



T.C.

BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE NODULARINLE İNDÜKLENEN OKSİDATİF  
STRES ÜZERİNE TANGERETİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Zeynep CİHAN KARA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**VETERİNER FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Doç. Dr. Fatma KOCASARI**

**BURDUR-2018**

T.C.  
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE NODULARİNLE İNDÜKLENEN OKSİDATİF  
STRES ÜZERİNE TANGERETİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Zeynep CİHAN KARA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

VETERİNER FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Doç. Dr. Fatma KOCASARI**

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinatörlüğü tarafından 0420-YL-17 proje numarası ile desteklenmiştir.

**BURDUR – 2018**


## KABUL ve ONAY SAYFASI

### SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

*Zeynep CİHAN KARA* tarafından *Doç. Dr. Fatma KOCASARI* yönetiminde hazırlanan "*Farelerde Nodularinle İndüklenen Oksidatif Stres Üzerine Tangeretin Koruyucu Etkisinin Araştırılması*" başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

28/08/2018

  
Prof. Dr. Yavuz Osman BIRDANE

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Veteriner Fakültesi

Farmakoloji ve Toksikoloji AD

Başkan

  
Prof. Dr. Asım KART

  
Doç. Dr. Fatma KOCASARI

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Veteriner Fakültesi

Farmakoloji ve Toksikoloji AD

Jüri

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Veteriner Fakültesi

Farmakoloji ve Toksikoloji AD

Jüri

### ONAY

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu 28/09/2018 Tarih ve 33 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa Doğan TEMİZSOYLU

Müdür

Sağlık Bilimleri Enstitüsü



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın bütün aşamalarında bilgi ve tecrübeleriyle desteğini ve kıymetli zamanını esirgemeyen, varlığı ve ilgisiyle her daim yanımda olan ve bana her konuda rehberlik eden değerli hocam Doç. Dr. Fatma KOCASARI'ya,

Yardım ve destekleri ile çalışmamıza yön veren Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Özlem ÖZMEN'e,

Yardımlarından ve değerli katkılarından dolayı Biyolog Dilnur İLERİ' ye,

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı hocalarım Prof. Dr. Asım KART, Prof. Dr. Firdevs MOR ve Dr. Öğr. Üyesi Hidayet TUTUN'a,

Tez çalışmam süresince dostluğu, özverisi ve bilgisiyle her zaman destek olan ve bunu şartlar ne olursa olsun esirgemeyen Arş. Gör. Selinay Başak ERDEMLİ KÖSE'ye,

DeneySEL aşamalarda destekleri için Zeki EROL ve yüksek lisans arkadaşlarıma,

Sevgili servis sorumlum ve iş arkadaşlarıma,

Manevi desteklerini yanımda hissettiren büyük ailemin bütün fertlerine,

En güzel zamanlarında eksik kaldığım, sonsuz sevgimle ve büyük bir anlayışla canım oğlum Ataol Sami ve sevgili kızım Zeynep Çağıl'a,

Yaptığım herşeyde olduğu gibi; yüksek lisans eğitimim süresince sınırsız sabrı, uçsuz bucaksız anlayışı, her türlü desteğiyle yanımda olan ve olmaya devam eden, varlığıyla bana güç katan sevgili eşim Eyup KARA' ya sonsuz teşekkür ediyorum.

Zeynep CİHAN KARA

BURDUR, 2018

## BEYAN

“Farelerde Nodularinle İndüklenen Oksidatif Stres Üzerine Tangeretin Koruyucu Etkisinin Araştırılması” başlıklı tez çalışmasının; kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlâl edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

28/08/2018

Zeynep CIHAN KARA

## ONAY

Doç. Dr. Fatma KOCASARI

Danışman

# İÇİNDEKİLER

|   |             |
|---|-------------|
| <b>İÇ KAPAK SAYFASI</b>                     | <i>i</i>    |
| <b>KABUL ve ONAY SAYFASI</b>                | <i>ii</i>   |
| <b>TEŞEKKÜR</b>                             | <i>iii</i>  |
| <b>BEYAN SAYFASI</b>                        | <i>iv</i>   |
| <b>İÇİNDEKİLER</b>                          | <i>v</i>    |
| <b>ŞEKİLLER</b>                             | <i>vii</i>  |
| <b>TABLolar</b>                             | <i>viii</i> |
| <b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>              | <i>ix</i>   |
| <b>TÜRKÇE ÖZET</b>                          | <i>xi</i>   |
| <b>İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)</b>            | <i>xiii</i> |
| <b>1. GİRİŞ</b>                             | <b>1</b>    |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>                    | <b>3</b>    |
| 2.1. Siyanobakteriler ve Siyanotoksinler    | <b>3</b>    |
| 2.1.1. Nodularinler                         | <b>6</b>    |
| 2.2. Serbest Radikaller                     | <b>13</b>   |
| 2.2.1. Süperoksit Anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ) | <b>14</b>   |
| 2.2.2. Singlet Oksijen ( $^1O_2$ )          | <b>15</b>   |
| 2.2.3. Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ )       | <b>15</b>   |
| 2.2.4. Peroksil Radikali ( $ROO\cdot$ )     | <b>15</b>   |
| 2.2.5. Hidroksil Radikali ( $OH\cdot$ )     | <b>15</b>   |
| 2.3. Oksidatif Stres                        | <b>16</b>   |
| 2.4. Antioksidan Enzimler/Sistemler         | <b>17</b>   |
| 2.4.1. Süperoksit Dismutaz                  | <b>18</b>   |
| 2.4.2. Katalaz                              | <b>18</b>   |
| 2.4.3. Glutasyon Peroksidaz                 | <b>18</b>   |
| 2.4.4. Glutasyon                            | <b>18</b>   |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.5. Turunçgil Flavonoidleri                              | 18        |
| 2.5.1. Polimetoksisflavonlar                              | 19        |
| <b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>                                 | <b>23</b> |
| 3.1. Gereç  | 23        |
| 3.1.1. Kimyasal Maddeler                                  | 23        |
| 3.1.2. Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri                | 24        |
| 3.2. Yöntem   | 24        |
| 3.2.1. Etik   | 24        |
| 3.2.2. Hayvan Materyali                                   | 24        |
| 3.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Protokolü | 24        |
| 3.2.4. Örneklerin Toplanması                              | 25        |
| 3.2.5. Kan ve Doku Analizleri                             | 25        |
| 3.3. İstatistiksel hesaplamalar                           | 29        |
| <b>4. BULGULAR</b>  | <b>30</b> |
| 4.1. Biyokimyasal Parametreler                            | 30        |
| 4.2. Antioksidan-Oksidatif Stres Parametreleri            | 30        |
| 4.3. Histopatolojik Bulgular                              | 31        |
| 4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular                         | 32        |
| 4.4.1. Kaspaz-3 İmmunohistokimyasal Bulguları             | 32        |
| 4.4.2. PCNA İmmunohistokimyasal Bulguları                 | 33        |
| 4.4.3. iNOS İmmunohistokimyasal Bulguları                 | 34        |
| 4.4.4 TNF- $\alpha$ İmmunohistokimyasal Bulguları         | 35        |
| <b>5. TARTIŞMA</b>  | <b>37</b> |
| <b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>                               | <b>45</b> |
| <b>7. KAYNAKLAR</b>                                       | <b>46</b> |
| <b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>  | <b>57</b> |

## ŞEKİLLER

|   |    |
|---|----|
| Şekil 2.1. Burdur Gölü'nden elde edilen <i>N. spumigena</i> ipliklerinin mikroskopta çekilmiş genel görünüşleri | 4  |
| Şekil 2.2. Nodularin-R'nin kimyasal yapısı  | 6  |
| Şekil 2.3. Burdur Gölü <i>N. spumigena</i> patlamaları  | 7  |
| Şekil 2.4. Turunçgil flavoidlerinin temel kimyasal yapısı   | 19 |
| Şekil 2.5. Polimetoksisflavonların kimyasal yapısı  | 20 |
| Şekil 2.6. Tangeretinin yapısı  | 20 |
| Şekil 4.1. Araştırma gruplarının histopatolojik görünüşleri   | 32 |
| Şekil 4.2. Araştırma gruplarının kaspaz-3 immunohistokimyasal görünüşleri                                       | 33 |
| Şekil 4.3. Araştırma gruplarının PCNA immunohistokimyasal görünüşleri   | 34 |
| Şekil 4.4. Araştırma gruplarının iNOS immunohistokimyasal görünüşleri   | 35 |
| Şekil 4.5. Araştırma gruplarının TNF- $\alpha$ immunohistokimyasal görünüşleri                                  | 36 |



## TABLULAR

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tablo 2.1.</b> Siyanobakteriyel toksinler ile etkiledikleri hedef yapılar                                  | <b>5</b>  |
| <b>Tablo 2.2.</b> Alg örneklerindeki NOD yoğunlukları   | <b>8</b>  |
| <b>Tablo 2.3.</b> Su örneklerindeki NOD yoğunlukları  | <b>9</b>  |
| <b>Tablo 2.4.</b> Vahşi ve evcil hayvanlardaki zehirlenme vakaları  | <b>12</b> |
| <b>Tablo 2.5.</b> Laboratuvar hayvanlarında görülen zehirlenme vakaları                                       | <b>12</b> |
| <b>Tablo 3.1.</b> Araştırmadaki gruplara verilen maddeler ve verildiği günler                                 | <b>25</b> |
| <b>Tablo 4.1.</b> Araştırma gruplarının serum AST ve ALT düzeyleri  | <b>30</b> |
| <b>Tablo 4.2.</b> Araştırma gruplarının kan SOD, CAT ve GSH-Px enzim etkinliği ile GSH ve MDA düzeyleri       | <b>31</b> |
| <b>Tablo 4.3.</b> Araştırma gruplarının karaciğer SOD, CAT ve GSH-Px enzim etkinliği ile GSH ve MDA düzeyleri | <b>31</b> |

## SİMGELER ve KISALTMALAR

|        |                                       |
|--------|---------------------------------------|
| ALT    | Alanin aminotransferaz                |
| AST    | Aspartat aminotransferaz              |
| ATP    | Adenozin trifosfat                    |
| CAT    | Katalaz                               |
| COX-2  | Siklooksijenaz-2                      |
| DMBA   | Dimetilbenz- <i>a</i> -antrasen       |
| DMSO   | Dimetilsülfoksit                      |
| DTNB   | 5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit) |
| EDTA   | Etilen diamin tetraasetik asit        |
| GSH    | Glutatyon                             |
| GSH-Px | Glutatyon Peroksidaz                  |
| GST    | Glutatyon S-tranferaz                 |
| JNK    | c-Jun N-terminal kinaz                |
| Hb     | Hemoglobin                            |
| HOO•   | Hidroperoksil radikali                |
| IL     | İnterlökin                            |
| iNOS   | İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz  |
| LDL    | Düşük yoğunluklu lipoprotein          |
| LPS    | Lipopolisakkarit                      |
| MAPK   | Mitojen-aktif protein kinaz           |

|                  |   |
|------------------|---|
| MDA              | Malondialdehit                                |
| NADPH            | Nikotinamid adenin dinükleotidfosfat hidrojen |
| NO               | Nitrik oksit                                  |
| NOD              | Nodularin                                     |
| Nrf-2            | Nükleer faktör (eritroid türevi-2) benzeri-2  |
| OH•              | Hidroksil radikali                            |
| ÖD <sub>50</sub> | Öldürücü doz <sub>50</sub>                    |
| PCNA             | Prolifere hücre nükleer antijeni              |
| p.i              | Periton içi                                   |
| PMF              | Polimetoksillenmiş flavon                     |
| PP               | Serin/treonin (protein) fosfataz              |
| ROO•             | Peroksil radikali                             |
| ROS              | Reaktif oksijen türleri                       |
| SOD              | Süperoksit dismutaz                           |
| TAN              | Tangeretin                                    |
| TBA              | Tiyobarbitürik asit                           |
| TNF $\alpha$     | Tümör nekroz faktör $\alpha$                  |

**T.C.**  
**BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Farelerde Nodularinle İndüklenen Oksidatif Stres Üzerine Tangeretinin**  
**Koruyucu Etkisinin Araştırılması**

**Zeynep CİHAN KARA**

**Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı**

**Tez danışmanı**

**Doç. Dr. Fatma KOCASARI**

**BURDUR– 2018**

**ÖZET**

Bu araştırma ile farelerde nodularinle (NOD) oluşturulan oksidatif hasara karşı tangeretinin (TAN) koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada kontrol, TAN, NOD ve TAN+NOD'un birlikte verildiği grup olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu. Her bir grupta 14 adet olmak üzere toplam 56 adet Balb/c Albino erkek fare kullanıldı. Farelere *ad libitum* pelet yem ve su verildi. Kontrol grubundaki farelere 7 gün süreyle periton içi (p.i) % 0,1 dimetilsülfoksit (DMSO) içeren % 0,9'luk NaCl verildi. Tangeretin tek başına 7 gün süreyle p.i 100 mg/kg/c.a./gün (% 0,1 DMSO içeren % 0,9'luk NaCl içinde çözdürülerek), NOD tek başına 7 gün süreyle p.i 15 µg/kg/c.a./gün (% 0,9'luk NaCl içinde çözdürülerek) dozlarında hayvanlara uygulandı. Tangeretin+NOD'in birlikte verildiği grupta bulunan farelere ise 3 gün süreyle 100 mg/kg c.a./gün TAN ve 4. günden itibaren TAN ile birlikte 15 µg/kg/c.a./gün NOD 10. güne kadar her gün p.i olarak uygulandı. Çalışma sonunda kan ve karaciğer örnekleri alındı. Serum örneklerinde *alanin aminotransferaz* (ALT) ve *aspartat aminotransferaz* (AST), eritrositlerde ve karaciğerde katalaz (CAT), glutatyon (GSH) ve glutatyon

peroksidaz (GSH-Px) düzeyleri ile serumda ve karaciğerde MDA ve SOD düzeyleri ölçüldü. Ayrıca karaciğer örneklerinde histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler yapıldı. Çalışmada NOD verilen grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum AST ve ALT değerlerinde önemli düzeyde bir artış, TAN+NOD'un birlikte verildiği grupta ise, NOD'in tek başına verildiğinde artan AST ve ALT değerlerinde önemli düzeyde bir düşüş olduğu belirlendi. Kan ve karaciğer doku örneklerinde NOD verilen grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA miktarlarında önemli düzeyde bir artış; SOD, CAT ve GSH-Px enzimlerinin etkinliği ile GSH düzeylerinde ise önemli bir düşüş tespit edildi. Tangeretin+NOD'un birlikte verildiği grupta ise, NOD tek başına verildiğinde artan MDA miktarında önemli düzeyde bir düşüş; SOD, CAT ve GSH-Px enzimlerinin etkinliği ile GSH düzeylerinde ise önemli düzeyde bir artış belirlendi. Sonuç olarak NOD'un kan ve karaciğer dokularında lipid peroksidasyona ve antioksidan savunma sistemlerinde tükenmeye yol açtığı, NOD ile birlikte TAN verilmesinin oluşan lipid peroksidasyonu azalttığı ve antioksidan enzimler/sistemler üzerinde düzeltici etki gösterdiği tespit edildi. Ayrıca histopatolojik ve immunokimyasal incelemeler sonucunda da NOD'un karaciğerlerde belirgin şekilde patolojik lezyon oluşturduğu ancak TAN'ın bu lezyonları belirgin şekilde iyileştirdiği saptandı.

**Anahtar Kelimeler:** nodularin, oksidatif stres, tangeretin, fare

**BURDUR MEHMET AKIF ERSOY UNIVERSITY**

**INSTITUTE of HEALTH SCIENCE**

**Master of Science Thesis**

**Investigation of the Protective Effect of Tangeretine on Nodularin-Induced  
Oxidative Stress in Mice**

**Zeynep CİHAN KARA**

**Veterinary Pharmacology and Toxicology**

**Supervisor**

**Doç. Dr. Fatma KOCASARI**

**BURDUR– 2018**

**ABSTRACT**

This study aimed to investigate the protective effect of tangerine (TAN) against oxidative damage induced by nodularin (NOD) in mice. As control, TAN, NOD and TAN + NOD four groups were formed. A total of 56 Balb/c Albino male mice, 14 in each group, were used in the study. *Ad libitum* pellet feed and water were given to animals. As control, TAN, NOD and TAN + NOD four groups were formed. The mice in the control group received % 0.9 NaCl containing 0.1% dimethylsulfoxide (DMSO) intraperitoneally (p.i) for 7 days. 100 mg/kg b.w/day TAN p.i (dissolved in % 0.9 NaCl containing 0.1 % DMSO) and 15 µg/kg b.w/day NOD p.i (dissolved in % 0.9 NaCl) were given to animals in the TAN and NOD groups respectively for 7 days. Mice in the group TAN+NOD were administered 100 mg/kg b.w/day TAN p.i daily for up to 3 days and then 100 mg/kg b.w/day TAN+15 µg/kg b.w/day NOD were given together from day 4 to 10. Blood and liver samples were taken at the end of the study. In serum samples, *alanine aminotransferase* (ALT) and *aspartate aminotransferase* (AST), in erythrocytes and liver catalase (CAT), glutathione (GSH) and glutathione peroxidase (GSH-Px) levels and in liver MDA and SOD levels were measured. Histopathological and immunohistochemical studies were also performed on liver samples. In the NOD-administered group compared with the control group, a significant increase in serum

AST and ALT levels and in the TAN+NOD group compared to the group in which NOD was administered alone, a significant decrease in AST and ALT values were found. In blood and liver tissue samples, a significant increase in the amount of MDA and significant decrease in the activity of SOD, CAT and GSH-Px enzymes and GSH levels were determined in the NOD-administered group when compared to the control group. In the TAN+NOD group, a significant decrease in MDA levels and significant increase in the activity of SOD, CAT and GSH-Px and in GSH levels were determined compared to the NOD group. As a result, it was determined that NOD causes lipid peroxidation and depletion in antioxidant defense systems in blood and liver, and TAN administration with NOD reduces lipid peroxidation and has a corrective effect on antioxidant systems. Histopathological and immunohistochemical studies also revealed that NOD significantly causes pathological changes in the liver, but TAN significantly healed these lesions.

**Key Words:** nodularin, oxidative stress, tangeretin, mice

## 1. GİRİŞ

Siyanobakteriler yeryüzündeki bilinen en eski organizmalar arasında yer alırlar. Fotosentez yapan prokaryotik bakterilerdir. Tuzlu, tatlı ve acı sular ile toprakta özellikle nemli yüzeylerde yaygın şekilde bulunurlar. Birçoğu planktonik mikroorganizmalardır (37, 94).

Siyanobakteriler optimal koşullar altında hızla çoğalırlar ve suların yüzeyinde kalın bir tabaka halinde yoğun hücre kümeleri oluştururlar. Bu olay siyanobakteri patlaması anlamına gelen “bloom” olarak adlandırılır. Siyanobakteri patlamaları bazen o kadar yoğun olur ki suya saçılmış parlak yeşil boyayı andırırlar (3, 98). Son yıllarda plansız yerleşim ve endüstrinin hızla gelişmesi; deniz, göl, baraj gölü ve akarsu gibi su kaynaklarının yoğun olarak kullanılmasına, su kalitesinin bozulmasına ve siyanobakteri patlamalarının oluşumuna sebep olmaktadır (105). Sıcak ülkelerde sulardaki ötrofikasyonla ilişkili olarak siyanobakteri patlamalarında artış olduğu bildirilmiştir (11).

Siyanobakteri türleri tarafından sentezlenen toksinler siyanotoksinler olarak adlandırılır. Yapısal olarak 2000 çeşit siyanobakteri türü tespit edilmiştir; fakat bunların 40’ı insan ve hayvanlar için zararlı olabilecek düzeyde toksin üretebilmektedir. Toksin üreten başlıca siyanobakteri cinsleri *Microcystis*, *Nodularia*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermum*, *Cylindrospermopsis* ve *Nostoc*’dur (15). Nodularinler (NOD) ve mikrosistinler siyanotoksinler içinde en yaygın bulunanlardır (28, 37).

Nodularin, *Nodularia spumigena* (*N. spumigena*) türü siyanobakteriler tarafından sentezlenen ve genellikle acı-tuzlu göllerde bulunan, insan ve hayvanlarda güçlü karaciğer toksini olarak bilinen bir siyanotoksindir (94). Bu toksin karaciğer hücrelerinde dönüşümsüz olarak *serin/tireonin (protein) fosfataz* (PP) PP1, PP2A ve PP3’ün etkinliği engelleyerek etki gösterir. Bu enzimler kanser oluşumunu baskı altına alan enzimlerdir (11, 37, 112). Nodularin hem bu enzimlerin etkinliğini engelleyerek hem de süperoksit anyonu ( $O_2^{\bullet-}$ ) ve hidroksil radikalleri ( $OH^{\bullet}$ ) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturarak karaciğerde hasara sebep olmaktadır. Bu serbest radikaller



de organizmada lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın peroksidasyonuna sebep olarak oksidatif hasar meydana getirmektedirler (11).

