

**HİPOKSİK ve HİPEROKSİK STRES
UYGULAMALARININ GÖKKUŞAĞI
ALABALIĞI'NDA (*Oncorhynchus mykiss*) ANTİOKSİDAN
ENZİM AKTİVİTELERİ ve GEN EKSPRESYONLARI
ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Abdullah TUNÇ

**Doktora Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Genetik Bilim Dalı
Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN
2017
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**HİPOKSİK ve HİPEROKSİK STRES UYGULAMALARININ GÖKKUŞAĞI
ALABALIĞI'NDA (*Oncorhynchus mykiss*) ANTIOKSİDAN ENZİM
AKTİVİTELERİ ve GEN EKSPRESYONLARI ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Abdullah TUNÇ

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI
Genetik Bilim Dalı**

**ERZURUM
2017
Her hakkı saklıdır**



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**HİPOKSİK ve HİPEROKSİK STRES UYGULAMALARININ GÖKKUŞAĞI
ALABALIĞI'NDA (*Oncorhynchus mykiss*) ANTİOKSİDAN ENZİM
AKTİVİTELERİ ve GEN EKSPRESYONLARI ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN danışmanlığında, Abdullah TUNÇ tarafından hazırlanan bu çalışma, 14/07/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı - Genetik Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. İsmail ÇELİK

İmza :

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Nevzat ESİM

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu **20.../07.../2017** tarih ve **29.../.../21**..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Tübitak 1001 projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 1140366

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

HİPOKSİK ve HİPEROKSİK STRES UYGULAMALARININ GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI'NDA (*Oncorhynchus mykiss*) ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ ve GEN EKSPRESYONLARI ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Abdullah TUNÇ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Genetik Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Bu çalışmada, iki grup yavru gökkuşığı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) 28 gün boyunca bir grup hipoksik ($4,5 \pm 0,5$ mg O₂/L) diğer grup hiperoksik ($12 \pm 1,2$ mg O₂/L) suya maruz bırakılmıştır. Antioksidan enzim aktiviteleri glutatyon durumu ve lipit peroksidasyonunu içeren antioksidan ve ayrıca gen ekspresyonu cevabı araştırılmak için 6, 12, 24, 48, 72. saatlerde (akut) ve ilave olarak 28. günde (kronik) karaciğer, böbrek ve solungaç dokuları alındı. Elde edilen biyokimyasal değişiklikler $p < 0.05$ 'de önemli olarak belirlenmiştir. Karaciğer dokusunda GSSG, OSI ve MDA seviyeleri önemli derecede artmıştır. Hipoksi ve hiperoksinin akut etkisi, SOD, GPx ve GR aktivitelerini önemli derecede düşürmüştür, CAT aktivitesini önemli derecede artırmıştır. Kronik etkideki değişim muameleye göre değişkenlik göstermiştir. Antioksidan enzimlerin gen ekspresyonları 24. saatlerde yüksek olmasına rağmen hipoksi ve hiperoksinin akut ve kronik muamelesi sonucu azalmıştır. Solungaç dokusunda glutatyon seviyeleri (tGSH, GSH ve GSSG) kontrole kıyasla değişmemiştir. Böbrek dokusunda ise ilk zamanlar kontrol seviyelerinde seyreden glutatyon düzeyleri 72. saat ve 28. günde azalış göstermiştir. MDA seviyeleri böbrek ve solungaç dokularında kontrole kıyasla değişmemiştir. H₂O₂ seviyeleri hem hipoksi hem de hiperoksinin kronik etkisi ile kontrole kıyasla artmıştır. Böbrek ve solungaç dokularındaki antioksidan enzim aktiviteleri kontrole kıyasla genel artmıştır. Bu parametrelerdeki değişimler hipoksik ve hiperoksik maruziyetlerin gökkuşığı alabalıklarında oksidatif stres gelişimine neden olduğunun bir göstergesidir. Bu da hem hipoksi hem de hiperoksi ile indüklenen oksidatif strese karşı gökkuşığı alabalıklarında telafi edemeyici bir etkiye işaret etmiştir.

2017, 225 sayfa

Anahtar Kelimeler: oksidatif stres, gökkuşığı alabalığı, hipoksi, hiperoksi, antioksidan enzim aktivitesi, gen ifadesi, glutatyon, lipit peroksidasyonu

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINATION of THE EFFECTS of THE HYPOXIC and HYPEROXIC STRESS EXPOSURES on ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES and GENE EXPRESSIONS on RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)

Abdullah TUNÇ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

In this study, juvenile rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*) were subjected for 28 day to either hypoxic ($4,5\pm 0,5$ mg O₂/L) or hyperoxic ($12\pm 1,2$ mg O₂/L). Liver, kidney and gill were taken 6, 12, 24, 48, 72 hours (acute) in addition to 28 days (chronic), following the sampling times and gene expression and antioxidant responses studied with regard to antioxidant enzyme activities, glutathione status and lipid peroxidation. Biochemical changes were accepted as significant at $p < 0.05$. GSSG, OSI and MDA levels in liver have increased significantly compared to control. The acute effect of hypoxia and hyperoxia significantly reduced SOD, GPx and GR activities and significantly increased CAT activity compared to control. The change in chronic effect varied according to treatment. Although the gene expressions of antioxidant enzymes were high at 24h, as a result of the acute and chronic treatment of hypoxia and hyperoxia was decreased. Glutathione levels in the gill (tGSH, GSH and GSSG) did not change compared to control. Although glutathione levels in kidney were in control levels at the first time, This decreased at 72h and 28d. MDA levels did not changed compared to control in kidney and gill. H₂O₂ levels were increased compared to control with the chronic effect of both hypoxia and hyperoxia. Antioxidant enzyme activities in kidney and gill generally increased compared to control. The changes in these parameters are an indication that hypoxic and hyperoxic exposures cause oxidative stress development in rainbow trout. This is an irreversible effect in rainbow trout exposure to both hypoxia- and hyperoxia- induced oxidative stress.

2017, 225 pages

Keywords: Oxidative stress, rainbow trout, hypoxia, hyperoxia, antioxidant enzyme activity, gene expression, glutathione, lipid peroxidation

TEŞEKKÜR

Tüm yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca bana danışmanlık yapan, bilgi ve birikimini benden esirgemeyen saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a, tez çalışmam süreci boyunca değerli katkılarından dolayı, tez izleme komitesinde yer alan Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e ve Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımın tüm aşamalarında fakültemiz ve bölümümüzün tüm imkanlarını benden esirgemeyen Fen Fakültesi dekanımız Sayın Prof. Dr. Yüksel ÖZDEMİR'e, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü öğretim Üyelerinden Sayın Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na ve Sayın Doç. Dr. Harun BUDAK'a şükranlarımı sunarım.

Tezimin, bir parçası olduğu projeyi destekleyen TÜBİTAK'a ve TOVAG grubu çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımızı beraber yürüttüğümüz ekip arkadaşlarım Sayın doktora öğrencisi Onur VURAL'a ve Sayın yüksek lisans öğrencisi Esra GÜNAYDIN'a, manevi desteklerinden dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Mesut IŞIK'a teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hep bir kale gibi arkamda hissettiğim babam Hasan Basri TUNÇ, annem Nurhan TUNÇ ve kardeşim Ali TUNÇ'a teşekkürlerimi sunarım.

Karşılaştığım an hayatımın dönüm noktası olan ve hayatıma renk katan eşim Elif TUNÇ'a ve dünyalar tatlısı kızım Eylül Aksa TUNÇ'a teşekkürlerimi sunarım.

Abdullah TUNÇ

Temmuz, 2017

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT | ii |
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| İÇİNDEKİLER | iv |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ | x |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | xiii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xvi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Genel Bakış | 1 |
| 1.2. Oksijen Molekülü..... | 2 |
| 1.3. Reaktif Oksijen Türleri ve Savunma Sistemleri..... | 3 |
| 1.4. Reaktif Oksijen Türlerinin Etkileri | 11 |
| 1.5. Oksidatif Patlama | 13 |
| 1.6. ROS Temelli Sinyalizasyon | 15 |
| 1.7. Oksidatif Stres Teorisi ve Oksidatif Streslerin Sınıflandırılması..... | 16 |
| 1.8. Hipoksi ve Hiperoksi ile İndüklenen Oksidatif Stres..... | 19 |
| 1.9. Balıklarda Stres Toleransı | 22 |
| 1.10. Gökkuşluğu Alabalığı Hakkında Genel Bilgiler | 23 |
| 1.11. Çalışmanın Amacı | 24 |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ | 25 |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM | 34 |
| 3.1. Materyal | 34 |
| 3.1.1. Kullanılan materyal ve cihazlar | 34 |
| 3.1.2. Araştırma yeri..... | 35 |
| 3.1.3. Balık materyali | 35 |
| 3.1.4. Deneme ünitesi ve ekipmanları | 36 |
| 3.1.5. Nitrifikasyon bakterilerinin kapalı devre sisteme ekimi | 38 |
| 3.1.6 Hipoksia ve hiperoksi uygulaması | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2. Yöntem..... | 41 |
| 3.2.1. Dokuların alınması..... | 41 |
| 3.2.2. Enzim aktivitesinde kullanılan kantitatif protein tayini..... | 41 |
| 3.2.2.1. Bradford yöntemiyle protein tayini..... | 41 |
| 3.2.3. Glutatyon seviyelerinin belirlenmesi..... | 43 |
| 3.2.3.1. Homojenat eldesi..... | 43 |
| 3.2.3.2. Toplam ve okside glutatyon miktarlarının belirlenmesi..... | 43 |
| 3.2.3.3. Okside ve redükte glutatyon ve oksidatif stres indeksi değerlerinin hesaplanması..... | 45 |
| 3.2.4. Lipit peroksidasyonunun belirlenmesi..... | 46 |
| 3.2.5. Hidrojen peroksit seviyesinin belirlenmesi..... | 47 |
| 3.2.6. Moleküler çalışmalar..... | 47 |
| 3.2.6.1. Total RNA izolasyonu..... | 47 |
| 3.2.6.2. RNA'nın kantitatif tayini..... | 48 |
| 3.2.6.3. RNA'nın kantitatif tayini..... | 49 |
| 3.2.6.4. RT-PCR ile cDNA kütüphanesinin oluşturulması..... | 49 |
| 3.2.6.5. Sentezlenen cDNA'nın kontrolü..... | 49 |
| 3.2.6.6. Primer ve TaqMan prob hazırlanması..... | 50 |
| 3.2.6.7. Real-Time PCR uygulamaları..... | 52 |
| 3.2.7. Antioksidan enzimlerin spesifik aktivite ölçümleri..... | 53 |
| 3.2.7.1. Homojenat eldesi..... | 53 |
| 3.2.7.2 Süperoksit dismutaz enziminin aktivite ölçümü..... | 54 |
| 3.2.7.3 Katalaz enziminin aktivite ölçümü..... | 56 |
| 3.2.7.4 Glutatyon Peroksidaz enziminin aktivite ölçümü..... | 57 |
| 3.2.7.5. Glutatyon Redüktaz enziminin aktivite ölçümü..... | 60 |
| 3.2.7.6. Glutatyon-S-Transferaz enziminin aktivite ölçümü..... | 61 |
| 3.2.8. İstatistiksel analizler..... | 63 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI..... | 64 |
| 4.1. Su Parametre Değerleri..... | 64 |
| 4.2. Glutatyon Seviyelerine İlişkin Bulgular..... | 64 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.1. Karaciğer dokusunda glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular | 64 |
| 4.2.1.1. Karaciğer dokusunda toplam glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular | 64 |
| 4.2.1.2. Karaciğer dokusunda redükte glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular | 66 |
| 4.2.1.3. Karaciğer dokusunda okside glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular | 68 |
| 4.2.1.4. Karaciğer dokusunda redükte glutatyonun okside glutatyona oranının seviyelerine ilişkin bulgular | 69 |
| 4.2.1.5. Karaciğer dokusunda oksidatif stres indeksi seviyelerine ilişkin bulgular | 71 |
| 4.2.2. Böbrek dokusunda glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular | 75 |
| 4.2.2.1. Böbrek dokusunda toplam glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular | 75 |
| 4.2.2.2. Böbrek dokusunda redükte glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular | 76 |
| 4.2.2.3. Böbrek dokusunda okside glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular | 78 |
| 4.2.2.4. Böbrek dokusunda redükte glutatyonun okside glutatyona oranının seviyelerine ilişkin bulgular | 80 |
| 4.2.2.5. Böbrek dokusunda oksidatif stres indeksi seviyelerine ilişkin bulgular | 81 |
| 4.2.3 Solungaç dokusunda glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular | 85 |
| 4.2.3.1. Solungaç dokusunda toplam glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular | 85 |
| 4.2.3.2. Solungaç dokusunda redükte glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular | 86 |
| 4.2.3.3. Solungaç dokusunda okside glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular | 88 |
| 4.2.3.4. Solungaç dokusunda redükte glutatyonun okside glutatyona oranının seviyelerine ilişkin bulgular | 89 |
| 4.2.3.5. Solungaç dokusunda oksidatif stres indeksi seviyelerine ilişkin bulgular | 90 |
| 4.3. Malondialdehit Seviyelerine İlişkin Bulgular | 94 |
| 4.3.1. Karaciğer dokusunda malondialdehit seviyelerine ilişkin bulgular | 94 |
| 4.3.2. Böbrek dokusunda malondialdehit seviyelerine ilişkin bulgular | 95 |
| 4.3.3. Solungaç dokusunda malondialdehit seviyelerine ilişkin bulgular | 96 |
| 4.4. Hidrojen Peroksit Seviyelerine İlişkin Bulgular | 99 |
| 4.4.1. Karaciğer dokusunda hidrojen peroksit seviyelerine ilişkin bulgular | 99 |
| 4.4.2. Böbrek dokusunda hidrojen peroksit seviyelerine ilişkin bulgular | 100 |
| 4.4.3. Solungaç dokusunda hidrojen peroksit seviyelerine ilişkin bulgular | 102 |

| | |
|---|-----|
| 4.5. Moleküler Çalışmalara İlişkin Bulgular..... | 105 |
| 4.5.1. RNA'nın kalitatif tayini bulgusu..... | 105 |
| 4.5.2. RNA ve elde edilen cDNA'nın kantitatif tayini bulgusu | 106 |
| 4.6. Real-Time PCR Uygulamalarına İlişkin Bulgular | 108 |
| 4.6.1. Karaciğer dokusuna ilişkin gen ekspresyon bulguları | 109 |
| 4.6.1.1. Karaciğer dokusunda Süperoksit Dismütaz genine ilişkin ekspresyon bulguları | 109 |
| 4.6.1.2. Karaciğer dokusunda Katalaz genine ilişkin ekspresyon bulguları | 111 |
| 4.6.1.3. Karaciğer dokusunda Glutasyon Peroksidaz genine ilişkin ekspresyon bulguları | 112 |
| 4.6.1.4. Karaciğer dokusunda Glutasyon Redüktaz genine ilişkin ekspresyon bulguları | 113 |
| 4.6.1.5. Karaciğer dokusunda Glutasyon-S-Transferaz genine ilişkin ekspresyon bulguları | 115 |
| 4.6.2 Böbrek dokusuna ilişkin gen ekspresyonu bulguları | 118 |
| 4.6.2.1. Böbrek dokusunda Süperoksit Dismütaz genine ilişkin ekspresyon bulguları | 118 |
| 4.6.2.2. Böbrek dokusunda Katalaz genine ilişkin ekspresyon bulguları | 119 |
| 4.6.2.3. Böbrek dokusunda Glutasyon Peroksidaz genine ilişkin ekspresyon bulguları | 121 |
| 4.6.2.4. Böbrek dokusunda Glutasyon Redüktaz genine ilişkin ekspresyon bulguları | 122 |
| 4.6.2.5. Böbrek dokusunda Glutasyon-S-Transferaz genine ilişkin ekspresyon bulguları | 124 |
| 4.6.3 Solungaç dokusuna ilişkin gen ekspresyonu bulguları | 127 |
| 4.6.3.1. Solungaç dokusunda Süperoksit Dismütaz genine ilişkin ekspresyon bulguları | 127 |
| 4.6.3.2. Solungaç dokusunda Katalaz genine ilişkin ekspresyon bulguları | 128 |
| 4.6.3.3. Solungaç dokusunda Glutasyon Peroksidaz genine ilişkin ekspresyon bulguları | 130 |

| | |
|---|-----|
| 4.6.3.4. Solungaç dokusunda Glutasyon Redüktaz genine ilişkin ekspresyon bulguları | 131 |
| 4.6.3.5. Solungaç dokusunda Glutasyon-S-Transferaz genine ilişkin ekspresyon bulguları | 133 |
| 4.7. Enzim Spesifik Aktivitelerine İlişkin Bulgular..... | 136 |
| 4.7.1. Karaciğer dokusuna ilişkin antioksidan enzimlerin spesifik aktivite bulguları | 136 |
| 4.7.1.1. Karaciğer dokusuna ilişkin Süperoksit Dismütaz enzimi spesifik aktivite bulguları | 136 |
| 4.7.1.2. Karaciğer dokusuna ilişkin Katalaz enzimi spesifik aktivite bulguları..... | 137 |
| 4.7.1.3. Karaciğer dokusuna ilişkin Glutasyon Peroksidaz enzimi spesifik aktivite bulguları | 139 |
| 4.7.1.4. Karaciğer dokusuna ilişkin Glutasyon Redüktaz enzimi spesifik aktivite bulguları | 140 |
| 4.7.1.5. Karaciğer dokusuna ilişkin Glutasyon-S-Transferaz enzimi spesifik aktivite bulguları | 142 |
| 4.7.2. Böbrek dokusuna ilişkin antioksidan enzimleri spesifik aktivite bulguları | 146 |
| 4.7.2.1. Böbrek dokusuna ilişkin Süperoksit Dismütaz enzimi spesifik aktivite bulguları | 146 |
| 4.7.2.2. Böbrek dokusuna ilişkin Katalaz enzimi spesifik aktivite bulguları..... | 148 |
| 4.7.2.3. Böbrek dokusuna ilişkin Glutasyon Peroksidaz enzimi spesifik aktivite bulguları | 149 |
| 4.7.2.4. Böbrek dokusuna ilişkin Glutasyon Redüktaz enzimi spesifik aktivite bulguları | 151 |
| 4.7.2.5. Böbrek dokusuna ilişkin Glutasyon-S-Transferaz enzimi spesifik aktivite bulguları | 153 |
| 4.7.3. Solungaç dokusuna ilişkin antioksidan enzimleri spesifik aktivite bulguları | 156 |
| 4.7.3.1. Solungaç dokusuna ilişkin Süperoksit Dismütaz enzim spesifik aktivite bulguları | 156 |

| | |
|--|------------|
| 4.7.3.2. Solungaç dokusuna ilişkin Katalaz enzim spesifik aktivite bulguları..... | 157 |
| 4.7.3.3. Solungaç dokusuna ilişkin Glutasyon Peroksidaz enzim spesifik aktivite bulguları | 159 |
| 4.7.3.4. Solungaç dokusuna ilişkin Glutasyon Redüktaz enzim spesifik aktivite bulguları | 161 |
| 4.7.3.5. Solungaç dokusuna ilişkin Glutasyon-S-Transferaz enzim spesifik aktivite bulguları | 163 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ | 167 |
| 5.1. Tartışma..... | 167 |
| 5.1.1 Antioksidan Kapasitesine Bağlı Metabolitlere İlişkin Tartışma | 167 |
| 5.1.2. Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve Gen İfadelerine İlişkin Tartışma | 171 |
| 5.1.2.1. Karaciğer dokusunda antioksidan enzim aktiviteleri ve gen ifadelerine ilişkin tartışma..... | 177 |
| 5.1.2.2. Böbrek dokusunda antioksidan enzim aktiviteleri ve gen ifadelerine ilişkin tartışma..... | 181 |
| 5.1.2.3. Solungaç dokusunda antioksidan enzim aktiviteleri ve gen ifadelerine ilişkin tartışma..... | 182 |
| 5.1.3. Genel Değerlendirme | 184 |
| 5.2. Sonuç..... | 187 |
| KAYNAKLAR | 189 |
| EKLER | 204 |
| EK 1: Model Organizma Ünitesi Ekipmanları ve Özellikleri..... | 204 |
| EK-2: Etik Kurul Belgesi | 210 |
| EK-3: Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası | 211 |
| EK 4: Primer Prob Dizaynı | 213 |
| ÖZGEÇMİŞ | 226 |

