abcd}
DMBA+Pekmez(Pek)	52.71 \pm 3.40 ^{acd}	77.29 \pm 5.99 ^{abcd}	25 \pm 1.15 ^{abcd}

^ap<0,05 kontrole göre, ^bp<0,05 resveratrole göre, ^cp<0,05 pekmeze göre, ^dp<0,05 DMBA' ya göre kıyaslamalar

4.1.1. Serum ALT Düzeyleri

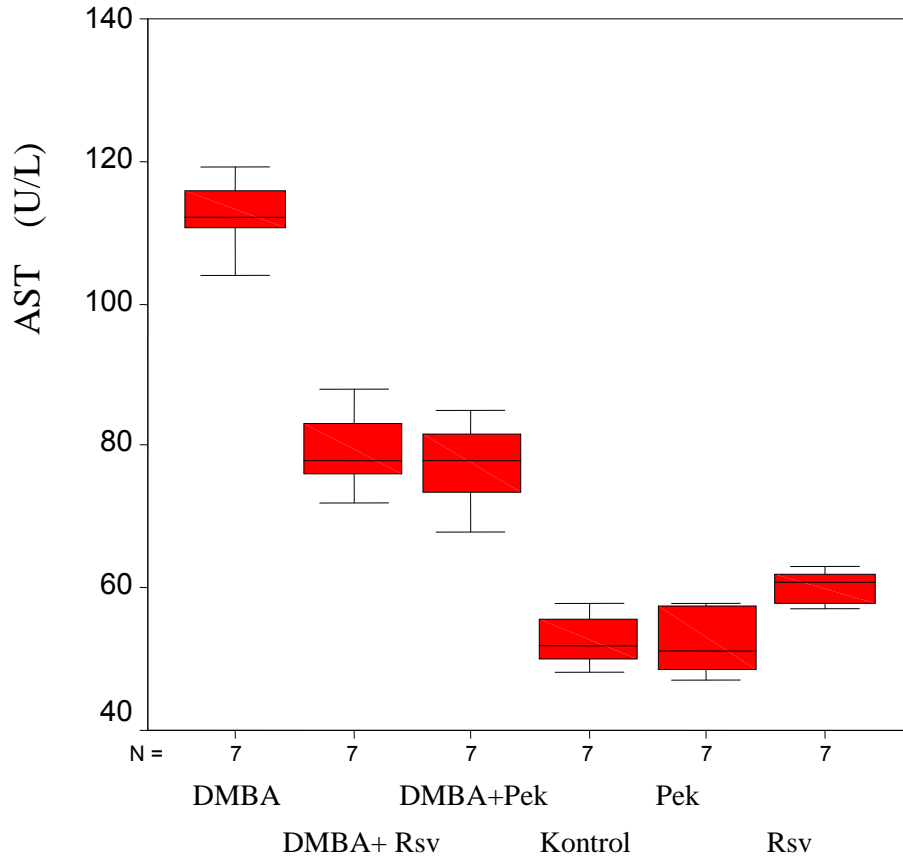
ALT bakımından kontrol grubuna göre DMBA, DMBA+Rsv, DMBA+Pek ve Rsv grupları arasında artış gözlemlenirken (Tablo 4.1.), Pek grubu ile farklılık olmadığı görüldü (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Serum ALT düzeylerinin karşılaştırılması

4.1.2. Serum AST Düzeyleri

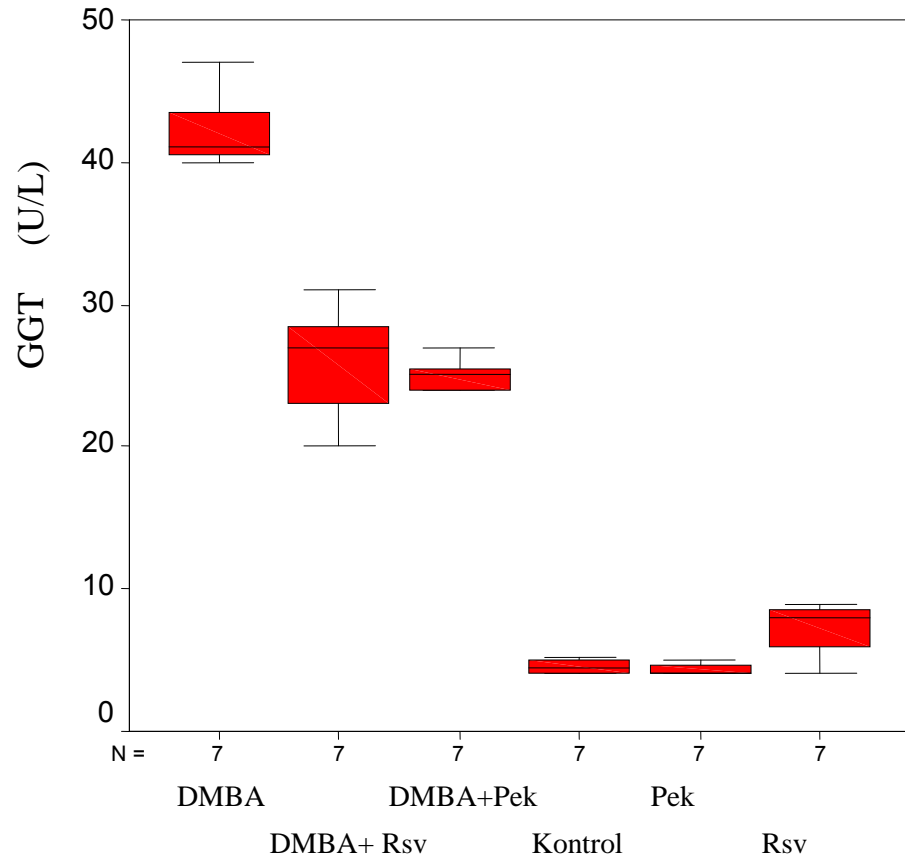
AST bakımından kontrol grubuna göre DMBA, DMBA+Rsv, DMBA+Pek ve Rsv grupları arasında artış olduğu görüldü (Tablo 4.1.). Pek grubu ile farklılık olmadığı görüldü (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Serum AST düzeylerinin karşılaştırılması

4.1.3. Serum GGT Düzeyleri

GGT düzeyleri bakımından kontrol grubuna göre DMBA, DMBA+Rsv, DMBA+Pek ve Rsv grupları arasında artış olduğu görüldü (Tablo 4.1.). Pek grubu ile farklılık olmadığı görüldü (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Serum GGT düzeylerinin karşılaştırılması

4.2. Karaciğer Dokusu Değerleri

Kontrol ve deney gruplarında 5' Nükleotidaz, TAS, TOS ve OSİ değerleri Tablo 4.2.'de verilmiştir. Sonuçlar Ortalama \pm Ortalama standart sapma olarak verilmiştir.

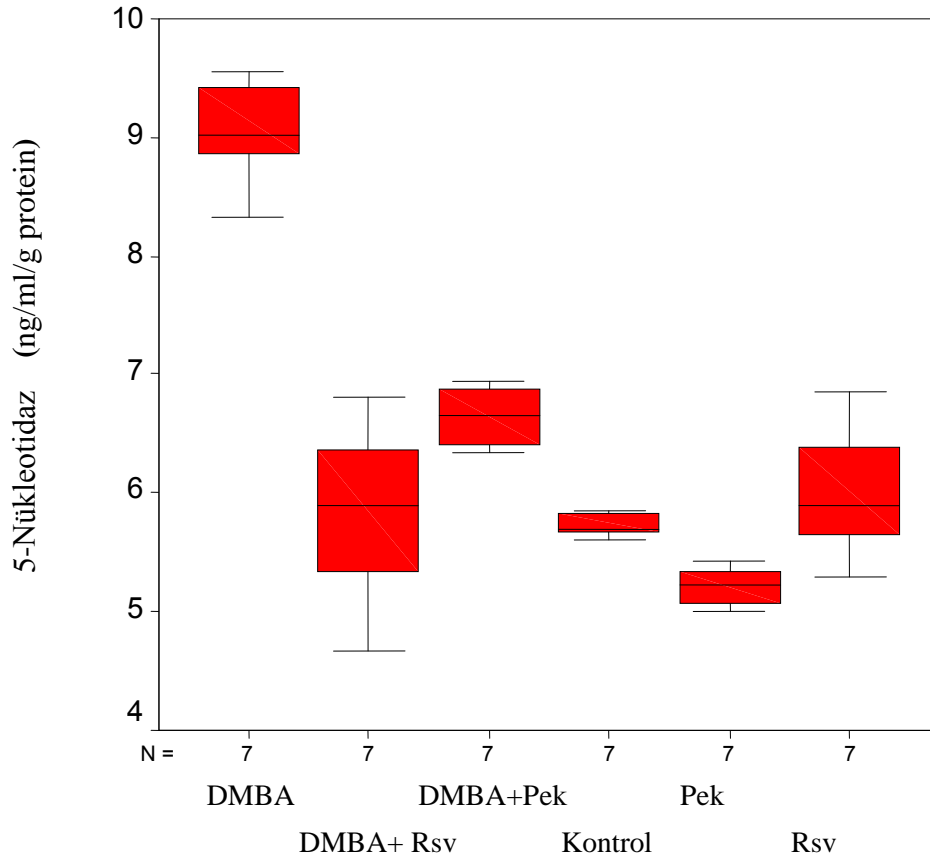
Tablo 4.2. Kontrol ve deney gruplarının 5' Nükleotidaz, TAS, TOS ve OSİ değerleri