Son yıllarda çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynayan oksidatif hasarı önlemede flavonoidler gibi doğal antioksidanların rolü ve kullanımını konusuna artan bir ilgi vardır (92). Turunçgillerden elde edilen polimetoksillenmiş flavonların (PMF) antioksidan, yangı önleyici, antialerjik, damar genişletici, kanser önleyici ve antiviral olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahip oldukları belirtilmiştir (52, 61, 62). Son yıllardaki araştırmalar PMF'lerin, hidroksillenmiş flavonlara kıyasla, daha fazla tümör önleyici, anti-metastatik ve antiinvaziv özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (61, 62, 115). Turunçgil kabuğunda bulunan bir PMF olan tangeretin (TAN), flavonlarda bulunan hidroksillenmiş grupların polimetilasyonu ile oluşur. Yapısında bulunan metoksi grupları bileşiğın lipofilikliğini ve böylece bağırsaklardan emilimini artırır. Ayrıca karaciğerde biyotransformasyona uğramaya karşı daha dayanıklı olmasını sağlar, dolayısıyla biyoyararlanımını artırır. Tangeretin *in vivo* ve *in vitro* yangı önleyici, antioksidan, kanser önleyici (akciğer, meme, kolorektal, gastrik, ağız içi gibi çeşitli kanser türlerinde) ve antidiyabetik etkinlik gösteren bir flavonoiddir (68, 89). Bu araştırma ile farelerde NOD'la indüklenen oksidatif hasara karşı TAN'in koruyucu etkilerinin araştırılması ve literatüre yeni bilgiler kazandırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Siyanobakteriler ve Siyanotoksinler

Siyanobakteriler içerdikleri, fikosiyanın ve diğer pigmentlerden dolayı mavi-yeşil görünürler ve “mavi-yeşil algler” olarak adlandırılırlar. Siyanobakteriler yeryüzünde sıcak su kaynaklarından Antartika'nın soğuk topraklarına kadar geniş bir yayılım gösterirler (39). Siyanobakteriler klorofil *a* ve çeşitli aksesuar pigmentleri sayesinde fotosentez yapan prokaryotik organizmalardır (113). Bu canlılar evrimsel açıdan büyük öneme sahiptir. Ayrıca atmosferdeki çözünmüş oksijen oranının artmasından sorumlu organizmalar oldukları düşünülmektedir (39).

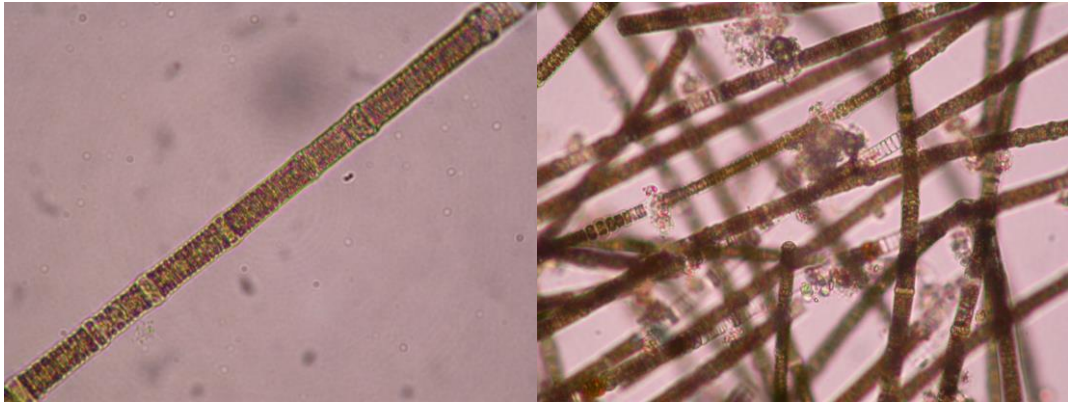
Siyanobakterilerde gerçek bir zarla çevrili çekirdek ve diğer organeller bulunmaz (113). Çekirdek zarı olmadığından DNA ve aksesuar pigmentleri sitoplazmada dağınık halde bulunur ve ribozomları prokaryotlara özgü 70 S yerine 80 S'lidir (116). Siyanobakterilerin hücre duvarı Gram-negatif mikroorganizmalardaki gibi peptidoglikan yapısındadır (15). Siyanobakteriler diğer bakterilerden fotosentez yapabilmeleri ve oksijen üretebilme özelliğine sahip olmaları bakımından farklılık gösterirler (113). Zarla çevrili çekirdekleri olmadığından “bakteri”, fotosentez yapabilme kabiliyetlerinden dolayı “alg” olarak sınıflandırılırlar (116).

Bütün siyanobakteriler klorofil-*a* içerdiklerinden yeşil ve çoğu da fikosiyanın ve allofikosiyanın gibi fikobiliproteinler içerdiklerinden mavi rengi alarak, bu organizmalara özgü mavi-yeşil renge sahip olurlar. Fikobiliproteinler tilakoid (fotosentetik) zar üzerinde fikobilizomlar olarak adlandırılan yapılarda bulunurlar. Bu yapılar fotosentez reaksiyonlarının II. merkezi (klorofil *a* I. merkez) olarak kabul edilir (113).

Siyanobakteriler zara-bağımlı organelleri olmamasına rağmen, çeşitli hücresel yapılara ve sitoplazmik cisimciklere sahiptir. Bu yapılar fikobilizomları içeren fotosentetik tilakoid zarlar, hücrenin ortasında bulunan sitoplazma ve nükleik asit bölgesidir (sarmal DNA). Bu hücreler glikojen granülleri (karbon depoları), sanofisin granülleri (aspartik asit ve arginden oluşan nitrojen depoları), fotosentetik enzim deposu olarak görev yapan ribuloz *1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz*dan oluşan karboksizomlar ve polifosfat granülleri gibi çeşitli besin ve metabolit depolarını ihtiva

ederler. Bu sitoplazmik cisimcikler hücrelerin enerji ve besin biriktirmesine yardımcı olurlar. Çeşitli planktonik cinslerde binlerce gaz kesecikleri bulunur. Bu kesecikler açık sularda yaşayan siyanobakter türlerinde yaygın olarak görülür. Protein moleküllerinden oluşan bu yapılar sayesinde canlı, keselerin içindeki gaz miktarını değiştirerek suda istediği derinlikte durabilir. Gaz kesecikleri fotosentez için siyanobakterinin ışık kaynağına doğru ilerlemesini ve böylece hücre ya da kolonilerinin canlılığının sürdürülmesini sağlar (113, 116).

Siyanobakteriler tek hücreli veya çok hücreli iplikli yapıdadır (Şekil 2.1) ve hücre büyüklüğü 0,5-60 µm'ye kadar değişebilir. Siyanobakterilerde eşeyli üreme görülmez. Üremeleri vejetatif bölünmeyle veya sporlar aracılığıyla olur (116). Kamçılı siyanobakterilerin çoğu fizyolojik, üreme ya da ekolojik rol oynayan farklı hücre tipleri üretebilirler. Bu formlar içinde en iyi bilinen formu heterosisttir. Kamçılı heterosist içeren siyanobakteri türleri, fotosentezin yanında azot tutma özelliğine de sahiptir. Bu kalın çeperli hücrelerde nitrojenaz enzimi bulunur, bu enzim azot gazını amonyağa ve sonra da aminoasite dönüştürür. Bu hücre tipi havanın serbest azotunu tutabilme yeteneği için gerekli değildir. Başka bir spesifik formu da uygun olmayan koşullar altında dönüştüğü akinet (spor hücreleri) formudur (113).



**Şekil 2.1.** Burdur Gölü'nden elde edilen *N. spumigena* ipliklerinin mikroskopta çekilmiş genel görünüşleri (56).

Siyanotoksinler kimyasal yapılarına göre halkasal peptidler, alkaloidler ve lipopolisakkaritler (LPS) olmak üzere üç gruba ayrılır (39, 98). Siyanobakteriyel toksinler ve etkiledikleri hedef yapılar Tablo 2.1'de sunulmuştur.

Siyanobakteri hücrelerinin parçalanması ya da ölmesi sonucu siyanotoksinler serbest hale geçer. Bazen sularda siyanobakteri sayısı az olduğu halde, siyanotoksin düzeyleri oldukça yüksek olabilir (98). Siyanobakterilerin toksin üretimini genetik faktörler (siyanobakter türü) ve çevresel koşullar (suyun sıcaklığı, pH'sı ve besin yoğunluğu) etkiler. Su sıcaklığı, fosfor ve azot miktarı arttığında toksin üretimi artar. Yapılan çeşitli araştırmalarda, *N. spumigena* patlamalarının ve siyanotoksin düzeylerinin özellikle Temmuz ve Ağustos aylarında arttığı belirtilmiştir (55, 72, 73, 98).

**Tablo 2.1.** Siyanobakteriyel toksinler ile etkiledikleri hedef yapılar (39).

| Toksin grubu              | Memelilerdeki hedef yapılar | Siyanobakteriler  |
|---------------------------|-----------------------------|---|
| <b>Halkasal peptidler</b> |                             |   |
| Mikrosistinler            | Karaciğer                   | <i>Microcystis</i> ,<br><i>Anabaena</i> ,<br><i>Planktothrix</i> ,<br><i>Nostoc</i> ,<br><i>Hapalosiphon</i> ,<br><i>Anabaenopsis</i> |
| Nodularinler              | Karaciğer                   | <i>Nodularia</i>  |
| <b>Alkaloidler</b>        |                             |   |
| Anatoksin-a               | Sinir sinapsları            | <i>Anabaena</i> ,<br><i>Planktothrix (Oscillatoria)</i> ,<br><i>Aphanizomenon</i>   |
| Silindrospermopsin        | Karaciğer                   | <i>Cylindrospermopsis</i> ,<br><i>Aphanizomenon</i> ,<br><i>Umezakia</i>  |
| Saksitoksin               | Sinir aksonları             | <i>Anabaena</i> ,   |

---

|                            |                     |                           |
|----------------------------|---------------------|---------------------------|
|                            |                     | <i>Aphanizomenon</i> ,    |
|                            |                     | <i>Lyngbya</i> ,          |
|                            |                     | <i>Clindrospermopsis</i>  |
| <b>Lipopolisakkaritler</b> | Maruz kalan dokular | Siyanobakterilerin tamamı |

---

## 2.1.1. Nodularinler

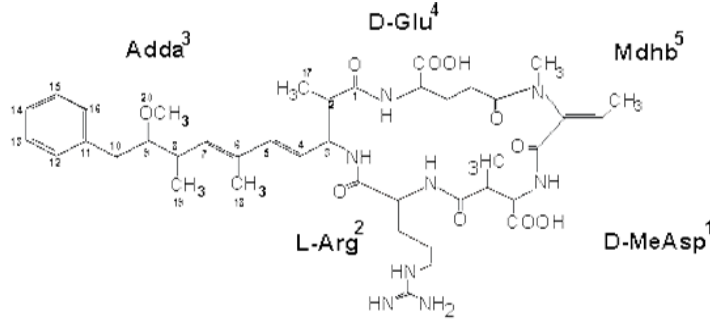
### 2.1.1.1. Kaynakları ve Habitatı

Nodularinler, kamçılı ve planktonik bir siyanobakteri olan *N. spumigena* tarafından sentezlenen ve genellikle acı-tuzlu göllerde bulunan siyanotoksinlerdir (94).

### 2.1.1.2. Kimyasal Yapı ve Özellikleri

Nodularinler ilk olarak 1988 yılında tanımlanmış ve yaklaşık olarak 9 farklı çeşidi keşfedilmiştir (11). Nodularinler halka yapısına (-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdhh) sahip pentapeptid bileşiklerdir. Molekül ağırlığı 824 Dalton'dur. Yapıda bulunan MeAsp, D-eritro-β-metilaspartik asit; L-Arg, L-arginine; Adda, (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metoksi-2,6,8,-trimetil-10-fenildeka-4(E),6(E)-dienoik asit; D-Glu, D-glutamik asit; Mdhh, 2-(metilamino)-2-(Z)-dehidrobütirik asittir (Şekil 2.2) (94, 112). Nodularinler yapısal ve biyolojik etkinlik bakımından mikrosistinlere benzer, zincirinde beş aminoasit bulunmasıyla ve halka yapısının daha küçük olmasıyla mikrosistinlerden ayrılırlar (11, 37).

Nodularin-R siyanobakteri patlamalarında ilk ve en fazla bulunan NOD formudur. Günümüze kadar doğal olarak oluşan dokuz NOD-R izoformu rapor edilmiştir: Lineer NOD-R, NOD-V (arjinin yerine L-valin grubu, motuporin), NOD-Har (arjinin yerine L-Homoarjinin), Adda'nın 6Z-stereoizomerini içeren bir toksik olmayan izoformu (Adda'nın C6-C7 çift bağı cis yapısına sahip), üç dimetillenmiş izoformu (Adda yerine DMeAdda, D-MeAsp yerine D-Asp, Mdhh yerine dhh), [MeAdda<sup>3</sup>]NOD ve [Glu<sup>4</sup>(OMe)]NOD'da fazladan metil grubu yer alan iki izoformu (11, 94, 112).



**Şekil 2.2.** Nodularin-R'nin kimyasal yapısı (112).

Nodularinlerin toksisitesinin D-Glu karboksil grubunun serbest olmasına ve Adda'nın 6E çift bağının bulunduğu halka yapısına bağlı olarak oluştuğu belirtilmiştir. Nodularinlerin bazı çeşitleri sentetik olarak da elde edilmiştir, ancak yalnızca NOD-R ticari olarak mevcuttur (11).

### 2.1.1.3. Çevresel Birikimi ve *N. spumigena* patlamaları

Tatlı sulardaki siyanobakteri patlamaları *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Anabaenopsis*, *Nostoc*, *Aphanizomenon* cinslerine mensup türler tarafından yaygın olarak şekillenmekte iken, acı-tuzlu sulardaki siyanobakteri patlamaları ise sadece *N. spumigena* tarafından ve daha seyrek şekillenmektedir (17, 73, 98). Fakat son yıllarda tatlı sularda da *N. spumigena* patlamaları bildirilmiştir (2). *N. spumigena*'nın baskın olduğu acı-tuzlu-sodalı göller genelde doğrudan su temini amaçlı kullanılmadığından, bu alg üzerine yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. *Nodularia* patlamaları Türkiye'de tatlı (2) ve acı göllerde (30, 53, 55), Avustralya acı göllerinde (34, 77), Amerika tuzlu göllerinde (5), Baltık Denizi'nde (33, 44, 47, 57, 72, 73, 74, 75, 110) ve Hazar Denizi'nde (80) bildirilmiştir. Türkiye'de *N. spumigena* patlamalarının acı sularda ilk olarak Haziran 1996 yılında Bafa Gölü'nde (53), tatlı sularda ilk olarak İznik Gölü'nde oluştuğu belirtilmiştir (2). Burdur Gölü'nün 2000'li yıllardan bu tarafa ötrifikasyon sürecine girdiği göz önüne alındığında *N. spumigena* patlamalarının arttığı görülmüştür (30, 55) (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** Burdur Gölü *N. spumigena* patlamaları (30.07.2011) (55).

Çeşitli araştırmacıların alg ve su örneklerinde tespit ettikleri NOD düzeyleri Tablo 2.2. ve Tablo 2.3’de sunulmuştur.

**Tablo 2.2.** Alg örneklerindeki NOD yoğunlukları.

| Bölge, Zaman                     | NOD yoğunlukları | Kaynaklar                    |
|----------------------------------|------------------|------------------------------|
| İznik Gölü, Haziran-Ağustos 2005 | 578 µg/g         | Akcaalan ve ark. (2)         |
| Gdańsk Körfezi, 1994             | <2,6 mg/g        | Mazur-Marzec ve ark. (73)    |
| 2001                             | <3,5 mg/g        |                              |
| 2003                             | <2,8 mg/g        |                              |
| 2004                             | <3,8 mg/g        |                              |
| 2005                             | <1,9 mg/g        |                              |
| Finlandiya Körfezi, Temmuz 2003  | 0,2-1,3 mg/g     | Karlsson ve ark. (49)        |
| Gdańsk Körfezi, 2001             | 3 000-3 520 µg/g | Mazur-Marzec ve Plinski (72) |
| 2002                             | 5-919 µg/g       |                              |

|  |                  |                                 |
|--|------------------|---------------------------------|
| Vistula Nehri Swibno çıkışı,<br>Temmuz sonu, 2002              | 712 µg/g         | Mazur-Marzec ve<br>Plinski (72) |
| Baltık Girişinde Sound ve Køge<br>Körfezi, Haziran- Eylül 2002 | 9,8 ± 7,0 mg/g   | Henriksen (33)                  |
| Finlandiya Körfezi, Ağustos 2000                               | 0,2-60 mg/g      | Laamanen ve ark. (59)           |
| Cape Town yakınında Zeekoevlei<br>sınırı, 1995                 | 3,47 µg/mg       | Harding ve ark. (32)            |
| Orielton Lagünü, Tazmania,<br>Ocak-Nisan 1993                  | 2 000-3 500 µg/g | Jones ve ark. (43)              |
| Finlandiya Körfezi ve Bothnia<br>Körfezi, 1990-1991            | 0,3-18,1 mg/g    | Kononen ve ark. (57)            |

**Tablo 2.3.** Su örneklerindeki NOD yoğunlukları.

| Bölge, Zaman                   | NOD Yoğunluğu   | Kaynaklar                    |
|--------------------------------|---|------------------------------|
| Burdur Gölü, Mayıs-Kasım 2011  | 4,82 µg/L   | Kocasarı ve ark. (55)        |
| Kuzey Baltık Denizi, 2000-2007 | 70-2 450 µg/L   | Kankaanpää ve ark. (47)      |
| Gdańsk Körfezi, 2005           | 1,9-3 964 µg/L  | Mazur-Marzec ve ark.<br>(74) |
| Gdańsk Körfezi, 2005           | <0,1 µg/L<br>6,8 µg/L                                     | Mazur-Marzec ve ark.<br>(75) |
| Finlandiya Körfezi, 2005       | <0,1 µg/L<br>0,6 µg/L<br>0,8 µg/L<br>0,1 µg/L<br>0,3 µg/L | Mazur-Marzec ve ark.<br>(75) |



|  |                                 |                           |
|--|---------------------------------|---------------------------|
| Gdańsk Körfezi, 2004-2005                                      | 0,3 ± 0,1 µg/dm <sup>3</sup>    | Mazur-Marzec ve ark. (73) |
|  | <0,1-2,9 µg/dm <sup>3</sup>     |                           |
|  | 25,852 ± 107 µg/dm <sup>3</sup> |                           |
|  | <34,5 µg/dm <sup>3</sup>        |                           |
|  | 4,2 + 0,2 µg/dm <sup>3</sup>    |                           |
|  | 0,9 + 0,2 µg/dm <sup>3</sup>    |                           |
|  | 3 964 ± 125 µg/dm <sup>3</sup>  |                           |
|  | 2 688 ± 312 µg/dm <sup>3</sup>  |                           |
|  | 68-95 µg/dm <sup>3</sup>        |                           |
|  | <2 µg/dm <sup>3</sup>           |                           |
| Baltık Denizi'nin farklı alanları,<br>Temmuz 2003              | 258 µg/L                        | Luckas ve ark. (67)       |
|  | 228 µg/L                        |                           |
|  | 149 µg/L                        |                           |
|  | 804 µg/L                        |                           |
|  | 404 µg/L                        |                           |
|  | 166 µg/L                        |                           |
|  | 158 µg/L                        |                           |
| Baltık Girişinde Sound ve Køge<br>Körfezi, Haziran- Eylül 2002 | 4-565 000 ng/L                  | Henriksen (33)            |

**Tablo 2.3.** Su örneklerindeki NOD yoğunlukları (devamı).

| <b>Bölge, Zaman</b>                                      | <b>NOD Yoğunluğu</b> | <b>Kaynaklar</b>             |
|--|----------------------|------------------------------|
| Gdańsk Körfezi, 2001- 2002                               | 90-18 135 µg/L       | Mazur-Marzec ve Plinski (72) |
|  | <12,6 µg/L           |                              |
|  | 0,3 µg/L             |                              |
|  | 0,6 µg/L             |                              |
| Kuzey Baltık Denizi, Finlandiya<br>26 Temmuz 2001        | 0,24 µg/L            | Spoof ve ark. (109)          |
| Kuzey Baltık Denizi, Finlandiya<br>26 Temmuz 2001        | 0,61 µg/L            | Spoof ve ark. (109)          |
| Kentucky Gölü, ABD, 2002                                 | <0,5 ppb             | Oehrle ve ark. (85)          |
| Batı Finlandiya Körfezi, Baltık<br>Denizi, Ağustos 1999  | <0,5-2,6 µg/L        | Kankaanpää ve ark. (46)      |
| Alexandrina Gölü ve Albert Gölü,<br>Ekim 1994-Mayıs 1995 | 0,02-1,7 µg/L        | Heresztyn ve Nicholson (34)  |

#### **2.1.1.4. Etki mekanizması**

Nodularinlerin etki mekanizması mikrosistinlere oldukça benzemektedir. Birincil hedef organ karaciğerdir. Nodularinler hidrofilik yapıya sahip oldukları için omurgalı canlılarda hücreye basit taşınma ile giremezler. Nodularinler omurgalı canlılarda hücrelere adenozin trifosfata (ATP)-bağımlı taşıyıcılarla girerler. Asidik yapıya sahip olduklarından spesifik olmayan organik anyonik bir taşıyıcı (safra asit taşıyıcı gibi) ile bağırsak epitel ve karaciğer hücrelerine girerler (94, 112). Hücre içine girişlerinin ardından PP1, PP2A ve PP3 enzimlerinin etkinliğini güçlü bir şekilde engellerler, proteinlerin hücre iskeletinde fosforilasyona sebep olurlar ve bu durum karaciğer hücrelerinde şekil bozukluğu ile sonuçlanır (11, 37, 94). Nodularinler PP1 ve PP3'ün etkinliğini, PP2A'ya kıyasla daha yüksek oranda engellemektedirler. Mikrosistinler fosfatlarla kovalent olarak bağlanırken, NOD'lar kovalent bağ ile

bağlanmaz, ancak bu durum inhibisyon etkinliklerini etkilemez. Yapılarındaki Adda grubu NOD'ların toksisitesi için çok önemlidir. Bu grup, enzimlerin hidrofobik kısmıyla etkileşerek ve substratın aktif kısma ulaşmasını engelleyerek inhibisyonu gerçekleştirir. Bu inhibisyon sonucu, hücresel proteinlerin fosforilasyonu artmaktadır. Hücrelerin ortasında bulunan iplikçi yapılar olan sitokeratin 8 ve 18'in fosforilasyonuna bağlı olarak, hücre iskeleti yeniden şekillenmekte ve bunun sonucunda da tüm hücre yapısında değişiklikler oluşmaktadır (11). Bu değişiklikler sonucunda komşu hücreler arasındaki temas azalır, sinüzoidal kapiller damarlar dayanıklılığını kaybeder ve bunun sonucunda karaciğerde iç kanamalar ve ciddi fonksiyon bozukluklarına bağlı ölümler meydana gelir (11, 94).