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

| | |
|-----------|----------------------------------|
| " | İnç |
| % | Yüzde |
| ° | Derece |
| μ Ws | Mikrowatts |
| Å | Angstrom |
| C | Santigrat |
| Ø | Çap |
| p | İstatistiksel önem seviyesi |
| pH | Hidrojen İyonları Konsantrasyonu |
| V | Volt |
| γ | Gama |
| λ | Lambda |

Kısaltmalar

| | |
|-----------------|---|
| μ g | Mikrogram |
| μ L | Mikrolitre |
| μ M | Mikromolar |
| 4-HNE | 4-hidroksi-nonenal |
| BTU | British thermal unit, İngiliz sıcaklık birimi |
| CAT | Katalaz |
| cm ² | Santimetrekare |
| CP | Protein carbonyls, protein karbonilleri |
| d | Distile |
| dd | Di distile |
| dk | Dakika |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| EC | Enzyme code, enzim kodu |
| <i>et al.</i> | ve arkadaşları |

| | |
|-----------------|--|
| EtBr | Etidyum Bromür |
| EU | Enzyme Unit, Enzim Ünitesi |
| g | Gün |
| GPx | Glutasyon Peroksidaz |
| GR | Glutasyon Redüktaz |
| gr | Gram |
| GSH | Glutasyon (redükte) |
| GSSG | Glutasyon (okside) |
| h | Yükseklik |
| HDPE | High Density Polyetylene, Yüksek Yoğunluklu Polietilen |
| <i>in vitro</i> | Yapay koşullar |
| <i>in vivo</i> | Canlı içi |
| j | Jül |
| kDa | Kilodalton |
| L | Litre |
| LPO | Lipit Peroksidasyonu |
| M | Molar |
| m ² | Metrekare |
| m ³ | Metreküp |
| MDA | Malonic Dialdehyde, Malondialdehit |
| mg | Miligram |
| mL | Mililitre |
| mm | Milimetre |
| mM | Milimolar |
| mmHg | Milimetre civa (basınç birimi) |
| MOPS | 3-(<i>N</i> -morpholino) propanesulfonic acid, Morfolino propan sülfonik asit |
| N | Normal |
| n | Tekerrür sayısı |
| N ₂ | Azot |
| nm | Nanometre |

| | |
|---------|--|
| OSI | Oksidatif stres indeksi |
| p | Piko (trilyonda bir) |
| ppm | Parts per million, milyonda bir birim |
| qRT-PCR | Quantitative Real Time-Polimerase Chain Reaction, Kantitatif Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| RBC | Red Blood Cell - Kırmızı Kan Hücresi |
| RCF | Rölatif santrifüj kuvveti |
| RNA | Ribonükleik asit |
| ROS | Reactive Oxygen Species, Reaktif Oksijen Türleri |
| S | Svedberg birimi, (çökelme katsayısı) |
| sa | Saat |
| SOD | Süperoksit Dismutaz |
| TBA | Thiobarbituric acid, tiyobarbitürik asit |
| TBARS | Thiobarbituric acid-reactive substances, tiyobarbitürik asit reaktif maddeler |
| UN | Unit, Ünite |
| UV | Ultraviyole |
| V | Volt |
| vb | ve benzeri |
| vd | ve diğerleri |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|-----|
| Şekil 1.1. Moleküler oksijenin antioksidan enzimler tarafından indirgenmesi | 8 |
| Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan yavru gökkuşuğu alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) | 36 |
| Şekil 3.2. Çalışmanın yürütüldüğü model organizma ünitesi | 37 |
| Şekil 3.3. Çalışmanın yürütüldüğü model organizma ünitesi alabalık tankları | 37 |
| Şekil 3.4. Model organizma ünitesinin şematize görünümü | 38 |
| Şekil 3.5. Bradford protein tayininde kullanılan Coomassie Brilliant Blue çözeltisi standard grafiği | 42 |
| Şekil 3.6. Dokulardaki tGSH ve GSSG miktarlarının belirlenmesi için hazırlanan standart grafik | 44 |
| Şekil 4.1. Karaciğer dokusunda tGSH seviyeleri | 66 |
| Şekil 4.2. Karaciğer dokusunda GSH seviyeleri | 67 |
| Şekil 4.3. Karaciğer dokusunda GSSG seviyeleri | 69 |
| Şekil 4.4. Karaciğer dokusunda GSH/GSSG seviyeleri | 71 |
| Şekil 4.5. Karaciğer dokusunda Oksidatif Stres İndeksi seviyeleri | 73 |
| Şekil 4.6. Böbrek dokusunda tGSH seviyeleri | 76 |
| Şekil 4.7. Böbrek dokusunda GSH seviyeleri | 78 |
| Şekil 4.8. Böbrek dokusunda GSSG seviyeleri | 79 |
| Şekil 4.9. Böbrek dokusunda GSH/GSSG seviyeleri | 81 |
| Şekil 4.10. Böbrek dokusunda Oksidatif Stres İndeksi seviyeleri | 83 |
| Şekil 4.11. Solungaç dokusunda tGSH seviyeleri | 86 |
| Şekil 4.12. Solungaç dokusunda GSH seviyeleri | 87 |
| Şekil 4.13. Solungaç dokusunda GSSG seviyeleri | 89 |
| Şekil 4.14. Solungaç dokusunda GSH/GSSG seviyeleri | 90 |
| Şekil 4.15. Solungaç dokusunda Oksidatif Stres İndeksi seviyeleri | 92 |
| Şekil 4.16. Karaciğer dokusuna ilişkin MDA seviyeleri | 95 |
| Şekil 4.17. Böbrek dokusuna ilişkin MDA seviyeleri | 96 |
| Şekil 4.18. Solungaç dokusuna ilişkin MDA seviyeleri | 97 |
| Şekil 4.19. Karaciğer dokusuna ilişkin hidrojen peroksit seviyeleri | 100 |

| | |
|--|-----|
| Şekil 4.20. Böbrek dokusuna ilişkin hidrojen peroksit seviyeleri | 101 |
| Şekil 4.21. Böbrek dokusuna ilişkin hidrojen peroksit seviyeleri | 103 |
| Şekil 4.22. Total RNA ların jel elektroforezinde yürütülmesi sonucu elde edilen jel görüntüsü..... | 105 |
| Şekil 4.23. Real Time PCR’da elde edilen örnek bir pik kromatogramı | 109 |
| Şekil 4.24. Karaciğer dokusuna ilişkin SOD geni rölatif ekspresyon seviyeleri..... | 110 |
| Şekil 4.25. Karaciğer dokusuna ilişkin CAT geni rölatif ekspresyon seviyeleri..... | 112 |
| Şekil 4.26. Karaciğer dokusuna ilişkin GPx geni rölatif ekspresyon seviyeleri..... | 113 |
| Şekil 4.27. Karaciğer dokusuna ilişkin GR geni rölatif ekspresyon seviyeleri | 114 |
| Şekil 4.28. Karaciğer dokusuna ilişkin GST geni rölatif ekspresyon seviyeleri | 116 |
| Şekil 4.29. Böbrek dokusuna ilişkin SOD geni rölatif ekspresyon seviyeleri..... | 119 |
| Şekil 4.30. Böbrek dokusuna ilişkin CAT geni rölatif ekspresyon seviyeleri..... | 120 |
| Şekil 4.31. Böbrek dokusuna ilişkin SOD geni rölatif ekspresyon seviyeleri..... | 122 |
| Şekil 4.32. Böbrek dokusuna ilişkin GR geni rölatif ekspresyon seviyeleri | 123 |
| Şekil 4.33. Böbrek dokusuna ilişkin GST geni rölatif ekspresyon seviyeleri | 125 |
| Şekil 4.34. Solungaç dokusuna ilişkin SOD geni rölatif ekspresyon seviyeleri..... | 128 |
| Şekil 4.35. Solungaç dokusuna ilişkin CAT geni rölatif ekspresyon seviyeleri..... | 129 |
| Şekil 4.36. Solungaç dokusuna ilişkin GPx geni rölatif ekspresyon seviyeleri..... | 131 |
| Şekil 4.37. Solungaç dokusuna ilişkin GR geni rölatif ekspresyon seviyeleri | 132 |
| Şekil 4.38. Solungaç dokusuna ilişkin GST geni rölatif ekspresyon seviyeleri | 134 |
| Şekil 4.39. Karaciğer dokusuna ilişkin SOD enzimi spesifik aktivite seviyeleri | 137 |
| Şekil 4.40. Karaciğer dokusuna ilişkin CAT enzimi spesifik aktivite seviyeleri | 138 |
| Şekil 4.41. Karaciğer dokusuna ilişkin GPx enzimi spesifik aktivite seviyeleri | 140 |
| Şekil 4.42. Karaciğer dokusuna ilişkin GR enzimi spesifik aktivite seviyeleri..... | 142 |
| Şekil 4.43. Karaciğer dokusuna ilişkin GST enzimi spesifik aktivite seviyeleri..... | 144 |
| Şekil 4.44. Böbrek dokusuna ilişkin SOD enzimi spesifik aktivite seviyeleri | 147 |
| Şekil 4.45. Böbrek dokusuna ilişkin CAT enzimi spesifik aktivite seviyeleri | 149 |
| Şekil 4.46. Böbrek dokusunda GPx enzimi spesifik aktivite seviyeleri | 151 |
| Şekil 4.47. Böbrek dokusuna ilişkin GR enzimi spesifik aktivite seviyeleri..... | 152 |
| Şekil 4.48. Böbrek dokusuna ilişkin GST enzimi spesifik aktivite seviyeleri..... | 154 |

| | |
|--|-----|
| Şekil 4.49. Solungaç dokusuna ilişkin SOD enzimi spesifik aktivite seviyeleri | 157 |
| Şekil 4.50. Solungaç dokusuna ilişkin CAT enzimi spesifik aktivite seviyeleri | 159 |
| Şekil 4.51. Solungaç dokusuna ilişkin GPx enzimi spesifik aktivite seviyeleri | 161 |
| Şekil 4.52. Solungaç dokusuna ilişkin GR enzimi spesifik aktivite seviyeleri..... | 163 |
| Şekil 4.53. Solungaç dokusuna ilişkin GST enzimi spesifik aktivite seviyeleri..... | 165 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|-----|
| Çizelge 3.1 Tez kapsamında kullanılan materyal ve cihazların markaları | 34 |
| Çizelge 3.1. (Devamı) Tez kapsamında kullanılan materyal ve cihazların markaları | 35 |
| Çizelge 3.2. Dokulardaki tGSH ve tGSSG ölçümü protokolü | 45 |
| Çizelge 3.3. Real-Time PCR için kullanılan primer ve problemlerin sekans, ürün uzunluğu ve genbank erişim numaraları | 51 |
| Çizelge 3.4. qPCR protokolü | 53 |
| Çizelge 3.5. qPCR uygulamasına ilişkin sıcaklık protokolü | 53 |
| Çizelge 3.6. Süperoksit Dismutaz enzimi aktivite ölçüm protokolü | 56 |
| Çizelge 3.7. Katalaz enzimi aktivite ölçüm protokolü..... | 57 |
| Çizelge 3.8. Glutasyon Peroksidaz enzimi aktivite ölçüm protokolü | 59 |
| Çizelge 3.9. Glutasyon Redüktaz enzimi aktivite ölçüm protokolü..... | 61 |
| Çizelge 3.10. Glutasyon-S-Transferaz enzimi aktivite ölçüm protokolü..... | 63 |
| Çizelge 4.1. Oksijen değişkenliğine bağlı sudaki fiziksel ve kimyasal parametreler | 64 |
| Çizelge 4.2. Karaciğer dokusunda tGSH, GSH, GSSG, GSH/GSSG ve OSİ değerleri | 74 |
| Çizelge 4.3. Böbrek dokusunda tGSH, GSH, GSSG, GSH/GSSG ve OSİ değerleri | 84 |
| Çizelge 4.4. Solungaç dokusunda tGSH, GSH, GSSG, GSH/GSSG ve OSİ değerleri | 93 |
| Çizelge 4.5. Tüm dokularda MDA seviyelerine ilişkin değerler (nmol/mL) | 98 |
| Çizelge 4.6. Tüm dokularda Hidrojen Peroksit seviyelerine ilişkin değerler (pmol/mL)..... | 104 |
| Çizelge 4.7. RNA ve cDNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri (ng/μl) ... | 107 |
| Çizelge 4.7. (devamı) RNA ve cDNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri (ng/μl) | 108 |
| Çizelge 4.8. Karaciğer dokusuna ilişkin SOD, CAT, GPx, GR ve GST genlerinin β-Aktin'e kıyasla uygulama zamanlarında rölatif ekspresyon değerleri | 117 |

| | |
|--|-----|
| Çizelge 4.9. Böbrek dokusuna ilişkin SOD, CAT, GPx, GR ve GST genlerinin β -Aktin'e kıyasla uygulama zamanlarında rölatif ekspresyon değerleri..... | 126 |
| Çizelge 4.10. Solungaç dokusuna ilişkin SOD, CAT, GPx, GR ve GST genlerinin β -Aktin'e kıyasla uygulama zamanlarında rölatif ekspresyon değerleri | 135 |
| Çizelge 4.11. Karaciğer dokusuna ilişkin SOD, CAT, GPx, GR ve GST enzimleri spesifik aktivite seviyeleri değerleri (EU/mg)..... | 145 |
| Çizelge 4.12. Böbrek dokusuna ilişkin SOD, CAT, GPx, GR ve GST enzimi spesifik aktivite seviyeleri değerleri (EU/mg)..... | 155 |
| Çizelge 4.13. Solungaç dokusuna ilişkin SOD, CAT, GPx, GR ve GST enzimleri spesifik aktivite seviyeleri değerleri (EU/mg)..... | 166 |
| Çizelge 5.1. Hipoksi ve hiperoksiye maruz kalan çeşitli balıklarda redoks parametrelerine ilişkin bulgular (Enzim aktiviteleri)..... | 174 |
| Çizelge 5.1. (Devamı) Hipoksi ve hiperoksiye maruz kalan çeşitli balıklarda redoks parametrelerine ilişkin bulgular (Enzim aktiviteleri)..... | 175 |
| Çizelge 5.2. Hipoksi ve hiperoksiye maruz kalan çeşitli balıklarda gen ekspresyonlarına ilişkin bulgular | 176 |

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bakış

Tüm aerobik organizmalar kendi yaşadıkları ortamda oksijene bağımlıdır. Oksidatif fosforilasyon aracılığı ile enerji üretmek için oksijeni kullanırlar. Bu süreç Sitokrom oksidaz tarafından oksijen moleküllerinin suya indirgenmesi ile ilgilidir (Storey 1996). Reaktif oksijen türleri (ROS) diye adlandırılan oksijen metabolizmasının çeşitli yan ürünlerinin oluşumu madalyonun diğer yüzüdür. Bunlar; süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali gibi birçok bileşiği kapsar (Halliwell and Gutteridge 1999). ROS, ksantin oksidaz, Sitokrom P450 redüktaz, glikoz oksidaz vs. tarafından katalizlenen oksidaz reaksiyonlarında ve elektron taşıma zincirinden ayrılan elektronun bir sonucu olarak üretilir (Winston and Di Giulio 1991; Kelly *et al.* 1998). Meydana gelen ROS öncelikle protein, lipit ve nükleik asitleri hedefleyerek onları hasara uğratabilir ve gittikçe artan doku yaralanmasına neden olur. Eğer ROS oluşumu, ROS eliminasyonundan daha fazla ise oksidatif stres oluşur (Sies 2013). Oksidatif strese karşı korunmak için organizmaların bünyesinde düşük molekül ağırlıklı antioksidan kapasitesine bağlı bileşenler (glutasyon, askorbik ve ürik asit, tokoferol vs) ve antioksidan enzimleri içeren proteinlerden meydana gelen antioksidan sistemler bulunmaktadır. Bu enzimler; Süperoksit Dismutaz (SOD; E.C. 1.15.1.1), Katalaz (CAT; E.C. 1.11.1.6), Glutasyon Peroksidaz (GPx; E.C. 1.11.1.9), Glutasyon-S-Transferaz (GST; E.C. 2.5.1.18) ve Glutasyon Redüktaz (GR; E.C. 1.8.1.7) enzimleridir (Halliwell and Gutteridge 1999; Hermes-Lima 2004). Genellikle hücre içi ROS seviyesindeki artış antioksidan enzimlerin aktivite artışına neden olur. ROS, protein, lipit ve DNA gibi hücrel makromolekülleri değiştirebilme kapasitesine sahiptir. Onların proteinlere saldırması peptit bağlarının parçalanmasına, aminoasit rezidülerin modifikasyonlarına, sülfidril gruplarının oksidasyonuna, proteinlerin karbonil türevlerinin oluşumuna vs. öncülük edebilir (Stadtman 1993). Oksidatif olarak hasarlı proteinlerin birikimi enzimlerin inaktivasyonuna ve dolayısı ile metabolizmal perturbasyonuna (karışıklık) neden olur

(Szweda and Stadtman 1992; Cabiscol and Levine 1995). Lipit peroksidasyonu (LPO) biyolojik sistemler için başka önemli sonuçlara da neden olabilmektedir.

Lipitler arasında çoklu doymamış yağ asitleri ROS tarafından neden olacak oksidatif modifikasyonlara hassastır. Lipit peroksidasyonunun yoğunluğu; konjuge diyenler ve lipit peroksitler ve/veya MDA ve diğer aldehitler gibi lipit peroksidasyonunun son ürünleri olarak değerlendirilir (Rice-Evans 1991; Halliwell and Gutteridge 1999). Bu ürünlerin çoğu toksik ve mutajeniktir. Bunlar; DNA'ya yapışma potansiyelinde, gen ekspresyonunu değiştiren ve mutasyona sebep olan formlar olabilmektedir (Marnett 1999). Peroksidize lipitlerin geçirgenliği ve bütünlüğü değişir ve sonuçta DNA, ROS etkisinin hücresel hedefi haline gelir. Başta süperoksit anyonu olmak üzere ROS, nokta mutasyonlarına neden olarak nükleotitlere ve şeker-fosfat omurgasına etki eder (Buxton 1988). Tüm bu antioksidan kapasitesine bağlı bileşenler farklı koşullar altında artan oksidatif stresi değerlendirmek için kullanılır. Oksidatif strese sebep olan tüm bu bileşenler redoks döngüsü bileşenleridir. Aerobik organizmaların yanında balıkları da içine alan sucul organizmalar da bu ksenobiyotiklere, savunma sistemlerini indükleyerek cevap verirler.

1.2. Oksijen Molekülü

Moleküler durumdaki oksijen (O_2) birçok metabolik süreç için gereklidir. Oksijen, toksik etkisinden dolayı aerobik canlılar için birçok güçlüğü de beraberinde getirir (Ahmad 1995). Bu durum, oksijensiz olarak yaşayamayan aerobik organizmaların, oksijenin var olmasına rağmen yine de oksidatif stresten dolayı riskte olduğunu belirten "aerobik yaşam paradoksu" veya "oksijen paradoksu" adlandırmalarını ortaya çıkarmıştır. Oksijen paradoksu, atomik formda (O) bir serbest radikal, moleküler formda (O_2) serbest iki radikali olan oksijenin kimyasal doğasından kaynaklanmaktadır (Davies 2000). Atomik oksijenin değerlik orbitali eşlenmemiş elektron içerir. İki oksijen atomu moleküler oksijen oluşturmak için birleştiğinde, elektronları iki eşlenmemiş elektron olarak kalır. Serbest radikal, bir veya daha fazla

eşleşmemiş elektron içeren herhangi bir atom veya molekül olarak tanımlanır. Radikaller, radikal olmayan bir elektronun kaybı veya kazanımı ile oluşur. Oksijen molekülünün bi-radikal yapısı oksidasyon/redüksiyon reaksiyonlarına izin verir. Mitokondriyal elektron taşıma zincirinin sonunda sitokrom oksidaz tarafından katalize edilen, oksijenin dört değerlikli indirgenmesi ile su üretilir. Ancak, tek değerlikli redüksiyon, süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($HO\cdot$) gibi birkaç reaktif ara madde üretir (Martínez-Álvarez *et al.* 2005).