GRUPLAR	5' Nükleotidaz (ng/ml/g protein)	TAS (mmol Trolox Equiv./g protein)	TOS (mmol H ₂ O ₂ Equiv./g protein)	OSİ (Arbitrary Unit)
Kontrol	5.74 \pm 0.1 ^{cd}	0.96 \pm 0.01 ^{bcd}	13.56 \pm 0.85 ^d	14.12 \pm 0.81 ^{cd}
Rsv	6.02 \pm 0.56 ^{cd}	0.97 \pm 0.03 ^a	12.65 \pm 0.63 ^d	13.06 \pm 0.50 ^d
Pek	5.2 \pm 0.36 ^{abd}	1 \pm 0.10 ^a	12.53 \pm 1.47 ^d	12.52 \pm 1.40 ^{ad}
DMBA	9.06 \pm 0.44 ^{abc}	0.82 \pm 0.08 ^a	18.32 \pm 1.20 ^{abc}	22.65 \pm 3.28 ^{abc}
DMBA+Rsv	5.82 \pm 0.78 ^{cd}	1.32 \pm 0.13 ^{abcd}	12.96 \pm 1.76 ^d	9.93 \pm 1.74 ^{abcd}
DMBA+Pek	6.64 \pm 0.26 ^{abcd}	1.14 \pm 0.19 ^{bd}	13.03 \pm 1.28 ^d	11.97 \pm 3.76 ^{abd}

^ap<0,05 kontrole göre, ^bp<0,05 resveratrole göre, ^cp<0,05 pekmeze göre, ^dp<0,05 DMBA'ya göre kıyaslamalar

4.2.1. Karaciğer Dokusu 5'-Nükleotidaz Düzeyleri

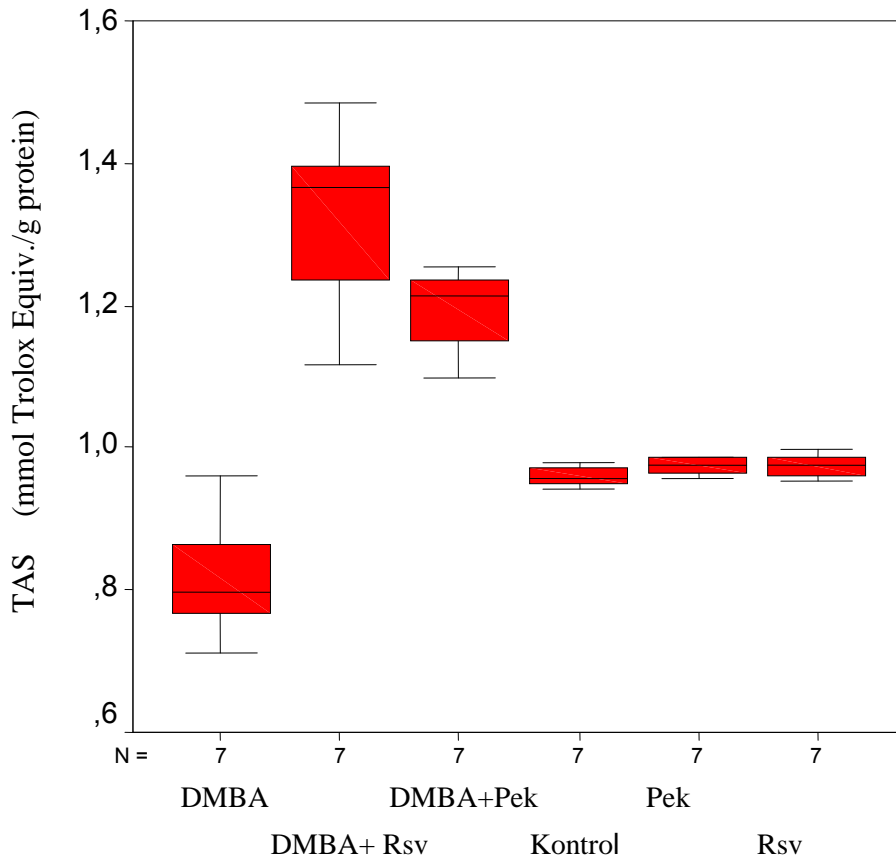
5' Nükleotidaz bakımından kontrol grubuna göre DMBA, DMBA+Pek ve RSV grupları arasında farklılık olduğu görüldü (Tablo 4.2.). Diğer gruplar ile farklılık olmadığı görüldü (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Karaciğer dokusu 5'-Nükleotidaz düzeylerinin karşılaştırılması

4.2.2. Karaciğer Dokusu TAS Düzeyleri

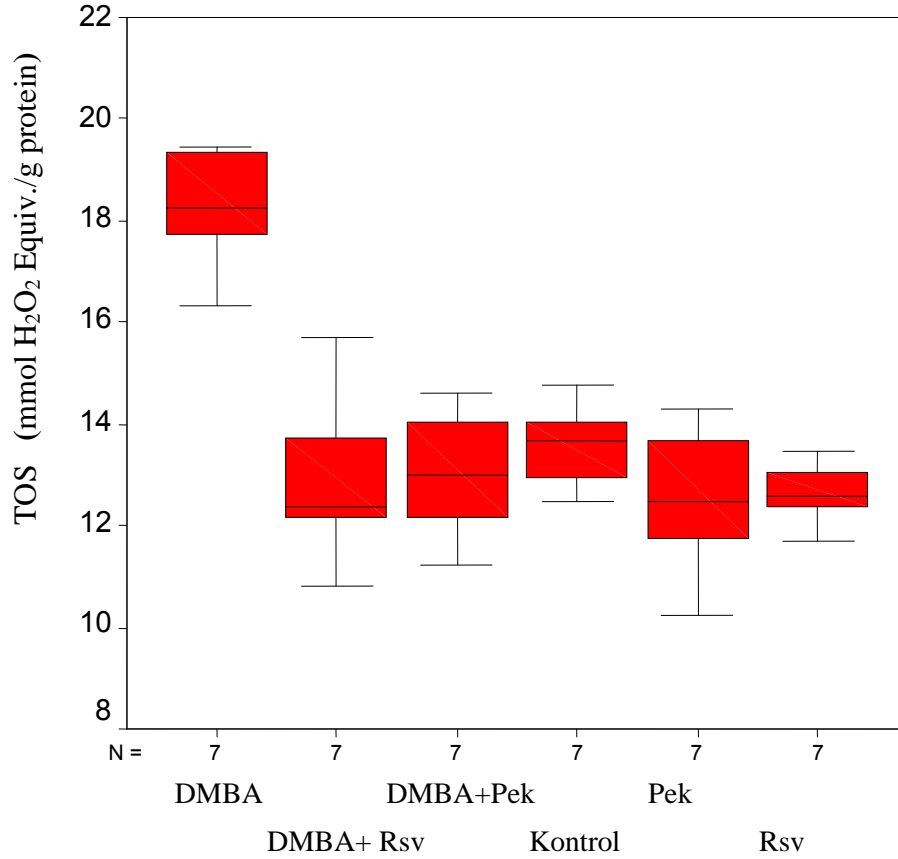
TAS bakımından kontrol grubuna göre DMBA grubunda azalış görülürken, DMBA+Rsv, DMBA+Pek gruplarında artış olduğu görüldü (Tablo 4.2.). Diğer gruplar ile farklılık olmadığı görüldü (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Karaciğer dokusu TAS düzeylerinin karşılaştırılması

4.2.3. Karaciğer Dokusu TOS Düzeyleri

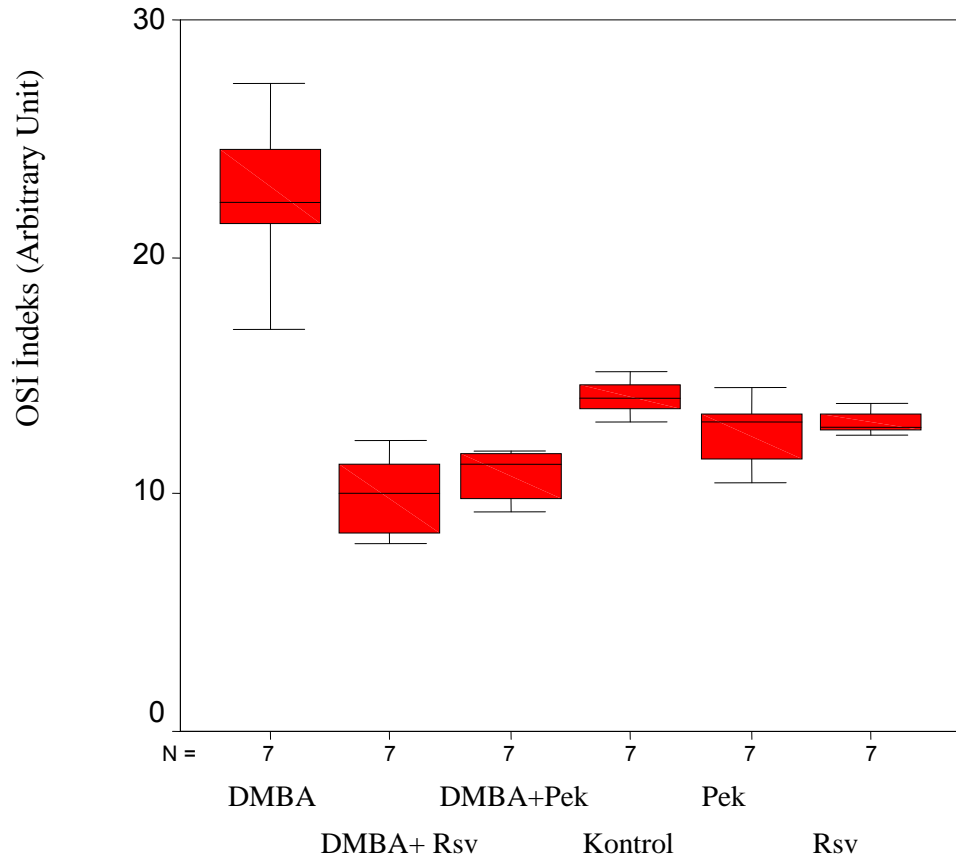
TOS bakımından kontrol grubuna göre DMBA grubu arasında artış olduğu görüldü (Tablo 4.2.). Diğer gruplar ile farklılık olmadığı görüldü (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Karaciğer dokusu TOS düzeylerinin karşılaştırılması