#### **2.1.1.5. Canlılar Üzerine Etkileri**

Nodularinler insan ve hayvanlarda güçlü karaciğer toksinleridir (94). Yapılan çalışmalar NOD'ların en yüksek miktarda karaciğerde, bunu takiben bağırsaklarda biriktiğini göstermektedir (39, 87). Safra asidi gibi spesifik olmayan organik anyon taşıyıcılar ile ince bağırsak ve karaciğer hücrelerine etkin taşımayla girmektedirler. Karaciğerde hücre iskelet düzeninde bozulma, lipid peroksidasyon, hücre zarının bütünlüğünde bozulma, DNA'nın çift sarmal yapısında bozulma ve kırılmalar, doku ölümü, nekroz ve iç kanamalara yol açarlar. Canlıların kan kaybına bağlı olarak gelişen şok sonucu hayatını kaybetmesine sebep olurlar (11, 94). Nodularinler mikrosistinlere göre daha küçük halkasal yapıya sahip olduğundan, karaciğer hücrelerine daha kolay girebilmektedirler. Bu durum NOD'ların karsinojenik özelliklerinin daha fazla olmasının sebeplerindendir (11).

İnsanlar siyanotoksinleri içme, kullanma ve arıtılmış sularla doğrudan ya da besinler aracılığıyla dolaylı yoldan alırlar. Laboratuvar hayvanları çalışmalar sırasında denek olarak kullanıldıkları için, vahşi ve evcil hayvanlar ise insanlar gibi içme ve kullanma sularıyla NOD'lara maruz kalırlar (11, 98). Son yıllarda yapılan çalışmalarda mavi-yeşil alg içeren sucul canlıların insanlar tarafından yenilmesi sonucu zehirlenme vakaları bildirilmiştir (98). Şimdiye kadar insanlarda NOD ile ilgili zehirlenmelere bağlı olarak ölüm olayları bildirilmemiş olmasına rağmen, uzun süreli temaslarda alerjik reaksiyonlar, deride tahriş ve sindirim sistemi rahatsızlıklarının

(kusma, ishal) görüldüğü belirtilmiştir (2, 72). Tablo 2.4 ile 2.5’de vahşi, evcil ve laboratuvar hayvanlarında görülen zehirlenme vakaları sunulmuştur.

**Tablo 2.4.** Vahşi ve evcil hayvanlardaki zehirlenme vakaları.

| <b>Vakalar</b>   | <b>Kaynaklar</b>     |
|--|----------------------|
| 1878 yılında Australian Gölü’nde koyun, at, domuz ve köpek ölümleri  | Francis (25)         |
| 1974’te Avusturalya bir çiftlikte 650 hayvan bulunan bir sürüde 3-4 yaşlarında ileri dönem gebe 33 koyunun ölümü | Main ve ark. (70)    |
| Güney Afrika’da 1 köpeğin ölümü  | Harding ve ark. (32) |
| 1984’te Temmuz-Ağustos aylarında Saaremaa Adası’nın 15 km’lik kıyı alanındaki merada 2 buzağının ölümü           | Olli (88)            |
| 1990’da Almanya Banter Denizinde 2 köpeğin ölümü   | Nehring (81)         |
| 1997’de Finlandiya Körfezi’nde 2 köpeğin ölümü   | ICES (40)            |

**Tablo 2.5.** Laboratuvar hayvanlarında görülen zehirlenme vakaları.

| <b>Vakalar</b>  | <b>Kaynaklar</b>       |
|---|------------------------|
| Bir deney sırasında 3 koyun ve 2 kobayın ölümü  | Main ve ark. (70)      |
| Nodularin ÖD <sub>50</sub> p.i dozu 50 µg/kg c.a. alan bir farenin ölümü                  | Eriksson ve ark. (22)  |
| Nodularin ÖD <sub>50</sub> p.i dozu 60 µg/kg c.a. alan bir farenin ölümü                  | Carmichael ve ark. (9) |
| <i>N. spumigena</i> ’dan elde edilen toksinin p.i 70 µg/kg c.a doz alan bir farenin ölümü | Runnegar ve ark. (102) |
| Açık denizden toplanan siyanobakter patlamalarının örneklerini alan farelerin ölümü       | Sivonen ve ark. (108)  |

---

Bir deney sırasında alabalık karaciğerinde artan derişimlerde Kankaanpää ve ark.  
NOD benzeri bileşiklerin birikmesi (45)

---

ÖD<sub>50</sub>: Öldürücü Doz<sub>50</sub> p.i: periton içi

#### 2.1.1.6. Oksidatif stres üzerine etkisi

Nodularinler O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ve OH<sup>•</sup> gibi ROS oluştururlar ve bu radikaller de organizmada lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın peroksidasyonuna sebep olarak oksidatif hasara sebep olurlar. Nodularinle indüklenmiş oksidatif stresin mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da, mikrosistinlerle NOD'ların ROS indüksiyon ve oksidatif DNA hasar kinetiğinin birbirinden farklı olduğu kanıtlanmıştır. Dışarıdan alınan desteklerle de koruyucu etki sağlanabileceği gibi, organizmanın oksidatif strese karşı kendi koruma sistemi de mevcuttur. Bu sistemler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimlerdir. Bu enzimler biyotransformasyon yoluyla oksidatif hasara karşı koruma oluştururlar. Sucul canlılarda (balık, midye, su piresi gibi) NOD'ların biyotransformasyonu, glutatyonun (GSH) tiyol grubunun glutatyon S-transferaz (GSH-T) ile N-metil dehidrobütirik asit kalıntılarına konjugasyonu ile başlar. Bu birleşmenin ürünleri ya mevcut şekliyle ya da γ-glutamil sistein konjugatıyla işlenerek atılır. Bunun sonucunda suda çözünürlük artar ve GSH ile konjugasyon toksinlerin atılımına yardımcı olur (11).

#### 2.1.1.7. Nodularin ile yapılan toksisite çalışmaları

Sıçan karaciğer hücre kültürlerinde NOD'un 24 saat öldürücü doz (ÖD<sub>50</sub>) değeri 62 ng/ml'dir. Sıçan karaciğerlerinin toksik olmayan dozlarda 2 ya da 10 ng/ml NOD'a 3, 24 ya da 48 saat maruziyet sonucunda oksidatif stresin olduğu tespit edilmiştir (112). Nodularin memelilerde spesifik bir karaciğer zehridir. Yüksek dozlarda akut maruziyeti takiben karaciğerde kanamalara ya da karaciğer yetmezliğine bağlı olarak ölüme sebebiyet vermektedir. Nodularin-R için farelerde periton içi (p.i) ÖD<sub>50</sub>'si 30-50 µg/kg iken, NOD-Har için farelerde p.i ÖD<sub>50</sub> canlı ağırlığa 70 µg/kg'dır (9).

Erkek Swiss farelere NOD p.i % 0,9'luk fizyolojik tuzlu su içinde 1, 5 ve 10 µg/kg c.a. dozunda 7 gün boyunca verilmiştir, 5 ve 10 µg/kg c.a. gruplarında karaciğer/canlı ağırlık oranının anlamlı şekilde arttığı ve SOD, CAT, GSH-Px

etkinliklerinin anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Bu etkiler NOD'un toksisitesine bağlı olarak gelişen oksidatif hasarı işaret etmektedir (63). F344 7 haftalık sıçanlardan oluşturulan gruplara, tek sefer p.i fizyolojik tuzlu su enjeksiyonunun 2 hafta sonrasında, 2 gün günde bir kez p.i 25 µg/kg c.a. NOD verilmiş, serumda testosteron seviyelerinde düşüş ve serumda düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) tespit edilmiştir. Testosteron seviyesindeki düşüşün olası sebeplerinin hipofiz bezinin fonksiyon bozukluğu ya da NOD'un testislerde direk toksisitesine bağlı olarak Leydig hücrelerinde gerçekleşen programlı hücre ölümünün olduğu vurgulanmıştır (93).

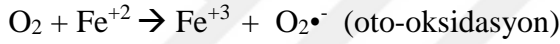
## 2.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan atom veya atom gruplarıdır. Enerji üretimi sırasında, metabolik işlemlerde ve elektron transferinde üretilmektedirler (26). Serbest radikallerin çoğu kararsız ve oldukça reaktiftir. Diğer moleküllerden elektron alabilir veya başka moleküllere elektron verebilirler, bu şekilde yükseltgeyici veya indirgeyici gibi davranabilirler (66). Eşleşmemiş elektron içermeleri bu moleküllerin reaktif, kısa yarı ömürlü ve kararsız olmasına neden olmaktadır (118).

Serbest radikaller hücrelerde devamlı olarak enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar sonucu oluşur. Enzimatik tepkimeler; hücresel solunum sırasında, fagositoz olayıyla, prostaglandin sentezinde ve mikrozomal enzim sisteminde gerçekleşebilir. Ayrıca serbest radikaller oksijen ile organik moleküller arasındaki enzimatik olmayan reaksiyonlarda da oluşturulabilir. Hücre homeostazının muhafaza edilmesi, sinyal transdüksiyonu, gen ekspresyonu ve reseptörlerin aktivasyonu gibi fonksiyonları kapsayan süreçlerin düzenlenmesindeki önemli bileşiklerdir (38). Fakat bu serbest radikaller ve diğer ROS'lar, canlı vücudundaki normal temel metabolik süreçler sonucu ya da çeşitli ksenobiyotiklere maruziyet nedeniyle fazla miktarlarda oluşabilirler. Hücrelerde ve dokularda aşırı üretimleri sonucu oksidatif stres durumunun ortaya çıkmasına ve böylece birçok hastalığın oluşmasına sebep olan oksijen içeren serbest radikallerden en önemlileri; OH•, O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>, hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve singlet oksijendir (66).

### 2.2.1. Süperoksit Anyonu

Süperoksit anyon radikali, enzimatik reaksiyon, oto-oksidasyon reaksiyonu ve bir elektronun moleküler oksijene aktarıldığı enzimatik olmayan elektron transfer reaksiyonları ile çoğunlukla mitokondri içerisinde üretilir. Süperoksit üreten enzimler; *ksantin oksidaz*, *lipoksijenaz*, *siklooksijenaz* ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH)'a bağlı *oksidaz*lardır. Düşük pH'da  $O_2^{\bullet-}$  veya hidroperoksil radikali ( $HOO^{\bullet}$ ) gibi iki şekilde bulunabilir. Hidroperoksil radikali en önemli formdur ve yüklü forma göre ( $O_2^{\bullet-}$ ) fosfolipid katmanlarından kolayca girebilir. Fizyolojik pH altında en çok görülen form  $O_2^{\bullet-}$ 'dir. İndirgeyici madde olarak hareket edebilir ve  $Fe^{+3}$ 'ün  $Fe^{+2}$ 'ye indirgendiği sitokrom-c ve demir-etilen diamintetraasetik asit (Fe-EDTA) gibi demir komplekslerini azaltır. Ayrıca yükseltgeyici madde olarak hareket edebilir ve askorbik asit ve tokoferolü oksitleyebilir (97, 111).



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

Elektronik olarak uyarılmış, yarı-kararlı moleküler oksijen formudur ve oldukça reaktiftir. Nötrofil ve eozinofillerin aktivasyonu ile *in vivo* üretilir. Ayrıca *lipoksijenazlar*, *dioksijenazlar* ve *laktoperoksidazlar* gibi enzimlerle katalize edilen bazı enzimatik reaksiyonlarla da oluşur. Doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek  $ROO^{\bullet}$  radikali oluşturabilir. DNA ve doku hasarına neden olabilen oldukça güçlü bir oksitleyici ajandır (97, 99).

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

Hidrojen peroksit, SOD tarafından katalize edilen reaksiyon sonucu *in vivo* olarak oluşur. Serbest radikal değildir, ancak nispeten düşük konsantrasyonlarda hücrenin hasar görmesine neden olabilir. Fakat daha yüksek seviyelerde *gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz* gibi hücresel enerji üreten enzimlerin etkinliğini engeller. Biyolojik membranlara kolaylıkla nüfuz edebilir. Hidrojen peroksit DNA üzerinde direkt etki göstermez. Fakat DNA'ya geçiş metallerinin varlığında  $OH^{\bullet}$  üreterek zarar

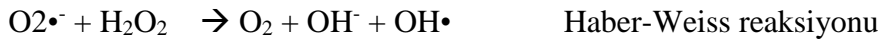
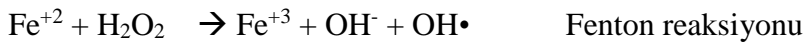
verebilir. Katalaz ve GSH-Px, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi ortadan kaldıracı başlıca antioksidan enzimlerdir (97, 76).

#### 2.2.4. Peroksil Radikali (ROO•)

Canlı organizmalarda oksijen kaynaklı oluşur. Peroksil radikalının en basit şekli, O<sub>2</sub>• protonlanması ile oluşur. Toplam O<sub>2</sub>•'nin yaklaşık % 0,3'ü tipik bir hücrenin sitozolünde protonlanmış formdadır. Yağ asidi peroksidasyonunu başlatır ve oluşan hasarın ilerlemesine yol açar (97).

#### 2.2.5. Hidroksil Radikali (OH•)

Hidroksil radikali, hidroksit iyonunun nötr şeklidir ve oldukça reaktif bir serbest radikaldir. DNA, proteinler, lipidler ve karbonhidratlar dahil olmak üzere hem organik hem de inorganik moleküller ile güçlü bir şekilde reaksiyona girebilir ve hücrelerde diğer ROS'ların yapabileceğinden çok daha ciddi hasarlara neden olabilir. Hidrojen peroksitin metal iyonlarıyla reaksiyona girdiği, sıklıkla ferritin ve seruloplazmin gibi farklı proteinlerle kompleks halinde bağlandığı Fenton reaksiyonunda oluşur. Oksidatif stres koşulları altında, aşırı O<sub>2</sub>• ferritinden demirin serbest kalmasına sebep olur ve serbest kalan demir, OH• oluşturmak için Fenton reaksiyonuna katılır. Ayrıca, Haber-Weiss reaksiyonu adı verilen bir reaksiyonda da O<sub>2</sub>• ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> arasındaki reaksiyon ile oluşur (64, 97).



### 2.3. Oksidatif Stres

Oksijenli solunum yapan organizmalarda serbest radikal oluşumunu önlemek ya da kontrol altında tutmak ve serbest radikallerin yıkıcı etkilerine karşı korunmak için antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Antioksidan mekanizmalar ve oksidan etkenler oksidatif denge halinde bulunur. Bu antioksidan mekanizmaların yetersiz kaldığı durumlarda denge bozulur ve oksidatif stres oluşur (50, 111). Hücrelerde ve dokularda aşırı ROS üretimi sonucu oluşan oksidatif stresi antioksidan sistem nötralize edemez ve sonuçta serbest radikaller lipidler, proteinler ve DNA'yla etkileşime



girerek, doku ve zarlarda hasara yol açarak bir dizi hastalığın (kanser, yangı, diyabet, yaşa bağlı göz hastalığı, Parkinson vb.) başlamasına neden olur (4, 50, 54, 111). Oksidatif stres oluştuğunda, hücreler oksidan etkilerini ortadan kaldırmaya ve savunma enzimleri, transkripsiyon faktörleri ve yapısal proteinleri kodlayan genlerin aktivasyonu ile redoks dengesini tekrar kazanmaya çalışırlar (6). Oksidatif stresin tespit edilmesi için organizmanın tamamının oksidatif hasar altında olması gerekmez. Belli bir organ, doku veya zarın hasara uğraması tespit için yeterlidir. Oksidatif stresle beraber oluşan ROS tipine bağlı olarak DNA, lipid ve protein gibi hücre bileşenlerine zarar verirler. Lipidler ROS'un toksik etkilerine karşı en duyarlı yapılardır ve serbest radikallerden en fazla lipidler etkilenmektedir. Serbest radikaller hücre zarının enzim ve reseptörlerine kovalent bağlanır ve hücrenin taşıma özelliği bozulur. Hücre zarında bulunan çoklu doymamış yağ asitleriyle yüksek oranda tepkimeye girer (31, 84, 100). Doymamış yağ asitleri hücre zarının akışkanlığını sağlamaktadır. Tepkime sonucu oluşan hasardan dolayı akışkanlıkta azalma olur ve lipid geçirgenliği artar. Böylece lipoproteinler kana geçer. Doymamış yağ asitlerinin yükseltgenmesi olayı "lipid peroksidasyon" olarak adlandırılmaktadır (29, 83). Lipid peroksidasyonu sonucunda lipid peroksitler ve malondialdehit (MDA) oluşur. Malondialdehit küçük moleküllü olup kolay difüze edildiği için DNA ile kolaylıkla reaksiyona girer. Lipid peroksidasyonu, oksidatif hücresel hasarın ve yaşlanmanın önemli bir biyolojik sonucudur. Antioksidan korumanın yetersiz kaldığı ve lipid peroksidasyonun arttığı durumlarda organizmada epoksitler üretilmektedir. Epoksitler hücrelerdeki nükleofilik yapılarla reaksiyona girerek sitotoksik, alerjik, mutajenik ve karsinojenik etkiler oluşturabilirler. Bu yapılar, oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, hücre büyümesinin engellenmesi veya hücre ölümü gibi olumsuz etkilere yol açabilir (4, 101, 118).

#### **2.4. Antioksidan Enzimler/Sistemler**

Organizmadaki serbest radikal oluşumunu ve meydana gelebilecek hasarı önleyen maddelere antioksidan adı verilir. Antioksidanlar hem hücre içinde hem de hücre dışı sıvıda bulunarak serbest radikal hasarını önlemektedir. Birincil etkileri zar yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu engellemesidir (119). Antioksidanlar oluşan serbest radikalleri kararlı hale getirir, serbest radikal üreten

kimyasal reaksiyonları durdurur veya reaksiyon hızını azaltır ve oksidatif hasar görmüş moleküllerdeki oluşan hasarları onarır (50).

Reaktif oksijen türleri fazla miktarda üretildiğinde ve savunma mekanizmaların yetersiz kaldığı durumlarda oksidatif stres belirtileri görülmektedir. Bu nedenle, dış kaynaklı antioksidanların uygulanması, bu oksidatif stresin üstesinden gelmede yardımcı olabilir. Serbest radikaller ve antioksidanlar konusundaki son gelişmeler, sağlık açısından umut vaat etmektedir. Son yıllarda bilim insanları antioksidan aktivitesi yüksek olan ve toksik olmayan doğal bileşiklerin araştırılması üzerine çalışmalarını yoğunlaştırmıştır (23, 31). Antioksidanlar serbest radikalleri ortadan kaldıran, hidrojen ve elektron verici, enzim baskılayıcı ve metalleri bağlayıcı maddeler olarak görev yaparlar. Antioksidanların iki temel etki mekanizması vardır. Birincisi, antioksidanın, sistemlerdeki serbest radikallere bir elektron vererek etki ettiği zincir kırma mekanizmasıdır. İkincisi, zincir başlatıcı katalizörün etkinliğini engelleyerek ROS başlatıcıların (ikincil antioksidanlar) uzaklaştırılmasını içeren mekanizmadır. Ayrıca antioksidanlar, elektron verme, metal iyonu şelasyonu veya gen ekspresyon regülasyonu gibi farklı mekanizmalarla biyolojik sistemlere etki edebilirler (66).