1.3. Reaktif Oksijen Türleri ve Savunma Sistemleri

Oksijenin canlılar üzerindeki toksik etkilerinin bilinmesi 18. yüzyıla kadar uzanmasına rağmen, toksik oksidatif elementlerin hücredeki biyolojik reaksiyonların yan ürünleri olarak üretildiği 20. yüzyıla kadar gösterilememiştir (Martínez-Álvarez *et al.* 2005). Serbest radikaller ise ilk kez yaklaşık yüz yıldan daha önce Moses Gomberg tarafından kimyasal sistemlerde tanımlanmıştır (Gomberg 1900). Bu tarihten yaklaşık kırk yıl sonra Leonor Michaelis serbest radikallerin tüm oksidasyon reaksiyonları ile ilgili olduğunu bildirmiştir (Michaelis 1939). Michaelis birçok noktada yanlış olmasına rağmen antioksidan enzimler ile ilgilenilmesine ve onların biyolojik sistemlerdeki rollerinin anlaşılmasına olanak sağlamıştır (Lushchak 2016). Serbest radikallerin biyolojik sistemlerde tanımlanması 1950'lerde olmuştur (Commoner *et al.* 1954) ve çeşitli patolojik süreçler (Gerschman *et al.* 1954) ve yaş ile (Harman 1956; 2009) bağlantılı olduğu tahmin edilmiştir. Çevrede bulunan çeşitli fiziksel ve biyolojik birçok stres faktörü serbest radikalleri artırır. Serbest radikaller üzerine çoğu araştırma oksijen radikali üzerine yoğunlaşmıştır. Serbest radikal olmayan aktif oksijen formları ile birlikte bu oksijen radikalleri ROS olarak adlandırılırlar.

Süperoksit dismütaz enziminin McCord and Fredovich (1969) tarafından bulunması ile canlı organizmaların ROS'a karşı düzenli bir enzimatik savunma sistemine sahip

oldukları anlaşılmıştır. Bu gelişme zamanla antioksidan enzimler diye adlandırılan diğer enzimler ve proteinlerin yanı sıra düşük moleküler kütleli antioksidanların da keşfedilmesiyle desteklenmiştir. Daha sonra 1970 ve 80'lerde ROS'ların immün sistem tarafından patojenler ile mücadeleden sorumlu oldukları belirlenmiştir (Babior *et al.* 1973, 1975; Rossi *et al.* 1985; Britigan *et al.* 1987). Yaklaşık 30 yıl önce ilk kez Helmus Sies (1985) oksidatif stresi “potansiyel olarak hasara öncülük eden oksidan korumasındaki oksidan ve antioksidan arasındaki dengesizlik” olarak tanımlamıştır. “Stabil haldeki ROS konsantrasyonunun akut ve kronik olarak artması ile hücresel bileşenlerin oksidatif modifikasyonu ve hücresel metabolizma ve düzenleyici yolların bozulması ile sonuçlanması durumu” olarak da tanımlanmıştır. Farklı fiziksel, kimyasal ve biyolojik çevresel faktörlerin oksidatif stresi indüklediği bulunmuştur. Aslında, oksidatif stres çoğu stresin genel bir durumu olabilir ve ROS ile indüklenmiş maddeler, organizmanın strese cevabını koordine etmede bütünleşmiş bir rol oynarlar (Lushchak 2016).

Balıklar bilinen yaklaşık yirmi bin türü ile omurgalıların büyük bir bölümünü oluşturur. Onlar soğuk denizlerden sıcak denizlere, hiperoksik nehirlerden hipoksik sulara, tatlı sulardan aşırı tuzlu okyanus sularına kadar olan çok geniş ekosistemlerde yaşarlar. Bu çok geniş çevrelerde hayatta kalmak için bu balıklar yüksek plastisite ve adaptivite potansiyeline ihtiyaç duyarlar. Akvatik koşullar karalardan genellikle daha stabildir. Ancak suda çevresel koşullar ciddi bir şekilde değişebilir. Eğer balık adaptif potansiyeli, harici faktörler tarafından baskı altına alınır ise organizmalar stres koşullarına girebilir. Akvatik organizmaların maruz kaldığı çoğu çevresel stres koşulları; insan aktivitesi ve doğal süreçlerden dolayı kirliliğe maruz kalmanın yanında tuzluluk, iyon kompozisyonu, sıcaklık ve oksijen varlığındaki değişimleri de içerir. Bir çalışmada, birçok çevresel stresin balıklarda oksidatif stresi indüklediği gösterilmiştir (Lushchak 2016).

Tüm aerobik organizmalar gibi balıklar da ROS saldırılarına karşı duyarlıdır ve antioksidan savunma sistemlerine sahiptirler. Balıklarda birçok durum antioksidan

cevabı teşvik eder. Yaş, beslenme davranışı ve diyet tipi günlük ve mevsimsel sıcaklık değişimleri, çözünmüş oksijen, sudaki toksinler, patojenler ve parazitler gibi çevresel faktörler antioksidan cevabı tetikler. (Felton 1995; Martínez-Álvarez *et al.* 2005).

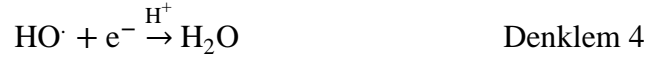
Balıklarda yaşlanmanın antioksidan savunma sistemi üzerinde etkileri vardır. Yaşlanma ile ROS artarken antioksidan savunma zayıflar. Yaşlanma ile ilişkili olan fonksiyonel bozukluk oksidatif hasar birikiminden kaynaklanmaktadır. Wdzieczak *et al.* (1982) farklı balık türlerinin eritrosit ve karaciğerlerinde SOD ve CAT aktivitesi ve lipit peroksidasyonunu kıyasladıkları bir çalışmada daha genç olan balıkların yüksek antioksidan aktivite gösterdiklerini bulmuşlardır. Alabalık karaciğer ve karaciğerle bağlantılı olmayan dokularındaki SOD ve GR aktivitesinde yaşlanma ile bir azalış meydana gelirken, sekiz türde GPx ve CAT enzimlerindeki değişiklik ile ilgili bir kanıt bulunmamaktadır (Otto and Moon 1996).

Balıklarda oksidatif stres ile ilgili çalışmaların çoğu, lipit peroksidasyonu ve oksidatif stresin diğer biyomarkırlarının yoğunluğunun yanında biyotransformasyon süreçlerinin tetiklenmesi, antioksidan enzim aktiviteleri üzerine farklı ksenobiyotiklerin etkileri gibi toksikolojik özellikler üzerine odaklanmıştır (Di Giulio *et al.* 1989; Winston and Di Giulio 1991).

Ökaryotlarda tüketilen oksijenin %90'ından fazlası aerobik koşullar altında mitokondriyal elektron taşıma zincirinde (ETC) sitokrom oksidaz tarafından ROS salınımı olmaksızın 4-elektronlu mekanizma kullanılarak doğrudan suya indirgenir (Ott *et al.* 2007; Skulachev 2012). Organizmalar tarafından tüketilen oksijenin %90'ından fazlası ATP'nin oluşumunda enerji üretmek için kullanılmasına rağmen tüketilen oksijenin %10'undan daha azı moleküler oksijenin süperoksit anyon radikaline (O_2^-) dönüşümü ile başlayan 1-elektronlu ardışık yollar aracılığı ile indirgenir (Şekil 1.1). Daha sonra ileride 1-elektronlu mekanizma aracılığı ile

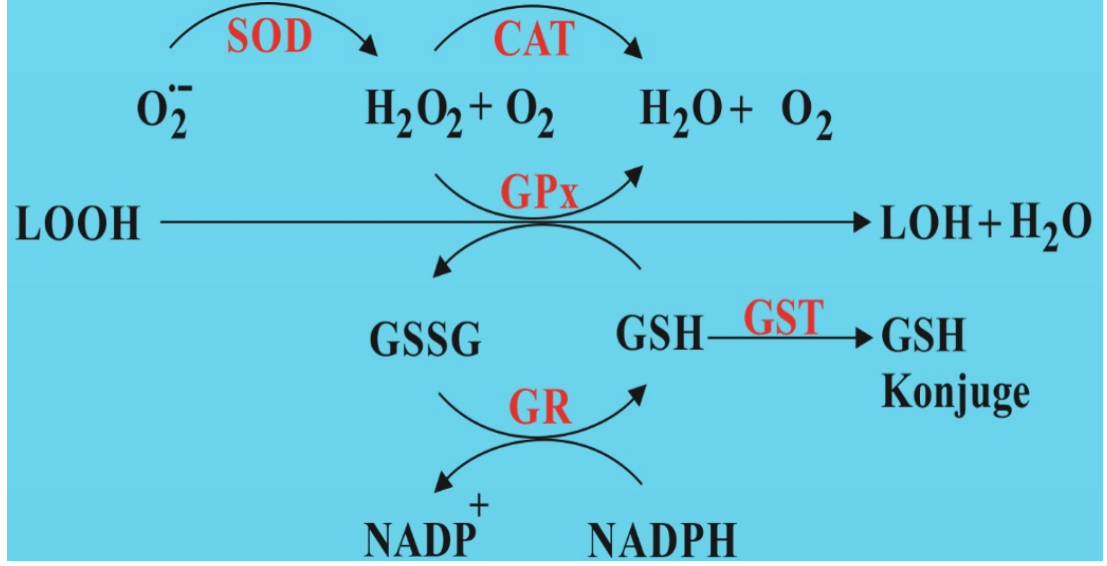
hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($HO\cdot$) ve son olarak su (H_2O) oluşturmak üzere indirgenir. $O_2^{\cdot-}$ ve $HO\cdot$ dış elektron orbitallerinde eşleşmemiş elektronlara sahiptirler. Bu yüzden serbest radikal olarak tanımlanırlar. Hidrojen peroksit böyle elektronlara sahip olmadığından serbest radikal değildir. Bu üç molekül $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 ve $HO\cdot$ moleküler oksijenden daha aktiftirler ve ROS diye adlandırılırlar. ROS'un reaktivitesi $HO\cdot > O_2^{\cdot-} > H_2O_2$ olacak şekilde indirgenir (Halliwell and Gutteridge 1989). Çoğu ROS, mitokondriyal ETC'den moleküler oksijene kaçan elektronların bir sonucu olarak üretilir. Bu elektronlar H_2O_2 ve $HO\cdot$ 'e spontan ya da enzimatik dönüşüm ile $O_2^{\cdot-}$ oluşturmak için moleküler oksijen ile etkileşir. ETC'den kaçan elektronların miktarı organizmanın fizyolojik durumuna ve oksijen varlığına bağlıdır. Mitokondrielerde üretilen toplam ROS miktarı hücreler tarafından zayıf bir şekilde kontrol edildiği görülmektedir. Belli miktarlardaki ROS da endoplazmik retikulum, plazmatik ve nüklear membranlarda yerleşen ETC'de üretilir. Karbonhidratlar, aminoasitler, heterosiklik ve diğer bileşenler üzerine de etki edebilen farklı oksidazlar ROS üretebilirler (Yeldandi *et al.* 2000; Bartosz 2009). Özellikle hipoksik koşullar altında, ROS üretiminde ksantin oksidazın rolü geniş bir şekilde tartışılmaktadır (Griguer *et al.* 2006; Nanduri *et al.* 2013). Eğer yukarıda belirtilen yollar ile ROS üretimi organizmalar tarafından zayıf olarak kontrol edilirse, NADPH oksidaz onu kontrollü duruma dönüştürür. Bu enzim 1970'lerin sonunda keşfedilmiştir (Briggs *et al.* 1977; Yamaguchi *et al.* 1980) ve immün sistem tarafından bakteri ve diğer patojenlere karşı hayvanları savunmaktan sorumlu olduğu bulunmuştur. İkinci olarak, ROS, NO ve peroksinitrit ($ONOO\cdot$) gibi reaktif nitrojen türleri (RNS) ile uyumlu olarak çalışır ve işgalci patojenlere saldırmak için halojenlerin oluşumuna duyarlıdır. İlginç bir şekilde, NADPH oksidaz, immün olmayan hücrelerde de bulunmuştur ve burada kontrollü ROS üretiminden sorumlu olduğu görülmektedir. Bazı durumlarda, belli endojenik ve eksojenik küçük moleküllerin, özellikle de ksantobiyotiklerin otoksidasyonu, önemli miktarda ROS sağlayabilir (Miller *et al.* 1996; Saller *et al.* 2012; Michail *et al.* 2013).

Bir elektronun bir oksijen molekülüne eklenmesi, süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) oluşumuna yol açar (Denklem 1). Bir elektronun $O_2^{\cdot-}$ 'ye eklenmesi, hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumuna neden olur (Denklem 2). H_2O_2 'nin bir elektronun indirgenmesi bir hidroksil radikali (HO^{\cdot}) ve hidroksil anyon (OH^-) oluşturur (Denklem 3). Son olarak, bir elektron ve protonun HO^{\cdot} 'ya eklenmesi bir su molekülü oluşturur (Denklem 4).



$O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 'nin dönüşümü, birincil antioksidan enzimler olarak adlandırılan bazı enzimler tarafından büyük oranda hızlandırılır. Bu süreçlerdeki ilk enzim, moleküler oksijen ve H_2O_2 üretmek üzere bunları dismutasyona tabi tutan iki $O_2^{\cdot-}$ molekülünün katılımıyla redoks reaksiyonunu gerçekleştiren SOD enzimidir. Sonraki, birkaç spesifik enzim ve daha belirsiz olan büyük bir grup tarafından daha az zararlı türlere dönüştürülen H_2O_2 'nin bir elektron indirgemesidir. Spesifik enzimler, H_2O_2 'nin moleküler oksijene ve suya dönüşmesini katalizleyen CAT'ı ve H_2O_2 'yi suya indirgemek için kofaktör glutasyonu kullanan GPx'i içermektedir. HO^{\cdot} üretiminin önlenmesinin zararlı etkilerden kaçınmanın en iyi yolu olduğuna inanılması nedeniyle, hidroksil radikalini yok edebilecek spesifik enzimatik sistemler hakkında hiçbir bilgi yoktur. Okside glutasyonun (GSSG) indirgenmiş formuna (GSH) dönüştürülmesi, çoğunlukla glukoz-6-fosfat dehidrojenaz reaksiyonu (G6PDH) ile

sağlanan NADPH'yi kullanarak GR tarafından katalize edilir. GST enziminin birincil görevi ksenobiyotik veya iç kaynaklı alkilleyici ajanlara karşı detoksikasyon işlemi olabileceği düşünülür (Armstrong 1991; Lushchak 2016). Bu enzimlerin redoks döngüleri Şekil 1.1'de verilmiştir.



Şekil 1.1. Moleküler oksijenin antioksidan enzimler tarafından indirgenmesi

Sürekli durumdaki aşırı ROS seviyelerinin kontrolü, sadece üretim yoluyla değil aynı zamanda tolere etme yoluyla da sağlanmaktadır. Canlı organizmalar ROS oluşumunu önlemek, ROS'u elemine etmek veya negatif etkilerini minimize etmek için organize olan çok seviyeli ve karmaşık antioksidan sistemlere sahiptir. Bileşenler moleküler kütlesi üzerine sınıflandırıldığında düşük (1 kDa altında) ve yüksek (1 ya da 10 kDa'dan daha yüksek) molekül kütleli antioksidanlar olarak 2'ye ayrılabilir. Vit-C (askorbik asit) ve E (tokoferol), karotenoid, antosiyanin, polifenoller, ürik asit ve glutatyon düşük molekül ağırlıklı antioksidan grubundandır. Balıklar bunların çoğunu diyetlerinden alırlar fakat üç peptitli glutatyon (γ -glutamyl-sisteinyl-glycine, GSH) çoğu aerobik organizmalar tarafından sentezlenir. GSH, ya onlar ile doğrudan etkileşimleri aracılığı ile ya da ROS detoksifiye edici enzimler için kofaktör olarak kullanılarak ROS seviyelerini kontrol etmek için kullanılır (Marí *et al.* 2009; Lushchak 2012). GSH seviyesi organizmalar tarafından birçok düzenleyici yolak

aracılığı ile fizyolojik ve çevresel koşullara hassas bir şekilde ayarlanır. Glutasyon (GSH) ve disülfid glutasyon (GSSG) biyolojik olarak önemli hücre içi tiolleridir (Berntssen *et al.* 2000; Armstrong 2002). GSH, indirgeyici değerliklerini verici özelliği nedeniyle toksik reaktif türlerin hem doğrudan (kimyasal) hem de enzimatik olarak nötralize edilmesi ve özellikle oksidanlara karşı hücrel savunma için şarttır (Wu *et al.* 2004). Oksidasyon koşulları altında, iki GSH molekülünün sülfür atomlarının her biri bir elektronu verir ve glutasyon disülfite (GSSG) dönüşürler ve bu da GSSG redüktaz (GR) etkisi ile tekrar GSH'ye indirgenebilir. Bu nedenle, GSH'de ve GSH/GSSG oranında azalma, redoks dengesizliğinin kanıtı olarak yorumlanır ve diyabet, böbrek yetmezliği, kanserleşme, nörodejeneratif hastalıklar ve daha birçok rahatsızlık dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarıyla ilişkilendirilmiştir (Dalle-Donne *et al.* 2008; Ballatori *et al.* 2009; Giustarini *et al.* 2009). Klinik çalışmalarda, GSH ve GSSG, dolaylı olarak bu minimal invaziv tipli analizin daha az erişilebilir doku ve organların ve hatta bütün organizmanın redoks dengesi hakkında değerli bilgiler sağladığı varsayımına dayanarak, tüm kanda veya izole edilmiş kırmızı kan hücrelerinde (RBC) genellikle hafif derecede ortaya çıkmaktadır (Margaritelis *et al.* 2015). Glutasyon apoptoz metabolizmasında da rol oynamaktadır. Normal koşullar altında ROS oluşumu ile antioksidanlar arasında bir denge olmasına rağmen çeşitli olumsuz durumlarda antioksidan savunmaları apoptoz ve hücre ölümlerine neden olan oksidatif stres ile sonuçlanarak yetersiz hale gelir. Apoptoz gereksiz ya da hasar görmüş hücreleri ortadan kaldırmak için memeliler, bitkiler ve diğer organizmalar tarafından kullanılan bir mekanizmadır (Kroemer *et al.* 1998; Hoeberichts and Woltering 2003). Apoptoz, hücre dışı sinyaller (dış yolak) veya hücre içi süreçler (iç yolaklar) ile tetiklenebilir. Mitokondrilerde GSH ve sülfidril gruplarının oksidasyonu aracılığı ile oksidatif stres tarafından porlar açılır ve geçirgenlik artar. Mitokondrilerde ROS'un artışı geçirgen porun açılması ile mitokondriyal dış membranın permeabilitesini artırarak iç yolağı başlatır (Chernyak 1997). Bu işlem sonucunda, sitokrom c, zarlar arası boşluktan hücrenin sitoplazmasına geçer (Liu *et al.* 1996) ve bu da Apaf-1 adı verilen başka bir faktöre katılır. dATP varlığında bu kompleks 'apoptozom' olarak bilinen bir oligomere

polimerleşir. Apoptozom, bir proteazı (kaspaz-9) aktive eder ve bu da kaspaz-3'ü harekete geçirir. Proteolitik reaksiyonların basamakları da DNaz'ları aktive eder ve sonuçta süreç hücre ölümü ile sonuçlanır (Li *et al.* 1997). Normal koşullar altında, çeşitli anti-apoptotik faktörler (Bcl-xL dahil), dış zara bağlı kaldığı sürece mitokondriyal geçişini engeller. Başka bir faktör olan Bax, mitokondriye transloke edildiği zaman bu faktör apoptosise başlarken ortadan kaldırılır (Finucane *et al.* 1999).