4.2.4. Karaciğer Dokusu OSİ Değerleri

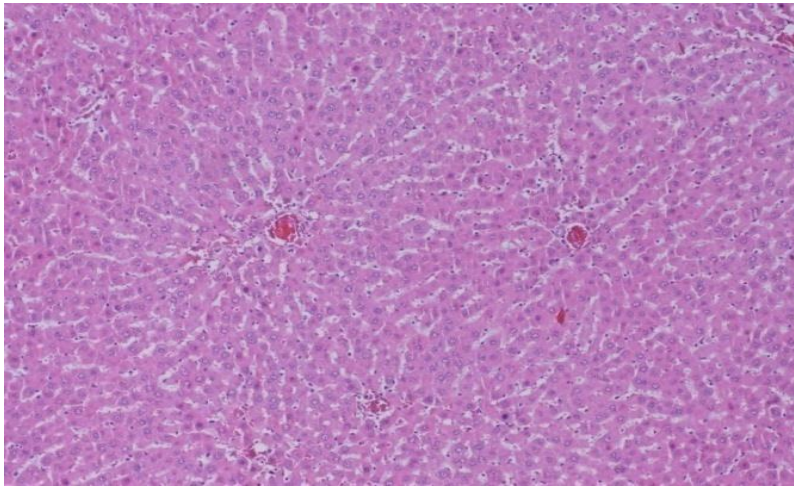
OSİ değerleri bakımından kontrol grubuna göre DMBA, DMBA+Pek, DMBA+Rsv ve Pek grubu arasında farklılık olduğu görüldü (Tablo 4.2.). Diğer gruplar ile farklılık olmadığı görüldü (Şekil 4.7.).



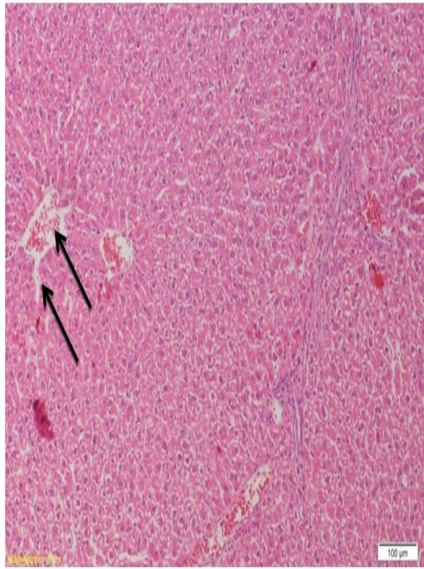
Şekil 4.7. Karaciğer dokusu OSİ düzeylerinin karşılaştırılması

4.3. Karaciğer Dokusunun Histopatolojik Bulguları

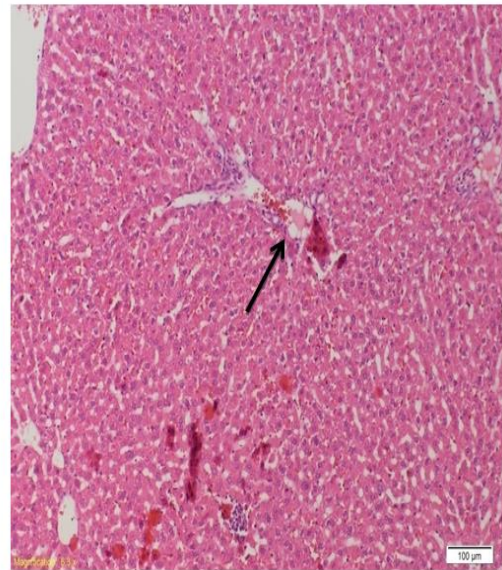
Karaciğer dokuları %10'luk formaldehit içerisinde Turgut Özal Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarına gönderildi. Makroskobik örneklemenin ardından alınan örnekler rutin doku takip işlemine tabi tutuldu. Ardından parafine gömülüp Rotary mikrotomunda 4 mikronluk kesitler alınarak rutin hematoksil-eozin boyası ile boyandıktan sonra ışık mikroskopunda incelendi. Elde edilen sonuçlara göre DMBA verilen gruplarda kontrol grubuna göre santral venede dilatasyon, konjesyon ve lenfoid topluluklar gözlemlenmiştir (Resim 4.1-5.).



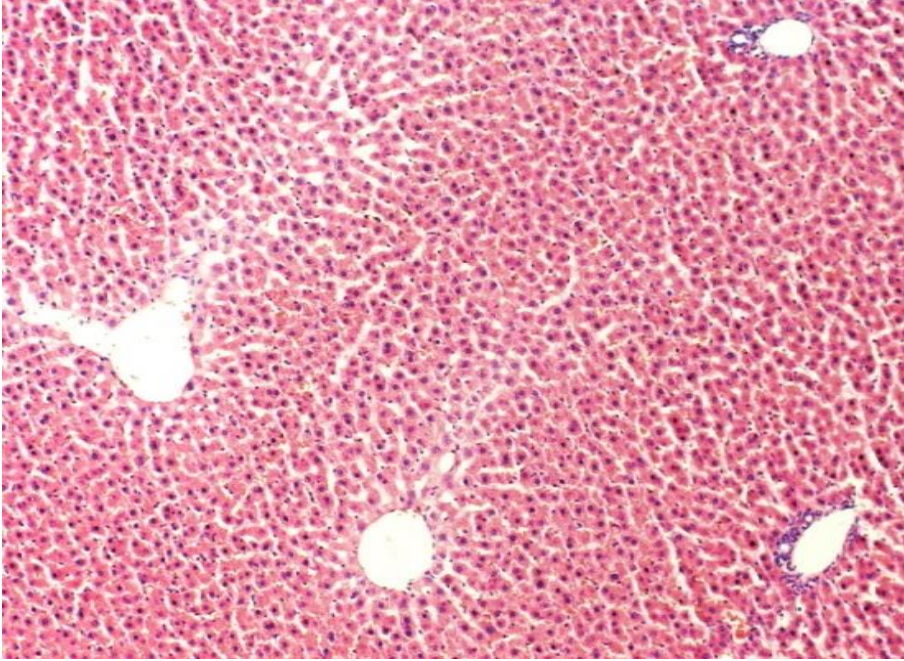
Resim 4.1: Kontrol Karaciğer Dokusu H&EX100



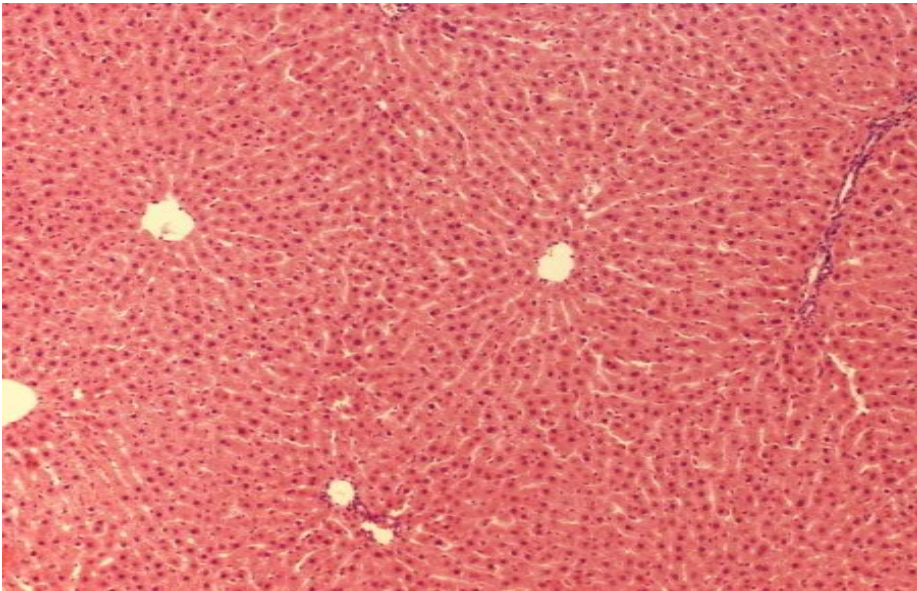
Resim 4.2: DMBA Grubunda santral venlerde yaygın konjesyon ve sinüzoidal dilatasyon H&Ex100



Resim 4.3: DMBA Grubunda Santral vende konjesyon yanısıra parenkimde lenfoid topluluklar H&Ex100



Resim 4.4: DMBA+Rsv Grubunda minimal konjesyon H&Ex100



Resim 4.5: DMBA+Pek Grubunda minimal konjesyon ve sinüzoidal dilatasyon H&Ex100

TARTIŞMA

DMBA, oksidatif stresi indükleyerek tümör oluşumuna yol açabilir (138). Resveratrol içerdiği hidroksil fenolik gruptan dolayı antioksidan kapasiteye sahiptir. Resveratrol, serbest radikal (hidroksil radikali, süperoksit anyonu radikali) yakalayarak ve antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak antioksidan etkisini iki farklı yolla gösterir. Pekmez, resveratrol ve antioksidan içeren yöresel olarak üretilen doğal bir gıdamızdır. Polifenollerin serbest radikal yakalayıcı aktivite için ideal bir kimyasal yapıya sahip olduğu belirtilmiştir (139).