#### **2.4.1. Süperoksit Dismutaz**

Süperoksit dismutaz,  $O_2^{\bullet-}$ 'i  $O_2$  ve  $H_2O_2$ 'ye dönüştüren enzimdir. Aerobik hücrelerin hepsi SOD içerir. Enzim hücrelerdeki  $O_2^{\bullet-}$ 'yi etkisizleştirir ve zararlı etkilerinden korur. Oksijen kullanımı yüksek olan dokularda SOD aktivitesi daha yüksektir (48, 50).

#### **2.4.2. Katalaz**

Katalaz,  $H_2O_2$  ile reaksiyona girerek  $H_2O$  ve  $O_2$  oluşturur. Hidrojen peroksitin yüksek yoğunlukta olduğu durumlarda daha yüksek aktiviteye sahiptir (31).

#### **2.4.3. Glutatyon Peroksidaz**

Yapısında selenyum içeren bir enzim olan GSH-Px,  $H_2O_2$  ile hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlar. Glutatyon peroksidazın aktivitesindeki azalma sonucunda  $H_2O_2$

birikmesi ve hücre hasarı ortaya çıkar. Oksidatif strese karşı en etkili antioksidan olduğu bilinmektedir (26).

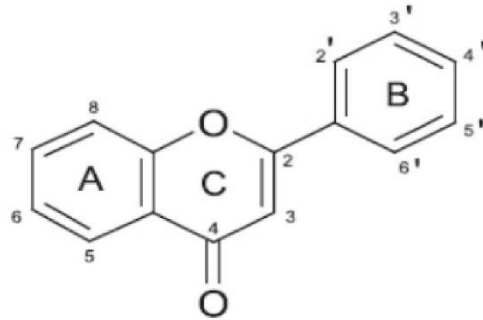
#### 2.4.4. Glutasyon

Glutasyon, GSH-Px ve GSH-R enzimleri ile  $H_2O_2$ 'yi  $H_2O$  ve  $O_2$  karşı detoksifiye etmeye ve işlevsel bütünlüğü için gerekli olan indirgenmiş durumda bulunan proteinlerin sisteinil-tiyol gruplarını korumaya yardımcı olur (79).

#### 2.5. Turunçgil Flavonoidleri

Gıdalardaki çeşitli biyoaktif bileşenlerin canlıların sağlığı üzerinde çok yönlü etkileri vardır (19). Flavonoidler doğada her yerde bulunan bitkisel kaynaklı ve çeşitli farmakolojik özellikleri olan polifenolik bileşiklerdir (65). Flavonoidler, genellikle turunçgillerde bulunan çiçek ve meyve renginden sorumlu pigmentlerdir. Bunlar düşük molekül ağırlıklı bileşikler olup, bitkiler alemi içinde sekonder metabolitler şeklinde yaygın olarak bulunurlar (13).

Bu polifenolik bileşikler bazik karakterde olup, 15-karbon atomlu kimyasal iskelete sahiptirler. Flavonoidler C6-C3-C6 heterosiklik iskelet yapısını içeren 2-fenil-benzo- $\gamma$ -piron çekirdeğine sahiptir ve heterosiklik piron halkasına (C) bağlanan iki benzen halkasından (A ve B) oluşurlar (Şekil 2.4) (65). Günümüzde, 9000'den fazla flavonoid tanımlanmıştır ve bunların bazıları klinik olarak kullanılmaktadır. Temel flavonoidlerin iskelet yapısına çok sayıda hidroksil ve metoksil grubunun bağlanması sonucu farklı bileşik sentezlenmektedir (13). Turunçgillerden elde edilen flavonoidler, C4'de bir karbonil grubu içeren bir benzo- $\gamma$ -piron yapısına sahiptir (65). Turunçgil flavonoidleri heterosiklik (C3) halkanın oksitlenmesine göre flavanonlar, flavonollar, flavonlar ve PMF'lere ayrılırlar (14).

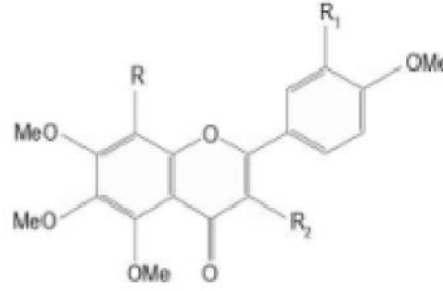


Şekil 2.4. Turunçgil flavonoidlerinin temel kimyasal yapısı (13).

Turunçgil flavonoidlerinde 60'dan fazla flavonoid çeşidi tanımlanmıştır. Flavanonlar en çok bulunan flavonoidlerdir, bunları flavonlar, flavonoller ve antosiyaninler (sadece kan portakallarında) izlemektedir (13).

### 2.5.1. Polimetoksiflavonlar

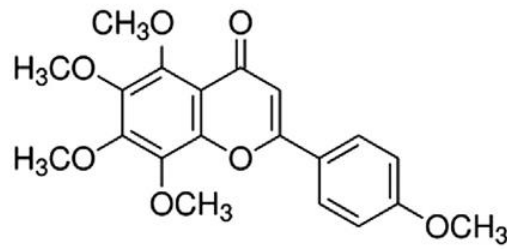
Turunçgiller flavonlar bakımından oldukça zengindir ve özellikle PMF A, B ve C halkalarında genellikle en az 4 adet metoksi grubuna sahiptirler (Şekil 2.5). Polimetoksiflavonlar özellikle *Citrus* cinsine bağlı portakal ve mandalında yüksek yoğunlukta bulunur. Şimdiye kadar turunçgillerden 20 çeşit PMF izole edilmiştir. Polimetoksiflavonların miktarı ve çeşidi turunçgilin türüne göre değişkenlik gösterir. Portakalda bulunan ana PMF'ler TAN ve nobiletindir (51, 65).



Şekil 2.5. Polimetoksiflavonların kimyasal yapısı (13).

#### 2.5.1.1. Tangeretin

Kimyasal yapısı 4',5,6,7,8-pentametoksiflavon olan TAN, turunçgillerin kabuklarında yüksek yoğunluklarda bulunan bir PMF'dur (Şekil 2.6). Kimyasal yapısı C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>, molekül ağırlığı 372 g/mol'dır (96).



Şekil 2.6. Tangeretin yapısı (61).

Tangeretin insan ve sıçan karaciğerlerinde sitokrom P450 sistemi ile demetilasyona uğrar (8, 114). Breinholt ve ark. (7) hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda TAN'ın 3 ana metabolitini tanımlamışlardır. Bunlar 4-desmetiltangeretin, 3,4-dihidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon ve 6,4-dihidroksi-5,7,8-trimetoksiflavon'dur. Nielsen ve ark. (82) sıçanlarda TAN'ın tekrarlanarak gavajla verilmesini takiben yaptıkları biyotransformasyon çalışmasında idrar ve dışkıda hem ana hem de diğer metabolitlerini tespit etmişlerdir. Sıçan idrarındaki ana metabolitleri 4-desmetiltangeretin ve 3,4-dihidroksi 5,6,7,8-tetrametoksiflavondur. Bu sebeple TAN'ın 4-metoksi grubunun demetilasyon için ana bölge ve 3-konumunun Faz 1 enzimleri tarafından yükseltgenme ve kopma için en uygun alan olabileceği düşünülmektedir (65). Özellikle antioksidan ve yangı önleyici özellikleriyle dikkat çeken TAN'ın son yıllarda yapılan çalışmalarda kanser önleyici, hipolipidemik, antialerjik ve antimikrobiyal etkileri olduğu da belirtilmiştir (89, 96).

Omar ve ark. (89) sıçanlarda cis-platinle indüklenen akut karaciğer hasarına karşı TAN'ın koruyucu etkinliğini araştırmışlardır. Tangeretin tümör nekroz faktör  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )'yı baskıladığı, interlökin-10 (IL-10) arttırdığı, MDA, nitrik oksit (NO) ve nükleer faktör (eritroid türevi-2) benzeri-2 (Nrf-2) düzeylerini azalttığı, GSH ve GSH-Px düzeylerini yeniden yapılandığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar TAN'ın yangıyı, oksidatif hasarı ve apoptotik hücre ölümünü önlediğini belirtmişlerdir. Lakshmi ve Subramanian (62) 7,12 dimetilbenz-*a*-antrasen (DMBA) ile meme kanseri oluşturulan sıçanlarda böbrek dokularındaki oksidatif hasar üzerine TAN'ın koruyucu etkinliğini araştırmışlardır. Tangeretin böbrek dokusunda enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan düzeyleri arttırdığı, lipid peroksidaz düzeyleri ile DNA hasarı ve yangısal sitokinleri önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir. Benzer şekilde mRNA, protein ve immunohistokimyasal analizlerde TAN'ın, böbrekte yangısal sitokinler ve proteinlerin düzeylerini azalttığını, Nrf2/Keap 1 ekspresyonunu önemli ölçüde normal düzeylerine getirdiğini bildirmişlerdir. Dimetilbenz-*a*-antrasenin O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, OH<sup>•</sup> ve NO gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumunu indüklediği, bunun sonucunda böbrek hücrelerinde ve makromoleküllerde hasar olduğu belirtilmiştir. Tangeretin antioksidan özelliği vasıtasıyla serbest radikallerin oluşumunu engellediği ve oluşan hasarları önlediği tespit edilmiştir.

Periyasamy ve ark. (96) 7,12 DMBA ile meme kanseri oluşturulan sıçanlarda meme dokularındaki tumoral oluşumlar ve oksidatif hasar üzerine TAN'ın koruyucu etkinliğini araştırmışlardır. Araştırmacılar bu amaçla kontrol, DMBA, TAN+DMBA, DMBA+TAN ve TAN verilen gruplar olmak üzere 5 grup oluşturmuşlar. DMBA verilen grupta NO ve MDA gibi oksidatif stress parametrelerinde artma, SOD, CAT, GSH-Px ve GSH gibi antioksidan sistemlerinde önemli düzeyde azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Tangeretin'in DMBA'dan önce ve sonra verildiği gruplarda NO ve MDA düzeylerinde önemli düzeyde azalma, SOD, CAT, GSH-Px ve GSH düzeylerinde artma olduğunu belirtmişlerdir. Tangeretin'in tek başına verildiği grupta kontrole göre antioksidan enzim düzeylerinde önemli değişiklik olmadığını bildirmişlerdir.

Shu ve ark. (106), TAN'ın LPS ile uyarılan primer sıçan mikroglialında ve BV-2 hücrede mikroglial aktivasyonu baskılandığını göstermiştir. Tangeretin'in RAW264.7 hücrelerinde LPS ile indüklenen NO üretimini azalttığı belirtilmiştir (12). Chen ve ark. (10) IL-1 $\beta$  ile indüklenen mitojen-aktif protein kinaz (MAPK), c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve Akt P38 etkinliği baskılayan siklooksijenaz-2 (COX-2) ekspresyonunun TAN ile baskılandığını bildirmişlerdir. Tavşan sinoviyal hücrelerinde IL-1 ile indüklenen ön MMP-9/projelatinaz B üretiminin TAN ile baskılandığı belirtilmiştir.

Flavonoidlerin yangı önleyici etkilerinin organizmada oluşan serbest radikalleri yok etmesiyle ilişkili olduğu belirtmiştir. Süperoksit radikali gibi serbest radikaller organizmada fazla miktarda oluşmaktadır. Bu radikaller daha reaktif ve hasar verici radikallere dönüşebilir. Örneğin O<sub>2</sub><sup>-</sup> su ya da ferri demir iyonu varlığında Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları sonucu hızla OH radikaline dönüşür (65). Flavonoidlere olan farmakolojik ilgi, Fazilatun ve ark. (24) bazı flavonoidlerin O<sub>2</sub><sup>-</sup>'yi yok ettiğini tespit etmesiyle başlamıştır.

Flavonoidlerin hücre çoğalmasını önleyici etkilerinin karsinogenezi ve anjiyogenezi engellemeleri sonucu olduğu belirtilmiştir. Tangeretinle ilgili güvenilirlik çalışmalarında organ fonksiyonlarını olumsuz etkilemediği ve genotoksisiteye yol açmadığı bildirilmiştir (96). Tangeretin'in, akciğer (10) ve kolorektal karsinoma hücrelerinde hücre çoğalmasını engellediği (91), mide kanser

(20) ve lösemi hücrelerinde apoptozu indüklediği (35), aortik düz kas hücrelerinde proliferasyon ve metastazı engellediği (104) saptanmıştır. Ayrıca TAN'ın sinir hücre koruyucu (16) ve hipolipidemik (58) ve *in vitro* ksenobiyotik kaynaklı genotoksisiteye karşı güçlü bir engelleyici etkinliği (60) olduğu bildirilmiştir.



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Kimyasal Maddeler

İsofluran (Adeka),  
Nodularin (Enzo ALX-350-061-C250),  
Tangeretin (Sigma T8951),  
SOD kit (Rat superoxide dismutase ELISA kit SRB-T-84380),  
Potasyum sodyum tartarat (Merck SK.M108087),  
Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat redüktaz (NADPH) (TCI T0521),  
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma L3771),  
Sodyum potasyum tartarat (Sigma-Aldrich S2377),  
Bakır sülfat (CuSO<sub>4</sub>) (Aldrich 451657),  
Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) (Sigma E5134),  
Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck 106482),  
Potasyum dihidrojen fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Merck 104873),  
Asetik asit (Smyras 64-19-7),  
Bütanol (B4800/17),  
Trikloroasetik asit (TCA) (Merck 100810),  
Disodyum hidrojen fosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Merck 106580),  
Ditiyobisnitrobenzoik asit (DTNB) (TCI D0944),  
Tiyobarbitürik asit (TBA) (Sigma T5500),  
Glutatyon redüktaz (GSH-R) (Sigma G3664),  
*t*-Bütilhidroperoksit (Aldrich 458139),  
Sodyum klorür (NaCl) (Merck 106400),  
Piridin (Sigma-Aldrich 270970),  
Tris (Sigma T1503),  
İndirgenmiş glutatyon (Sigma G4251),  
Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Merck 107209).



### **3.1.2. Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri**

ELISA okuyucu (ELx800, Biotek),  
Soğutmalı santrifüj (Eppendorf-5810R),  
Magnetik karıştırıcı (IKA-RH Basic 2),  
Vorteks (Yellowline TTS2),  
Homojenizatör (IKA),  
Otoanalizör (gesanChem-200),  
Su banyosu (Memmert WNB 14),  
pH metre (Metrohm 704),  
Spektrofotometre (Shimadzu-1700),  
Hassas terazi (BX 4200H),  
Analitik terazi (Shimadzu AY-220).

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Etik**

Araştırma, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 21/09/2016 tarihli toplantısında alınan 21 nolu karar doğrultusunda gerçekleştirildi.

### **3.2.2. Hayvan Materyali**

Araştırmada kullanılan fareler Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edildi ve aynı yerde deneysel uygulamalar gerçekleştirildi.

### **3.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Protokolü**

Bu araştırmada kontrol, TAN, NOD ve TAN+NOD birlikte verildiği grup olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu. Her bir grupta 14 adet olmak üzere toplam 56 adet (yaklaşık 25-30 g ağırlığında 10-12 haftalık) Balb/c Albino ırkı erkek fare kullanıldı. (Tablo 3.1). Hayvanlara *ad libitum* pelet yem ve su verildi. Hayvanlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodunda 21-23 °C sıcaklık ve % 60-80 nem ortamında tutuldu. Deneme süresi boyunca hayvanlara % 24 ham protein, % 6,19 ham selüloz ve 3100 Kcal/kg metabolik enerji içeren fare pelet yemi verildi.

Hayvanlara verilen NOD dozu Lankoff ve ark. (2002), TAN dozu ise Omar ve ark. (2016) yaptıkları araştırmalardan yararlanılarak belirlendi. Tangeretin % 0.1'lik dimetilsülfoksit (DMSO) içeren % 0,9'luk NaCl, NOD ise % 0,9'luk NaCl içinde çözdürüldü ve maddelerin hepsi p.i uygulandı.

**Tablo 3.1.** Araştırmadaki gruplara verilen maddeler ve verildiği günler.

| <b>Deney Grupları</b> | <b>Verilen maddeler</b>  | <b>Verildiği günler</b> |
|-----------------------|--|-------------------------|
| Kontrol               | % 0,1 DMSO içeren % 0.9'luk NaCl p.i   | 4-10.                   |
| TAN                   | 100 mg/kg/c.a/gün p.i (% 0, 1 DMSO içeren % 0.9'luk NaCl)  | 4-10.                   |
| NOD                   | 15 µg/kg/c.a/gün p.i (% 0.9'luk NaCl)  | 4-10.                   |
| TAN+NOD               | İlk 3 gün 100 mg/kg/c.a/gün TAN p.i<br>4. günden itibaren 100 mg/kg/c.a/gün TAN p.i +<br>15 µg/kg/c.a/gün NOD p.i. | 1-10.                   |

### **3.2.4. Örneklerin Toplanması**

Çalışma 11. günde sonlandırıldı, hayvanların tamamı % 2-3 oranında izofluran (inhalasyon) ile anesteziye alınarak kalpten kan alma işlemi gerçekleştirildi. Hayvanlar anestezi altındayken servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi edildi, kan ve karaciğer örnekleri alındı.

### **3.2.5. Kan ve Doku Analizleri**

Direkt olarak tüplere alınan kanlar 4000 devirde 10 dakika santrifüj edildi ve serumda *aspartat aminotransferaz* (AST) ve *alanin aminotransferaz* (ALT) değerleri otoanalizör ile ölçüldü. Hemogloblin (Hb) değerleri ve hemolizatın hazırlanması için kanlar K<sub>3</sub>EDTA içeren tüplere alındı. Hemogloblin değerlerine otoanalizör ile bakıldı.

#### **3.2.5.1. Eritrositlerin Yıkılması ve Hemolizatın Hazırlanması**

Kan K<sub>3</sub>EDTA içeren tüplere alınıp 4 °C'de 4000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek plazma kısmı ayrıldı. Analiz yapılmıyaca kadar -20 °C saklandı. Kalan kısma hacminin 3 katı oranında tuzlu fosfat tampon çözeltisi (pH 7,4) eklendi ve 4000 devirde 5 dakika süreyle santrifüj edilip üstte kalan kısım atıldı. Bu işlem aynı şekilde

3 kez tekrarlandı ve 1 ml eritrosit kısmından alınarak 1:1 hacimde tuzlu fosfat tampon çözeltisi eklendi. Örnekler analiz aşamasına kadar -20 °C’de saklandı.

### **3.2.5.2. Karaciğer Dokularının Homojenizasyonu ve Homojenatın Hazırlanması**

Karaciğer dokuları ilk önce % 0,9’luk NaCl ile yıkandı ve dokular 1:5 oranında hazırlanan tampon çözeltisi (140 mM KCl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/L; 950 ml deiyonize suda çözdürülerek 5 N NaOH ile pH’sı 7,2’ye ayarlandı ve 1000 ml’ye tamamlandı) ile sulandırılarak homojenize edildi. Örnekler analiz aşamasına kadar -20 °C’de saklandı.

Eritrositlerde ve karaciğer dokusunda CAT ve GSH-Px aktiviteleri ve GSH düzeyleri ile serumda ve karaciğer dokularında SOD aktivitesi ve MDA düzeyleri ölçüldü.

### **3.2.5.3. Süperoksit Dismutaz Analizi**

Serum ve karaciğer örneklerindeki SOD aktiviteleri ticari kit (Rat Super Oxidase Dismutase ELISA Kit SRB-T-84380) kullanılarak yapıldı. Analiz kitte belirtilen prosedüre göre gerçekleştirildi. Standart kuyucuklarına standart solüsyonlarından 50 µl, örnek kuyucuklara ise 40 µl serum/doku örneği +10 µl SOD antikoru konuldu. Sonra bu kuyucukların üzerine 50 µl Streptavidin-HRP çözeltisi ilave edildi. Blank kuyucukları boş bırakıldı. Mikropleyt 37 °C’de 60 dakika bekletildi. Kuyucuklar yıkama çözeltisi ile 5 kez yıkandı. Her bir kuyucuğa sırasıyla 50 µl kromojen A çözeltisi ve 50 µl kromojen B çözeltisi ilave edilerek 37 °C 10 dakika karanlıkta bekletildi. Ardında kuyucuklara 50 µl stop çözeltisi konularak iyice karıştırıldı ve 450 nm’de 10 dakika içinde ELISA okundu. Serum ve doku örneklerinde ölçülen SOD aktivitesi sırasıyla U/ml ve U/g protein olarak ifade edildi.