Çoğu araştırmacı doğrudan ROS'u detoksifiye eden birincil antioksidan enzimleri içine alan yüksek molekül kütleli antioksidanlar ve bunların fonksiyonunu destekleyen ilişkili enzimler üzerine odaklanmıştır. Birincil antioksidan enzimler süperoksit anyonunu hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştüren SOD, hidrojen peroksit ve peroksidazları parçalayan CAT ve GPx'i içerir. GPx lipid peroksitlerin yanında diğer peroksitleri de parçalayabilir. GSH havuzu bir indirgeyici olarak NADHP kullanarak okside GSH (GSSG)'ı redükte GSH'a indirgeyen GR tarafından indirgenmiş durumda tutulur (Lushchak 2011b; Lushchak 2014a).

ROS çevrimleri Şekil 1.1' de sistematik olarak gösterilmiştir. Başta ROS'un üretimi ve çevrimi gösterilmişken sonrasında ROS'un süpürülmesinden sorumlu enzimler arasındaki ilişki sergilenmiştir. Moleküler oksijenin indirgenmesi, ROS oluşturulmaksızın su oluşumu ile sonuçlanan 4-elektronlu şema aracılığı ile meydana gelir (sitokrom C oksidaz tarafından yürütülülerek). Bir elektron indirgenmesi ard arda O_2^- , H_2O_2 ve HO^{\cdot} oluşumuna öncülük eder. SOD, moleküler oksijen ve H_2O_2 oluşturmak için O_2^- 'nin dismütasyonunu gerçekleştirir ve sonrasında HO^{\cdot} ve su oluşturmak için indirgenir. SOD, CAT ve GPx, ROS'a karşı savunmanın ilk hattıdır. GR ve GST ise ikincil savunma hattındadır. Birinci savunma hattı enzimleri substrat olarak ROS'u kullanırlar. İkincil hattaki antioksidan enzimler ilk hattaki enzimlere yardımcı olurlar, ilk savunma hattı antioksidan enzimlerin organizasyonları için gerekli olan GSH NADPH'ı indirgemeyi sağlarlar. İkincil antioksidan enzimlerin

organizasyonu için gerekli olan şeyler aracı metabolik yollardan sağlanır, örneğin NADPH indirgeyici gücün birincil kaynağı pentozfosfat yolundan gelir (Lushchak 2016).

1.4. Reaktif Oksijen Türlerinin Etkileri

Yüksek reaktivitesinden dolayı ROS'un çok hızlı bir şekilde parçalandığı vurgulanmıştır (örneğin; hidroksil radikali *in vivo* yarılanma ömrü yaklaşık 10^{-9} saniyedir), yani "normal koşullar altında ROS biriktiği" 'ni söylemek doğru değildir. ROS sürekli üretilir ve süpürülür.

ROS'un biyolojik sistemlerin bileşenleri ile etkileşiminin sonuçları onların doğasına, etkileştikleri molekül ya da makromolekül tiplerine ve mikroçevresel koşullarına bağlıdır. ROS çeşitli hücrel bileşenlerle etkileşebildiği için, birçok etkisi ve sonucu olabilir. Bunların başlıcaları: gen ekspresyonu gibi farklı hücrel aktivitelerin düzenlenmesi, patojenlere karşı organizmaları korumak ve sinyal yolağındaki organik bağlanmalar (Lushchak 2016), hücre döngüsü ve duraklaması, enerji metabolizması, redoks dengesi (Kowaltowski *et al.* 2009), apoptozis, protein ve gen ekspresyon düzenlenmesi (Handy *et al.* 2009), hücrel bileşenlere spesifik olmayan hasarlardır. Moleküler seviyede bu etkiler ROS'un hücrel ve yabancı bileşenler ile etkileşimi tarafından neden olunur.

ROS; lipitler, karbonhidrat, protein, nükleik asit vs. diye adlandırılan neredeyse tüm hücrel bileşenler ile etkileşebildiği kabul edilmektedir. ROS tarafından modifiye edilen lipitler ve karbonhidratlar parçalanabilir veya toksik son ürünlere dönüştürülebilir. Benzer bir durum, okside proteinler spesifik sistemler tarafından indirgendiği zaman birçok istisnai proteinde de meydana gelir (Lushchak 2007). ROS ile modifiye edilmiş RNA da parçalanır fakat ROS ile modifiye edilmiş DNA eğer ciddi zararlar meydana getirmeyecekse spesifik onarım sistemleri tarafından onarılır.

Oksijen ile teşvik edilen lipit oksidasyonu (daha sonra ROS tarafından indüklenmiş lipit peroksidasyonu veya oksidasyonu olarak adlandırılmıştır) üzerine ilk çalışma 1930'larda yürütülmüştür (Olcott and Mattill 1931a, b; Monaghan and Schmitt 1932). O tarihte LPO'nun araştırılması için balık yağı klasik bir madde olarak kullanılmıştır (Olcott and Mattill 1931a, b). LPO ilk kez geniş bir şekilde besinlerin bozulması ve balık yağındaki çoklu doymamış yağ asitleri ile ilişkili olarak çalışılmıştır (Fritsche and Johnston 1988; Gonzalez *et al.* 1992; Niki 2000). Daha sonraki çalışmalar LPO ürünlerinin canlı organizmalarda oluşturulabileceğini gösterdi (Hermes-Lima *et al.* 1995; Storey 1996; Lushchak 2011a; Lushchak 2011b; Lushchak 2012).

LPO ürünlerinin ölçümü biyolojik sistemlerde ROS tarafından indüklenen etkileri değerlendirmek için popüler bir yaklaşımdır. ROS'un teşvik ettiği birçok lipit peroksidasyonunun ürünü geniş bir şekilde analiz edilmiştir ve bunların en temel olanı malondialdehit (MDA) seviyelerinin değerlendirmesidir. Genellikle MDA, TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) oluşturmak için onun TBA (thiobarbituric acid) ile reaksiyonu sonucu ölçülür (Lushchak 2016). MDA, hücre zarının yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ve serbest radikaller ile üretilen oksidatif ürünlerdir (Iwama 2004; Moraes 2004). Malondialdehit gibi sitotoksik aldehitler hücrede DNA ve proteinler gibi makro moleküllere zarar vererek hücrenin fonksiyonunu kaybetmesine (Ritola *et al.* 2002d), hücrede membran bütünlüğünün yok olmasına ve permabilitenin artmasına neden olmaktadır (Tarin *et al.* 1998; Prunet *et al.* 2008). MDA ve 4-hidroksi-nonenal (4-HNE) gibi lipit peroksidasyonunun bazı ürünleri proteinlerle konjuge olurlar. Böylece immünolojik teknikler tarafından ölçülebilmesine olanak sağlanmış olur (Brannian *et al.* 1997).

ROS ile modifiye edilmiş proteinlerin seviyelerinin ölçümü de araştırmacılar arasında çok popüler bir yaklaşımdır. Genellikle oksidatif bir şekilde modifiye edilmiş proteinler parçalanır fakat bazı durumlarda biriktirilebilirler. Hatta bunların

bazısı ROS üreticisi dahi olabilir. Oksidatif bir şekilde modifiye edilmiş proteinlerin seviyesi genellikle oksidatif stresin bir markırı olarak kullanılır (Lushchak 2007; Lamarre *et al.* 2009).

DNA'nın oksidasyonu hücrelerde ROS'un varlığının bir diğer etkisidir. Mutasyonlar ile sonuçlanabileceğinden bu tip hasarlar hücre fonksiyonları açısından önemlidir. ROS ile indüklenen DNA modifikasyonları mitokondrilerde nükleustakilerden daha yaygındır. Ancak daha önce de bahsedilen genellikle spesifik sistemler tarafından onarılırlar (Lushchak 2016).

Son yıllarda, oksidatif stres; mutagenез, hücre transformasyonu, kanser, arteriyoskleroz, kalp krizi, kronik inflamatuvar hastalıklar, fotoksidatif göz stresi, merkezi sinir sistemini bozuklukları ve yaşla ilişkili çeşitli işlev bozuklukları gibi çeşitli prosesler, hastalıklar ve sendromlar ile ilişkilendirilmiştir (Harman 1956).

1.5. Oksidatif Patlama

ROS'ların hızlı salınımı anlamına gelen "Solunum Patlaması" Baldrige ve Gerard tarafından fagositozun artan oksijen tüketimi ile ilgili olduğunu farkettilerinde keşfedilmiştir (Baldrige and Gerard 1933). 30 yıl boyunca bu reddedilmiştir. Fakat oksidatif patlama, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon inhibitörleri tarafından engellenemediği anlaşıldığında solunum patlamasına ilgi 1960'larda tekrar artmıştır (Mürer 1968). Daha sonraki çalışmalar patlamanın, fagositoz için enerji sağlamadığını ancak bunun yerine mikropları öldürmek için öldürücü seviyelerde oksidanları üretmek için kullanıldığını göstermiştir (Drath and Karnovsky 1975; Curnutte *et al.* 1979; Babior 1984). 1970'lerde "Oksidatif Patlama" diye adlandırılan bakteriyal saldırı altındaki lökositler tarafından çok büyük boyutlarda oksijen tüketiminin stimülasyonu belirlenmiştir (Muenzer *et al.* 1975; Drath and Karnovsky 1975). Bu stimülasyona cevap olarak fagositler (nötrofil, eozinofil ve mononükleer fagositler) metabolizmayı önemli derecede değiştirmiştir: Bunların oksijen alım oranı

bazen 50 kattan daha fazla olacak şekilde artmış ve bunlar büyük miktarlarda O_2^- ve H_2O_2 üretmiştir. Bazen de bunlar NADPH üretmek için hekzoz monofosfat yolu aracılığı ile büyük miktarlarda glukozu metabolize etmeye başlamıştır. Solunum (hücresel) oksidatif patlama ile ilişkilidir ancak enerji üretimi ile ilgisi yoktur. Daha ziyade oksijenin kısmi indirgenmesiyle güçlü antimikrobiyal ajanlar üretmek için kullanılır. Biyotıp alanındaki potansiyel uygulamaları ve muhtemelen bağışıklığa katıldığından dolayı, oksidatif patlamaya yönelik çalışmalar birçok araştırmacı tarafından cezbedilmiştir ve tek elektronlu tepkimeler aracılığı ile moleküler oksijenin indirgenmesine yönelik belirli sistemlerin keşfedilmesine olanak sağlamıştır. Bu sistemin lökosit plazma membranının ayrılmaz bir parçası olduğu gösterilmiştir ve bunun işleyişi için NADPH'ye ihtiyaç duyulmuştur. Bu nedenle "NADPH oksidaz" adı verilmiştir. Sistem, moleküler oksijenin bir elektron indirgenmesini katalize eder ve spontan veya enzimatik olarak H_2O_2 ve HO^{\cdot} 'ne dönüştürülen süperoksit anyon radikalini üretir. Bu ROS'un bağışıklık sistemi hücreleri tarafından patojenler ile mücadeleden sorumlu olduğuna inanılmaktadır. Lökositlerin daha sonra, NO sentaza (NOS) sahip olduğu ve NADPH oksidaz ile birlikte çalıştığı da bulunmuştur. Bunun gerekçesi, HO^{\cdot} ile 'NO' un birleşimi güçlü bir oksidan olan peroksinitriti oluşturmasıdır. Bir diğer tepkime (bir molekülün iki veya daha fazla farklı ürüne yıkıldığı tipik bir redoks reaksiyonu) diğer ürünler arasında HO^{\cdot} 'yu oluşturmasıdır (Lushchak 2016).

Memelilerde tarif edilen sistem balıklarda da işlemektedir. Örneğin, balık lökositlerinde hem NADPH oksidaz hem de NO sentaz bulunur (Alvarez-Pellitero 2008). Birçok enfeksiyona karşı savunmada aktif rol almaktadırlar. NADPH oksidaz ve NO sentaz, birçok farklı hücre tipinde de tanımlanmıştır. Bu sistem pek çok organizmada oldukça iyi incelenmiştir ve akuakültürdeki potansiyel öneminden dolayı yüksek etkili antimikrobiyal mekanizmaların örneğin yoğun popülasyonlarda yetiştirilen balıklar için bir avantaj olacağı hala yüksek ilgi görmektedir.

1.6. ROS Temelli Sinyalizasyon

1980'lerde, kan damarlarındaki endotel kaynaklı gevşetici/dinlendirici faktör, serbest radikal nitrik oksit (NO) olarak tanımlanmıştır ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) biyokimyası ve özellikle metabolik sinyaldeki NO'nun rolleri üzerine çalışmalar başlamıştır (Furchgott and Zawadzki 1980; Palmer *et al.* 1987, 1988; Furchgott and Vanhoutte 1989). Sonuç olarak, ROS sadece ROS ile bağlantılı olan süreçlerde değil aynı zamanda verim, büyüme ve farklılaşma gibi birçok temel fonksiyonlarda da sinyal rollerine sahip olduğu bulunmuştur (Christman *et al.* 1985; Morgan *et al.* 1986; Tartaglia *et al.* 1989; Scandalios 2005; Semchyshyn *et al.* 2005). Ayrıca hayvanlarda insülin sinyali (Spagnoli *et al.* 1995) ve bitkilerde yaseminik asit ve etilen temelli sinyaller (Lushchak 2011b) gibi iyi bilinen birçok hormonal sinyal iletim yollarında da ROS'un rol aldığı keşfedilmiştir.

1990'lı yılların başında birçok grup, bakterilerde belli spesifik sistemlerin ROS'un neden olduğu antioksidanlar ve diğer bazı enzimlerin up-regülasyonu ile ilgisinin bulunduğunu keşfetmişlerdir (Demple 1991, Demple ve Amabile-Cuevas 1991; Storz and Imlay 1999; Lushchak 2001). Daha sonra, benzer sistemler mayada (Kuge and Jones 1994; Toone and Jones 1999; Lushchak 2010) ve daha yüksek ökaryotlarda (Itoh *et al.* 1999; Després *et al.* 2000) tanımlanmıştır. Çoğu durumda, bu sistemlerin işlemesi, spesifik proteinlerin sistein rezidülerinin tersinir oksidasyonuna dayanmaktadır (Toledano *et al.* 2007; Lushchak 2011b, 2012). Bununla birlikte, bakterilerdeki bu proteinler, belli transkripsiyon düzenleyicileri (örneğin, SoxR ve OxyR) gibi hem sensörler hem de hücresel yanıtların düzenleyicileri olarak görev yapabilirken, ökaryotlarda düzenleyici yollar çok daha karmaşıktır. Genelde, bir sensör molekülü, sitoplazmada lokalize olur ve sinyal alımından sonra ya gen ifadesini doğrudan uyararak için nükleusa geçer veya bu sensör, daha sonra gen ifadesine aracılık eden belli transkripsiyon faktörlerini aktive etmek için transkripsiyon faktörü mekanizmasına sinyal gönderir. Hayvanlarda, özellikle de balıklarda, ROS tarafından düzenlenen birçok sistem tanımlanmıştır. Bu sistemler

arasında Nrf2/Keap1 sistemi en dikkat çekici olarak görünmektedir (Mukhopadhyay *et al.* 2015). ROS ile indüklenen sinyalizasyon esas olarak hücrel ROS savunma sistemlerini düzenlemesine rağmen, gelişme, apoptoz ve nekroz gibi diğer birçok hücrel süreci düzenlediği artık netleşmiştir. Bu, birçok araştırma grubunun ilgisini cezbetmiştir ve kuşkusuz gelecekte dahi ilgileri üzerinde toplayacaktır (Lushchak 2016).

1.7. Oksidatif Stres Teorisi ve Oksidatif Streslerin Sınıflandırılması

Oksidatif strese ilişkin birçok tanım vardır, ancak bu terimin şimdiye kadar kesin bir anlamı bulunamamıştır ve tanımlamaların hiçbiri tam tatmin edici değildir. Sezgisel olarak, oksidatif stresin, oksidatif hasarın artması olduğu kabul edilir ki bu durum, ROS üretimi ve berteraf edilmesi arasındaki dengesizlik durumu olarak açıklanır. İlk kez 1985 yılında H. Sies tarafından ortaya atılan tanım, kısmen "prooksidan-antioksidan dengesinden kaynaklanan oksidatif stres" şeklinde dönüştürülmüştür (Sies 1991). Halliwell ve Gutteridge (1989), oksidatif stresi "ROS/RNS üretimi ve antioksidan savunması arasında ciddi bir dengesizlik" olarak tanımlamıştır. Bütün bu tanımlamalar çok önemli bir unsurdan yoksundur: Bu tanımlar, ROS üretimi ve eliminasyonunun dinamiklerini gözardı etmektedirler yani kararlı durumdaki ROS seviyesinden de bahsedilmelidir. Tanımlamada sinyal fonksiyonlarının da yansıtılması için ROS'un çoklu rolleri de yansıtılmalıdır. Bu nedenle, Lushchak (2016) bir tanım ortaya atmıştır: "Oksidatif stres, nekroz veya apoptoz tarafından hücre ölümü ile sonuçlanan, hücrel bileşenlerin oksidatif modifikasyonuna neden olan ROS temelli olanlar da dahil olmak üzere hücre çekirdeği ve sinyal yollarını ciddi şekilde rahatsız eden kararlı durumda bulunan ROS seviyelerindeki geçici veya kronik bir artıştır." İdeal veya tam olduğunu iddia etmeyen bu tanım, son birkaç on yıl içinde elde edilen bilgiyi yeteri kadar açıklamaktadır.

Oksidatif stres çeşitli şekillerde ortaya çıkabilir: (a) artan ROS üretimi, (b) azalan ROS eliminasyonu ve (c) eliminasyona karşı üretimin dengesizliği. Oksidatif stresin

direkt olarak hastalığa neden olabileceğini göstermek zor olsa da, oksidatif stres ile yaşlanmanın yanı sıra birçok patolojinin arasında güçlü bir ilişki olduğunu gösteren çok sayıda kanıt vardır. Çeşitli durumlarda, farklı antioksidanların uygulanması, hastalık belirtilerinde profilaktik, iyileştirici veya en azından bir azalma sağladığı göstermiştir. ROS homeostaz teorisine göre, oksidanların ve antioksidanların kararlı durumdaki konsantrasyonu sınırlı bir aralıkta tutulur (Lushchak 2011b, 2014a, b; Ayer *et al.* 2014). Bu, antioksidan tedavinin genellikle neden etkisiz olduğunu açıklayabilir.

Oksidatif stres kavramına ideolojik olarak benzerlik, ancak zıt mantıkla, organizmalara indirgeyicilerin sıkıntı çıkarmasıdır. ROS'un kararlı durumdaki konsantrasyonundaki azalış, "indirgeyici stres" olarak adlandırılabilir; yani ya indirgeyicilerin artan seviyelerine maruz kalma veya hücre içi redoks durumunun indirgenmiş duruma dönüşmesidir. Bu terim yaygın olarak kullanılsa da, bu durum sudaki organizmaları, özellikle de balıkları etkileyebilir. Örneğin, Karadeniz'deki derin su, çoğu canlı organizma için çok toksik olan yüksek konsantrasyonda hidrojen sülfür (H_2S) içerir. Yüzeysel veya orta su canlıları, yüksek H_2S seviyelerine sahip bentik sulara ve dip çamurlara maruz kaldıklarında zarar görebilirler. Bununla birlikte, bu biyotopların çeşitli balıkları ve diğer canlıları, çevresel indirgeyici koşullarına başarılı bir şekilde karşı koymak için farklı stratejiler geliştirmiştir (Rudneva *et al.* 2010).