Çalışmamızda resveratrol ve pekmezin antioksidan etkilerini incelemek ve birbiriyle karşılaştırmak amacıyla, DMBA ile karaciğerde oluşan hasarı önleyici etkisi olup olmadığını araştırdık. DMBA verdiğimiz gruplarda karaciğerdeki doku harabiyetini izlemek; antioksidan özelliği kabul görmüş resveratrol ve antioksidan özelliğini araştırdığımız pekmezin bu hasara etkilerini incelemek amacıyla serum da ALT, AST, GGT seviyelerini, karaciğer doku homojenatlarında ise 5'- Nükleotidaz, TAS, TOS seviyelerini analiz ettik.

Ghanim ve ark. insanlarda yaptıkları çalışmalarda resveratrolün antioksidan etkisi araştırılmıştır. Sağlıklı gönüllülere 6 hafta boyunca 40 mg/gün resveratrol verildiğinde, mononükleer hücrelerin ROS üretiminde kontrol grubuna göre belirgin bir azalma saptanmıştır (140). Ignatowicz ve arkadaşlarının (141) yaptıkları çalışmalara göre bitkilerin yapılarında bulunan fenolik bileşikler (tannik asit, klorojenik asit, resveratrol), DMBA'nın yol açtığı toksik etkileri ortadan kaldırmaktadır.

Normal şartlarda antioksidan sistemler ile serbest radikaller arasında bir denge söz konusudur. Bu denge sayesinde serbest radikaller zararsız hale getirilmektedirler. Dengenin oksidanlar tarafına doğru kayması, oksidatif strese ve hasarlayıcı olayların başlamasına neden olur (142). Oksidatif stres, vücuttaki antioksidan savunmanın reaktif oksijen türlerine karşı yetersiz kalması sonucu oluşan bir süreçtir. Antioksidan moleküller, bu oksidatif strese neden olan serbest radikalleri etkisiz hale dönüştürmelerinden dolayı önemli moleküllerdir (143). Total oksidan kapasiteye en büyük etkiyi endojen olarak vücutta sentezlenen serbest oksijen moleküllerinin yan

ürünleri sağlar. Vücuttaki oksidatif stresi ve antioksidan kapasiteyi belirlemek için oksidan ve antioksidan moleküllerin ayrı ölçümü yerine total olarak ölçümünü sağlayan yöntemler vardır. Total oksidan status (TOS) düzeyinin, total antioksidan status (TAS) düzeyine oranlanmasıyla oksidatif stres indeksi (OSİ) hesaplanmaktadır. OSİ vücudun oksidan antioksidan dengesinin yönünü belirtmede kullanılır (144).

Çalışmamızda ALT, AST, GGT, TOS ve 5'-Nükleotidaz verilerinde DMBA grubu kontrol grubuna göre yüksek çıkmıştır. DMBA+ Rsv grubunda ise DMBA' lı gruba göre düşüş gözlemlenmiştir. Bu da bize resveratrolün DMBA' nın yol açtığı toksik etkileri önlemeye çalıştığını göstermiştir. DMBA+Pek grubunda da DMBA' lı gruba göre düşüş görülmüştür. Pekmezinde resveratrol gibi DMBA' nın yol açtığı toksik etkileri azalttığı görülmüştür.

Yuluğ ve arkadaşlarının yaptıkları sıçan testis iskemi reperfüzyon hasarı üzerine resveratrolün (20 mg/kg, Detorsiyondan 30 dk önce) kısa süreli etkileri çalışmasında Torsiyon/detorsiyon (T/D) ve T/D+Resveratrol (RSV) olarak ayrılmıştır. Sonuç olarak resveratrol, özellikle antiapoptotik ve histopatolojik düzeyde, bir testiküler T/D modeli ile uyarılan çalışmada oksidatif hasara karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (145).

Şehirli ve arkadaşlarının (146) yaptıkları ve resveratrolün karaciğer toksisitesi üzerinde etkilerini araştırdıkları çalışmada hem erkek hem de dişi farelere resveratrol verilen grupta TAS seviyesi artmıştır. Sonuç olarak, resveratrol, oksidan-antioksidan dengesi ve inflamatuvar mediatörlerin üretimini düzenleyerek, karaciğer detoksitesinde oksidatif organ yaralanmasını iyileştirmiştir.

DMBA ile oluşturduğumuz karaciğer hasarında DMBA verilen grupta TAS seviyelerinin kontrol grubuna göre düşük olduğunu gözlemledik. Bu düşüşün sebebi; DMBA'nın karaciğer dokusunda serbest radikal miktarını artırması veya antioksidan savunma kapasitesini azaltması olabilir. Karaciğer hasarının iyileşme derecesini gösteren parametre olarak kullandığımız TAS seviyelerinin, resveratrol ve pekmez verilen gruplarda DMBA verilen gruba göre anlamlı ölçüde artmış olduğunu

gözlemledik. Ancak bu artışı pekmez verilen grupta resveratrol verilen gruba göre daha yüksek bulduk.

Çalışmamızda DMBA ile oluşturulan karaciğer hasarında; resveratrol ve pekmez verilen gruplarda TOS seviyesinin, DMBA verilen gruba göre azaldığını gözlemledik. DMBA ile birlikte verilen resveratrol ve pekmez grupları arasında TOS seviyeleri bakımından anlamlı fark bulunamadı. Ancak resveratrolün saf halde, subkutan yolla verilmesi göz önüne alındığında, oral yolla verilen pekmezin aynı etkiyi göstermesi dikkat çekici bir veridir.

Oksidatif stresin yönünü belirlemede kullanılan OSİ indeksi verileri göz önüne alındığında, karaciğer harabiyetinde resveratrol ve pekmez verilen gruplarda oksidatif stres yönünün antioksidanlar yönüne kaydığını gözlemledik. OSİ sonuçlarını değerlendirdiğimizde pekmezin de resveratrol gibi antioksidan özelliğe sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Karaciğer hastalıklarının tanısında en fazla ALT, AST ve GGT seviyeleri değerlendirilmektedir. AST hem mitokondri hem de sitoplazmada bulunurken, ALT sadece sitoplazmada bulunmaktadır. Hafif bir hücrel harabiyette ALT seviyeleri AST seviyelerinden daha fazla yükselmektedir. Ağır hücrel harabiyet ve nekrozun bulunduğu durumlarda ise AST artışı daha fazla olmaktadır. Osama ve ark. yaptıkları çalışmada DMBA uygulanan sıçanlar üzerinde kurkumin ve/veya naringin koruyucu etkilerini değerlendirmişlerdir. DMBA tek doz olarak 25 mg/kg olarak verilmiştir. DMBA uygulanan gruplarda ALT, AST ve GGT miktarları artmış olarak bulunmuşlardır (147). Yapılan bir çalışma da hemstırların yanaklarında skuamöz hücreli karsinom oluşturmak için DMBA uygulanmıştır. Tümör oluşturulan hayvanların ağız mukozasında, DMBA verilen grupta GGT seviyeleri kontrole göre yüksek bulunmuştur (148).

Sharma ve ark. DMBA ile gerçekleştirilen karaciğer hasarında Moringao leifera bitkisinin etkilerini araştırmışlardır. DMBA verilen grupta, kontrole göre ALT, AST ve ALP seviyelerinin düştüğü gözlemlenmiştir (149). Bizim çalışmamızın aksine, bu çalışmada DMBA verilen grupta ALT ve AST seviyeleri azalmıştır.

Çalışmamızda DMBA verilen grupta ALT, AST ve GGT seviyeleri kontrol grubuna göre artış gösterdi. Bu durum DMBA kaynaklı karaciğer hasarının göstergelerinden biridir. Ayrıca histopatolojik karaciğer incelemelerinde konjesyon, dilatasyon ve lenfoid hücrelerin görülmesi DMBA'nın deneysel karaciğer hasarı oluşturduğunu desteklemektedir.