### **3.2.5.4. Katalaz Analizi**

Eritrosit ve karaciğer doku örneklerinde CAT aktiviteleri Aebi’nin (1) bildirdiği yöntemle yapıldı. Katalaz analizinin prensibi, ortama eklenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’nin örneklerdeki CAT’ın tarafından parçalanması esasına dayanır. Homojenat veya hemolizattan 50 µl alındı ve üzerine 200 µl distile su eklendi (1:5 oranında seyreltildi). Bu karışımdan 50 µl alınarak 4950 µl fosfat tamponu ilave edildi ve 1:100 oranında

ikinci seyreltme yapıldı (toplam seyreltme oranı 1:500). Eş zamanlı olarak kör ve örnek için 2 ml süpernatant alındı, köre 1 ml fosfat tampon çözeltisi, örneğe ise 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PBS çözeltisi eklendi. Absorbanslar 240 nm'de köre karşı 0. ve 30. saniyelerde spektrofotometrede okundu. Eritrosit ve doku örneklerinde ölçülen CAT aktivitesi sırasıyla k/g Hb ve k/g protein olarak ifade edildi.

### **3.2.5.5. Glutatyon Peroksidaz Analizi**

Eritrosit ve karaciğer doku örneklerindeki GSH-Px aktiviteleri Paglia ve Valentine'nin (90) bildirdiği yönteme göre yapıldı. Yöntemin prensibi, kofaktör olarak kullanılan NADPH varlığında GSH-Px tarafından üretilen okside GSH'ın, GSH-R tarafından indirgenmesi esasına dayanır. Analizde kör ve örnek tüplere sırasıyla 100 µl Tris-EDTA (1 M Tris tamponu ve 5 µM EDTA ile hazırlandı), 20 µl 0,1M indirgenmiş glutatyon, 100 µl 10 U GSH-R, 100 µl 2 µM NADPH, 10 µl hemolizat/homojenat ve distile su (köre 670 µl, örneğe 660 µl ) ilave edilerek 37 °C'de 10 dakika bekletildi. Reaksiyon örnek tüplere 10 µl 7 µM t-bütillhidroperoksit eklenmesiyle başlatıldı. Ardından 340 nm'de 0. ile 150. Saniyelerde spektrofotometrede ölçüm yapıldı. Eritrosit ve doku örneklerinde ölçülen GSH-Px aktivitesi sırasıyla U/g Hb ve U/g protein olarak ifade edildi.

### **3.2.5.6. Glutatyon Analizi**

Eritrosit ve karaciğer doku örneklerinde GSH düzeyleri Sedlak ve Lindsay'ın (103) bildirdiği yöntem esas alınarak yapıldı. Bu yöntemin prensibi, bir tiyol bileşiği olan GSH'ın DTNB ile reaksiyona girip disülfit bağı kırarak 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB) maddesini oluşturması esasına dayanır. Glutatyon analizinde 700 µl hemolizat (kör için distile su) alındı ve üzerine 700 µl % 15'lik TCA ilave edilerek 2500 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Sonra 500 µl süpernatant alınarak üzerine sırasıyla 2 ml Tris-EDTA ve 100 µl 0,01 M DTNB eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra absorbans köre karşı 412 nm'de spektrofotometrede okundu. Eritrosit ve doku örneklerinde ölçülen GSH düzeyi sırasıyla U/g Hb ve U/g protein olarak ifade edildi.

### 3.2.5.7. Malondialdehit Analizi

Serum ve karaciğer doku örneklerinde MDA düzeylerinin ölçümü Ohkawa ve ark. (86) bildirdiği yöntemle göre yapıldı. Yöntemin prensibi asidik ortamda tiyobarbitürik asit ile lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA'nın oluşturduğu pembe renkli ürünün spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanır. Analiz için 200 µl serum/doku homojenizatı alınarak üzerine 100 µl % 8,1 SDS ilave edildi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Kör için distile su kullanıldı. Sonra üzerine sırasıyla 750 µl % 20'lik asetik asit (pH: 3,5) ve 750 µl % 0,6 TBA eklendi. Kaynar su banyosunda 60 dakika bekletildi ve oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Daha sonra 2,5 ml butanol:piridin (15:1) karışımı eklenerek organik (pembe) tabaka ayrıldı. Absorbans spektrofotometrede 532 nm'de köre karşı okundu. Serum ve doku örneklerinde ölçülen MDA düzeyleri sırasıyla nmol/ml ve nmol/g protein olarak ifade edildi.

### 3.2.5.8. Karaciğer Örneklerindeki Total Protein Analizi

Dokulardaki total protein yoğunluğu Gornal ve ark. (27) bildirdiği Biüret metoduna göre yapıldı. Yöntemin prensibi Biüret ayırıcında bulunan  $Cu^{+2}$  nin proteinlerin yapısındaki azot atomları ile mavi renkli kompleks oluşturması ve bu kompleksin 540 nm'de absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır. Analizde 1 ml homojenat üzerine (kör için 1 ml su üzerine) 4 ml Biüret ayırıcı (Na-K tartarat+ $CuSO_4$ ) karıştırılarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Absorbans 540 nm'de spektrofotometrede okundu.

### 3.2.5.9. Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal İnceleme

Nekropsi sırasında toplanan karaciğer örnekleri % 10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda 2 gün bekletilerek tespit edildi. Leica ASP300S model ototeknikon kullanılarak rutin takip prosedüründen geçirilen örnekler parafine bloklandı. Bloklardan, 4-5 saat soğutulmanın ardından Leica 2155 rotary mikrotom ile 5 µm kalınlığında seri kesitler alınarak histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak incelemelerde kullanıldı. Normal lama alınan kesitler hematoksilin eozin (HE) ile boyandı. Bu işlem için karaciğer kesitleri parafinin uzaklaştırılması için 30'ar dakika süre ile 3 ayrı ksilol serisinden geçirildi. Ardından sırasıyla % 100, 96, 90, 80 ve 70'lik

alkollerden geçirilerek dokulara su verildi. Daha sonra hematoksilinle 15 dakika ve ardından eozinle 3 dakika boyandı. Bunun ardından sırasıyla % 70, 80, 90, 96 ve 100'lük alkollerden geçirilen dokuların suyu alındı. Ksilolde parlatılan dokuların üzerine entellan damlatılarak lamel yapıştırıldı ve mikroskop altında incelendi.

Immunohistokimyasal incelemeler için parafine gömülmüş karaciğer dokularından 4 kesit alınarak kaspaz-3, proliferasyon hücre nükleer antijeni (PCNA), iNOS (indüklenebilir nitrik oksit sentetaz) ve TNF- $\alpha$  antiserumu kullanılarak boyandı. İmmunohistokimyasal incelemeler için primer ve sekonder antikolar Abcam (İngiltere) firmasından temin edildi. Primer antiserum olarak aktif kaspaz-3 için [Anti-Caspase-3 antibody (ab4051), 1/100 dilüsyon], PCNA için [Anti-PCNA antibody (ab1819), 1/100 dilüsyon], iNOS için [Anti-iNOS antibody (ab15323), 1/100 dilüsyon] ve TNF- $\alpha$  için [Anti-TNF alpha antibody (ab6671), 1/100 dilüsyon] kullanıldı. Sekonder kit olarak EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC kit (ab80436) kullanıldı. İmmunoperoksidaz yöntemi için streptavidin-biotin kompleksi peroksidaz metodu uygulandı. Kesitler ksilol ve dereceli alkollerden geçirilerek deparafinize ve rehidre edildi. Dokular 10 dakika süreyle PBS çözeltisi ile yıkandı. Daha sonra dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini gidermek amacıyla % 3'lük metanoldeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 20 dakika muamele edildi. Dokular 2 defa 10'ar dakika süreyle PBS'de yıkandı. Ardından dokular non spesifik boyamaları önlemek amacıyla normal serumda 45 dakika süreyle tutuldu. Bu aşamadan sonra yıkama yapılmadan dokulara primer antiserumlar döküldü ve bir gece bekletildi. Daha sonra dokular aynı şekil ve süreyle PBS'te yıkandı, takiben komplement ile 30 dakika süreyle muamele edildi ve PBS'te 2 defa 10'ar dakika yıkandı. Bu işlemden sonra dokular konjugat ile 30 dakika süreyle muamele edildi. Dokular aynı şekil ve süreyle yıkandı ardından DAB kromojen ile boyandı. Karşıt boyama için Harris hematoksilin kullanıldı ve lamel ile kapatılan preparatlar ışık mikroskopunda incelendi.

### **3.3. İstatistiksel Hesaplamalar**

Sonuçlar aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata (SE) ile ifade edildi. Elde edilen verilerin öncelikli olarak Kolmogorov-Smirnov testi ile parametrik-nonparametrik olup olmadıkları analiz edildi. İstatistiksel yöntem olarak One-Way ANOVA testi uygulandı ve gruplar arasındaki olası farklılıklar Tukey testi ile belirlendi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Biyokimyasal Parametreler

Nodularin verilen grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum AST ve ALT değerlerinde önemli düzeyde ( $p<0,05$ ) artış tespit edildi. TAN+NOD'un birlikte verildiği grupta ise, NOD tek başına verildiğinde artan AST ve ALT değerlerinde önemli düzeyde ( $p<0,05$ ) düşüş olduğu belirlendi (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** Araştırma gruplarının serum AST ve ALT düzeyleri.

| Parametreler | Gruplar                  |                          |                         |                          |
|--------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
|              | Kontrol                  | NOD                      | TAN                     | TAN+NOD                  |
| AST          | 111,65±6,64 <sup>b</sup> | 312,70±5,25 <sup>d</sup> | 83,16±4,48 <sup>a</sup> | 182,06±5,77 <sup>c</sup> |
| ALT          | 41,44±2,90 <sup>a</sup>  | 152,28±5,85 <sup>c</sup> | 33,00±1,39 <sup>a</sup> | 86,85±2,12 <sup>b</sup>  |

Değerler aritmetik ortalama ± standart hatayı ifade eder.

a, b, c, d Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ( $p<0,05$ ).

ALT: U/L AST:U/L

### 4.2. Antioksidan-Oksidatif Stres Parametreleri

Nodularin verilen grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kanda MDA düzeyinde önemli ( $p<0,05$ ) bir artış; SOD, CAT ve GSH-Px enzimlerinin etkinliği ile GSH düzeyinde ise önemli ( $p<0,05$ ) bir düşüş tespit edildi. TAN+NOD'un birlikte verildiği grupta ise, NOD tek başına verildiğinde artan MDA düzeyinde önemli ( $p<0,05$ ) bir düşüş, SOD, CAT ve GSH-Px enzimlerinin etkinliği ile GSH düzeyinde ise önemli ( $p<0,05$ ) bir artış belirlendi (Tablo 4.2).

Nodularin verilen grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında karaciğerde MDA düzeyinde önemli ( $p<0,05$ ) bir artış; SOD, CAT ve GSH-Px enzimlerinin etkinliği ile GSH düzeyinde ise önemli ( $p<0,05$ ) bir düşüş tespit edildi. TAN+NOD'un birlikte verildiği grupta ise, NOD tek başına verildiğinde artan MDA düzeyinde önemli ( $p<0,05$ ) bir düşüş; SOD, CAT ve GSH-Px enzimlerinin etkinliği ile GSH düzeyinde ise önemli ( $p<0,05$ ) bir artış belirlendi (Tablo 4.3).

**Tablo 4.2.** Araştırma gruplarının kan SOD, CAT ve GSH-Px enzim etkinliği ile GSH ve MDA düzeyleri.

| Parametreler | Gruplar                  |                          |                          |                          |
|--------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|              | Kontrol                  | NOD                      | TAN                      | TAN+NOD                  |
| SOD          | 133,79±3,88 <sup>c</sup> | 37,08±0,77 <sup>a</sup>  | 112,32±1,98 <sup>c</sup> | 74,09±1,63 <sup>b</sup>  |
| CAT          | 77,48±0,95 <sup>c</sup>  | 27,23±0,79 <sup>a</sup>  | 80,19±0,96 <sup>c</sup>  | 46,05±0,73 <sup>b</sup>  |
| GSH-Px       | 81,25±1,66 <sup>c</sup>  | 53,99±0,47 <sup>a</sup>  | 84,33±1,31 <sup>c</sup>  | 63,10±0,83 <sup>b</sup>  |
| GSH          | 0,67±0,02 <sup>c</sup>   | 0,11±0,01 <sup>a</sup>   | 0,69±0,03 <sup>c</sup>   | 0,37±0,02 <sup>b</sup>   |
| MDA          | 33,08±1,76 <sup>a</sup>  | 245,95±6,17 <sup>c</sup> | 35,64±0,73 <sup>a</sup>  | 137,58±5,52 <sup>b</sup> |

Değerler aritmetik ortalama ± standart hatayı ifade eder.

a, b, c, d. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ( $p<0,05$ ).

CAT: Katalaz (k/g Hb) GSH: Glutasyon (U/g Hb) MDA: Malondialdehit ( $\mu$ M/ml)

GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz (U/g Hb) SOD: Süperoksit Dismutaz (U/ml)

**Tablo 4.3.** Araştırma gruplarının karaciğer SOD, CAT ve GSH-Px enzim etkinliği ile GSH ve MDA düzeyleri.

| Parametreler | Gruplar                    |                            |                            |                            |
|--------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|              | Kontrol                    | NOD                        | TAN                        | TAN+NOD                    |
| SOD          | 1279,01±40,01 <sup>d</sup> | 685,05±21,26 <sup>a</sup>  | 1087,43±24,30 <sup>c</sup> | 832,80±11,21 <sup>b</sup>  |
| CAT          | 287,89±2,90 <sup>b</sup>   | 126,26±4,36 <sup>a</sup>   | 408,62±10,01 <sup>c</sup>  | 297,87±2,85 <sup>b</sup>   |
| GSH-Px       | 85,75±1,90 <sup>b</sup>    | 37,85±1,19 <sup>a</sup>    | 136,78±2,75 <sup>c</sup>   | 82,56±1,51 <sup>b</sup>    |
| GSH          | 28,17±0,71 <sup>c</sup>    | 10,42±0,33 <sup>a</sup>    | 45,05±0,97 <sup>d</sup>    | 19,85±0,67 <sup>b</sup>    |
| MDA          | 1142,36±31,36 <sup>a</sup> | 3296,51±72,07 <sup>c</sup> | 1211,68±14,65 <sup>a</sup> | 2674,78±76,56 <sup>b</sup> |

Değerler aritmetik ortalama ± standart hatayı ifade eder.

a, b, c, d. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ( $p<0,05$ ).

GSH: U/g protein

GSH-Px: U/g protein

MDA:  $\mu$ M/g protein

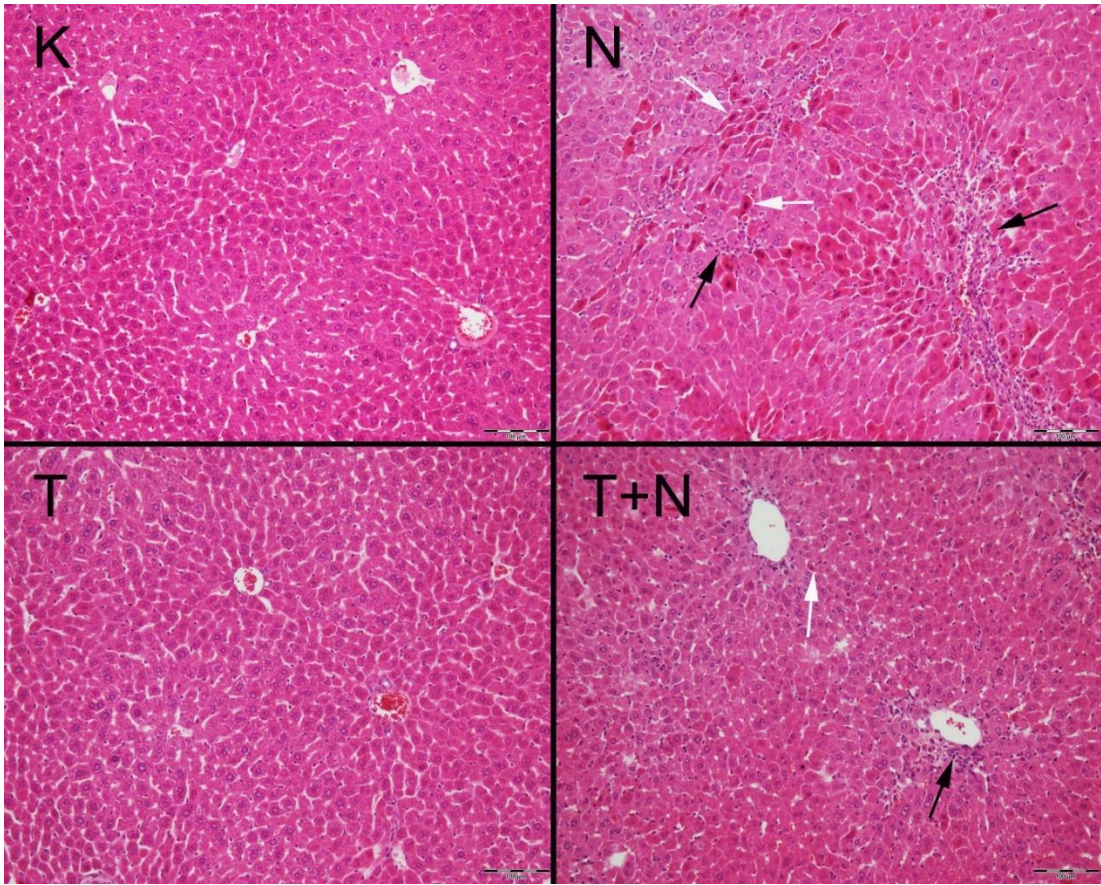
CAT: k/g protein

SOD: U/g protein



### 4.3. Histopatolojik Bulgular

Çalışmada kontrol ve TAN gruplarında karaciğer normal histolojik görünümdeydi, patolojik bulgu saptanmadı. Nodularin grubunda karaciğerlerde şiddetli hiperemi, bazı bölgelerde kanama ve özellikle perivasküler olarak çoğunluğunu mononükleer hücrelerin oluşturduğu, nötrofil lökositlerin de bulunduğu yangısal hücre infiltrasyonlarına rastlandı. Bu grupta ayrıca birçok hepatositte piknotik değişikliklerle karakterize nekrozlar dikkati çekti. TAN+NOD grubunda bulguların belirgin şekilde azaldığı, ancak tamamen düzelmediği görüldü (Şekil 4.1).



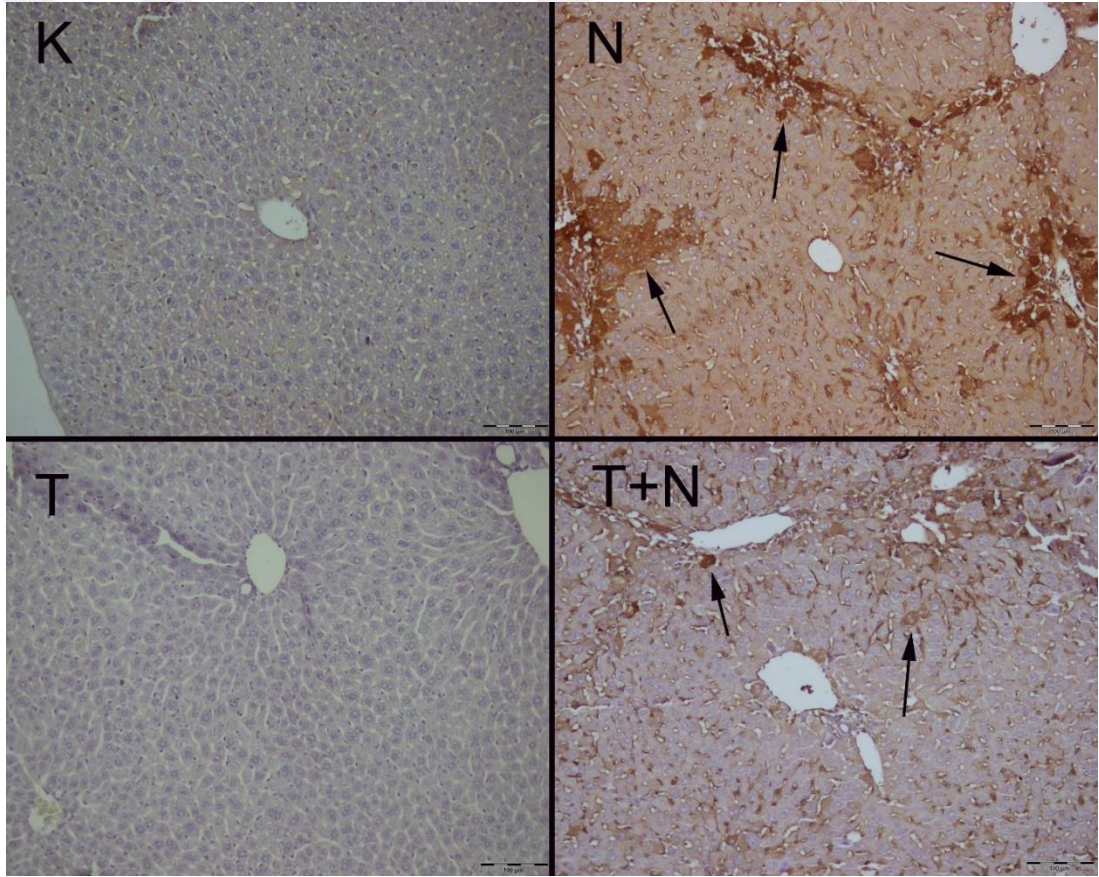
**Şekil 4.1.** Araştırma gruplarının histopatolojik görünümleri. Kontrol ve TAN gruplarında normal histolojik görünüm. NOD grubunda karaciğerlerde yaygın yangısal infiltrasyonlar (siyah oklar) ile nekrotik hepatositler (beyaz oklar), TAN+NOD grubunda infiltrasyonlar (siyah ok) ve nekrotik hücrelerde (beyaz ok) belirgin azalma. HE, Barlar = 100µm.