Oksidatif stresin ilk tanımı 1985 yılında H. Sies tarafından önerilmesine rağmen şimdiye kadar oksidatif stres kategorilerini zaman veya yoğunluk açısından ayırt etmek zor olmuştur. Bu nedenle, son zamanlarda, Lushchak (2014a, b) iki şekilde tanımlanabilen şu sınıflamaları sunmuştur: (a) ROS'un kararlı durumdaki seviyeleri altında metabolik bozulmaların zaman seyrini analiz etmek ve (b) farklı dozlardaki veya konsantrasyonlardaki bir oksidatif stres indükleyicisinin uygulanması nedeniyle gelişen oksidatif stresin yoğunluğunu analiz etmek. Zamana bağlı sınıflamayı inceleyerek, normal koşullar altında kararlı durumdaki ROS konsantrasyonunun

hücre veya dokudaki ROS üretimi ve eliminasyonu arasındaki dengeyi yansıtan bazı aralık içerisinde dalgalanacağını görebiliriz. Bununla birlikte, oksidatif zorlanma koşulları altında, kararlı durumdaki ROS konsantrasyonu kararlı hal aralığının daha ötesine giderek artabilir. Hücrenin veya dokunun antioksidan potansiyeli yeterince güçlü olursa, ROS seviyeleri hızlı ve muhtemelen organizma için ciddi sonuçlar doğurmadan önceki kararlı durum aralığına geri dönecektir; Bu, akut oksidatif stres için bir modeldir. Bununla birlikte, antioksidan potansiyeli, gelişmiş ROS seviyesiyle başa çıkacak kadar yüksek değilse, organizmanın, ROS seviyelerini etkin bir şekilde azaltmadan önce antioksidan potansiyelini arttırması gerekebilir. Bu, şu iki sonucu doğurabilir: (i) Kararlı durumdaki ROS konsantrasyonu başlangıçtaki kararlı durum aralığına veya yakınına çekilebilir (kronik oksidatif stres), ya da (ii) yarı kararlı diye adlandırılan yeni bir kararlı durumda ROS seviyesi kurulabilir. Kronik oksidatif stres genellikle stres tepkisine bağlı olan birçok genin ekspresyonunda artış ile ilişkilidir. Bu stres, hücre için ciddi sonuçlar doğurmayabilir, ancak bazı durumlarda belli patolojilerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Başka bir deyişle, artan kararlı durumdaki ROS seviyelerinin stabilize edilmesi, organizma için zararlı olabilir ve birçok durumda kronik enflamasyon ile ilişkili olabilir.

Oksidatif stres, yoğunluğuna göre de sınıflandırılabilir. Bu durumda, oksidatif stresler, indükleyicinin dozu veya konsantrasyonunun bir sonucu olarak organizmanın farklı oksidatif şiddet yoğunluklarına tepkisi nedeniyle kategorize edilir. Bu sistemdeki oksidatif stres teorik sınıflandırması, dört zona ayrılır: (a) Zon I: bazal oksidatif stres (BOS), değişen indükleyici konsantrasyonlarda gözlemlenebilir etkiler görülmediğinde; (B) Zon II: düşük yoğunluklu (hafif) oksidatif stres (DOS), Az miktarda oksidatif olarak modifiye edilmiş molekül seviyelerinin artışı ve oksidatif strese yanıt olarak antioksidan enzimlerin aktivitesini uyarması; (C) Zon III: orta şiddette oksidatif stres (OOS), ROS ile modifiye edilmiş bileşenlerin seviyesinin DOS'dan daha yüksek olduğu zaman, ancak antioksidan enzimlerin aktivitesi kontrol durumundaki aktiviteden daha düşük; son olarak, (d) Zon IV: yüksek yoğunluklu (güçlü) oksidatif stres (YOS), ROS ile modifiye edilmiş

bileşenlerin seviyesi maksimuma doğru eğildiğinde ve antioksidan enzimlerin aktiviteleri minimuma düştüğünde. Bununla birlikte pratikte, muhtemelen en kullanışlı sınıflandırma iki zona ayrılır: (1) hafif oksidatif stres (HOS), ROS ile modifiye edilmiş bileşenlerin ve antioksidan enzimlerin aktivitelerinin seviyesi kontrollerden daha yüksek olduğunda ve (2) güçlü oksidatif stres (SOS), ROS ile modifiye edilmiş bileşenlerin seviyesi MOS'dakinden daha yüksek olduğunda, böyle iken antioksidan enzimlerin aktiviteleri kontrol koşullarına göre daha düşüktür (Lushchak 2014a, b).

1.8. Hipoksi ve Hiperoksi ile İndüklenen Oksidatif Stres

Balıklarda oksidatif stres gelişimi genellikle diğer hayvanlardan farklı değildir. Bu nedenle, yukarıda bahsedilen tüm temel şeyler balıklara da uygulanabilir. Balıklarda yaşam suya bağlıdır. Bu sebeple oksijen, karbondioksit, pH, sıcaklık, doygunluk, amonyak, nitrat ve nitrit seviyeleri gibi su parametreleri balıkları tamamen etkisi altına alır. Bu sebeple balıklar su parametrelerine tamamen bağımlı olarak yaşarlar. Bu parametrelerin optimum şartlarda olmaması halinde balıklarda gözlemlenen ilk tepki stres durumu olacaktır.

Çevresel kirleticiler, balıklarda iki şekilde oksidatif stres oluşturabilirler: Doğrudan hayvanlar üzerindeki etkiler yoluyla ve dolaylı olarak çevre koşulların modifikasyonu nedeniyle. Doğrudan ve dolaylı oksidatif stresin başka bir tanımı, gelişimine yol açan mekanizmalar ile ilişkili olabilir. Yani direkt oksidatif stres, değişken değerlikli metal iyonları, kinonlar vd. gibi doğrudan hücrel redoks döngülerine giren çeşitli maddelerin neden olduğudur. Dolaylı oksidatif stres, stabil bir redoks durumuna sahip olan maddelerden kaynaklanabilir, ancak örneğin enerji ve substrat kaynaklarına müdahale edebilir, normal görev yerinde önemli metallerin yerini alabilir, mekanik etkilere (nanoparçacıklar) sahip olabilir veya transkripsiyonel faktörlerin işleyişini etkileyebilir.

Oksijen varlığı, balık dağılımından sorumlu olan kritik çevresel parametrelerden biridir. Suyun oksijen ile aşırı doyurulması (hiperoksi), alternatif olarak düşük (hipoksi) veya tam oksijen yoksunluğu (anoksi) ile balıkta oksidatif stresin indüklenmesi durumları meydana gelebilir ve oksidatif stres ve antioksidan tepkisi üzerine tüm bunların etkileri bir çok araştırmacı tarafından incelenmiştir (Lygren *et al.* 2000; Lushchak *et al.* 2001; Ritola *et al.* 2002a; Ritola *et al.* 2002c; Ritola *et al.* 2002d; Olsvik *et al.* 2005; Lushchak *et al.* 2005a; Lushchak *et al.* 2005b; Olsvik *et al.* 2006; Trenzado *et al.* 2006; Lushchak and Bagnyukova 2007; Leveelahti *et al.* 2014; Tiedke *et al.* 2014; Pillet *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2016; Lubiana *et al.* 2016; Trasviña-Arenas *et al.* 2013; Li *et al.* 2016; Feng *et al.* 2016). Hiperoksinin balıklarda oksidatif stres oluşturabileceğini tahmin etmek mantıklıdır (Olsvik *et al.* 2005, 2006; Lushchak *et al.* 2005b). Söz konusu mekanizma, bu durumda bol miktarda bulunan oksijen molekülleri ile etkileşime girmek üzere mitokondriyal ETC'den kaçan elektronların olasılığının yüksek olması nedeniyle ROS üretimini arttırabilir. Sucul ekosistemlerde, çevresel oksijen artışının, ya hava ya da ozon ile arındırma istasyonlarında kabarcıklanma gibi insan faaliyetleriyle ilişkisi olabilir. Düşük konsantrasyonlarda ozon, organizmalar için yararlı olabilirken, yüksek seviyeleri zararlıdır (Bocci *et al.* 2009). Doğada yüksek ozon konsantrasyonlarının bulunması beklenmemekle birlikte, balıklar su arındırma ve mor ötesi ışınlama gibi bazı teknolojik işlemler sırasında buna maruz kalabilir. Model deneylerinde, gökkuşağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) kırmızı kan hücreleri (RBC), hemoliz, methemoglobin oluşumu ve RBC zar lipid peroksidasyonuna neden olan ozona maruz bırakılmıştır (Fukunaga *et al.* 1999). Ozonla yapılan inkübasyon, RBC hasarına aracılık etmede kritik bir rol oynadığı öngörülen H₂O₂ üretimini arttırmıştır. Ne ozon ne de türevlerinin hücre dışından direk olarak saldırıya uğramadığı, ancak zar yoluyla nüfuz eden ozonun, hücre içi hemoglobin tarafından ROS üretimini uyardığı öne sürülmüştür. Ozonun gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) üzerindeki etkileri, ROS üretiminin uyarılmasıyla da bağlantılı olabilir (Hébert *et al.* 2008). Doğal ve yapay sularda, oksijen ile aşırı doygunluk, çevredeki tarım arazilerinden akan tipik olarak nitrojen ve fosfor gibi aşırı besinlerden kaynaklanan ötrofikasyona

bağlı fotosentez sonucunda oluşabilir. Solarizasyon altında yoğun bir şekilde yetiştirilen algler ve fotosentetik oksijenik bakteriler oksijen üretirler; bu da balıkları çok fazla etkiler. Ancak gece boyunca tüm organizmalar tarafından oksijen tüketimi bu gündüz hiperoksisini tersine döndürebilir. Bu durum kronik bir problem olmayabilir ancak, oksijen yetersizliği (hipoksi veya anoksi) oksidatif strese neden olabilir (Lushchak ve Bagnyukova 2006a). Ne yazık ki bugüne kadar, sudaki ROS seviyelerinin balık için tehlikeli olma olasılıkları ve balık solungaçlarında ve diğer dokularındaki çevreden gelen ROS nüfuzunun derecesi hakkında hiçbir bilgi bulunmamaktadır (Lushchak 2016).

1980'lerin başından beri hipoksik maruziyetin eritropoietin (EPO), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve glikolitik enzimlerin up-regülasyonunu, protein sentezinin down-regülasyonunu ve krebs döngüsü enzimlerini baskılamasını başlattığı bilinmektedir (ATP turnover oranını düşürmek için) (Hochachka *et al.* 1996). Oksijen hassasiyetinin altında yatan mekanizmayı araştırmada, azalan ROS ürünlerinin hipoksi boyunca gen transkripsiyonunu indüklemeyi gerektirdiği ileri sürülmüştür (Wenger 2000; Maxwel *et al.* 2001).

Mitokondrilerde elektron taşıma sisteminin iyileşmesinin sağlanması için sudaki çözünmüş oksijenin yeterli konsantrasyonları aerobik organizmalar için gereklidir (Richards 2009). Düşük oksijen seviyeleri, balıklar gibi çeşitli organizmalarda potansiyel olarak sub-letal (davranışsal, fizyolojik ya da biyokimyasal düzenlemeler) ve letal etkilere neden olabilir (Jensen *et al.* 1993; Rees *et al.* 2001). Balıklar düşük oksijen seviyesinde hemoostazi ve organizma fonksiyonlarını sürdürmek için çeşitli davranışsal, fizyolojik ve hücrel cevaplar ile cevap verebilir. Subletal etkiler, düşük oksijen seviyelerine cevabın belirlenmesinde önemlidir. Solunum ile oksijenin girmesi ile düşük oksijen durumunda organizmanın ilk etkilendiği yer solunum metabolizmasıdır (Thomas *et al.* 1999). Anaerobik organizmalardan aerobik organizmalara kadar hipoksik ortamlara karşı akuatik organizmanın cevabı değişmektedir (Via *et al.* 1998). Hipoksiye verilen cevapta organizmaların metabolik

stratejileri ve davranış değişiklikleri akuatik hayvanlarda oksidatif stresi indükleyebilir (Olsvik *et al.* 2005; Salas-Leiton *et al.* 2009). Bu canlılar oksidatif stresin gelişmesini önlemek için de antioksidan potansiyelini artıracaktır (Lushchak 2011a).

Hipoksi ile indüklenen oksidatif stres gelişiminden sorumlu olabilecek en az iki mekanizma önerilebilir. Bunlar (i) mitokondrial ETC'deki elektron taşıyıcılarının artan indirgenme durumu, elektron kaçışının artmasına ve bunun sonucu olarak da tek-elektron mekanizması yoluyla moleküler oksijenin indirgenmesine neden olabilir (Şekil 1) ve (ii) ksantin redüktazın ksantin oksidaza ve ksantin oksidaz tarafından da ROS üretimine proteolitik dönüşümü. Balıklarda veya diğer organizmalarda hipoksi ile uyarılan oksidatif stresin ya doğrulanmasına ya da başka mekanizmaları önermeye yardımcı olabilecek hiçbir deneysel bilgi bulunmamaktadır (Lushchak 2016).

Teorik olarak, balıkta çevresel oksidatif strese dolaylı olarak neden olabilecek insan kaynaklı aktivitelerin farklı türleri, çevresel sıcaklık ve aydınlanma değişiklikleri ile ilişkili olabilir. Son zamanlarda, Johannsson *et al.* (2014), gece oksijen doygunluğunun neredeyse gece sıfırdan gündüz % 400' e kadar değişebileceğini belirlemiştir; bu periyotlarda hidrojen peroksit seviyeleri benzer şekilde sıfır ila 8 µM aralığında değişebilir.

1.9. Balıklarda Stres Toleransı

Genellikle memeliler hücresel hasar ve buna cevap ile ilgili mekanizmaları aydınlatmak ve oksidatif stres çalışmak için kullanılır. Ancak balıklara karşı, onların organizmalar ile ilişkisi ve su çevrelerinin özelliklerinden dolayı özel ilgi vardır (Winston and Di Giulio 1991; Kelly *et al.* 1998; Nikinmaa and Rees 2005). Akuatik bir çevre su sıcaklığı, tuzluluk, akışkanlık, ötrofikasyon, alg yoğunluğu ve fotosentetik aktiviteler ve organizmaların solunum yoğunluğundan dolayı oksijen

yoğunluğu yönünden sürekli heterojeniktir. Böylece sucul organizmalar sürekli bir şekilde değişik oksijen konsantrasyonlarına maruz kalır. Doğal olarak oksijen seviyesi gece boyunca düşük seviyelerden gün boyunca aşırı yüksek seviyelere kadar çıkabilir. (Zernov 1934). Balıkların oksijen toleransları kendi aralarında değişmektedir. Sođuđa adaptasyonu olan türler genellikle yüksek oksijen toleranslıdır. Hal böyleyken Cyprinid türler anoksiden hiperoksiye kadar her ortamda hayatta kalabilirler (Love 1980; van den Thillart and van Waarde 1985; Lushchak *et al.* 2001; Lushchak and Bagnyukova 2006b, c). Hipoksi/Anoksi toleranslı balıklar birçok noktada özelleşmişlerdir (Nilsson and Renshaw 2004). Bu yüzden anoksi toleranslı goldfish'in hepatositleri akut hipoksiye cevap olarak oksijen tüketimini kısıtlar. Bu noktada gökkuşuğı alabalığının anoksi toleransı bulunmamaktadır (Krumchnabel *et al.* 2000). Ayrıca, *L. xanthurus* (Cooper *et al.* 2002), *Carassius auratus* (Lushchak *et al.* 2001), *S. aurata*'nın (Pérez-Jimenez *et al.* 2012) ciddi hipoksiye, hatta anoksiye dahi yüksek toleransının olduğu bildirilmiştir.

1.10. Gökkuşuğı Alabalığı Hakkında Genel Bilgiler

Model organizmaların deney manüplasyonlarına uygun olması, kısa yaşam döngüsüne sahip olması, jenerasyonlar arası sürenin kısa olması, insan genomuna genetik ve biyolojik benzerliği (böylece insan genomik diziliminin yorumlanmasına yardımcı olurlar), temininin kolay olması, özel yaşam gereksinimine sahip olmaması, laboratuvar ortamında üretmek ve üretimlerini devam ettirmenin kolay olması embriyonik gelişiminin kolayca izlenebilmesi ve müdehale edilebilirliği, kolay kültüre alınması gibi özelliklere sahip olması beklenir. Bu özellikler araştırmacılara deneysel avantajlar sunar (Ankeny 2006). Bütün organizmalarda var olan türler arası genetik benzerlikler, bir organizma ile ilgili yapılan çalışmanın diğer türler için de veri kaynağı olarak kullanılabilereği anlamına gelmektedir (Collins *et al.* 1998). Sucul ekosistemlerle ilişkili genotoksik etkilerin çalışılmasında kullanılan çeşitli omurgasız ve omurgalı test organizmaları özellikle son 10 yılda model organizma olarak balık türlerinin kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır (Çavaş 2004)

Salmonidae familyasında yer alan Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ülkemizde tatlı su balıkları içerisinde yetiştiriciliğinin en yaygın olarak yapıldığı balık türüdür. Bu tür hızlı gelişmesi, yemden daha iyi yararlanması, çevreye uyumu ve hastalıklara karşı dayanıklı olması gibi özelliklerinden dolayı dünyada ve ülkemizde su ürünleri yetiştiriciliğinde ön plana çıkmış ve karasal ve özellikle de sucul canlılar ile ilgili olarak moleküler biyoteknoloji çalışmalarında model organizma olarak kullanılmaktadır.

1.11. Çalışmanın Amacı

Literatürde şimdiye kadar hipoksinin akut etkilerinin pembe karides (*Pandalus borealis*), Atlantik somonu (*Salmo salar*), Pasifik beyaz karidesi (*Litopenaeus vannamei*), Japon balıkları (*Carassius auratus*), zebra balığı (*Danio rerio*) veya gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) gibi organizmalarda araştırılmasına rağmen (Pillet *et al.* 2016; Lygren *et al.* 2000; Li *et al.* 2016; Lushchak *et al.* 2005b; Feng *et al.* 2016; Ritola *et al.* 2002c) 28 günlük kronik hipoksi ve hiperoksi maruziyetlerinin antioksidan savunma sistemi, beraberinde antioksidan enzimlerine bağlı metabolitlerin ve bunların yanında mRNA ifadelerinin üzerindeki etkisinin aynı anda belirlenmesine yönelik çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, hem akut hem de kronik mild hipoksi veya hiperoksi ile indüklenen oksidatif stres mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmaktır. Bu bağlamda biz bu çalışmada hem akut hem de kronik mild hipoksi veya hiperoksinin gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek ve solungaç metabolizmalarındaki antioksidan enzimleri gen ekspresyonu, antioksidan enzim aktiviteleri ve metabolitlere (GSH, GSSG, MDA ve LPO) etkilerini araştırdık.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Pillet *et al.* (2016) pembe karides (*Pandalus borealis*) ve yavru siyah tütün balıklarını (*Reinhardtius hippoglossoides*) 1 hafta boyunca 5 °C'de % 100, 40, 30 ve 20 doygunlukta çözünmüş oksijene maruz bırakmışlar ve hepatopankreas ve karaciğer dokularında antioksidan savunması ile ilgili enzimlerin (GPx, SOD ve CAT) aktiviteleri üzerine aşırı akut hipoksi etkisini değerlendirmişlerdir. Pembe karideste hepatopankreas GPx aktivitesinde hipoksi altında (%20 oksijen doygunluğunda) erkeklerde daha fazla olacak şekilde artış görülmüştür. Kronik olarak da hipoksiye maruz bırakılan siyah tütün balıklarında enzimatik cevap, akut hipoksi maruziyetinden daha fazla olduğu görülmüştür. Diğer balık türlerine kıyasla antioksidan enzim aktivitelerinde hiçbir değişiklik olmadığı fakat normoksidedeki aktivitenin yüksek olduğu bulunmuştur. Kronik hipoksiye maruz kalan siyah tütün balıklarında CAT gen ifadesinin istatistiksel olarak arttığı gözlenmiş diğer gen ifadelerinde ise farklılığın anlamlı olmadığı görülmüştür.