Serum ALT, AST ve GGT seviyelerinde DMBA verilen gruba göre DMBA ile birlikte verilen resveratrol ve pekmez gruplarındaa anlamlı düşüş belirledik. Ancak bu düşüş pekmez grubunda resveratrol grubuna göre daha belirgindi. Ancak literatürde pekmez ve resveratrolün etkilerinin karşılaştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

5'-NT bağırsaklar, kalp, beyin, endokrin, kan damarları, pankreas ve karaciğer gibi birçok organda bulunmaktadır. Ancak hepatobiliyer hastalıklarda serum seviyelerinde belirgin bir yükselme olmaktadır. Karaciğerde öncelikle kanaliküler ve sinüsoidal plazma membranlarında bulunmaktadır. Ayrıca 5'-NT karaciğerin metastatik tümörlerinin gelişimini izlemek için de kullanılabilir (150). Karabulut ve ark' nın, sıçanlarda DMBA ile oluşturulan karaciğer hasarında % 20 kayısı içeren takviyeli yem ve radyoterapi uygulamasının etkisini araştırdığı çalışmasında, DMBA uygulanan gruplarda 5'NT seviyesinde artış olduğunu rapor etmişlerdir (151). Pattanayak ve Mazumder yaptıkları çalışmada DMBA uygulanan otuz dişi farede meme karsinomunuyla beraber karaciğer hasarı oluşturmuşlardır. Meme kanseri taşıyan hayvanların karaciğerlerinde, kontrol grubuna göre DMBA verilen grupta 5'-NT seviyelerinde artış olduğu görülmüştür (152). Bu sonuçlarla benzer şekilde çalışmamızda, DMBA grubunda 5'-NT seviyesi artarken, DMBA'nın resveratrol ve pekmez ile birlikte verilmesi bu artışı baskılamıştır. Bu sonuçtan yola çıkarak resveratrol ve pekmezin karaciğer hücre harabiyeti üzerinde iyileştirici etkisi olduğunu söyleyebiliriz.

Bütün sonuçlar göz önüne alındığında, yöresel gıdamız olan pekmezin, antioksidan özelliği bilinen ve hakkında pek çok araştırma bulunan resveratrole alternatif olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çevre sorunu; dünyanın pek çok yerinde özellikle son yıllarda gündelik yaşama giren ve acil çözüm bekleyen bir olgudur. Çevrede ve endüstriyel alanlarda bulunan çok sayıda bileşik insanlarda doku hasarı veya toksik etkiler meydana getirmektedir. İnsan vücudu bu toksik etkileri çeşitli enzim sistemleri aracılığıyla detoksifiye ederek önlemeye çalışmaktadır. Ancak bu tip kimyasallara maruziyetin süresinin artması durumunda doku hasarı ve sonrasında kanserojenik sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, yeşil sebze ve taze meyvelerin içerdikleri bileşiklerin oluşabilecek toksik etkilere karşı organizmayı koruduğunu göstermektedir.

Bazı meyvelerde bol miktarda bulunan resveratrolün ve pekmezin karaciğer hasarını engelleme mekanizmalarının anlaşılması, pek çok hastalığın önlenmesinde etkin rol oynayacaktır. Son zamanlarda insanlarda kanserin veya kanser tedavilerinin neden olduğu doku hasarını önlemek ya da geriletme amacıyla alternatif bitkisel ya da yöresel gıdalara başvurulmaktadır. Bu açıdan hayvan deneylerinde yeşil çay, kateşin, likopen, soya isoflavone, nar fenolik, selenyum, vitamin E ve D, salatalık, sitilbinin ve resveratrol gibi birçok gıda ürününün anti-oksidan özelliği üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Çalışma verilerimiz sonucunda yukarıda bir kısmı sayılan gıdalara ek olarak pekmezin de önemli bir antioksidan olduğunu göstermiştir. Bu durum, pekmezin içerdiği resveratrol'den kaynaklandığını söyleyebiliriz. Artırılan grup sayıları ve doz etkileri açısından klinik çalışmalarla desteklenerek ileri çalışmalar yapılmasını önerebiliriz.

Bunlara ek olarak doğal bir antioksidan olan resveratrolün tek başına uygulandığında pekmezden daha az etkili olduğu görülmüştür. Ancak farklı yollarla verilen resveratrol ve pekmezin etkilerinin kıyaslanmasının doğru sonuçları elde etmekte bir engel teşkil ettiği söylenebilir. Bu nedenle bundan sonra yapılacak çalışmalarda pekmez ve resveratrolün eşit miktarda ve aynı yolla verilmesini öneriyoruz.

Bu bulgular ışığında; karaciğer hasar gelişim sürecinde, özellikle resveratrol içerikli besinlerin yanı sıra pekmezin zengin resveratrol içerdiği oksidatif stresi ve

karaciğer hasarını azaltıcı etkisi olduğu görüldü. Ancak pekmezin etkisinin moleküler düzeyde araştırıldığı yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Hsue, SS., Chen, YK., Lin, LM. (2008). Expression of Survivin and XIAP for DMBA-Induced Hamster Buccal Poch Squamous Cell Carcinogenesis is Associated with p53 Accumulation. *Oral Oncology*, 44,43-49.
2. Ladics, GS., Kawabata, TT., White, KL. (1991). Suppression of the in Vitro Humoral Immune Response of Mouse Splenocytes by 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene Metabolites and Inhibition of Immunosuppression by Alpha-Naphthoflavone. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 110,31-44.
3. Lichius, JJ., Muth, C. (1997). The Inhibiting Effect of Urtica dioica Root Extracts on Experimentally Induced Prostatic Hyperplasia in the Mouse. *Planta Med*, 63, 307-310.
4. Davila, DR., Mounho, BJ., Burchiel, SW. (1997). Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to the Human Immuno System. *Models and Mechanism*, 4,5-9.
5. Vardı, N., Ozturk, F., Ozturk, C., Batcioglu, K. (2001). 7,12 Dimetil Benzantresin Fare İleum Mukozasında Neden Olduğu Histolojik Değişiklikler ve Bu Değişiklikler Üzerine E vitamini+Selenyum ve Melatoninin Etkileri. *Journal of Inonu University Medical Faculty*, 8, 3.
6. Erer, H., Kıran, M.M. (2000). Tumorlerin Meydana Geliş Sebepleri. *Veteriner Onkoloji*. Konya: Damla Yayıncılık.
7. Li, Y., Cao, Z., Zhu, H. (2006). Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cell leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacol Res*, 53,6-9.
8. De La Lastra, CA., Villages, I. (2007). Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem soc trans*, 35,1156-1160.

9. Russo, P., Tedesco, I., Russo, M., Russo, GL., Venezia, A., Cicala, C. (2001). Effects of de-alcoholated red wine and its phenolic fractions on platelet aggregation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 11, 25-34.
10. Tsai, SK. (2001). Resveratrol reduction of infarct size in Long-Evans rats subjected to focal cerebral ischemia. *Life Sci*, 69, 1057-1065.
11. Batu, A. (2011). Üzüm, Pekmez ve İnsan Sağlığı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 6 (2), 25-35.
12. Çoklar, H., Akbulut, M. (2012). Adsorban ve İyon Değiştirici Reçine Uygulamasının Üzüm Pekmezlerinin Mineral Madde İçeriğine Etkisi. *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 26 (2), 1-5
13. Karakaya, A., (2003). Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlara Maruz Kalan Bir Grup İşçide Hücrel İmmün Fonksiyonların İncelenmesi, *Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma*, Ankara.
14. Bayram, A., Muezzinoglu, A. (1996). Environmental aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) originating mainly from coal-fired combustion systems and their monitoring requirements. In: M. Richardson (ed.), *Environmental Xenobiotics*, 333-354. London, UK: Taylor & Francis,
15. Qu, S., Stacey, NH. (1996). Formation and persistence of DNA adducts in different target tissues of rats after multiple administration of benzo(a)pyrene. *Carcinogenesis*, 17, 53-59.
16. DiGiovanni, J., Juchau, MR. (1980). Biotransformation and bioactivation of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (7,12-DMBA). *Drug Metab Rev*, 11, 61-101.
17. Batcioglu, K., Karagözler, A. A., Ozturk, I.C., Genc, M., Bay, A., Ozturk, F., Aydogdu N. (2005). Comparison of chemopreventive effects of vitamin E plus selenium versus metatonin in 7,12-Dimethyl benz[a]anthracene-induced Mouse brain damage. *Cancer Detect Prev*, 29, 54-58.
18. Cheeseman, KH., Slater, TF. (1993). An Introduction to Free Radical Biochemistry, *Br. Med. Bul*, 49, 479-490.