#### 4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

İmmunohistokimyasal incelemeler için poly L lysinli lamlara çekilen karaciğer kesitleri kaspaz-3, PCNA, iNOS ve TNF- $\alpha$  ile boyanarak incelendi.

##### 4.4.1. Kaspaz-3 İmmunohistokimyasal Bulguları

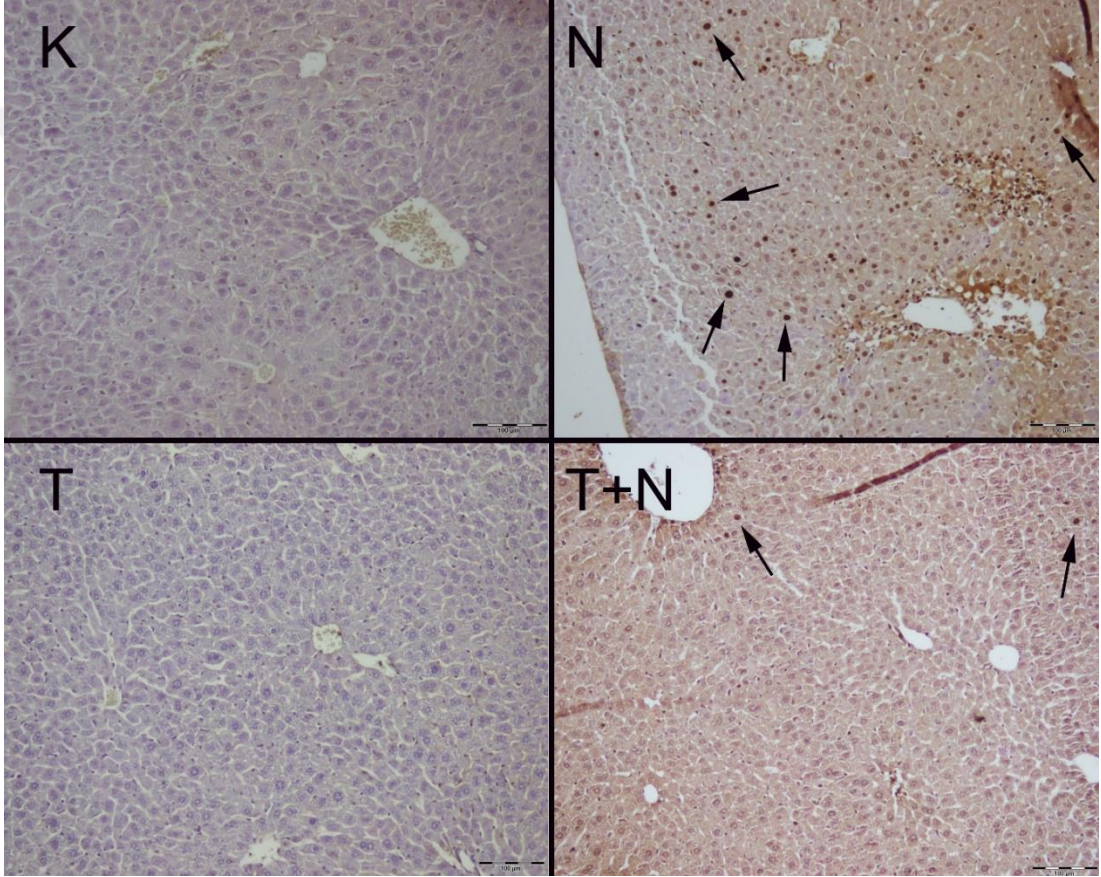
Kontrol ve TAN gruplarında negatif kaspaz-3 immunoreaksiyonu gözlenirken N grubunda belirgin şekilde artmış bir immunopozitiflik saptandı. Tangeretin+NOD grubunda immunoreaksiyonun belirgin bir şekilde azaldığı dikkati çekti (Şekil 4.2). Kaspaz-3 immunoreaksiyonunun hücre sitoplazmasında lokalize olduğu ve koyu kahverengi renk değişimleri şeklinde görüldüğü saptandı.



**Şekil 4.2.** Araştırma gruplarının kaspaz-3 immunohistokimyasal görünüşleri. Kontrol ve TAN gruplarında negatif immunoreaksiyon. NOD grubunda şiddetli şekilde artmış immunopozitif reaksiyon (oklar), TAN+NOD grubunda hepatositlerde belirgin şekilde azalmış immunoreaksiyon (oklar). Streptavidin biyotin metodu, Barlar=100 $\mu$ m.

#### 4.4.2. PCNA İmmunohistokimyasal Bulguları

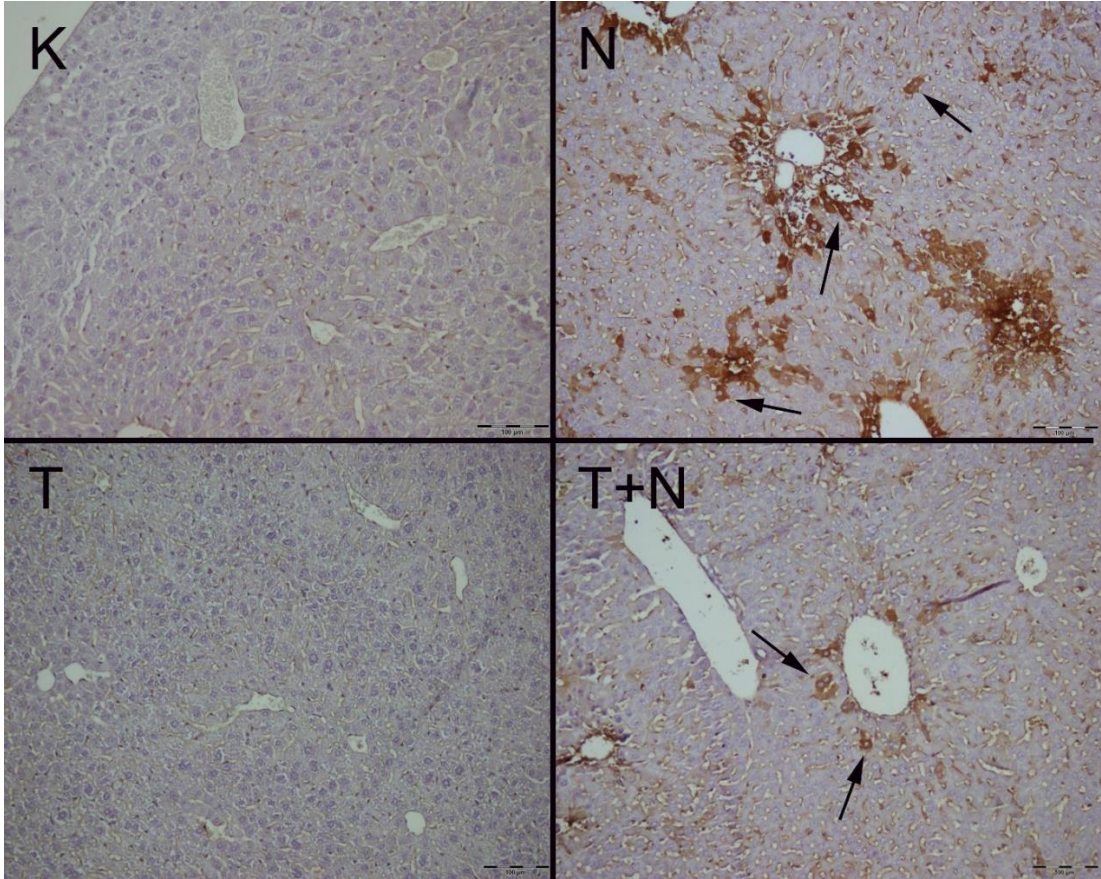
Çalışmada kontrol ve TAN gruplarında negatif immunoreaksiyon saptanırken, NOD grubunda PCNA immunoreaksiyonunda belirgin bir artış gözlemlendi. TAN+NOD grubunda immunoreaksiyonda azalma dikkati çekti (Şekil 4.3). PCNA immunoreaksiyonunun hücrenin çekirdeğinde lokalize olduğu ve hücrelerde proliferasyonun göstergesi olduğu saptandı.



**Şekil 4.3.** Araştırma gruplarının PCNA immunohistokimyasal görünüşleri. Kontrol ve TAN gruplarında negatif PCNA immunoreaksiyonu. NOD grubunda hepatosit çekirdeklerinde şiddetli şekilde artmış immunopozitif reaksiyon (oklar), TAN+NOD grubunda hepatositlerde belirgin şekilde azalmış immunoreaksiyon (oklar). Streptavidin biyotin metodu, Barlar=100µm.

#### 4.4.3. iNOS İmmunohistokimyasal Bulguları

Çalışmada kontrol ve TAN gruplarında negatif iNOS immunoreaksiyon saptanırken, NOD grubunda immunoreaksiyonun belirgin bir şekilde arttığı gözlemlendi. TAN+NOD grubunda immunoreaksiyonda azalma dikkati çekti (Şekil 4.4). iNOS immunoreaksiyonunun hücrenin sitoplazmasında lokalize olduğu ve boyanmanın şiddeti ile reaksiyonun yoğunluğu arasında bağlantı olduğu dikkati çekti.

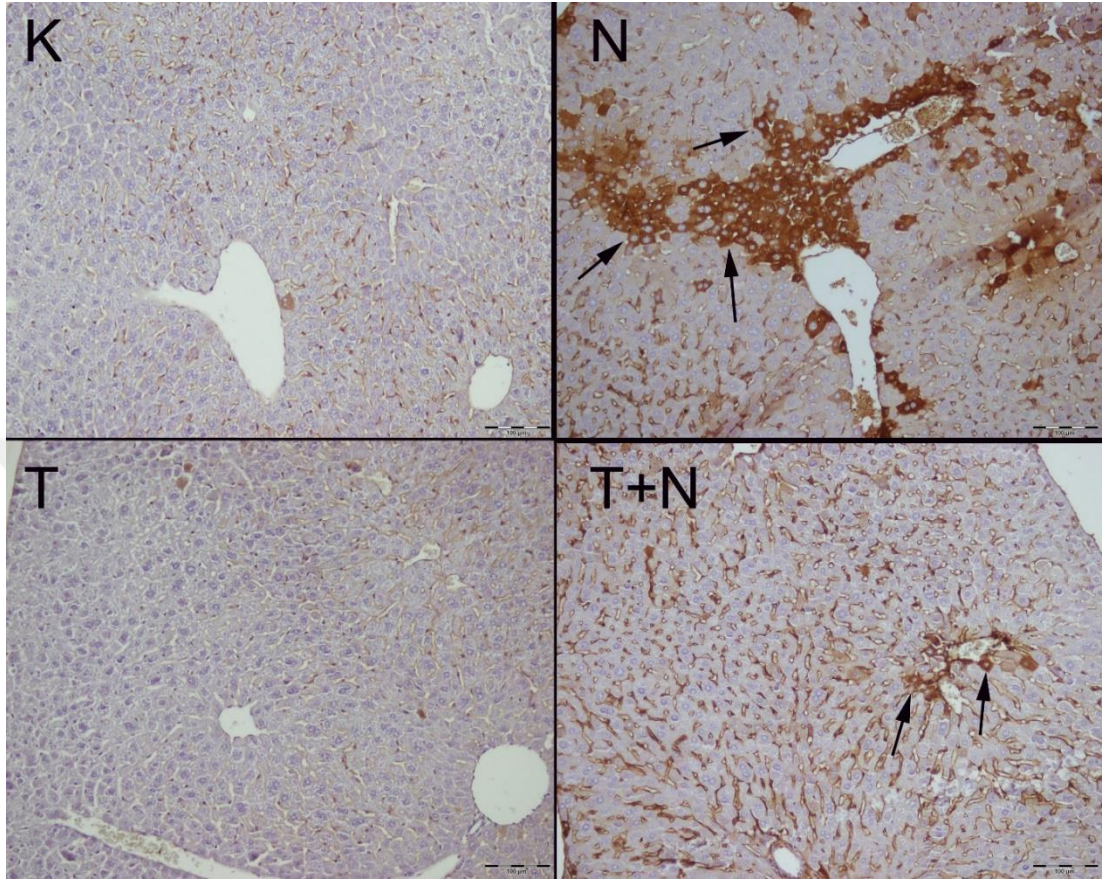


**Şekil 4.4.** Araştırma gruplarının iNOS immunohistokimyasal görünüşleri. Kontrol ve TAN gruplarında negatif-çok hafif immunoreaksiyon. NOD grubunda şiddetli şekilde artmış immunopozitif reaksiyon (oklar), TAN+NOD grubunda hepatositlerde belirgin şekilde azalmış iNOS immunoreaksiyonu (oklar). Streptavidin biyotin metodu, Barlar=100µm.

#### 4.4.4. TNF- $\alpha$ İmmunohistokimyasal Bulguları

Kontrol ve TAN gruplarında negatif TNF- $\alpha$  immunoreaksiyon gözlenirken NOD grubunda belirgin şekilde artmış bir immunopozitiflik saptandı. TAN+NOD grubunda immunoreaksiyonun belirgin bir şekilde azaldığı dikkati çekti (Şekil 4.5).

TNF- $\alpha$  immunoreaksiyonunun sitoplazmada lokalize olduğu ve Şiddetli olduğu gözlemlendi.



**Şekil 4.5.** Araştırma gruplarının TNF- $\alpha$  immunohistokimyasal görünümleri. Kontrol ve TAN gruplarında çok hafif immunoreaksiyon. NOD grubunda hepatositlerde Şiddetli Şekilde artmış immunopozitif reaksiyon (oklar), TAN+NOD grubunda hepatositlerde belirgin Şekilde azalmış TNF- $\alpha$  immunoreaksiyonu (oklar). Streptavidin biyotin metodu, Barlar=100 $\mu$ m.

## 5. TARTIŞMA

Serbest radikaller ve ROS biyolojik sistemler üzerinde oldukça zehirli etkiler gösterirler. Bu radikaller hücrenin moleküler bileşenleriyle reaksiyona girebilir ve diğer radikalleri oluşturabilir. Bunlar da diğer moleküllerle etkileşerek radikal zincir reaksiyonlarını devam ettirir. Serbest radikallerin hücrenin DNA, protein, lipid gibi çeşitli hücre bileşenleriyle etkileşerek fonksiyon kaybına ve modifikasyonlara neden olduğunu gösteren çok sayıda çalışma vardır (61, 62, 78, 89, 96). Serbest radikallerin canlı organizmadaki moleküler bileşenlerinin biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonlarını bozarak, lipid peroksidasyona ve zar akışkanlığına sebep olabileceği bildirilmiştir. Bu yapılarda bulunan çoklu doymamış yağ asitleri, hemoglobin ve oksijenin yüksek konsantrasyonlarını içerdiğinden oksidatif hasara karşı son derece hassastırlar. Canlı organizmalar olası çeşitli ksenobiyotik maruziyetlerine karşı doğal savunma sistemlerine sahiptirler. Bunlar GSH, SOD, CAT ve GSH-Px gibi serbest radikalleri bloke ederek fonksiyon gösteren çok gelişmiş antioksidatif enzim sistemleridir (78).

Çoğu ksenobiyotik, toksik etkilerini serbest radikaller aracılığıyla göstermektedir. Plansız yerleşim ve endüstrinin hızlı gelişmesi sonucu sanayi atıklarının doğrudan göl ve akarsulara akıtılması suların kalitesinin bozulmasına ve siyanobakter patlamalarının oluşumuna sebep olmaktadır. Bu siyanobakteriler tarafından sentezlenen NOD da etkisini serbest radikaller aracılığıyla gösteren ksenobiyotiklerden birisidir. Bu serbest radikaller aracılığında oluşan oksidatif stres NOD'un toksisitesinin patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Karaciğer NOD'un ana hedef organıdır. Noduların karaciğer hücresi içine girişinin ardından PP1, 2A ve 3 enzimlerinin etkinliğini güçlü bir şekilde engeller, proteinlerin hücre iskeletinde fosforilasyona sebep olur ve bu durum karaciğer hücrelerinde şekil bozukluğu ile sonuçlanır (11, 37, 94, 112).

Tangeretin turunçgillerin kabuklarında yüksek konsantrasyonlarda bulunan ve yangı önleyici, antioksidan, kanser önleyici (akciğer, meme, kolorektal, gastrik, ağız içi gibi çeşitli kanser türlerinde) ve antidiyabetik etkinlik gösteren bir flavonoiddir. Flavonoidlerin biyolojik etkileri büyük oranda kimyasal yapıları ile ilgilidir. Aromatik halka yapılarında çok sayıda hidroksil ya da metil grubu içeren iyi bir elektron veya

hidrojen/metil vericisi olan bu bağlayıcı sistem serbest radikalleri ve diğer ROS'ları nötralize eder (120). Tangeretin 4 metil grubu içeren bir PMF'dir. Son yıllardaki araştırmalar, PMF'lerin, hidroksillenmiş flavonlara kıyasla, daha fazla tümör önleyici, anti-metastatik ve antiinvaziv özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (115). Tangeretin çeşitli ksenobiyotiklere maruziyet sonucu oluşan oksidatif stresi azaltırken, antioksidan sistemleri iyileştirdiği araştırmalarda vurgulanmıştır (61, 62, 89, 96).

Oksidatif stres antioksidan savunma sistemlerinin azalması ve aşırı miktarda ROS üretilmesi sonucu oluşur. *Süperoksit dismutaz* enzimi zararlı oksijen radikallerine karşı hücreleri koruyan sitoplazmik bir enzimdir (96). Tangeretin  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$  ve  $H_2O_2$  radikallerini yok eder. SOD enzimi hücrelerdeki oksijen radikallerinin zararlı etkilerine karşı ilk savunma hattını oluşturur ve  $O_2^{\bullet-}$ 'i daha az etkin bir serbest radikal olan  $H_2O_2$  ile moleküler oksijene çevirir. Hidrojen peroksit de CAT veya GSH-Px enzimi aracılığı ile su ve moleküler oksijene dönüştürülerek zararsızlaştırılır. Böylece, bu enzimler serbest oksijen radikallerini yok etmede birlikte görev yaparlar (78, 84, 96). *Süperoksit dismutaz* aktivitesindeki düşüş, enzimin  $O_2^{\bullet-}$ 'i  $H_2O_2$ 'ye çevirmesi sırasında kullanılarak tükenmesinden kaynaklanabilir (78). Peixoto ve ark. (95) ksenobiyotiklerin mitokondriyal  $O_2^{\bullet-}$  üretimini indükleyebileceğini ve buna ek olarak SOD'un da inhibe olması durumunda hücrede üretilen  $O_2^{\bullet-}$  miktarının tehlikeli seviyelere ulaşabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada kan ve karaciğer dokusunda SOD enziminin aktivitesinin, NOD verilen grupta kontrol grubuna göre önemli düzeyde düştüğü tespit edilmiştir. Bu durumun, NOD'un  $O_2^{\bullet-}$  ve  $OH^{\bullet}$  gibi hücre içi ROS oluşumuna yol açması sonucu oluştuğu düşünülmektedir. TAN+NOD'un birlikte verildiği grupta, NOD'un yalnız verildiği grupta azalan SOD aktivitesinin önemli düzeyde arttığı tespit edilmiştir. Bu durumun TAN'ın antioksidan etkinliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Farklı ksenobiyotikler veya ajanlarla indüklenen çeşitli organlarda oksidatif hasara karşı TAN'ın koruyucu olarak kullanıldığı araştırmalar bulunmaktadır (61, 62, 89, 96). Deneysel olarak 7,12-DMBA ile meme kanseri oluşturulan sıçanlarda Lakshmi ve Subramanian (61) ile Periyasamy ve ark. (96) meme dokularında, Lakshmi ve Subramanian (62) böbrek dokularında TAN'ın koruyucu etkinliğini incelemişlerdir. Çalışmalarda sıçanlarda meme ve böbrek dokularında 7,12-DMBA verilen gruplarda kontrol gruplarına göre, SOD düzeyinde

önemli bir düşüş olduğunu, TAN verilen gruplarda ise değerlerin kontrole yaklaştığını; DMBA+TAN'ın birlikte verildiği gruplarda ise, DMBA'nın yalnız verildiği gruplara göre anlamlı artış olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmaların sonuçları bizim çalışmamız ile uyumludur. Lankoff ve ark. (63) yaptıkları çalışmada 10 µg/kg c.a NOD verilen grupta SOD düzeylerinde kontrole göre önemli bir düşüşün olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacıların çalışmasına benzer şekilde, bizim araştırmamızda da NOD verilen grupta SOD düzeyinde önemli bir düşüş olduğu tespit edilmiştir.