Trenzado *et al.* (2006) yaptıkları çalışmada gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ve mersin balığı (*Acipenser naccarii*) türleri arasında solungaç, kalp, sindirim borusu, karaciğer, beyaz kas, deri, kırmızı kan hücresi ve hava keselerinde antioksidan enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyon seviyelerini karşılaştırmışlardır. CAT hariç alabalığındaki antioksidan seviyesi daha yüksek bulunmuştur. Her iki türde de sindirim borusundaki lipid peroksidasyonu diğer dokulardan daha yüksek bulunmuştur. Sadece gökkuşağı alabalığı düşünüldüğünde SOD ve CAT enzimlerinin en yüksek aktivitesi karaciğerde bulunmuştur. LPO'nun ise solungaçlarda karaciğerden daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Lygren *et al.* (2000) tarafından yavru atlantik somonunda (*Salmo salar*) 6 haftalık orta dereceli hiperoksi (%140-150 doygunlukta) ardından 6 haftalık kronik aşırı hiperoksi (%280 doygunlukta) sonrası karaciğer dokusunda CAT, SOD ve GPx

aktiviteleri, TBARS ve GSH seviyeleri belirlenmiştir. 6 ve 12. haftadan sonra TBARS seviyesinin önemli derecede arttığı gözlenmiştir. 6 haftadan sonra karaciğer SOD ve GPx aktiviteleri önemli seviyede azalmıştır. Karaciğer CAT aktivitesi oksijen stresinden etkilenmemiştir. 12. haftadan sonra GSH konsantrasyonu düşük bulunmuştur.

Olsvik *et al.* (2005) atlantik somonları (*Salmo salar*) üzerinde smoltifikasyon süresince iki aşamalı yaptıkları çalışmada, birinci uygulamada 54 gün %80 (normoksi), %105 ve %130 doygunlukta oksijen, ikinci uygulamada 72 gün %90 ve %130 doygunlukta oksijen uygulamışlardır. Karaciğer dokusundaki SOD, CAT ve GPx enzimlerinin mRNA ve TBARS seviyelerindeki değişimleri, kanda ise tGSH GSSG ve OSI miktarlarını gözlemlemiştir. Sonuç olarak; karaciğerde her iki aşamada da hiperoksi sonrası CAT, SOD ve GPx mRNA seviyelerindeki değişim önemsiz bulunmuştur. 126 gün sonra %130 doygunlukta oksijene maruz kalan somonların OSI'nde azalma meydana gelmiştir. Oksijen maruziyeti TBARS seviyesi üzerine herhangi bir değişim yapmamıştır. Oksijen konsantrasyonlarına maruz kalan somonların kanlarında ilk aşamada hiperoksi uygulamasında OSI ve GSSG miktarlarını normoksi balıklarına kıyasla değişim önemsiz bulunmuşken ikinci aşamada önemli derecede düşük bulunmuştur.

Zhang *et al.* (2016) yayın balıklarında (*Pelteobagrus vachelli*) karaciğer ve beyin dokularında oksidatif stres üzerine hipoksinin ve yeniden oksijenlemenin etkilerini değerlendirmek için, SOD'ların (Cu/Zn-SOD ve Mn-SOD) mRNA ve protein ifadelerinin yanı sıra indisleri (CP, LPO ve MDA) ve enzimatik aktiviteleri (SOD, CAT, GPx, GR ve GST) analiz etmişlerdir. Kalp, beyin ve karaciğerde PvSOD2 baskın bir şekilde ifade olduğunu bulmuşlar. Buna karşılık, PvSOD1 ise karaciğerde yüksek oranda eksprese olmuştur. Antioksidan enzim aktivitelerinde ise hem hipoksi hem de yeniden oksijenleme ile çeşitli değişimlerin meydana geldiğini göstermişlerdir. Yukarıdaki parametrelerin gen ifade şekillerine dayanarak, 0,7 mg/L akut hipoksi şartlarının altında *P. vachelli*'nin beyin dokusunun hipometabolik

durumlar yaşayabileceğini veya acı çekme stresini yaşamayacağını ancak beyin dokusunun, hipoksi'den yeniden oksijenasyona geçiş esnasında oksidatif stresin en aza indirilmesi veya önlenmesi için etkili mekanizmalara sahip olduğunu öne sürmüşlerdir.

Lubiana *et al.* (2016) yaptıkları çalışmada dikence balıklarında (*Gasterosteus aculeatus*) üzerinde nonsteroid anti-inflamatuvar ilaç diklofenak ve hipoksinin etkilerini araştırmışlardır. 14 gün boyunca diklofenak konsantrasyonuna (1 µg/L), 24 saat hipoksiye (2,0 mg O₂/L) ve ikisinin kombinasyonuna maruz bırakmışlardır. Hipoksi veya diklofenak, balıklarda oksidatif stresle ilişkili olabilir, ancak sinerjistik olarak hareket edebilecekleri net değildir. Antioksidan yanıtı, hipoksi tepkisi ve solungaçlarda kimyasal metabolizma ile ilişkili genlerin ekspresyon analizi, diklofenakın tek başına etkili olmadığını, hipoksi ve diklofenak kombinasyonunun transkript seviyelerini daha fazla etkilediğini ve bu stresörlerin sinerjik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Antioksidan enzimlerin sadece SOD aktivitesi tedavilerde değişmeden kalırken, GPx hem transkript hem de aktivite seviyelerinde en çok etkilenen antioksidan yanıt olarak bulunmuştur.

Ritola *et al.* (2002a) iki grup yavru gökkuşağı alabalıklarını (*Oncorhynchus mykiss*) ya hiperoksi (<40 mg O₂/L) ya da ozona (5,2 µg O₃/L) maruz bırakarak solungaç, karaciğer, kan hücresi ve plazmadan 1, 5, 12, 24 ve 48. saatler sonrası örnekler almışlar ve antioksidan cevap, GSH durumu ve LPO'ya bakmışlardır. Hiperoksi etkisi ile 24. saatte hem solungaç hem de karaciğerde CAT aktivitesinin yükseldiğini, 48. saatte GSSG seviyesinin azaldığını fakat LPO'nun etkilenmediğini bulmuşlardır. Karaciğerde 1. saatte selenyum bağımlı GPx aktivitesinde bir artış saptamışlardır. GSH seviyesi hiperoksi ile birlikte çeşitli zamanlarda artış göstermiştir.

Ritola *et al.* (2002c) yavru gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ile yaptıkları çalışmada, 14 gün boyunca sürekli hiperoksi (% 173±24) ve üç hiperoksik/normoksik muameleye maruz bırakılmıştır. Oksidatif stresin göstergesi

olarak glutasyon, hemoglobin, hematokrit ve plazma kortizol seviyeleri gibi klasik stres göstergelerini normoksik, sürekli hiperoksik ve aşağıdaki episodik olarak hiperoksik oksijen muameleleri sırasında ölçmüşlerdir: 12 saat hiperoksi: 12 saat normoksi (12HYP:12NOR), 24HYP:24NOR ve 48HYP:24NOR. Bu çalışmaya göre; sabit hiperoksi, eritrositleri azaltma eğiliminde iken, 12HYP:12NOR tedavisi eritrosit sayısını arttırmıştır ve böylece kanın oksijen taşıma kapasitesi artmıştır. Benzer şekilde, 12HYP:12NOR muamele grubunda plazma kortizol konsantrasyonlarında yükselme eğilimi saptanmıştır. Karaciğer dokusunun oksidatif strese dirençte artan potansiyelinin göstergesi olan artan hepatik GSH düzeylerinin yükselmiş kortizol düzeyleri ile çakışması, 12HYP:12NOR muamelesindeki fizyolojik süreçlerin kandaki oksijen taşıma kapasitesini arttırmak ve oksiradikallere karşı koruma seviyesini yükseltmeye yardımcı olmak için olabileceği düşünülmüştür. Bununla birlikte, episodik hiperoksi veya sürekli hiperoksi muamelelerinin hiçbiri glutasyon seviyesini değiştirmedeği, mortaliteye neden olmadığı veya daha iyi büyüme sağlamadığını ortaya çıkarmıştır.

Leveelahti *et al.* (2014), apolet köpek balığı (*Hemiscyllium ocellatum*), dikence balığı (*Gasterosteus aculeatus*) ve gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) olmak üzere üç türün hipoksiye toleranslarının dereceleri üzerine veriler sunmuşlardır. Gökkuşağı alabalığının karaciğerinde CAT, SOD, GST ve G6PDH aktivitelerinin %33 hipoksiye cevapta değişim göstermediği bulunmuştur. Hipoksi boyunca antioksidan savunmadaki değişimlerin tür ve/veya dokuya spesifik olduğu ve balık türlerinin hipoksi tolerans seviyeleri ile bağlantılı olmadığı bildirilmiştir.

Ritola *et al.* (2002d) gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'ndan aldıkları kan örneklerini *in vitro* olarak 5 dk saf oksijen (hiperoksi) veya hem ozon hem de oksijen birlikte maruz bırakmışlardır. Maruziyetten sonra kan örneklerini 4 °C'de 10 dk, 3 ve 6 sa karanlıkta tutmuşlardır. Sonuçta, plazmada MDA seviyesinin oksijen muamelesi ile değişmediğini, kırmızı kan hücrelerinde 10. dk' da oksijen muamelesi ile MDA seviyesi yüksek bulunmuş ancak sonraki saatlerde değişimin olmadığını

gözlemişlerdir. Plazmada GSSG seviyesi başta normal iken 6. saatte azalış sergilediğini, kırmızı kan hücrelerinde ise 10. dk' da artış gösteren GSSG daha sonra normal seviyelerde bulunmuştur. Ayrıca kırmızı kan hücrelerinde CAT aktivitesi oksijen maruziyeti ile artış göstermiştir. SOD enziminde ise sadece 3. saatte artış bulunmuştur.

Tiedke *et al.* (2014) Avrupa nehirlerine özgü iki balık türü üzerinde hipoksinin etkisini moleküler seviyede araştırmışlardır. Levrek (*Gymnocephalus cernua*) ve pisi balığı (*Platichthys flesus*) beyin, solungaç ve kalplerinde qRT-PCR vasıtasıyla, on bir hipoksiye duyarlı genin ifadesini izlemiştir. İkinci bir yaklaşımda, kontrollü laboratuvar koşulları altında hipoksi yanıtındaki ekspresyon değişikliklerini izlemişlerdir. En kuvvetli etkiyi gösteren genlerin, iki solunum proteini olan, miyoglobin ve nöroglobin ve bunun yanında apoptoz enzimi kaspaz 3 olduğunu bulmuşlardır. Pisi balığının kalbi haricinde, seçilen genlerin mRNA düzeylerinin hemen hemen aynı olduğu gösterilmiştir. Hipoksi altında gen ekspresyonu değişikliklerinin eğilimlerinin aynı olduğu bulunmuştur. Genel olarak, pisi balığı hipoksiye ruffe'den daha kuvvetli bir tepki göstermiştir; bu da pisi balığının hipoksiye daha duyarlı olduğunu düşündürmüştür. En belirgin farklılıklar, bir türün içindeki dokularda bulunmuştur; bu, hipoksi tepkisinin büyük ölçüde doku spesifik olduğunu göstermektedir. Veriler laboratuvar deneylerinin arazi verilerini esasen taklit ettiğini, ancak ek çevresel faktörler doğadaki hipoksi tepkisini arttırdığını göstermiştir.

Trasviña-Arenas *et al.* (2013) tarafından Pasifik beyaz karidesinde (*Litopenaeus vannamei*) hipoksi (1,5 mg O₂/L, 6 ve 24 sa boyunca) ve yeniden oksijenleme (hipoksi sonrası 1 sa) ile CAT gen ifadesi ve enzim aktivitesi çalışılmıştır. Solungaçlarda hipoksi ile CAT aktivitesi 6 ve 24. saatlerde artarken ekspresyonu değişmemiştir. Hepatopankreastaki ekspresyon ve aktivitede hiçbir farklılık bulunmamıştır.

Li *et al.* (2016) tarafından Pasifik beyaz karidesinde (*Litopenaeus vannamei*) akut hipoksinin genotoksik ve fizyolojik etkilerini belirlemek için karidesler üç çözülmüş oksijen seviyelerine maruz bırakılmıştır. Bunlar 24 sa boyunca 6,5 ppm (kontrol), 3 ppm ve 1,5 ppm ve daha sonra 24 sa yeniden oksijenleme (6,5 ppm)'dir. Solungaç, hepatopankreas ve hemolenf dokularındaki SOD, GPx aktiviteleri, MDA konsantrasyonu ve DNA hasarındaki değişimler hipoksi ve yeniden oksijenleme boyunca araştırılmıştır. Sonuçlar; solungaçlarda 12 ve 24 sa 3 ppm hipoksideki MDA konsantrasyonu hariç SOD, GPx aktiviteleri, MDA konsantrasyonu ve DNA hasarı hipoksi periyodu boyunca kontrole kıyasla artmıştır. Bu parametreler yeniden oksijenleme boyunca normal seviyelerine geri dönmüş, iyileşme göstermiştir.

Feng *et al.* (2016) zebra balıkları (Zebrafish)'nın fizyolojisi üzerine hipoksinin etkisini tüm iç organ kütlelerinde araştırmışlardır. Balıklar 48 sa orta ($3\pm 0,3$ mg/L) veya ağır ($1\pm 0,2$ mg/L) dereceli hipoksiye maruz bırakılmış ve sonrasında 25 °C'de 96 sa yeniden oksijenlemeye ($8\pm 0,3$ mg/L) tabi tutulmuştur. Enzim aktivitelerinin normoksiye göre aşırı hipoksi için başlangıç, hipoksi ve reoksijenleme cevapları farklılık gösterdiğini, orta dereceli hipoksi için ise farklılık göstermediğini bulmuşlardır. Özellikle hipoksi maruziyeti ile balıklarda antioksidan aktivitelerinde (CAT, SOD ve GPx) önemli derecede azalış meydana geldiği bulunmuştur. Ayrıca zebra balıklarının orta dereceli hipoksiye hızlıca alışma gösterebileceklerini, çözülmüş oksijen yoğunluğunun 1 mg/L'nin altına düştüğünde ise oksidatif hasara maruz kalabilecekleri belirtilmiştir.

Lushchak *et al.* (2005a) sazan balığının (*Cyprinus carpio*) beyin, karaciğer, böbrek ve iskelet kaslarında lipid peroksit (LOOH), TBARS, karbonil protein, toplam glutatyon ve altı antioksidan enzim aktivitesi seviyeleri üzerine hipoksi maruziyeti (normal oksijen seviyesinin% 25'i) ve normoksik iyileştirmenin etkilerini belirlemişlerdir. 5 saatlik hipoksi maruziyetinin oksidatif hasar ürünlerinin seviyesini genel olarak düşürmüştür, ancak karaciğerde TBARS içeriğini yükseltmiştir. Hipoksi, beyinde katalaz aktivitesini (1,7 kat) ve GPx aktivitesini (1,3 kat) artırmıştır. Bunun

reoksijenleme ile meydana gelebilecek oksidatif stresin üstesinden gelmek için olduğu tahmin edilmiştir. Karaciğerde, sadece diğer enzimlerin etkilenmediği halde hipoksi ve reoksijenasyon altında GPx aktivitesi azalmıştır. Böbrekte, aerobik iyileşme altında GPx aktivitesinde azalma meydana gelmiş, ancak SOD ve CAT aktivitelerde keskin artışlarla yanıt vermiştir. İskelet kasında, hipoksi maruziyeti altında GPx aktivitesinde bir azalma ve reoksijenleme altındaki SOD aktivitesinde küçük değişikliklerde bir artış meydana gelmiştir. Sazan organlarında antioksidan savunmacılar ile verilen tepkiler beyinde bazı antioksidan enzimler tarafından hipoksi altında artmış gibi görünse de aslında iyileşme sırasında oksidatif hasara doğrudan tepki böbrek ve iskelet kasında enzim cevaplarını tetiklediği görülmüştür.

Lushchak and Bagnyukova (2007) yaptıkları çalışmada tatlı su yırtıcısı rotan (*Perccottus glenii*) beyin, karaciğer ve iskelet kasında 2, 6 veya 10 saatlik hipoksinin (0,4 mg O₂/L) ve ardından normoksik iyileştirmenin, LPO, TBARS, CP, serbest tioller ve altı antioksidan ve ilişkili enzimler üzerine etkileri ölçülmüştür. Hipoksi ile CP içeriği kontrollere göre beyinde (5,0-7,4 kat), karaciğerde (2,2-3,3 kat) ve kasda (3,2-6,1 kat) artmıştır ve iyileşme sırasında seviyelerde yükselme meydana gelmiştir. Lipit peroksit içeriği, incelenen tüm dokularda 2 saatlik hipoksi ile yükselmiş ancak en belirgin artış karaciğerde (8,7 kat) olmuştur fakat kas hariç daha uzun süre hipoksik maruziyet esnasında tekrar azalmıştır. Düşük molekül ağırlıklı tiollerin seviyeleri, tüm dokularda 2 saatlik hipoksiden sonra geçici olarak düşmüş, ancak daha uzun süre hipoksik maruz kalma ve iyileşme sonrasında kontrollerle karşılaştırıldığında daha yükselmiştir. Hipoksi ile karaciğer ve kastaki protein tiyol içeriği azalmış ve yeniden oksijenleme sonrasında kontrol seviyelerine dönmüştür. Hipoksi ile balığın karaciğerinde SOD aktivitesi iki kat artmış ve kas GST de benzer bir eğilim göstermiştir. Hipoksi sırasında diğer enzimlerin aktiviteleri azalmış ya da değişmemiş ve normoksik oksijenleme sırasında bazı noktalarda yükselmiştir.

Lushchak *et al.* (2005b) japon balıkları (*Carassius auratus*) üzerinde yaptıkları çalışmada hiperoksinin antioksidan savunma sistemlerine ve oksidatif hasar

markırlarına etkisi değerlendirilmiştir. 3-12 saatlik hiperoksiyi takiben 12-36 saatlik bir reoksijenleme üzerine japon balığının beyin, karaciğer, böbrek ve iskelet kasında LPO, TBARS, CP ve bazı antioksidan enzimlerin aktiviteleri ve llmştr. Yüksek oksijene maruz kalma, hiperoksi ve reoksijenleme boyunca dokularda protein karbonil birikimiyle sonuçlanırken, LPO ve TBARS kısa süreli hiperoksi stresi (3-6 saat) altında geçici olarak artmış ancak daha sonra güçlü bir Şekilde azaltılmıştır. Başlıca antioksidan enzimlerin aktiviteleri, SOD ve CAT, hiperoksi altında değişmemiştir, ancak CAT normoksik reoksijenleme sırasında artmıştır. Çoğu dokuda, glutasyonu kullanan enzimlerinin (GPX, GST ve GR) ve G6PD aktiviteleri, hiperoksi altında etkilenmemiştir, fakat normoksik reoksijenleme sırasında keskin bir Şekilde artmıştır. Bazı enzim aktiviteleri ile oksidatif stres markırları arasındaki korelasyonlar, örneğin, karaciğerde tiobarbitürik asit reaktif maddeleri ile glutasyon-S-transferaz düzeyleri ve böbrekte katalaz ile glukoz-6-fosfat dehidrogenaz düzeyleri arasında ters korelasyon görülmüştür.

Lushchak *et al.* (2001) alışmalarında, anoxia ve reoksijenleme boyunca japon balığının (*Carassius auratus*) antioksidan sisteminin verdiği cevapları değerlendirmişlerdir. 8 saatlik anoksi maruziyeti böbrekte tGSH düzeylerinde % 14'lk bir düşüşe neden olmuş iken karaciğer, beyin ve kas etkilenmemiştir. Anoksi ayrıca karaciğer CAT, beyin G6PD ve GPx aktivitelerinde (sırasıyla % 38, % 26 ve % 79) artışa ve böbrek CAT aktivitesinde (% 17,5) azalışa neden olmuştur. 14 saatlik reoksijenleme sonrası, karaciğer CAT ve beyin GPx aktiviteleri kontrollerden daha yüksek olarak kalmış ve enzim aktivitelerinde bazı diğer dokuya spesifik değişiklikler meydana gelmiştir. SOD aktivitesi anoksi ve reoksijenlemeden etkilenmemiştir. Lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak konjuge dienlerin seviyesi, 1 saatlik reoksijenleme sonrasında karaciğerde %114 artış göstermişken 14 saatlik yeniden oksijenleme sonrasında beyinde %75 artış göstermiştir. Böbrekte lipit peroksidasyonu etkilenmemiş ve kasda ise anoksi ve reoksijenleme (% 44-61) ile azalmıştır.