- 19.** Machlin, L.J., Bendich, A. (1987). Free Radical Tissue Damage: Protective Role of Antioxidant Nutrients. *Fabas J*, 1, 441-445.
- 20.** Keskin, E. (2009). Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlardan Benzo[A]Piren Ve 7,12-Dimetilbenz[a]Antrasen'in Kalem Grafit Elektrot Kullanarak Adsorptif Sıyırma Voltametrisi Yöntemiyle Redoks Özelliklerinin İncelenmesi Ve Miktar Tayini. Doktora tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van.
- 21.** Guillen, MD., Sopelana, P., Partearroyo, MA., (1997). Food as a source of polycyclic aromatic carcinogens. *Rev. Environ. Health*, 12, 133–146.
- 22.** Guillen, MD., Sopelana, P., (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in diverse foods. In Food safety: Contaminants and toxins, ed. J. P. F. D'Mello, 175–197.
- 23.** Murat, N., Demir, Ö., Can E., Gidener S., Esen A. (2005). İnsan Korpus Kavernozum Çalışmalarında Dimetil Sulfoksitin (DMSO) Optimum Konsantrasyonu. *Türk Üroloji Dergisi*, 31 (1), 17-20.
- 24.** Paul B, Masih I, Deopujari J, Charpentier C. (1999). Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasava, *J. Ethnopharmacol*, 68, 71–76.
- 25.** Soleas, GJ., Diamandis, EP., Goldberg, DM., (1997). Wine as a biological fluid: history, production and role in disease prevention. *J. Clin. Lab. Anal*, 11, 287-313.
- 26.** Orallo, F. (2006) Comparative studies on the antioxidant effects of Cis and trans-resveratrol. *Curr. Med. Chem*, 13, 87–98.
- 27.** Siemann, E., Creasy, L. (1992). Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am J Enol Vitic*, 43, 49-52.
- 28.** Pedras, MSC., Ahiahonu, PWK. (2005). Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi. *Phytochem*, 66, 391–411.
- 29.** Renaud SC., Geuguen R., Schenker J., d'Houtaud A. (1998). Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiol*, 9(2), 184-188.
- 30.** Trela, BC., Waterhouse, AL. (1996). Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. *J Agric Food Chem*, 44, 1253–1257.

31. Andlauer, W., Kolb, J., Siebert, K., Fu ¨ rst P. (2000). Assessment of resveratrol bioavailability in the perfused small intestine of the rat. *Drugs Exp Clin Res*, 26, 47–55.
32. Yu, C., Shin, YG., Chow, A., Li, Y., Kosmeder, JW. (2002). Human, rat and mouse metabolism of resveratrol. *Pharm Res*, 19. 1907–1914.
33. Fremont, L. (2000). Biological effects of resveratrol, *Life sci*, 66, 663-673.
34. Celotti, L., Ferrarini, R., Melcangi, RC. (1996). Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes: Recioto and Amonone, *J. Chromatogr*, 730, 47-52.
35. De la Lastra, CA., Villegas, I. (2007). Resveratrol as an antioxidant and prooxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans*, 35(5), 1156-1160.
36. Delmas, D., Lin, HY. (2011). Role of membrane dynamics processes and exogenous molecules in cellular resveratrol uptake: Consequences in bioavailability and activities. *Mol Nutr Food Res*, 55, 1142-1153.
37. Bowers, JL., Tyulmenkov, VV., Jernigan, SC., Klinge, CM. (2000). Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinol*, 141, 3657-3667.
38. Hambrock, A., de Oliveira Franz CB., Hiller, S., Grenz, A. (2007). Resveratrol binds to the sulfonylurea receptor (SUR) and induces apoptosis in a SUR subtype-specific manner. *J Biol Chem*, 282, 3347-3356.
39. Urpí-Sardà M., Jáuregui O., Lamuela-Raventós R.M., Jaeger W. (2005). Uptake of diet resveratrol into the human low-density lipoprotein. Identification and quantification of resveratrol metabolites by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 77, 3149-3155.
40. Lu, Z., Zhang, Y., Liu, H., Yuan, J. (2007). Transport of a cancer chemopreventive polyphenol, resveratrol: interaction with serum albumin and hemoglobin. *J Fluoresc*, 17, 580-587.

41. Jiang, Y.L. (2008). Design, synthesis and spectroscopic studies of resveratrol aliphatic acid ligands of human serum albumin. *Bioorg Med Chem*, 16, 6406-6414.
42. Goh, SS., Woodman, OL., Pepe, S., Cao, AH., Qin, C., Ritchie, RH. (2007). The red wine antioxidant resveratrol prevents cardiomyocyte injury following ischemia-reperfusion via multiple sites and mechanisms. *Antioxid. Redox Signal*, 9, 101–113.
43. Korucu, AA. (2012). Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon Hasarında Resveratrolün Büyük Kalsiyum Bağımlı-Potasyum Kanalları Aracılıklı Etki Mekanizmasının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
44. Soylemez, S., Sepici, A., Akar, F. (2009). Resveratrol supplementation gender independently improves endothelial reactivity and suppresses superoxide production in ealthy rats. *Cardiovasc. Drugs Ther*, 23, 449–458.
45. Kizer, O. (2012). Hiperkolesterolemik Tavşan Korpus Kavernozum Dokusu Üzerine Resveratrolün Doza Bağlı Koruyucu Etkileri. Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir. 35-37.
46. Galati, G. Sabzevari, O. Wilson, J.X. O'Brien, PJ. (2002). Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*, 177, 91-104.
47. Tamba, M., Simone, G., Quintiliani M. (1986). Interactions of Thiyl Free Radicals With Oxygen: A Pulse Radiolysis Study. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 50(4), 595-600.
48. Chen, CK., Pace-Asciak, CR. (1996). Vasorelaxing Activitiy of Resveratrol and Quercetin in Isolated Rat Aorta. *Gen Pharmacol*, 27(2), 363-366.
49. Orallo, F., Alvarez, E., Camina, M., Leiro, JM., Gomez, E., Fernandez, P. (2002). The Possible İmplication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long term moderato wine consumption. *Mol Pharmacol*, 61(2), 294-302.
50. Das, D.K., Maulik, N. (2006). Resveratrol in Cardioprotection: A Therapeutic Promise Alternative Medicine Molecular Interventions. *Card Res*, 6(1), 36-47.

- 51.** Arslan, N. (2012). Resveratrolün Hipoksi- Reoksijenasyon İle İndüklenen In Vitro Endotel Hücresi Hasarına Etkisinin Ve Nrf2'nin Olası Rolünün Araştırılması. Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.
- 52.** Batu, A., (2006). Klasik Ve Modern Yönteme Göre Sıvı Ve Beyaz Katı Üzüm Pekmezi (Zile Pekmezi) Üretimi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2, 9-26.
- 53.** Nas, S., Nas, M. (1987). Pekmez ve pestilin yapılışı, bileşimi ve önemi, *Gıda*, 12(16), 347-352.
- 54.** Yoğurtçu, H., Kamaşlı, F., (2006). Determination of rheological properties of some molasses samples in Turkey. *J Food En*, 77(4), 1064-1068.
- 55.** Kavas, A. (1990). İncir ve Üzümün Beslenmedeki Yeri ve Önemi. "Sağlıklı Beslenmede Kuru İncir ve Çekirdeksiz Kuru Üzümün Önemi" Semineri. İzmir. 2, 53-65.
- 56.** Kaya, C., Yıldız, M., Hayoğlu, İ., Kola, O., (2005). Pekmez Üretim Teknikleri. GAP 4.Tarım Kongresi. Şanlıurfa. 2. Cilt, 1482–1490.
- 57.** Aras, Ö. (2006). Üzüm ve Üzüm Ürünlerinin Toplam Karbonhidrat Protein, Mineral Madde Ve Fenolik Bileşik İçeriklerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- 58.** Aközlü, A., (2012). Kayseri ve Civarında Geleneksel Yollarla Üretilen Pekmezlerdeki Hidroksimetil Furfural Miktarlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Tayini. Yüksek Lisans Tezi. Erciyes Üniversitesi, Kayseri.
- 59.** Batu, A. (2011). Üzüm, Pekmez ve İnsan Sağlığı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 6(2), 25-35.
- 60.** AYTEKİN, Y., SOLAKOĞLU, S. (1998). *Temel Histoloji*. İstanbul: Barış kitapevi.
- 61.** D'Angelica, M., Fong, Y. (2004).The liver. Ed. Townsend CM Jr, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL. Sabiston Textbook of Surgery. Elsevier Saunders, 1513-1569.

62. Guyton, AC., Hall, JE. (1996). Textbook of medical physiology. The liver as an organ. Philedelphia: WB Saunders company,: 883-88.
63. Eşrefoğlu, M. (2009). *Özel Histoloji*. Malatya: Medipes matbaacılık yayıncılık Ltd. Şti.
64. Figlewicz, DP., Ioannou, G., Jay, JB., Kittleson, S., Savard, C., Roth, CL. (2009) Effect of moderate intake of sweeteners on metabolic health in the rat. *Physiol Behav*, 98(5), 618-24.
65. Karagül, H., Fidancı, UR., Altıntaş, A., Sel, T. (2000). *Klinik Biyokimya*. Ankara: Medisan Yayıncılık.
66. Ersoy, O. (2012). Karaciğer Enzim Yüksekliğinin Değerlendirilmesi. *Ankara Medical Journal*, 12(3), 129-135.
67. Clayton, B.E., Round, M. (1994). Chemical Pathology and the Sick Child, *Blackwe Scientific Publications*, 20-192.
68. Halliwell, B., Cross, CE., Gutteridge, J.M.C. (1992). Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now?. *J Lab Clin Med*, 598-620.
69. Aslan, R., Şekeroğlu, MR., Bayiroğlu, F. (1995). Serbest Radikal Türlerin Membran Lipid Peroksidasyonuna Etkileri ve Antioksidan Savunma. *Y.Y.Ü Sağlık Bil. Derg*, 2(1), 137-142.
70. Benzer, F., Ozan, TS. (2003). Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzymes And Levels Of Nitric Oxide in Sheep Infected With Fasciola Hepatica, *Turk J Vet Anim Sci*, 27, 657–661.
71. Uysal M. (1998). Serbest radikaller, lipit peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim*, 11, 336-340.
72. Çelik, A., Varol, R., Onat, T., Dağdelen, Y., Tugay, F. (2007). Akut Egzersizin Futbolcularda Antioksidan Sistem Parametrelerine Etkisi. *Spormetre Beden Eğitimi ve Spor Bilimleri Dergisi*, 4, 167-172.