Katalaz çok sayıda aerobik hücre tipinde bulunur ve eritrositlerde, karaciğerde ve böbrekte yüksek aktivite gösterir (18). Katalaz normal koşullar altında bazı hücre tiplerinde esansiyel olmasa da, hücrelerin oksidatif strese karşı direnç kazanmalarında önemli role sahiptir. Eritrositlerde ve dokularda çözünebilir bir protein formunda bulunan CAT, hemoglobini ve dokuları peroksidasyona karşı korumaktadır. Bazı çalışmalarda,  $O_2^{\bullet-}$  radikallerinin potansiyel CAT inhibitörleri olduğu, CAT'ın inhibisyonu sonucunda  $H_2O_2$  miktarındaki artışın sonuç olarak SOD aktivitesinde azalma görüldüğü ve bu durumun serbest radikal oluşum hızıyla ilgili olduğu belirtilmiştir (36, 78). Bu çalışmada, kan ve karaciğer dokusunda CAT enzim aktivitesinin, NOD verilen grupta kontrol grubuna göre önemli düzeyde düştüğü, TAN+NOD'un birlikte verildiği grupta, NOD'un yalnız verildiği grupta düşen değerlerin önemli düzeyde arttığı saptanmıştır. Katalaz enzim aktivitesinin özellikle karaciğer dokusunda TAN verilen grupta önemli düzeyde arttığı tespit edilmiştir. Deneysel olarak 7,12-DMBA ile meme kanseri oluşturulan sıçanlarda Lakshmi ve Subramanian (61) ile Periyasamy ve ark. (96) meme dokularında, Lakshmi ve Subramanian (62) böbrek dokularında TAN'ın koruyucu etkinliğini araştırmışlardır. Çalışmalarda sıçanlarda meme ve böbrek dokularında CAT aktivitesinde 7,12-DMBA verilen gruplarda kontrol gruplarına göre önemli bir düşüş olduğunu, TAN verilen gruplarda ise değerlerin kontrole yaklaştığını; DMBA+TAN'ın birlikte verildiği gruplarda ise, DMBA'nın yalnız verildiği gruplara göre anlamlı artış olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmaların sonuçları bizim çalışmamız ile uyumludur. Lankoff ve ark. (63) yaptıkları çalışmada 10 µg/kg c.a NOD verilen grupta CAT etkinliğinde kontrole göre anlamlı azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmaya benzer şekilde, bizim araştırmamızda da NOD verilen grupta CAT etkinliğinde anlamlı bir düşüş bulunmuştur.



Bir selenoenzim olan GSH-Px, hidroperoksitlerin indirgenmesini katalizleyerek, hayvansal hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Hidrojen peroksiti CAT enzimi ile paylaşmasına rağmen, yalnız başına da lipidler ve diğer organik hidroperoksitlerle hızla etkin bir şekilde reaksiyona girmektedir (71, 78). Bu çalışmada, kan ve karaciğer dokusunda GSH-Px enziminin aktivitesi, NOD verilen grupta kontrole göre önemli düzeyde düştüğü; TAN+NOD'un birlikte verildiği grupta, NOD'un yalnız verildiği grupta düşen değerlerin, anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir. GSH-Px aktivitesindeki düşüşün ana sebebinin, NOD ile indüklenen ROS olduğu düşünülmektedir. GSH-Px'in inhibisyonu, lipidlerin artan oksidasyonu sonucu, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin birikmesiyle sonuçlanabilir. Glutasyon redoks döngüsü, düşük oksidatif strese karşı koruyucu etkinin ana kaynağıdır. Oksidatif stresin seviyesi arttığında, CAT enzimi ile antioksidan koruma öne çıkmaktadır. Hücrelerde GSH-Px'in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye olan afinitesinin CAT'a göre daha yüksek olmasından dolayı, detoksifikasyonda ana antioksidan enzimin GSH-Px olduğu düşünülmüştür (41, 78, 117). Lakshmi ve Subramanian (61) ile Periyasamy ve ark. (96) 7,12-DMBA ile meme kanseri oluşturulan sıçanlarda TAN'ın koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada meme dokusunda 7,12-DMBA verilen gruplarda kontrol gruplarına göre, GSH-Px etkinliğinde önemli bir düşüş olduğunu, TAN verilen gruplarda ise değerlerin kontrole yaklaştığını; TAN+DMBA ve DMBA+TAN'ın birlikte verildiği gruplarda ise, DMBA'nın yalnız verildiği gruplara göre anlamlı yükselme olduğunu bildirmişlerdir. Lakshmi ve Subramanian (62) 7,12-DMBA ile meme kanseri oluşturulan sıçanlarda TAN'ın koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada böbrek dokusunda 7,12-DMBA verilen grupta kontrol grubuna göre, GSH-Px etkinliğinde önemli bir düşüş olduğunu, TAN verilen grupta ise değerlerin kontrole yaklaştığını; TAN+DMBA'nın birlikte verildiği gruplarda ise, DMBA'nın yalnız verildiği gruba göre anlamlı yükselme olduğunu belirtmişlerdir. Omar ve ark. (89) sıçanlarda cis-platinle indüklenen akut karaciğer hasarına karşı TAN'ın koruyucu etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar, karaciğer dokusunda kontrol grubuna göre cis-platin verdikleri grupta GSH-Px etkinliğinde önemli bir düşüş, TAN verilen grupta kontrole yakın değerler, TAN+cis-platinin birlikte verildiği grupta ise, cis-platini yalnız verdikleri gruba göre anlamlı yükselme olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada Lakshmi ve Subramanian (61, 62), Omar ve ark. (89) ve Periyasamy ve ark. (96)'nın yaptıkları araştırmalardan farklı

olarak karaciğer dokusunda GSH-Px etkinliğinde TAN verilen grupta kontrole göre anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. Lankoff ve ark. (63) yaptıkları çalışmada 10 µg/kg c.a NOD verilen grupta GSH-Px etkinliğinde kontrole göre anlamlı azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmaya benzer şekilde, bizim araştırmamızda da NOD verilen grupta GSH-Px düzeyinde anlamlı bir düşüş bulunmuştur.

Reaktif oksijen türlerine karşı organizma, ilk olarak GSH tarafından korunur ve dokularda hasara neden olan ksenobiyotikler GSH depolarının tükenmesine yol açar. Glutatyon hücre metabolizması, farklılaşması ve çoğalması için hayati önem taşır (21). Bu çalışmada, kan ve karaciğer dokusunda GSH düzeyleri, NOD verilen grupta kontrole göre önemli düzeyde düştüğü, TAN+NOD'un birlikte verildiği grupta, NOD'in yalnız verildiği grupta düşen değerlerin, anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir. GSH özellikle karaciğer dokusunda TAN verilen grupta kontrole göre anlamlı ölçüde artmıştır. Bu durum, TAN'ın karaciğerde GSH miktarını artırarak, antioksidan savunma sistemini güçlendirdiğinin göstergesidir. Lakshmi ve Subramanian (61) ile Periyasamy ve ark. (96) 7,12-DMBA ile meme kanseri oluşturulan sıçanlarda TAN'ın koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada meme dokusunda 7,12-DMBA verilen gruplarda kontrol gruplarına göre, GSH düzeyinde önemli bir düşüş olduğunu, TAN verilen gruplarda ise değerlerin kontrole yaklaştığını; TAN+DMBA'nın birlikte verildiği gruplarda ise, DMBA'nın yalnız verildiği gruplara göre anlamlı yükselme olduğunu bildirmişlerdir. Lakshmi ve Subramanian (62) 7,12-DMBA ile meme kanseri oluşturulan sıçanlarda TAN'ın koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada böbrek dokusunda 7,12-DMBA verilen grupta kontrol grubuna göre, GSH düzeyinde önemli bir düşüş olduğunu, TAN verilen grupta ise değerlerin kontrole yaklaştığını; TAN+DMBA'nın birlikte verildiği gruplarda ise, DMBA'nın yalnız verildiği gruba göre anlamlı yükselme olduğunu belirtmişlerdir. Omar ve ark. (89) sıçanlarda cis-platinle indüklenen akut karaciğer hasarına karşı TAN'ın koruyucu etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar, karaciğer dokusunda kontrol grubuna göre cis-platin verdikleri grupta GSH düzeyinde önemli bir düşüş, TAN verilen grupta kontrole yakın değerler, TAN+cis-platinin birlikte verildiği grupta ise, cis-platini yalnız verdikleri gruba göre anlamlı yükselme olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacıların bulguları, bizim çalışmamız ile uyumludur.

Malondialdehit perokside olmuş çoklu doymamış yağ asitlerinin ana oksidasyon ürünüdür ve MDA miktarındaki artış lipid peroksidasyonun önemli bir göstergesidir. Lipid peroksidasyon ksenobiyotiklerden kaynaklanan toksisitenin başlıca moleküler mekanizmalarından biri olarak görülmektedir. Doku ve organların normal fonksiyonlarını yerine getirmeleri, hücre zarlarının bütünlüğünü korumasına bağlıdır, birçok ksenobiyotiğin de hedefi bu bütünlüğü bozarak hücrelerin işlevini yapmasına engel olmaktır (69, 78). Bu çalışmada, kan ve karaciğer dokusunda MDA düzeylerinin, NOD verilen grupta kontrole göre önemli düzeyde arttığı, TAN+NOD'un birlikte verildiği grupta, NOD'un yalnız verildiği grupta artan değerlerin, önemli düzeyde düştüğü tespit edilmiştir. TAN'ın yalnız verildiği grupta MDA düzeylerinin kontrole yaklaştığı saptanmıştır. Bu durum TAN'ın lipid peroksidasyonu artırıcı herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Lakshmi ve Subramanian (61) ile Periyasamy ve ark. (96) 7,12-DMBA ile meme kanseri oluşturulan sıçanlarda TAN'ın koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında meme dokusunda 7,12-DMBA verilen gruplarda kontrol gruplarına göre, MDA düzeylerinde önemli bir artış olduğunu, TAN verilen gruplarda ise değerlerin kontrole yaklaştığını; TAN+DMBA'nın birlikte verildiği gruplarda ise, DMBA'nın yalnız verildiği gruplara göre anlamlı düşüş olduğunu bildirmişlerdir. Lakshmi ve Subramanian (62) 7,12-DMBA ile meme kanseri oluşturulan sıçanlarda TAN'ın koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada böbrek dokusunda 7,12-DMBA verilen grupta kontrol grubuna göre, MDA düzeyinde önemli bir artış olduğunu, TAN verilen grupta ise değerlerin kontrole yaklaştığını; TAN+DMBA'nın birlikte verildiği grupta ise, DMBA'nın yalnız verildiği gruba göre anlamlı düşüş olduğunu belirtmişlerdir. Omar ve ark. (89) sıçanlarda cis-platinle indüklenen akut karaciğer hasarına karşı TAN'ın koruyucu etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar, karaciğer dokusunda kontrol grubuna göre cis-platin verdikleri grupta MDA düzeyinde önemli bir artış, TAN verilen grupta kontrole yakın değerler, TAN+cis-platinin birlikte verildiği grupta ise, cis-platini yalnız verdikleri gruba göre anlamlı düşüş olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacıların bulguları, bizim çalışmamız ile uyumludur.

Karaciğer hasarı ALT, AST, *alkalin fosfataz* (ALP) ve bilirubin gibi biyokimyasal belirteçlerin düzeylerine bakılarak teşhis edilir. Serum enzim düzeylerindeki yükselmeler, karaciğer toksisitesinin ana göstergesi olarak

değerlendirilir. Hepatotoksisitenin tanısı için bu klinik biyokimyasal parametrelere ek olarak makroskopik ve özellikle histopatolojik incelemelerin yapılması da önemlidir (107). Bu çalışmada, NOD verilen grupta serum ALT ve AST değerlerinde kontrole göre anlamlı bir artış olduğu, TAN+NOD'un birlikte verildiği grupta, NOD'un yalnız verildiği grupta artan enzim değerlerinin anlamlı ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Tangeretin tek başına verildiği grupta enzim değerlerinin kontrole göre daha düşük olduğu, bu düşüşün AST'de anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Yapılan literatür taramaları sonucu NOD'un karaciğer enzimleri üzerine etkileri ile ilgili herhangi bir veriye rastlanmamıştır. Fakat NOD'a benzer yapı ve etki mekanizması ile karaciğer üzerinde benzer etkiler gösteren mikrosistin-LR ile ilgili veriler bulunmaktadır. Jayaraj ve ark. (42) farelerde mikrosistinle indüklenen toksisite üzerine yaptıkları çalışmada, mikrosistin-LR verilen grupta kontrole göre ALT ve AST değerlerinde anlamlı yükselme olduğunu bildirmişlerdir. Lakshmi ve Subramanian (61, 62) 7,12-DMBA ile meme kanseri oluşturulan sıçanlarda TAN'ın koruyucu etkinliğini araştırdıkları iki farklı çalışmada 7,12-DMBA verilen gruplarda kontrol grubuna göre, ALT ve AST düzeylerinde önemli bir artış olduğunu, TAN verilen gruplarda ise değerlerin kontrole yaklaştığını; TAN+DMBA'nın birlikte verildiği gruplarda ise, DMBA'nın yalnız verildiği gruplara göre anlamlı düşüş olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmalar bizim çalışmamız ile uyumludur.

Histopatolojik incelemede, NOD verilen grupta, karaciğerlerde şiddetli hiperemi, bazı bölgelerde kanama ve özellikle perivasküler olarak çoğunluğunu mononükleer hücrelerin oluşturduğu, nötrofil lökositlerin de bulunduğu yangısal hücre infiltrasyonlarına rastlanmıştır. Ayrıca bu grupta birçok hepatositte piknotik değişikliklerle karakterize nekrozlar dikkat çekmiştir. TAN+NOD grubunda ise bu bulguların belirgin şekilde azaldığı ancak tamamen düzelmediği tespit edilmiştir. Tangeretin yalnız verildiği grupta, karaciğerin normal histolojik görünümde olduğu ve patolojik bulgu saptanmadığı görülmüştür. Lankoff ve ark. (63) yaptıkları çalışmada 10 µg/kg c.a dozunda NOD verildiğinde karaciğerlerin makroskopik görünüşlerinin koyu kırmızı ve büyümüş olduğunu ve hemoraji alanlarının görüldüğünü tespit etmişlerdir. Bu durumun sinüzoidal hücre membranlarının lipid peroksidasyon ile hasara uğramasının sonucu olabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da, NOD verilen grupta karaciğerlerin makroskopik bulguları Lankoff ve

ark. (63)'nın bulguları ile benzerlik göstermektedir. Omar ve ark. (89) cis-platin verilerek oluşturulan karaciğer hasarına karşı TAN'ın koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada, TAN'ın cis-platinin sebep olduğu karaciğer hasarı üzerinde iyileştirici etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar TAN'ın, karaciğerde cis-platinin sebep olduğu sinüzoidler ve santral venlerde kanlanma ve genişleme bulgularını önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Periyasamy ve ark. (96) yaptıkları çalışmada, 7,12-DMBA ile indükledikleri oksidatif strese karşı meme dokusunda meydana gelen histopatolojik değişikliklere karşı TAN'ın koruyucu etkisi olduğunu tespit etmişlerdir. Omar ve ark. (89) ile Periyasamy ve ark. (96)'nın yaptıkları araştırmaların sonuçları, bizim araştırmamızın bulguları ile uyum göstermektedir.

İmmünohistokimyasal incelemelerde, NOD verilen grupta kaspaz-3, PCNA, iNOS ve TNF- $\alpha$  immunopozitifliklerinde belirgin şekilde artış saptanmış, TAN+NOD grubunda bu immunoreaksiyonun belirgin bir şekilde azaldığı dikkati çekmiştir. Tangeretinin yalnız verildiği grupta kontrole benzer şekilde negatif immunoreaksiyon tespit edilmiştir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada araştırılan oksidatif stres ölçütleri ve biyokimyasal parametreler ile elde edilen histopatolojik bulgular, NOD'un uygulanan doz ve belirtilen sürede karaciğerde hasara neden olduğunu göstermiştir. Oluşan oksidatif hasara karşı, TAN'ın koruyucu etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sebeple, doğal antioksidan etkinliği yüksek olan turunçgil flavonoidlerinden zengin besinlerin diyetle alınması, olası karaciğer hasarının önlenmesinde ve mevcut hasarın düzeltilmesinde oldukça önemlidir. Karaciğerde özellikle serbest radikaller aracılığıyla hasara sebep olan ksenobiyotiklere karşı, TAN'ın koruyucu olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. **Aebi H** (1984): Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.*, **105**, 121-126.
2. **Akcaalan R, Mazur-Marzec H, Zalewska A, Albay M** (2009): Phenotypic and toxicological characterization of toxic *Nodularia spumigena* from a freshwater lake in Turkey. *Harmful Algae*, **8**, 273-278.
3. **Baldia SF, Conaco, MCG, Nishijima T, Imanishi S, Harada KI** (2003): Microcystin production during algal bloom occurrence in Laguna de Bay, the Philippines. *Fish Sci.*, **69**, 110-116.
4. **Basaga HS** (1990): Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol.*, **68(7-8)**, 989-998.
5. **Beutel MW, Horne AJ, Roth JC, Barratt NJ** (2001): Limnological effects of anthropogenic desiccation of a large, saline lake, Walker lake, Nevada. *Hydrobiologia*, **466**, 91-105.
6. **Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O** (2012): Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO Journal*, **5**, 270.
7. **Breinholt V, Lauridsen ST, Dragsted LO** (1999): Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica*, **29**, 1227-1240.
8. **Canivenc-Lavier MC, Bentejac ML, Miller J, Leclerc MH, Siess NL, Suschetet M** (1996): Differential effects of nonhydroxylated flavones as inducers of cytochrome P450 1A and 2B isozymes in rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **136**, 348-353.
9. **Carmichael WW, Eschedor JT, Patterson GML, Moore E** (1988): Toxicity and partial structure of a hepatotoxic peptide produced by the cyanobacterium *Nodularia spumigena* mertens emend. L575 From New Zealand. *Appl Environ Microbiol.*, **54**, 2257-2263.

- 10. Chen KH, Weng MS, Lin JK** (2007): Tangeretin suppresses IL-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase (COX)-2 expression through inhibition of p38 MAPK, JNK, and AKT activation in human lung carcinoma cells. *Biochem Pharmacol.*, **73(2)**, 215-227.
- 11. Chen Y, Shen D, Fang D** (2013): Nodularins in poisoning. *Clin Chim Acta.*, **425**, 18-29.
- 12. Choi SY, Ko HC, Ko SY, Hwang JH, Park JG, Kang SH, Han SH, Yun SH, Kim SJ** (2007): Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biol Pharm Bull.*, **30(4)**, 772-778.
- 13. Cirimi S, Ferlazzo N, Lombardo GE, Maugeri A, Calapai G, Gangemi S, Navarra M** (2016a): Chemopreventive agents and inhibitors of cancer hallmarks: May citrus offer new perspectives? *Nutrients*, **8(11)**, 698.
- 14. Cirimi S, Ferlazzo N, Lombardo GE, Ventura-Spagnolo E, Gangemi S, Calapai G, Navarra M** (2016b): Neurodegenerative diseases: Might citrus flavonoids play a protective role? *Molecules*, **21(10)**, 1312.
- 15. Codd AG, Morrison FL, Metcalf SJ** (2005): Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **203**, 264-272.
- 16. Datla KP, Christidou M, Widmer WW, Rooprai HK, Dexter DT** (2001): Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus flavonoid tangeretin in a rat model of Parkinson's disease. *NeuroReport*, **12(17)**, 3871-3875.
- 17. De Figueiredo DR, Azeiteiro UM, Esteves SM, Goncalves FJM, Pereira MJ** (2004): Microcystin-producing blooms-a serious global public health issue. *Ecotoxicol Environ Saf.*, **59**, 151-163.
- 18. Deisseroth A, Dounce AL** (1970): Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalase, and physiological role. *Physiol Rev.*, **50(3)**, 319-375.
- 19. Di Marco-Crook C, Xiao H** (2015): Diet-based strategies for cancer chemoprevention: the role of combination regimens using dietary bioactive components. *Annu Rev Food Sci Technol.*, **6**, 505-526.