Olsvik *et al.* (2006) Atlantik morinası (*Gadus morhua*) hepatik dokusu üzerinde yaptıkları çalışmada 6 hafta boyunca % 46 (hipoksi), % 76 (normoksia) ve % 145 (hiperoksi) O₂ doygunluğunun, SOD, CAT, GPx antioksidan enzimlerini kodlayan üç genin ve metallothionein (MT) ve CYP1A stres proteinlerinin üzerine transkripsiyonel etkisini araştırmışlardır. Oksidatif stres durumunu değerlendirmek için, aynı doku örneklerinde tGSH, GSH, GSSG ve OSI düzeyleri belirlenmiştir. GPx'in transkript seviyesi, hiperoksiye maruz kalan balıklarda normoksi grubuna kıyasla belirgin şekilde yükselmiştir ve hipoksiye maruz kalan balıklarda belirgin olarak azalmıştır. Hipoksiye maruz kalan balıklarda SOD transkripsiyonel seviyesi için önemli derecede azalış tespit edilmiştir. CAT transkript seviyesi, karaciğerde değişmemiştir. Gruplar arasında tGSH, GSH, GSSG veya OSI için anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Olumsuz oksijen saturasyon seviyelerine uzun süre maruz kalma, OSI'yi değiştirmemiş; incelenen morina karaciğerinde antioksidan glutatyon sisteminin, değişmeden bir seviyede tutulduğunu göstermiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan materyal ve cihazlar

Tez kapsamında kullanılan materyal ve cihazların markaları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Tez kapsamında kullanılan materyal ve cihazların markaları

| Materyal ve Cihaz | Marka |
|-------------------------------------|----------------------|
| Kapalı Devre Sistem | AKUAMAKS |
| RNA İzolasyon Robotu | Qiagen, QIAcube |
| Real Time PCR | Qiagen, Rotor-Gene Q |
| UV Görüntüleme Cihazı | Bio-Rad |
| UV-VIS Spektrofotometre | Beckman Coulter |
| Soğutmalı Santrifüj | Beckman Coulter |
| Vorteks | WiseMix |
| PCR | Thermo Scientific |
| Homojenizatör | Blaster |
| Homojenizatör (RNA İzolasyonu için) | Qiagen |
| pH Metre | Ohaus |
| µdrop Spektrofotometre | Thermo, Multiskan Go |
| Çeker Ocak | Labcaire |
| Elektroforez Cihazı | Thermo Scientific |
| Distile Su Üretim Cihazı | Nüve |
| Kar Üretme Cihazı | Scotsman |
| Mikrosantrifüj | Sprout |
| Otoklav | WiseClave |
| Derin Dondurucu -20 °C | Uğur |
| Derin Dondurucu -80 °C | Nuaire |
| 4 °C Soğutucu | Liebherr |
| Etüv | Memmert |

Çizelge 3.1. (Devamı) Tez kapsamında kullanılan materyal ve cihazların markaları

| | |
|-----------------------------|-------------------|
| Mikropipet Takımı | Eppendorf |
| Hassas Terazi | Shimadzu |
| Raklar | Isolab |
| 1,5 ml Tüpler | Isolab |
| 1,5 ml ve 3 ml Kuvars Küvet | Merck |
| 96'lık Kuvars µdrop Playt | Thermo |
| Isı Bloğu | Dathan Scientific |
| Mikrodalga Fırın | Arçelik |
| Manyetik Karıştırıcı | Heidolph |

3.1.2. Araştırma yeri

Araştırma, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Hayvansal Biyoteknoloji Laboratuvarı ve Model Organizma Ünitesi Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

3.1.3. Balık materyali

Çalışmada 3 aylık, $8,75 \pm 1,8$ gr ağırlığında toplam 500 adet gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yavruları kullanılmıştır (Şekil 3.1). Yavru alabalıklar Erzincan il sınırları içerisinde faaliyet gösteren Deniz Balık Üretim Tesislerinden temin edilmiştir. Alabalıklar *in vitro* ortama oksijen destekli taşıma tankları ile getirilerek kapalı devre sisteme su sıcaklıkları arasındaki farklılıklar tedrici olarak giderildikten sonra transfer edilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan yavru gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)

3.1.4. Deneme ünitesi ve ekipmanları

Tüm deneysel çalışma ARS-1500-RAS kapalı devre model organizma ünitesinde (Akuamaks Su Ürünleri, Ankara, TÜRKİYE) gerçekleştirilmiştir. Uygulamanın gerçekleştirildiği kapalı devre araştırma sistemi olan model organizma ünitesi (Şekil 3.2 ve Şekil 3.3), su sıcaklık değerinin istenilen seviyede sabit tutulması, fiziksel, UV ve biyolojik filtreler tarafından kirliliğin kontrol altında tutulması ve istenen optimum koşulların sağlanabilmesi gibi avantajlara sahiptir.

Model organizma Ünitesi için kullanılan su doğrudan şehir şebeke suyundan alınarak sırası ile sediment, karbon, granül aktif karbon, blok karbon ve membran filtrelerinden geçirilmiştir. Daha sonra dinlendirme tanklarında dinlendirilen su sisteme verilmiştir. Böylece suyun balıklar açısından güvenilirliğinden emin olunmuştur.

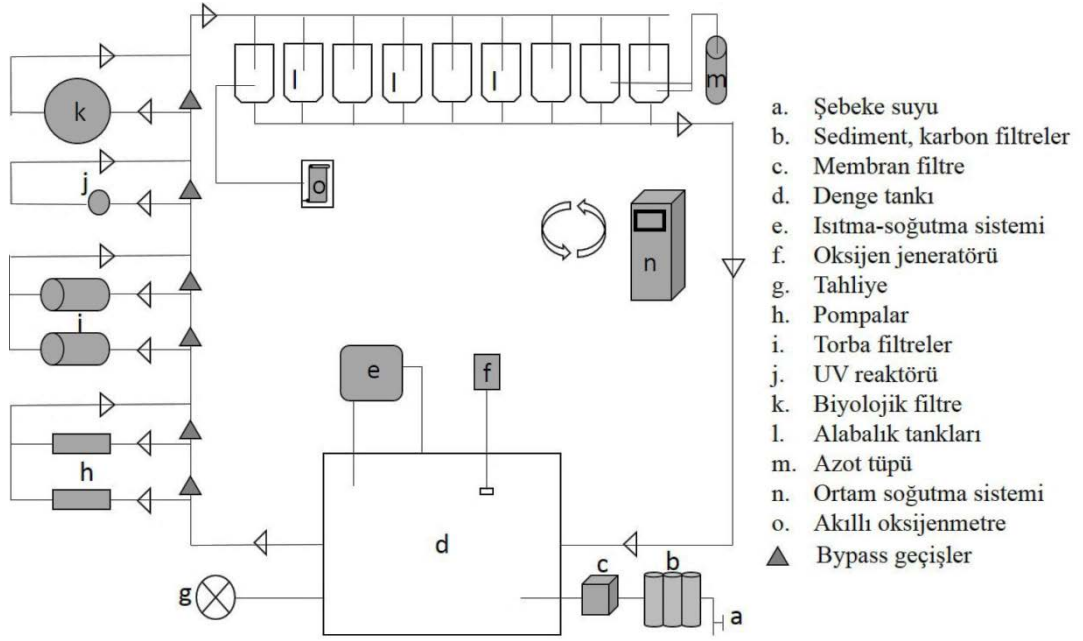


Şekil 3.2. Çalışmanın yürütüldüğü model organizma ünitesi



Şekil 3.3. Çalışmanın yürütüldüğü model organizma ünitesi alabalık tankları

Model Organizma Ünitesi ekipmanları ve özellikleri alt başlıklar halinde EK-1’de belirtilmiştir. Ayrıca tüm ekipmanlar Şekil 3.4’ da şematize edilmiştir.



Şekil 3.4. Model organizma ünitesinin şematize görünümü

3.1.5. Nitrifikasyon bakterilerinin kapalı devre sisteme ekimi

Biyolojik filtrenin aktif hale geçirilmesi için yaklaşık bir ay süresince sisteme suda oluşacak amonyak problemini önleme adına nitrifikasyon bakteri ekimi yapılarak, sisteme tutunması sağlanmıştır. Bakteri ekiminde aşağıdaki protokol uygulanmıştır;

Su dolu bir akvaryum içerisine hava taşları ve ısıtıcılar konularak su 30 °C'ye kadar ısıtılmış ve havalandırılmıştır. Su sıcaklığı 30 °C'ye ulaştığında Baktapur (içerisinde nitrifikasyon bakterilerinin bulunduğu suspansiyon) verilen dozajda (10 L su için 80 mL) akvaryuma ilave edilmiştir. Isıtıcılar ve hava taşları çalışır bir şekilde 24 saat boyunca 30 °C'de inkübasyona tabi tutulmuştur. 24 saatten sonra sadece ısıtıcılar kapatılarak bakteri kültürünün sıcaklığı (30 °C) sistemdeki su sıcaklığına (16 °C) düşmesi beklenmiştir. Su sıcaklığı istenen seviyeye ulaştığında havalandırmalar kapatılmıştır. İnkübe edilerek uyandırılmış bakteriler denge tankına boşaltılmıştır. Kapalı devre sistemdeki UV filtre kapatılarak bakterilerin tüm sisteme ulaşması ve kolonileri oluşturması sağlanmıştır. Tanklara biyolojik elementler ve biyolojik

filtreye bioballar konulmuştur. Bu şekilde sistemde bakterilerin tutunabileceği yüzey alanının artırılması sağlanmıştır. Bu işlem haftada bir defa olacak şekilde sistemdeki bakterileri desteklemek adına 1 ay süreyle tekrarlanmıştır.

3.1.6 Hipoksia ve hiperoksi uygulaması

Literatürlerde balık besleme amacına yönelik yaygın olarak kullanılan fiberglas araştırma tankları kullanılmıştır. Oksijen başta olmak üzere sudaki fiziksel ve kimyasal parametrelerin takibi ve kontrol altında tutulması amacıyla 50 L'lik tankların kullanılması tercih edilmiştir. Sudaki doygunluk, pH, sıcaklık ve çözülmüş oksijen değerlerini takip edebilen akıllı oksijenmetre probunun tank içerisine yerleştirilmesi ve balıkları rahatsız etmeyen bir hacmi kaplaması da bu hacimli tankların tercih sebeplerinden bir diğeridir.

Araştırmada 18 adet 50 L'lik tank kullanılmış olup her tanka 20 adet yavru alabalık konulmuştur. Kalan 140 adet yavru alabalık ise ayrıca bulundurulmuş stok tankına konulmuştur. Deneme süresi boyunca balıklara 14 saat aydınlık, 10 saat karanlık fotoperiyot uygulanmıştır ve günde ağırlıklarının %1,5'u oranında 4 defa (08:00, 12:00, 16:00, 20:00) yem verilmiştir. 2 haftalık süre sonrasında balıkların model organizma ünitesine aklimatizasyonlarının sağlandığı gözlenmiştir.

Bu 18 adet tankın 6'sı hipoksi, 6'sı normoksi, 6'sı da hiperoksi uygulamaları için kullanılmıştır. Her tankın oksijen seviyeleri balıklar tanka konulmadan önce ayarlanmış olup balıkların konulduktan sonraki tükettikleri oksijen miktarları göz önünde bulundurularak oksijen ölçümleri sürekli kontrol edilmiş ve gerekli müdahaleler yapılmıştır.

Hipoksi şartları tank kapakları kapalı halde, tanklara çözülmüş oksijen verilmeden, suya 30 mmHg N₂ verilerek (Almeida-Val *et al.* 2000), normoksi şartları tank

kapakları kapalı halde, % 93 saflıkta oksijen üreten jeneratörden düşük hacimli hava taşları ile suya çözülmüş oksijen verilerek, hiperoksi şartları ise yine tank kapakları kapalı halde % 93 saflıkta oksijen üreten jeneratörden yüksek hacimli hava taşları ile suya çözülmüş oksijen verilerek sağlanmıştır. Dakikada bir ölçüm alabilme ve hafızasına kaydederek internetten online takip edilebilme özelliğine sahip olan akıllı oksijenmetre probu ile sistem sürekli kontrol altında tutulmuştur.

Çalışmanın en önemli aşamalarından biri olan denemedeki hipoksi ve hiperoksi şartlarının deneme süresince sağlıklı bir şekilde yürütülebilmesi için 28 günlük deneme süresince sistem sürekli takip edilerek ölçümler yapılmıştır. Deneme başlangıcında balıklar tanklara yerleştirilmeden önce ve transfer edildikten sonra hipoksi, normoksi ve hiperoksi şartları özellikle çözülmüş oksijen miktarı sabitlenmiştir. Buna göre hipoksi ~4 ppm, normoksi ~8 ppm ve hiperoksi ~12 ppm olarak planlanmıştır.

Başladığı andan itibaren 4 hafta süreli bu üç uygulamanın 0 (başlangıç örneği), 6., 12., 24., 48., 72. saatlerde ve 28. günde moleküler ve enzim çalışmaları için kullanılacak dokular alınmıştır.

Hayvan deneyleri, laboratuvar hayvanlarının kullanımı ve bakımı için geçerli ulusal kurallara uygun olarak gerçekleştirilmiş ve Atatürk Üniversitesi yerel hayvan bakım komitesi tarafından onaylanmıştır. Etik kurul raporu EK-2’de verilmiştir. Diseksiyon uygulamaları Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası’na sahip kişiler tarafından gerçekleştirilmiştir. Tez yazarına ait “Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası” EK-3’te verilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Dokuların alınması

Uygulamaların akut ve kronik etkilerini belirlemek üzere moleküler ve enzim çalışmalarında kullanılmak için gökkuşağı alabalıklarından karaciğer, solungaç ve böbrek doku örnekleri diseksiyon yapılarak alınmıştır. Enzim çalışmaları için kullanılacak olan dokular sıvı azot içerisinde dondurularak, moleküler çalışmalar için kullanılacak olan dokular ise RNALater içerisinde konularak çalışılincaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

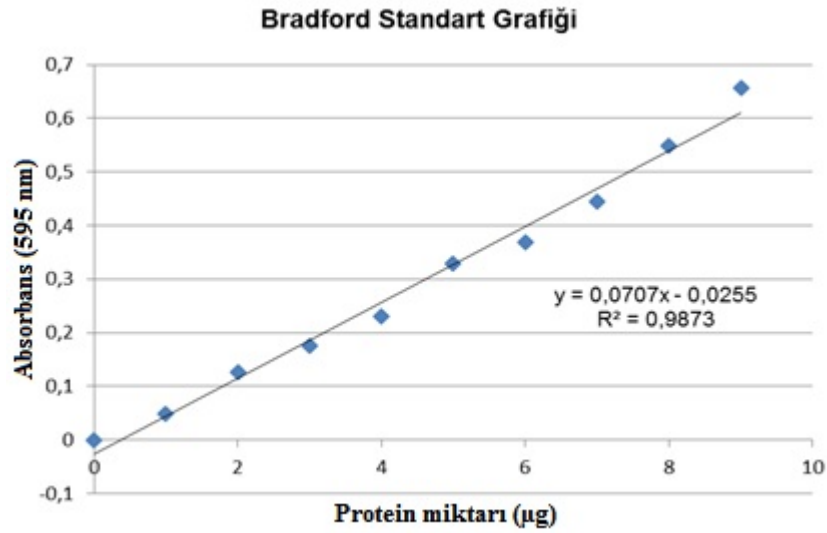
3.2.2. Enzim aktivitesinde kullanılan kantitatif protein tayini

Kantitatif protein tayini, Coomassie Brilliant Blue G-250'nin proteinlerle 595 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanan Bradford metoduna göre yapılmıştır. Bu metod yardımıyla önce standart protein olarak farklı konsantrasyonlarda Bovine Serum Albumin (BSA-Sığır serum albümini) kullanılarak bir standart grafik elde edilmiş ve bu grafik yardımıyla homojenize edilen numunenin protein miktarı hesaplanmıştır.

3.2.2.1. Bradford yöntemiyle protein tayini

Homojenatlardaki protein miktarı bu yöntemle belirlenmiştir. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250 negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ($\lambda_{max}=465$ nm) ve mavi ($\lambda_{max}=595$ nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin bozucu faktörlere hassasiyeti oldukça azdır (1-100 mg arası). Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder, 2 dakikada tamamlanır. Renk stabilitesi 2 saatin üzerinde devam edebilir (Bradford 1976).

Bu yöntem ile protein tayini yapabilmek için standart bir grafiğe ihtiyaç vardır. Bu amaçla 1 mg/mL protein ihtiva eden bovine serum albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL konulmuştur. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 100 µL'ye tamamlanmış ve 4900 µL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edilip vortekslenmiştir. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de köre karşı absorbans değerleri okunmuştur. Kör olarak, 100 µL saf su ve 4900 µL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen mg protein değerleri standart grafik haline getirilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Bradford protein tayininde kullanılan Coomassie Brilliant Blue çözeltisi standart grafiği

Tüplere elde edilen enzim numunelerinden 10 µL+ 90 µL su konularak üzerine 4900'er µL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edilmiştir. Vorteksledikten sonra 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 595 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Elde edilen bu absorbans değerlerine göre standart grafikten yararlanılarak protein miktarları belirlenmiştir.

Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltilisinin hazırlanışı: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 tartılıp 50 ml %95'lik Etanol içerisinde çözündürülmüştür. Üzerine 100 mL %95'lik Fosforik Asit eklenerek hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

3.2.3. Glutatyon seviyelerinin belirlenmesi

3.2.3.1. Homojenat eldesi

65±15 mg doku örnekleri (karaciğer, solungaç, böbrek) 2 mL'lik vida kapaklı tüplere alındıktan sonra 5 katı oranında %5'lik TCA çözeltilisi ilave edilmiştir. Üzerine zirkonyum boncuk (yaklaşık 20 adet) eklenip homojenizatörde 40 hertz'de 1'er dk 6 döngü olacak şekilde homojenize edilerek hücre zarları parçalanmıştır. Sonrasında 13.000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldıktan sonra oluşan çökelti atılarak homojenat elde edilmiştir. Homojenatın miktarı belirlenerek 300 µL'de 38,7 µL olacak şekilde 1,25 mM NaCO₃ (sodyum karbonat) katılmıştır (Koçpınar 2015).

Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı:

%5'lik TCA çözeltilisi: 5 gr TCA'dan alınarak 95 mL saf suda çözündürülmüştür.

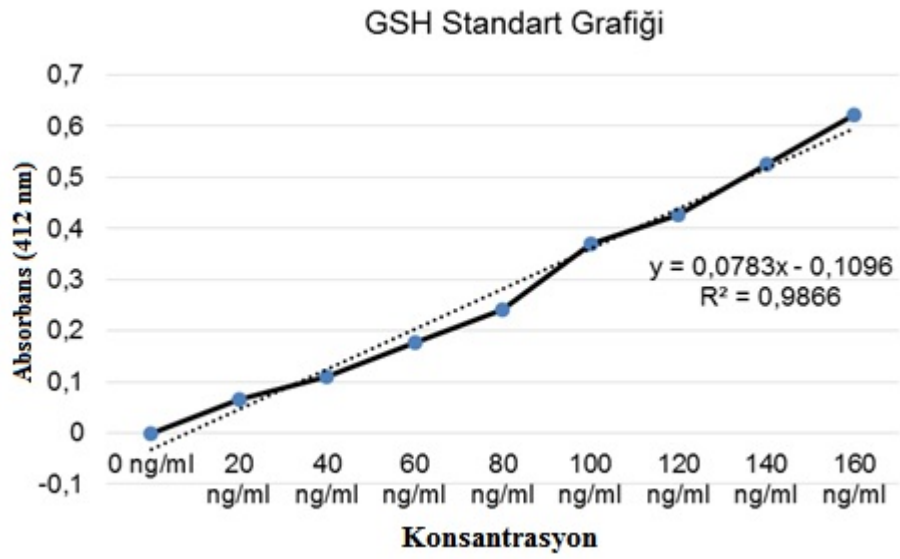
1,25 mM NaCO₃ çözeltilisi: 0,0013 gr NaCO₃ tartılıp 10 mL saf suda çözündürülmüştür.