- 73.** Halliwell, B., Hu, ML., Louie, S., Duvall, TR., Tarkington, BK., Motchnik, P., Cross, CE. (1992). Interaction of nitrogen dioxide with human plasma. *FEBS Lett*, 313(1), 62-66.
- 74.** Darley-Usmar, V., Wiseman, H., Halliwell, B. (1995). Nitric Oxide and Oxygen Radicals: A Question of Balance . *FEBS Letters*, 369, 131-135.
- 75.** Droge, W., (2002). Free Radicals in the Physiological Control of cell Function. *Physiol Rev*, 82(1), 47-95.
- 76.** Bal, W., Kasprzak, KS. (2002). Induction of oxidative DNA damage by carcinogenic metals. *Toxicol Lett*, 127, 55-62.
- 77.** Cheeseman, KH. (1992). Free radical and antioxidant. *Br Med Bull*, 12(6), 347-396.
- 78.** Basaga, HS. (1997). Biochemical aspect of free radical. Are the strongest determinants of plasma antioxidative capacity and serum lipid resistance to oxidation in Finnish men. *Atherosclerosis*, 130(1-2), 223-233.
- 79.** Gutteridge, JMC. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, 41(12), 1819-1828.
- 80.** Carroll, EC. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med*, 107, 526 – 545.
- 81.** Kurutaş, BE., İnanç, GF., Kılınç, M., (2004). Serbest Radikaller. *Arşiv*, 13, 120-13.
- 82.** Zimmerman, BJ., Granger, DN. (1994). Mechanisms of reperfusion injury. *Am. J. Med. Sc*, 307, 284–292.
- 83.** Kontos, HA., Wei, EP., Ellis, EF., Jenkins, LW., Povlishock, JT., Rowe, GT., Hess, ML. (1985). Appearance of superoxideanion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ. Res*, 57, 142–151.
- 84.** Clarkson, PM., Thompson, HS, (2000). Antioxidants: What role do they play in physical activity and health?. *Am. J. Clin. Nutr*, 72, 637–646.

- 85.** McCord, J. (1993). Human disease, free radicals and the oxidant/ antioxidant balance. *Clin Biochem*, 26, 351-7.
- 86.** Finaud, J., Lac, G., Filaire, E. (2006). Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med*, 36(4), 327-358.
- 87.** Leeuwenburgh, C., Heinecke, JW. (2001). Oxidative stress and antioxidants in exercise, *Curr. Med. Chem*, 8(7), 829-838.
- 88.** Akkuş, İ. (1995). *Serbest Oksijen Radikalleri ve Fizyopatolojik Etkileri*. Konya: Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım.
- 89.** Giriş, M. (2012). Deneysel Metabolik Sendromda Karaciğer Ve Kalp Dokularında Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve Ekspresyonlarının İncelenmesi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
- 90.** Raha, S., Robinson, BH. (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci*, 25, 502-507.
- 91.** Bonnefoy, M., Drai, J., Kostka, T., (2002). Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Med*, 31 (25), 1174-84.
- 92.** Iuliano, L., Colavita, AR., Leo, R., Pratico, D., Violi, F. (1997). Oxygen free radicals and platelet activation. *Free Radic Biol Med*, 22(6), 999-1006.
- 93.** Halliwell, B. (1993). Free radicals and vascular disease: how much do we know? *BMJ*, 307(6909): 885-891.
- 94.** Burçak, G., Andican, G. (2004). Oksidatif DNA Hasarı ve Yaslanma. *Cerrahpasa J Med*, 35, 159-169.
- 95.** Akpoyraz, M., Durak, İ. (1995). Serbest radikallerin biyolojik etkileri. *Ankara Univ Tıp Fak Mecm*, 48, 253-262.
- 96.** Kim, JW., Yu, BP. (1999). Characterization of age-related malondialdehyde oxidation: The effect of modulation by food restriction. *Mech Ageing Dev*, 50, 277-87.

- 97.** Cotran, RS., Kumar, V., Robbins, SL. (1989). Cellular Injury and Adaptations. Robins Pathologic Basis of Disease, 4th edition, *WB Saunders Company*, 1-38.
- 98.** Yavuzer, S.(1993). Serbest radikallerle hücre yaralanması. ‘Hücre-II, Oksidan Stres ve Hücre Hasarı’ Tıpta Temel Bilimler Kolu Sonbahar Okulu ‘93 Kızılcahamam Kurs Notları. Ankara.12-14.
- 99.** Young, ID. (2005). Medical Genetics. *Oxford University Pres.* 52-56.
- 100.** Halliwell, B., Gutteridge, JMC. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd edn. Oxford University Press, New York.
- 101.** Yalçın, A., S. (1992). Serbest radikaller ve patolojik etkileri. *Sendrom*, 4, 40-43.
- 102.** Aslan R. (1999). Homeostatik mekanizmanın korunması ve sağaltımda antioksidanlar. *İlaç ve Tedavi Dergisi*.12(8), 475-480.
- 103.** Deby, C., Goutier, R. (1990). New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem Pharmacol*, 39, 399–405.
- 104.** Marklund, SL. (1984). Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem J*, 220(1), 269–72.
- 105.** Young, IS., Woodside, JV. (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 54(3), 176-186.
- 106.** Uysal, M. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres. (2006). *Biyokimya*. Nobel Tıp Kitapevleri. İstanbul.
- 107.** Özkan, A., Gündüz, G., Çıplak, B., Fışkın, K. (2000). Kimyasal Mücadele Uygulanmış Dociostarus Morakanus Epidemik Populasyonunda Alınan Örneklerde Antioksidan Enzim Aktiviteleri, *Turk J Biol*, Tübitak, 24, 141-149.
- 108.** Karabulut, AB., Özerol, E., Temel, İ. (2002). Yaş ve sigara içiminin eritrosit katalaz aktivitesi ve bazı hematolojik parametreler üzerine etkisi. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(2), 85–88.

- 109.** Zhao, J., Liu, XJ., Ma, JW. (2004). DNA damage in healthy term neonate. *Early Hum Dev*, 77, 89–98.
- 110.** Koç, S. (2008). Glutasyon S–transferaz genindeki delesyonların (gstt1, gstm1) koroner arter, hastalığı ve akut miyokart infarktüsü ile ilişkisi, Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- 111.** Özkan A, Fışkın K. (2004). Serbest oksijen radikalleri, Karsinogenez ve antioksidant enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 14, 52–60.
- 112.** Cüre, E. (2007). Ratlarda demir yüklenmesi ile oluşturulan oksidatif stresin önlenmesinde kafeik asit fenetil esterinin etkinliğinin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.
- 113.** Sevgiler, Y. (2007). Oreochromis niloticus’da karaciğer ve böbrek dokularında Fenthionin NAC ve BSO modölatörlüğünde Glutasyon metabolizmasına oksidatif etkileri, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- 114.** Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*, 18, 872–879.
- 115.** Haddad, JJ., Olver, RE., Land, SC. (2000). Antioxidant/Pro-oxidant Equilibrium Regulates HIF-1a and NF-kB Redox Sensitivity Evidence For Inhibition By Glutathione Oxidation In Alveolar Epithelial Cells. *J Biol Chem*, 275(28), 21130–21139.
- 116.** Nijveldt, RJ., Noad, E., Hoarn, DEC., Boelens, PG., Norren, K., Leeuwen, PAM. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 74, 418–425.
- 117.** Kaur, H., Perkins, MJ. (1991). The free radical chemistry of food additives. In: Aruoma, O.I., Halliwell, B. (Eds.). *Free Radicals and Food Additives*. 17–35, London, UK: Taylor & Francis.
- 118.** Mercan, U. (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 15 (1-2), 91-6.