- 20. Dong Y, Cao A, Shi J, Yin P, Wang L, Ji G, Xie J, Wu D** (2014): Tangeretin, a citrus polymethoxyflavonoid, induces apoptosis of human gastric cancer AGS cells through extrinsic and intrinsic signaling pathways. *Oncology reports*, **31**, 1788-1794.
- 21. El-Boghdady NA, Abdeltawab NF, Nooh MM** (2017): Resveratrol and montelukast alleviate paraquat-induced hepatic injury in mice: Modulation of oxidative stress, inflammation and apoptosis, *Oxid Med Cell Longev.*, Article ID 9396425. (<https://doi.org/10.1155/2017/9396425>)
- 22. Eriksson JE, Meriluoto JA, Kujari HP, Osterlund K, Fagerlund K, Hallbom L** (1988): Preliminary characterization of a toxin isolated from the cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Toxicon*, **26**, 161-166.
- 23. Fang YZ, Yang S, Wu G** (2002): Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, **18**, 872-879.
- 24. Fazilatun N, Nornisah M, Zhari I** (2005): Superoxide radical scavenging properties of extracts and flavonoids isolated from the leaves of *Blumea balsamifera*. *Pharm Biol.*, **43**(1), 15-20.
- 25. Francis G** (1878): Poinonous Australian lake. *Nature*, **18**, 11-12.
- 26. Gilbert DL** (2000): Fifty years of radical ideas. *Ann N Y Acad Sci.*, **899**, 1-14.
- 27. Gornal AC, Bardawill CJ, David MM** (1949): Protein-Biuret colorimetric method. *J Biol Chem.*, **177**, 751-766.
- 28. Gurbuz F, Metcalf JS, Karahan AG, Codd GA** (2009): Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey. *Sci Total Environ.*, **407**, 4038-4046.
- 29. Gutteridge JM** (1995): Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.*, **41**(12), 1819-1828.
- 30. Gülle I, Turna II, Güçlü SS, Gülle P, Güçlü Z** (2010): Zooplankton seasonal abundance and vertical distribution of highly alkaline Lake Burdur, Turkey. *Turk J Fish Aquat Sci.*, **10**, 245-254.

- 31. Halliwell B** (1994): Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, **344**, 721-724.
- 32. Harding WR, Rowe N, Wessels JC, Beattie KA, Codd GA** (1995): Death of a dog attributed to the cyanobacterial (blue-green algal) hepatotoxin nodularin in South Africa. *J S Afr Vet Assoc.*, **66**, 256-259.
- 33. Henriksen P** (2005): Estimating nodularin content of cyanobacterial blooms from abundance of *Nodularia spumigena* and its characteristic pigments—a case study from the Baltic entrance area. *Harmful Algae*, **4**, 167-178.
- 34. Heresztyn T, Nicholson CB** (1997): Nodularin concentrations in Lakes Alexandrina and Albert, South Australia, during a bloom of the cyanobacterium (blue-green alga) *Nodularia spumigena* and degradation of the toxin. *Environ Toxicol Water Qual.*, **12**, 273-282.
- 35. Hirano T, Abe K, Gotoh M, Oka K** (1995): Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. *Br J Cancer*, **72(6)**, 1380–1388.
- 36. Hunt CR, Sim JE, Sullivan SJ, Featherstone T, Golden W, Von Kapp-herr C, Hock RA, Gomez RA, Parsian AJ, Spitz DR** (1998): Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. *Cancer Res.*, **58(17)**, 3986-3992.
- 37. Hunter PR** (1998): Cyanobacterial toxins and human health. *J Appl Microbiol Symp Suppl.*, **84**, 35-40.
- 38. Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier, Tossou MCB, Rahu N** (2016): Oxidative stress and inflammation: What polyphenols can do for us? *Oxid Med Cell Longev.*, Article ID 7432797. Doi:10.1155.
- 39. IARC** (2010): *Ingested nitrate and nitrite, and Cyanobacterial peptide toxins*. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon, France, p:327-359.

- 40. ICES (2017):** Report of the ICES/IOC Working Group on Harmful Algal Bloom Dynamics (WGHAB). Helsinki, Finland.
- 41. Izawa S, Inoue Y, Kimura A (1996):** Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.*, **320(1)**, 61-67.
- 42. Jayaraj R, Deb U, Bhaskar ASB, Prasad GBKS, Lakshmana Rao PV (2007):** Hepatoprotective efficacy of certain flavonoids against microcystin-induced toxicity in mice. *Environ Toxicol.*, **22(5)**, 472-479.
- 43. Jones GJ, Blackburn SI, Parker NS (1994):** A toxic bloom of *Nodularia spumigena* Mertens in Orielton Lagoon, Tasmania. *Aust J Mar Freshwater Res.*, **45(5)**, 787-800.
- 44. Kankaanpää H, Turunen KA, Karlsson K, Bylund G, Meriluoto J, Sipiä V (2002a):** Heterogeneity of nodularin bioaccumulation in northern Baltic Sea flounders in 2002. *Chemosphere*, **59**, 1091-1097.
- 45. Kankaanpää H, Vuorinen PJ, Sipiä V, Keinanen M (2002b):** Acute effects and bioaccumulation of nodularin in sea trout (*Salmo trutta m. trutta* L.) exposed orally to *Nodularia spumigena* under laboratory conditions. *Aquat Toxicol.*, **61**, 155-168.
- 46. Kankaanpää HT, Sipiä VO, Kuparinen JS, Ott JL, Carmichael WW (2001):** Nodularin analyses and toxicity of a *Nodularia spumigena* (Nostocales/Cyanobacteria) water-bloom in the western Gulf of Finland, Baltic Sea, in August 1999. *Phycologia*, **40**, 268-274.
- 47. Kankaanpää HT, Sjövall O, Huttunen M, Olin M, Karlsson K, Hyvarinen K, SneitzL, Harkönen J, Sipiä OV, Meriluoto AOJ (2009):** Production and sedimentation of peptide toxins nodularin-R and microcystin-LR in the northern Baltic Sea. *Environ Pollut.*, **157**, 1301-1309.
- 48. Kannan K, Jain SK (2000):** Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, **7(27)**, 153–163.

- 49. Karlsson KM, Spoo LE, Meriluoto JA** (2005): Quantitative LC-ESI-MS analyses of microcystins and nodularin-R in animal tissue-matrix effects and method validation. *Environ Toxicol.*, **20**, 381-389.
- 50. Kasapçopur-Özel GS, Birdane YO** (2014): Antioksidanlar. *Kocatepe Vet J.*, **7(2)**, 41-52.
- 51. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Nonomura-Nakano M, Nesumi H, Yoshida T, Sugiura M, Yano M** (2001): Quantitative study of fruit flavonoids in *Citrus* hybrids of King (*C. nobilis*) and Mukaku Kishu (*C. kinokuni*). *J Agric Food Chem.*, **49**, 3982-3986.
- 52. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M** (1999): Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits. *J Agric Food Chem.*, **47(9)**, 3565-35.
- 53. Kazancı N, Girgin S, Dügel M** (2008): Research on the limnology of Bafa Lake in South- Western Turkey and climate change impacts. *Int Rev Hydrobiol.*, **2**, 207-223.
- 54. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA** (2010): Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol.*, **38**, 96-109.
- 55. Kocasari SF, Gulle I, Kocasari S, Pekkaya S, Mor F** (2013a): The occurrence and levels of cyanotoxin nodularin from *Nodularia spumigena* in the alkaline and salty Lake Burdur, Turkey. *J Limnol.*, **74**, 530-536.
- 56. Kocasari SF, Gulle I, Kocasari S, Pekkaya S, Mor F** (2013b): Burdur Göl'ü Suyunda Nodularin ve Mikrosistin-LR Düzeylerinin Araştırılması (Proje No: 0130-NAP-11)
- 57. Kononen K, Sivenen K, Lehtimäki J** (1993): *Toxicity of phytoplankton blooms in the Gulf Bothnia, Baltic Sea*. In: Toxic phytoplankton Blooms in the Sea. T.J. Smayda, Y. Shimizu, Elsevier, p:269-274.

- 58. Kurowska EM, Manthey JA** (2004): Hypolipidemic effects and absorption of citrus polymethoxylated flavones in hamsters with diet-induced hypercholesterolemia. *J Agric Food Chem.*, **52(10)**, 2879–2886.
- 59. Laamanen MJ, Gugger MF, Lehtimäki JM, Haukka K, Sivonen K** (2001): Diversity of toxic and nontoxic nodularia isolates (cyanobacteria) and filaments from the Baltic Sea. *Appl Environ Microbiol.*, **67**, 4638-4647.
- 60. Lake BG, Beamand JA, Tredger JM, Barton PT, Renwick AB, Price RJ** (1999): Inhibition of xenobiotic-induced genotoxicity in cultured precision-cut human and rat liver slices. *Mutat Res.*, **440(1)**, 91–100.
- 61. Lakshmi A, Subramanian S** (2014a): Chemotherapeutic effect of tangeretin, a polymethoxylated flavone studied in 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene induced mammary carcinoma in experimental rats. *Biochimie*, **99**, 96-109.
- 62. Lakshmi A, Subramanian SP** (2014b). Tangeretin ameliorates oxidative stress in the renal tissues of rats with experimental breast cancer induced by 7,12-dimethylben(a)anthracene. *Toxicol Lett.*, **229**, 333-348.
- 63. Lankoff A, Banasik A, Nowak M** (2002): Protective effect of melatonin against nodularin-induced oxidative stress in Mouse liver. *Arch Toxicol.*, **76**, 158-165.
- 64. Leeuwenburgh C, Heinecke JW** (2001): Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem.*, **8(7)**, 829-838.
- 65. Li S, Pan MH, Wang Z, Lambros T, Ho CT** (2008): Biological Activity, Metabolism and Separation of Polymethoxyflavonoids from Citrus Peels. *Tree For Sci Biotech.*, **2(1)**, 36-51.
- 66. Lobo V, Patil A, Chandra N** (2010): Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.*, **4(8)**, 118-126.
- 67. Luckas B, Dahlmann J, Erler K, Gerdts G, Wasmund N, Hummert C, Hansen PD** (2005): Overview of key phytoplankton toxins and their recent occurrence in the North and Baltic Seas. *Environ Toxicol.*, **20**, 1-17.

- 68. Ma N, Lai CS, Chung CH, Yang JM, Hsu KC, Chen, CY, Chung TS, Li S, Ho CT, Pan MH** (2014): 5-Demethyltangeretin is more potent than tangeretin in inhibiting dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin tumorigenesis. *J Funct Foods.*, **11**, 528-537.
- 69. Mach WJ, Thimmesch AR, Pierce TJ, Pierce JD** (2011): Consequences of hyperoxia and the toxicity of oxygen in the lung. *Nurs Res Pract.*, Article ID 260482. (<http://dx.doi: 10.1155/2011/260482>)
- 70. Main DC, Berry PH, Peet RL, Robertson JP** (1977): Sheep mortalities associated with the blue green alga *Nodularia spumigena*. *Aust Vet J.*, **53**, 578-581.
- 71. Mate JM** (2000): Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicol.*, **153(1-3)**, 83-104.
- 72. Mazur H, Pliński M** (2003): *Nodularia spumigena* blooms and the occurrence of hepatotoxin in the Gulf of Gdańsk. *Oceanologia*, **45**, 305–316.
- 73. Mazur-Marzec H, Krezel A, Kobos J, Plinski M** (2006): Toxic *Nodularia spumigena* blooms in the coastal waters of the Gulf of Gdansk: a ten-year survey. *Oceanologia*, **48**, 255-273.
- 74. Mazur-Marzec H, Spoof L, Kobos J, Plinski M, Meriluoto J** (2008): Cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularins, in fresh and brackish waters of the Pomeranian Province, Northern Poland. *Oceanol Hydrobiol Stud.*, **37**, 3-21.
- 75. Mazur-Marzec H, Tyminska A., Szafranek J, Plinski M** (2007): Accumulation of nodularin in sediments, mussels, and fish from the Gulf of Gdansk, southern Baltic Sea. *Environ Toxicol.*, **22**, 101-111.
- 76. McCord J** (1993): Human disease, free radicals and the oxidant/ antioxidant balance. *Clin Biochem.*, **26**, 351-357.
- 77. McGregor BG, Stewart I, Sendall CB, Sadler R, Reardon K, Carter S, Wruck D, Wickramasinghe W** (2012): First report of a toxic *Nodularia spumigena* (Nostocales/Cyanobacteria) bloom in Sub-Tropical Australia. I.

Phycological and Public Health Investigations. *Int J Environ Res Public Health*, **9**, 2396-2411.

**78. Mossa ATH, Heikal TM, Mohafrash SMM** (2014): Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by aspirin and diazinon: the protective role of selenium. *Asian Pac J Trop Biomed.*, **4(2)**, 603-609.

**79. Mytilineou C, Kramer BC, Yabut JA** (2002): Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism Relat Disord.*, **8**, 385-387.

**80. Nasrollahzadeh HS, Makhloogh A, Pourgholam R, Vahedi F, Qanqermeh A, Foong SY** (2011): The study of *Nodularia spumigena* bloom event in the southern Caspian Sea. *Appl Ecol Environ Res.*, **9**, 141-155.

**81. Nehring S** (1993): Mortality of dogs associated with a mass development of *Nodularia spumigena* (Cyanophyceae) in a brackish lake at the German North Sea coast. *J Plakton Res.*, **15**, 867-872.

**82. Nielsen SE, Breinholt V, Cornett C, Dragsted LO** (2000): Biotransformation of the citrus flavone tangeretin in rats. Identification of metabolites with intact flavane nucleus. *Food Chem Toxicol.*, **38**, 739-746.

**83. Niki E** (2008): Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *Biofactors*, **34(2)**, 171-180.

**84. Noori S** (2012): An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. *Open Access Sci Rep.*, **1(8)**. doi.org/10.4172/413.

**85. Oehrle SA, Westrick J** (2002): Analysis of various cyanobacterial toxins by LC-MS. *LCGC Europe*, **2002**, 1-6.

**86. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K** (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.*, **95(2)**, 351-358.

**87. Ohta T, Sueoka E, Iida N, Komori A, Suganuma M, Nishiwaki R, Tatematsu M, Kim SJ, Carmichael WW, Fujiki H** (1994): Nodularin, a potent

inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. *Cancer Res.*, **54(24)**, 6402-6406.

**88. Olli K** (1996): Mass occurrences of cyanobacteria in Estonian waters. *Phycologia*, **35**, 156-159.

**89. Omar HA, Mohamed WR, Arab HH, Arafa EA** (2016): Tangeretin alleviates cisplatin-induced acute hepatic injury in rats: Targeting MAPKs and Apoptosis. *Plos One*, **11(3)**, e0151649. Doi:10.1371.

**90. Paglia DE, Valentine WN** (1967): Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Met.*, **70**, 158-169.

**91. Pan MH, Chen WJ, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK** (2002): Tangeretin induces cell- cycle G1 arrest through inhibiting cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human colorectal carcinoma cells. *Carcinogenesis*, **23(10)**, 1677–1684.

**92. Pandey KB, Rizvi SI** (2009): Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.*, **2(5)**, 270–278.

**93. Park TJ, Song KY, Sohn SH, Lim IK** (2002): Marked inhibition of testosterone biosynthesis by the hepatotoxin nodularin due to apoptosis of leydig cells. *Mol Carcinog.*, **34**, 151–163.

**94. Pearson L, Mihali T, Moffitt M, Kellmann R, Neilan B** (2010): On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Marine Drugs*, **8**, 1650-1680.

**95. Peixoto F, Vicente J, Madeira VM** (2004): A comparative study of plant and animal mitochondria exposed to paraquat reveals that hydrogen peroxide is not related to the observed toxicity. *Toxicol In Vitro*, **18(6)**, 733-739.

**96. Periyasamy K, Baskaran K, Ilakkia A, Vanitha K, Selvaraj S, Sakthisekaran D** (2015): Antitumor efficacy of tangeretin by targeting the oxidative stress mediated on 7,12-dimethylbenz(a) anthracene-induced proliferative



breast cancer in Sprague-Dawley rats. *Cancer Chemother Pharmacol.*, **75**, 263-272.

**97. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L** (2015): Free Radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Ind J Clin Biochem.*, **30(1)**, 11-26.

**98. Puschner B, Humbert JF** (2007): Cyanobacterial (blue-green algae) toxins. *Veterinary Toxicology-Basic and Clinical Principles*. R.C. Gupta, Academic Press, San Diego, p: 714-724.

**99. Raha S, Robinson BH** (2000): Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci.*, **25**, 502-507.

**100. Reznick AZ, Packer L** (1994): Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.*, **233**, p: 357-363.

**101. Rikans LE, Hornbrook KR** (1997): Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta.*, **1362**, 116-127.

**102. Runnegar MT, Jackson AR, Falconer IR** (1988): Toxicity of the cyanobacterium *Nodularia spumigena* Mertens. *Toxicon.*, **26**, 143-151.

**103. Sedlak J, Lindsay RH** (1968): Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.*, **25**, 192-205.

**104. Seo J, Lee HS, Ryoo S, Seo JH, Min BS, Lee JH** (2011): Tangeretin, a citrus flavonoid, inhibits PGDF-BB-induced proliferation and migration of aortic smooth muscle cells by blocking AKT activation. *Eur J Pharmacol.*, **673(1-3)**, 56-64.

**105. Shen PP, Shi Q, Hua ZC, Kong FX, Wang ZG, Zhuang SX, Chen DC** (2003): Analysis of microcystins in cyanobacteria blooms and surface water samples from Meiliang Bay, Taihu Lake, China. *Environ Int.*, **29**, 641-647.

- 106. Shu Z, Yang B, Zhao H, Xu B, Jiao W, Wang Q, Wang Z, Kuang H** (2014): Tangeretin exerts anti-neuroinflammatory effects via NF- $\kappa$ B modulation in lipopolysaccharide-stimulated microglial cells. *Int Immunopharmacol.*, **19(2)**, 275-282.
- 107. Singh A, Bhat TK, Sharma PO** (2011): Clinical biochemistry of hepatotoxicity. *J Clinic Toxicol.*, **4**, doi:10.4172/2161-0495-4-001.
- 108. Sivonen K, Kononen K, Carmichael WW, Dahlem AM, Rinehart KL, Kiviranta J, Niemela SI** (1989): Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and structure of the toxin. *Appl Environ Microbiol.*, **55**, 1990-1995.
- 109. Spoo L, Klimova S, Mikhailov A, Eriksson JE, Meriluoto J** (2003): Synthesis organotropism of 3H-dihydro derivatives of the cyanobacterial peptide hepatotoxin nodularin. *Toxicon.*, **41**, 153-162.
- 110. Suikkanen S, Laamanen M, Huttunen M** (2007): Long-term changes in summer phytoplankton communities of the open northern Baltic Sea. *Estuar, Coast Shelf Sci.*, **71**, 580-592.
- 111. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J** (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, **39**, 44-84.
- 112. Van Apeldoorn EM, Van Egmond PH, Speijers AJG, Bakker IJG** (2007): Toxins of cyanobacteria. *Mol Nutr Food Res.*, **51**, 7-60.
- 113. Vincent WF** (2009): Cyanobacteria. *Encyclopedia of Inland Waters*, **3**, 226-232.
- 114. Vyas KP, Shibata T, Highet RJ, Yeh HJ, Thomas PE, Ryan, DE, Levin W, Jerina DM** (1983): Metabolism of alpha-naphthoflavone and beta-naphthoflavone by rat liver microsomes and highly purified reconstituted cytochrome P-450 systems. *J Biol Chem.*, **258(9)**, 5649-5659.

- 115. Walle T** (2007): Methylation of dietary flavones greatly improves their hepatic metabolic stability and intestinal absorption. *Mol Pharm.*, **4(6)**, 826–832.
- 116. WHO** (1999): Toxic Cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. (Erişim Tarihi: 08.05.2017 [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/resourcesquality/toxcyanbegin.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/resourcesquality/toxcyanbegin.pdf))
- 117. Yan H, Harding JJ** (1997): Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem J.*, **328(2)**, 599-605.
- 118. Yoshikawa T, Naito Y** (2002): What is Oxidative Stress? *Japan Med Assoc J.*, **45(7)**, 271-276.
- 119. Young ID** (2005): *Medical Genetics*. Oxford University Press, Oxford, p: 52-56.
- 120. Zhang H, Tsao R** (2016): Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci.*, **8**, 33–42.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Zeynep CİHAN KARA  
Doğum Yeri ve Yılı : Dörtyol-1981  
Medeni Hali : Evli  
Yabancı Dili : İngilizce  
Uyruğu : T.C.  
Telefon No : 0 530 777 08 78  
Elektronik Posta : Zeynep\_\_\_cihan@hotmail.com  
İletişim Adresi : Konak Mah. Fevzipaşa Cad. Mehmet  
Kaftan Apt. No:32 Daire:3  
BURDUR

### Eğitim Durumu

Lisans : Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Ebelik  
Bölümü

Yüksek Lisans : Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri  
Enstitüsü

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

### Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl (Mesleki Deneyim):

1. Hatay Dörtyol Kuzuculu Sağlık Ocağı (Ocak 2007-Haziran 2007)
2. Gaziantep Adil Özberk Sağlık Ocağı(Temmuz 2007-Haziran 2008)
3. Van Merkez 1 Nolu Sağlık Ocağı(Temmuz 2008-Kasım 2011)
4. Van Toplum Sağlığı Merkezi (Kasım 2011-Nisan 2012)
5. Van Kadın Doğum Ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi(Nisan 2012-Temmuz 2012)
6. Burdur Devlet Hastanesi (Ağustos 2012 ve halen)