- 119.** Reiter, R J. (1995). Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *Faseb*;9, 526-33.
- 120.** Schuyer, M., Berns, EM. (1999). Is TP53 dysfunction required for BRCA1-associated carcinogenesis? *Mol Cell Endocrinol*, 155, 143-152.
- 121.** Nordberg, J., Arner, E.S.J. (2001). Reactive Oxygen Species, Antioxidants and The Mammalia Thioredoxin System. *Free Rad Biol Med*, 31(11), 1287–1317.
- 122.** Altınışik, M. (2000). *Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar*. Erişim:02.12.2014. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-Adsem-01b.Pdf>.
- 123.** Doğan, Ö. (2010). İskemik Strokta Oksidatif Stres Ve Total Antioksidan Kapasite. Uzmanlık Tezi, Kırıkkale.
- 124.** Marçıl, E. (2010). Süleyman Demirel Üniversitesi Acil Servisine Başvuran Yetişkin Travma Vakalarında Travma Skorları İle Oksidatif Stres Faktör Düzeyleri Arasındaki İlişkinin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.
- 125.** Deaton, CM., Marlin, DJ. (2003). Exercise-associated oxidative stress, *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2, 278-291.
- 126.** Lee, JSC. (2001). The In vivo Effects of Bap and Resveratrol on The Bone and The Ovary of Young Rats. Master of Science, Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toront.
- 127.** Currier, N., Solomon, SE., Demicco, EG., Chang, DLF., Farago, M., Ying, H., Dominguez, I., Sonenshein, GE., Cardiff, RD., Xiao ZX.J., Sherr, DH., Seldin, DC. (2005). Oncogenic Signaling Pathways Activated In Dmba-Induced Mouse Mammary Tumors. *Toxicol Pathol*, 33, 726–737.
- 128.** Mehmetoğlu, İ. (2004). *Klinik Biyokimya Laboratuvarı El Kitabı*, Konya: Yelken Yayınları.
- 129.** Şengül, C.,A.. (2010). Obez Olgularda İnsülin Direnci, Metabolik Sendrom İle Total Oksidan Ve Antioksidan Düzeyleri İlişkisi. Uzmanlık Tezi, Gaziantep.

- 130.** Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*, 38(12), 1103-11.
- 131.** Hu, ML., Louie, S., Cross, CE., Motchnik, P., Halliwell, B. (1993). Antioxidant protection against hydrochlorous acid in human plasma. *J Lab Clin Med*, 121, 257-62.
- 132.** Harma, M., Kocyigit, A., Erel, O. (2005). Increased DNA damage in patients with complete hydatidiform mole. *J. Mutat Res*, 583, 49-54.
- 133.** Amici, A., Magni, G., (2002). Human Erythrocyte pyrimidine 5'-Nucleotidase, PN-1, *Arch. Biochem. Biophys*, 397,184-190.
- 134.** Vivekanandhan, S., Soundararajan, CC., Tripathi, M., Maheshwari, MC. (2005). Adenosine Deaminase and 5' Nucleotidase Activities in Peripheral Blood T Cells of Multiple Sclerosis Patients. *Neurochem. Res*, 30, 453 –456.
- 135.** Enien, WM., Sahwy, SE., Haris, CP., Serif, MW., Elstein, M. (1995). Human chorionic gonadotropin and progesterone concentrations in preovulatory follicular fluid correlate with successful fertilization and cleavage of human oocytes in vitro fertilization cycles. *Hum. Reprod*, 10, 2840-2844.
- 136.** Eastbiopharm, Rat 5-Nucleotidase(5-NT) ELISA Kit, Cat. No: CK-E901184. 1,2.
- 137.** Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL., Randall, RJ. (1951). Protein measurement with Folin's phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- 138.** Hanausek, M., Spears, E., Walaszek, Z., Kowalczyk, MC., Kowalczyk, P., Wendel, C., Slaga, TJ. (2011). Inhibition of Murine Skin Carcinogenesis by Freeze-Dried Grape Powder and Other Grape- Derived Major Antioxidants. *Nutr. Cancer*, 63, 28-38.
- 139.** López-Vélez, M., Martínez-Martínez, F., Del Valle-Ribes, C. (2003). The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 43, 233-244.

- 140.** Ghanim, H., Sia, CL., Abuaysheh, S., Korzeniewski, K. (2010). An antiinflammatory and reactive oxygen species suppressive effects of an extract of *Polygonum cuspidatum* containing resveratrol. *J Clin Endocrinol Metab*, 95, 8.
- 141.** Ignatowicz, E., Balana, B., Vulimiri, SV., Szaefer, H., Baer-Dubowska, W. (2003). The effect of plant phenolics on the formation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-DNA adducts and TPA-stimulated polymorphonuclear neutrophils chemiluminescence in vitro. *Toxicology*, 189(3), 199-209.
- 142.** Sanchez, AR., Almedia, A., Medina JM. (2002). Oxidative stress in preterm rat brain is due to mitochondrial dysfunction. *Pediatr Res*, 51 (1), 34–39.
- 143.** Vural, N. (1996). *Toksikoloji*. Ankara: Ankara Ü. Eczacılık Fakültesi Yayınları.
- 144.** Söylemez, N., Demirbağ, R., Sezen, Y., Yıldız, A., Akpınar, O. (2010). Vücut kütle indeksine göre leptin ve adiponektin seviyeleri ve bunları oksidatif parametrelerle ilişkisi. *Anadolu Kardiyol Dergisi*, 10, 391-396.
- 145.** Yulug, E., Türedi, S., Karagüzel, E., Kutlu, O., Mentese, A., Alver, A. (2014). The short term effects of resveratrol on ischemia–reperfusion injury in rat testis. *J Pediatr Surg*, 49 (3), 484-489.
- 146.** Sehirli, O., Tozan, A., Omurtag, G.Z., Cetinel, S., Contuk, G., Gedik, N., Sener, G. (2008). Protective effect of resveratrol against naphthalene-induced oxidative stress in mice. *Ecotoxicol and Environ Saf*, 71, 301–308.
- 147.** Osama, M.A., Basant, MM., Asmaa MM. (2014). Curcumin And Naringin Prevent 7,12- Dimethylbenz(A)Anthracene-Induced Hepatic Injury By Suppressing Inflammation And Oxidative Stress. *J Int Acad Res*, 1, 393.
- 148.** Balasenthil, S., Arivazhagan, S., Ramachandran, C.R., Ramachandran, V., Nagini, S. (1999). Chemopreventive potential of neem (*Azadirachta indica*) on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *J. Ethnopharmacol*, 67(2), 189–195.

- 149.** Sharma, V., Paliwal,R., Janmeda, P., Sharma, S. (2012). Chemopreventive Efficacy of Moringa oleifera Pods Against 7, 12-Dimethylbenz[a]anthracene Induced Hepatic Carcinogenesis in Mice. *Res. Communic*, 13, 2563-2569
- 150.** Günşar F. (2003). Karaciğer Enzim Profilineki Değişikliklerde Yaklaşımlar. *Güncel Gastroenteroloji*. 68-69
- 151.** Karabulut, A.B., Karadag, N., Gürocak, S., Kiran., Tuzcu, M., Sahin, K. (2014). Apricot attenuates oxidative stress and modulates of Bax, Bcl-2, caspases, NFj-B, AP-1, CREB expression of rats bearing DMBA-induced liver damage and treated with a combination of radiotherapy. *Food Chem Toxicol*, 70, 128-133.
- 152.** Pattanayak, S. P., Mazumder, P.M. (2011). Therapeutic potential of Dendrophthoe falcata (L.f) Ettingsh on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumorigenesis in female rats: effect on antioxidant system, lipid peroxidation, and hepatic marker enzymes. *Comp Clin Pathol*, 20, 381–392.

8. EKLER

EK.1: Etik Kurul Onay Belgesi




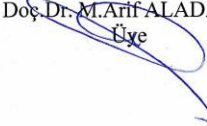
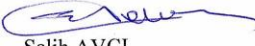

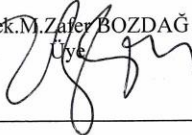
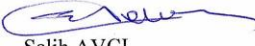


İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 27-12-2011
 Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
 Araştırma Protokol no.su : 2011/A-106
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Soyu : Spraque-Dawley
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 42adet
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı: 6ay/ 250g

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Aysun Bay Karabulut'un yürütücüsü olduğu "7,12-Dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) ile oluşturulan karaciğer hasarında resveratrolün hepatik enzimler ve oksidatif stres parametreleri üzerine etkileri" isimli 2011/A-106 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Denei Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

 Prof.Dr. Yusuf TÜRKÖZ Başkan	 Doç.Dr. Abdurrahman KARAMAN Başkan Yard.	 Prof.Dr. Selim DOĞANAY Üye
 Doç. Dr. M. Arif ALADAĞ Üye	 Yrd.Doç.Dr.Mehmet KARATAŞ Üye Fazlı	 Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN Üye Katılmadı
 Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ Üye	 Salih AVCI Sivil Üye	

EK.2: Etik Kurul Onay Belgesi



T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi
Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : B.30.2.İNÜ.0.20.05.05/16

Konu : 2011/A-106 nolu çalışma

MALATYA

08 / 07 / 2014

Sayın: Prof.Dr. Aysun BAY KARABULUT
Tıbbi Biyokimya AD

2011-/A-106 protokol nolu **7,12-Dimetilbenz[aj]antrasen (DMBA) ile oluşturulan karaciğer hasarında resveratrolün hepatik enzimler ve oksidatif stres parametreleri üzerine etkileri** isimli projenin başlığının "**DMBA ile oluşturulan rat karaciğer hasarında resveratrol ve pekmezin karaciğer enzimleri ve oksidatif stres parametreleri üzerine etkilerinin araştırılması.**" şeklinde değiştirilmesi. Ayrıca Sprague Dawley sıçanlar yerine, Wistar Albino sıçanlar kullanılması Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı tarafınca uygun görülmüştür.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.


Doç. Dr. M. Arif ALADAĞ
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı

8. ÖZGEÇMİŞ

24.11.1976 yılında Malatya’ da doğdum. İlköğretim ve lise eğitimimi Diyarbakır’ da tamamladım. 1999 yılında Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’ nden mezun oldum. 1999 yılından beri Milli Eğitim Bakanlığı’ nda öğretmen olarak çalışmaktayım.