3.2.3.2. Toplam ve okside glutatyon mitarlarının belirlenmesi

tGSH ve tGSSG ölçümünde Çizelge 3.2'deki protokol uygulanmıştır. GSSG oranlarının belirlenmesinde ilave olarak 0,2 mL'lik PCR tüplerine 50 µL homojenat alınıp üzerine 1µL 2-vinilpridin eklenip 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona

bırakılmıştır. GSSG ölçümleri inkübasyondan sonra gerçekleştirilmiştir. Ölçümler µdrop spektrofotometre’de 412 nm dalga boyunda 5 dk boyunca kaydedilerek gerçekleştirilmiştir.

tGSH ve tGSSG miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik Şekil 3.6’da verilmiştir.



Şekil 3.6. Dokulardaki tGSH ve GSSG miktarlarının belirlenmesi için hazırlanan standart grafik

Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı:

a. 200 mM KH₂PO₄/50 mM EDTA: 0,817 gr KH₂PO₄ tartılıp 25 mL saf suda çözündürülmüştür. 0,558 gr EDTA, KH₂PO₄ çözeltilisine ilave edilip NaOH ile pH 7,4’e ayarlanmıştır. Toplam hacim saf su ile 30 mL’ye tamamlanmıştır.

b. 2 mM NADPH: 0,0083 gr NADPH tartılıp 5 mL saf suda çözündürülmüştür.

c. **0,45 EU GR Çözeltisi:** 1,8 µL GR enziminden alınıp hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

d. **6 mM DTNB:** 0,0118 gr DTNB tartılıp 5 mL etanolde çözündürülmüştür.

Çizelge 3.2. Dokulardaki tGSH ve tGSSG ölçümü protokolü

| Çözeltiler | Kör (µL) | Numune (µL) |
|--|-----------------|--------------------|
| 200 mM KH ₂ PO ₄ /50 mM EDTA | 230 | 200 |
| 2 mM NADPH | 30 | 30 |
| Homojenat | - | 30 |
| 0,45 EU/mL GR | 10 | 10 |
| 6 mM DTNB | 30 | 30 |
| Toplam | 300 | 300 |

tGSH, GSH ve GSSG derişimleri her mg protein içerisindeki µg glutasyon olarak verilmiştir.

3.2.3.3. Okside ve redükte glutasyon ve oksidatif stres indeksi değerlerinin hesaplanması

Bulunan absorbans değerleri standart grafik ile elde edilen denklemde yerine konularak tGSH ve GSSG miktarları belirlenmiştir. Bu değerler dikkate alınarak GSSG, GSH, GSH/GSSG ve Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Eşitlik 1, 2 ve 3'ye göre hesaplanmıştır (Boehme 1992; Ritola *et al.* 2002a).

$$GSSG = \frac{tGSSG}{2} \quad \text{Eşitlik 1}$$

$$GSH = tGSH - GSSG \quad \text{Eşitlik 2}$$

$$OSİ = \frac{2 * GSSG}{tGSH} * 100$$

Eşitlik 3

3.2.4. Lipit peroksidasyonunun belirlenmesi

Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın konsantrasyonu, Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (Sigma, Aldrich) kullanılarak üretici firmanın protokolü modifiye edilerek kolorimetrik olarak belirlendi. Bu protokole göre;

100 gr doku örnekleri tartılıp 2 mL'lik vida kapaklı tüplere konularak üzerine 300 µL MDA Lysis Buffer ve 3 µL BHT konulmuştur. Üzerine yaklaşık 10 adet zirkonyum boncuk eklenerek homojenizatör (Benchmark Beadblaster 24)' de 4260 rpm'de 1'er dakikalık 3 döngü olacak şekilde dokular parçalanmıştır. Sonrasında 13.000 RCF'de 4 °C'de 10 dk santrifüj yapıldıktan sonra 200 µL üst faz alınarak 1,5 mL'lik eppendorf tüplerine konulmuştur. Her bir tüpe 600 µL TBA eklendikten sonra 60 dk boyunca 95 °C'deki su banyosuna konulmuştur. Sonrasında buz üzerinde bekletilip oda sıcaklığına gelmesi sağlanmış ve µdrop spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır.

Standart hazırlama: Standart protokole uygun olarak hazırlanmıştır. 407 µL su+ 10 µL standart ekleyip bundan 20 µL alıp üzerine 980 µL su konulmuş ve böylece 2 M'lık standart hazırlanmıştır. 2 mL'lik eppendorf tüplerine ayrı ayrı 0, 2, 4, 6, 8, 10 µL kadar hazırlanan 2 M'lık standarttan konulmuştur. Üzerlerine 600 µL TBA eklendikten sonra 95 °C'de 60 dk su banyosuna konulmuştur.

TBA hazırlanışı: %100'lük asetik asitten 7,5 mL alınıp üzeri saf suyla 25 mL'ye tamamlanmıştır. İçerisine manyetik bar atılarak manyetik karıştırıcıda çözünmesi sağlanmıştır.

3.2.5. Hidrojen peroksit seviyesinin belirlenmesi

H₂O₂ konsantrasyonu, Hydrogen Peroxide Assay Kit (abcam, ab102500) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre kolorimetrik olarak belirlenmiştir. Protokolde verilen kolorimetrik standart grafik hazırlanarak elde edilen denklem yardımıyla H₂O₂ konsantrasyonları hesaplanıp örnek hacmine bölünerek her örneğin konsantrasyonu µM olarak hesaplanmıştır. Her doku için ayrı standart hazırlanmıştır. Protokole göre;

50 mg doku tartılıp 2 mL'lik vida kapaklı tüplere alınarak üzerine alınan doku miktarının 5 katı oranında Ripa buffer eklenmiştir. Üzerine yaklaşık 10 adet zirkonyum boncuk eklenerek homojenizatör (Benchmark Beadblaster 24)'de 4260 rpm'de 1'er dk'lık 3 döngü olacak şekilde dokular parçalanmıştır. Sonrasında 1000 RCF'de 4 °C'de 15 dk santrifüj yapıldıktan sonra 50 µL üst faz alınarak µdrop mikroyuvarlığına yüklenmiştir. Hazırlanan standartlarda yüklenerek üzerlerine 50 µL mix eklenip 10 dk inkübasyondan sonra 570 nm'de ölçüm yapılmıştır.

Standart hazırlama: 10 mM H₂O₂ standart için, 10 µL H₂O₂ + 870 µL dH₂O eklenmiştir. Sırası ile 50, 40, 30, 20, 10, 0 µL su konulup ve yine aynı sırayla 0, 10, 20, 30, 40, 50 µL hazırlanan 10 mM H₂O₂ standarttan eklenmiştir.

3.2.6. Moleküler çalışmalar

3.2.6.1. Total RNA izolasyonu

-80°C'de saklanan dokular çıkarılıp kar üzerinde çözdürülmüştür. Bu dokulardan 50 mg doku örneği alınmış ve 2 mL'lik eppendorf tüpleri içerisine konulmuştur. Tüp içlerine doku parçalayıcısında parçalanmasına yardımcı olacak çelik bilyeler de konulmuştur. Ayrıca tüplere, hücrelerin ve yağların etkin parçalanması için 1 mL

QIAzol Lysis Reagent eklenmiştir. Homojenizatörde 3+3 dk olacak şekilde 40 Hz'de dokuların parçalanması sağlanmıştır. Sonrasında tüplere 200 µl kloroform eklenmiştir. 15 sn vorteks işlemi yapılmış ve örnekler +4°C'de 12000 RCF'de 15 dk santrifüj yapılmıştır. Sonrasında süpernatanttan 500 µl pipet yardımı ile alınmış ve QIACUBE RNA izolasyon cihazında izolasyon için 2 mL'lik koleksiyon tüplerine aktarılmıştır. Koleksiyon tüpleri, önceden solüsyonları ve programı hazırlanan RNA izolasyon cihazına konulmuştur. Her 12 örnek için 40 dk süren izolasyon sonrasında izole olan RNA örnekleri cihazdan çıkarılarak kalitatif ve kantitatif tayinleri yapılmıştır.

3.2.6.2. RNA'nın kalitatif tayini

3,5 µl ddH₂O, 0,5 µl 20xMOPS solüsyonu ve 5 µl formamid 2 mL'lik PCR tüplerine konularak üzerine elde edilen RNA örneklerinden 1µl eklenmiştir. 65 °C'de 15 dk etüvde inkübasyona bırakılmıştır. RNA örneklerinin yürütüleceği jel için 0,7 gr agaroz, 4,38 mL 20xMOPS ve 66,5 mL ddH₂O ve 15,6 µL formamid erlenmayere konulup mikrodalga fırında 3-4 dk kaynatılmıştır. Jel biraz soğutulduktan sonra üzerine 12,8 µL EtBr (etidyum bromür) eklenerek küvetine dökülüp donmaya bırakılmıştır. Jel donduktan sonra elektroforez küvetine 1xMOPS solüsyonundan jelin üzerini kaplayacak şekilde yavaşça dökülmüştür. Daha sonra örnekler jel üzerinde taraklar aracılığıyla oluşturulan kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez işlemi 90 V'da 30 dk elektrik akımı verilerek başlatılmıştır. Jel, yürümesi bittikten sonra UV (ultraviyole) ışığı altında görüntülenmiş ve görüntüler kaydedilmiştir.

1xMOPS hazırlanışı: 25 mL stok 20xMOPS solüsyonu saf su ile seyreltilerek toplam hacim 500 mL'ye ayarlanmış ve 4°C'de saklanmıştır.

20xMOPS hazırlanışı: 41,9 gr MOPS, 6,8 gr sodyum asetat, 2,6 gr EDTA, 400 mL DEPC H₂O bir erlende karıştırılarak pH'ı 7,0'ye ayarlanmıştır. Daha sonra toplam hacim DEPC H₂O ile 500 mL'ye tamamlanarak 4°C'de saklanmıştır.

3.2.6.3. RNA'nın kantitatif tayini

İzole edilen Total RNA örnekleri μ drop spektrofotometrede ng/ μ l cinsinden konsantrasyonları ve $\text{Å}_{260}/\text{Å}_{280}$ saflık oranları belirlenmiştir. Konsantrasyon ve saflıkları belirlemek için her örnekten 2 μ l alınarak ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.4. RT-PCR ile cDNA kütüphanesinin oluşturulması

İzole edilen total RNA örnekleri -80°C 'den çıkarılarak buz üzerinde çözündürülmüştür. Her örneğin konsantrasyonu spektrofotometrik ölçümler yapılarak hesaplanmıştır. Bu konsantrasyon hesaplamasına göre miktarı belirlenmiş RNA örneği, 1 μ L oligodT, 1 μ L mM dNTP mix (pH=7,0 olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'nin her birinden 10 mM) ve toplamda 13 μ L'ye tamamlanacak şekilde DNaz/Rnaz-free su 0,2 mL'lik PCR tüplerine eklenmiştir (Toplam örnek miktarı 13 μ L olacak şekilde ddH₂O miktarı 11-RNA miktarı olarak ayarlanmıştır). Tüpler, kapak sıcaklığı 105°C olan PCR'da 65°C 'de 15 dk inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda tüpler mikrosantrifüj yapılmış, üzerine 4 μ L 5XFirst Strand Buffer, 1 μ L 0,1 M DTT, 1 μ L RNase Out ve 1 μ L Superscript III Reverse Transcriptase (SSIII RT, Invitrogen) eklenip tekrar mikrosantrifüj sonrasında yavaşça pipetaj yapılmıştır. Tüpler daha sonra PCR'da 50°C 'de 45 dk ve hemen ardından 70°C 'de 15 dk inkübe edilmiştir. Böylece cDNA'lar elde edilmiş ve -20°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.2.6.5. Sentezlenen cDNA'nın kontrolü

RT-PCR ile sentezlenen cDNA'lar referans gen olarak kullanılan β -Aktin (GenBank Erişim No: AF254414) gen bölgesine spesifik primerlerle PCR'da amplifiye edilmiştir. Elde edilen PCR ürünü agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve görüntüleme sisteminde amplifikasyonu değerlendirilmiştir.

3.2.6.6. Primer ve TaqMan prob hazırlanması

B-Aktin, SOD, CAT, GPx, GR ve GST genlerinin spesifik primer ve TaqMan problemleri ile ilgili bilgiler Çizelge 3.3'de verilmiş ve ayrıca primer ve TaqMan prob dizaynı EK-4'de anlatılmıştır.

Çizelge 3.3. Real-Time PCR için kullanılan primer ve problemlerin sekans, ürün uzunluğu ve genbank erişim numaraları

| Gen | Primer ve Proplar | Sekans (5'→3') | Ürün Uzunluğu (bp) | GenBank Erişim No | Referans |
|-----------------------|-------------------|---|--------------------|-------------------|---------------------------------|
| <i>β-Actin</i> | Forward | TGGCCGTACCACCGGTAT | 79 | AF254414 | Johansen and Overturf 2005) |
| | Reverse | GCAGAGCGTAGTCCTCGTAGATG | | | |
| | Prob | ^{Cy5} - CTCCGGTGACGGCGTGACCC - ^{BQ2} | | | |
| SOD | Forward | TGCTTATGGAGACAACACCAA | 156 | AF469663.1 | Mercan <i>et al.</i> (2013) |
| | Reverse | TGGATGTTGATCTTAGCCACA | | | |
| | Prob | ^{FAM} - CCACTGATGCTGTTCGGCACGT - ^{TAMRA} | | | |
| CAT | Forward | TCCTTTATCCACTCTCAGAAGCG | 125 | NM_001140302.1 | Primerler ve prob dizayn edildi |
| | Reverse | CCACGGTCACTGAACAGGAA | | | |
| | Prob | ^{FAM} - TGGTGTGGGACTTCTGGAGCCTGC - ^{TAMRA} | | | |
| GPx | Forward | GTGCCCTGCAACCAGTTT | 134 | AF281338.1 | Mercan <i>et al.</i> (2013) |
| | Reverse | TTCCCATTCACATCCATCTTC | | | |
| | Prob | ^{FAM} - CCGTCCCGGAAATGGCTTTGA - ^{TAMRA} | | | |
| GR | Forward | ATCACGCCATCACCACCAG | 117 | HF969248.1 | Primerler ve prob dizayn edildi |
| | Reverse | CTTGCAACATCTCATCACAGCC | | | |
| | Prob | ^{FAM} - GGCAAGGAGGAGAAGGTGGTTGGCC - ^{TAMRA} | | | |
| GST | Forward | TGGCTGACGTTATTGTCTTCC | 112 | NM_001160559.1 | Mercan <i>et al.</i> (2013) |
| | Reverse | CTGGGTCTGTCCTTCACCATA | | | |
| | Prob | ^{FAM} - CGGCGCGTTACCCCAAAGT - ^{TAMRA} | | | |

3.2.6.7. Real-Time PCR uygulamaları

cDNA örnekleri elde edildikten sonra qPCR'da kullanılmak üzere konsantrasyonları Multiskan™ GO Microplate Spektrofotometre ile ölçülerek 200 ng/μL olacak şekilde seyreltilmiştir. Real Time PCR ile gen ekspresyonunun kantitatif tayini Qiagen Rotor-Gene Q ile gerçekleştirilmiştir. PCR işlemi 900 nM forward ve reverse primerler, 250 nM TaqMan prob ve AmpliTaq Gold DNA Polimeraz, AmpErase urasil N-Glikozilaz (UNG), dUTP'li dNTP, optimize baffle bileşeni içerisinde bulunduran 25 μl FastStart TaqMan Probe Master (Applied Biosystems) içeren 50 μl'lik hacimlerde gerçekleştirilmiştir. Örnek ve standartların amplifikasyonu ve belirlenmesi için termal koşullar; UNG enzimi aktivasyonu için 50 °C'de 2 dk, Gold DNA polimeraz amplifikasyonunu başlatmak için 95 °C'de 10 dk, sonrasında 45 döngü olacak şekilde 95 °C'de 15 sn denatürasyon, yapışma ve 60 °C'de 1 dk uzama olacak şekilde belirlenmiştir. Real-Time PCR verileri Pfaffl (2001)'in $(e)^{-\Delta\Delta C_t}$ matematiksel modelleme metodu kullanılarak analiz edilmiştir (Eşitlik 4). Bu metotta kontrol grubu ve referans gene karşı muamele grupları gen ifadesindeki katlı değişim belirlenmektedir. Analitik hassasiyet, standart eğri dikkate alınarak doğrulanmıştır. Etkinlik değeri $e=10(-1/slope)$ formülü kullanılarak slope eğrisi üzerinden hesaplanmıştır (Pfaffl 2001) ve Qiagen Rotor-Gene Q yazılımı ile slope değeri bilinmektedir.

$$(e)^{-\Delta\Delta C_t} = \frac{2^{(Kontrol-Muamele)Hedef Gen}}{2^{(Kontrol-Muamele)Referans Gen}} \quad \text{Eşitlik 4}$$

Kullanılan qPCR ve sıcaklık protokolü Çizelge 3.4 ve 3.5'da verilmiştir.

Çizelge 3.4. qPCR protokolü

| Reaksiyon bileşenleri | Miktar (µL) | Konsantrasyon |
|-------------------------------|--------------------|----------------------|
| FastStart TaqMan Probe Master | 12,5 | 2X |
| ddH ₂ O | 5 | - |
| Forward Primer | 1 | 20 pmol |
| Reverse Primer | 1 | 20 pmol |
| Prob | 0,5 | 10 pmol |
| cDNA | 5 | 200 ng/µl |

Çizelge 3.5. qPCR uygulamasına ilişkin sıcaklık protokolü

| Sıcaklık (°C) | Zaman | Döngü |
|--|--------------|--------------|
| 50 (Ön Denatürasyon) | 2 dk | - |
| 95 (AmpliTaq Gold DNA polymerase enziminin aktivasyonu için) | 10 dk | - |
| 95 | 15 sn | |
| 60 | 1 dk | 45 |
| Okuma | | |

3.2.7. Antioksidan enzimlerin spesifik aktivite ölçümleri

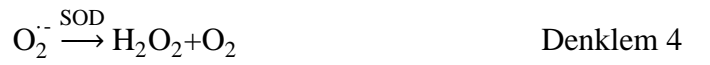
3.2.7.1. Homojenat eldesi

Enzim aktivite ölçümü deneyleri için, 60±10 mg doku örnekleri (karaciğer, solungaç, böbrek) 2 mL'lik vida kapaklı tüplere alındıktan sonra 5 katı oranında 50 mM KH₂PO₄ homojenat tamponu eklenmiştir. Üzerine yaklaşık 20 adet zirkonyum boncuk eklenerek homojenizatör (Benchmark Beadblaster 24)'de 40 hertz 1'er dk'lık 6 döngü olacak şekilde dokular parçalanmıştır. Sonrasında 13.000 rpm'de 60 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant alınarak 1.5 mL'lik eppendorf tüplerine konulmuştur.

50 mM KH₂PO₄ hazırlanışı: 0,68 gr KH₂PO₄ alınarak 80 mL suda çözündürülmüş pH 7,5 olarak ayarlandıktan sonra hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

3.2.7.2 Süperoksit dismutaz enziminin aktivite ölçümü

SOD enzim aktivite ölçümü, Sun *et al.* (1988) tarafından geliştirilen metot temel alınarak ölçülmüştür. SOD enziminin μ dropta spektrofotometrik ölçümü, 96 kuyucuklu kuvars küvet yardımıyla 560 nm'de 3 dk süreyle absorbansları ölçülerek yapılmıştır. SOD enzim aktivite ölçüm prosedürüne göre 10'ar μ L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ hem kör hem de numunelerin bulunduğu kuyucuklara konulup 560 nm dalga boyunda absorbans değerleri saf suya karşı okunmuştur. İnkübasyon sırasında NBT (nitro blue tetrazolium)'nin redüksiyon hızındaki %50'lik inhibisyon 1 SOD ünitesi olarak ifade edilir. SOD enzim aktivite ölçümünde kullanılan temel prensip, reaksiyon ortamında enzimatik bir reaksiyonla üretilen süperoksit radikallerinin, ortamda bulunan NBT'yi indirgemesinin homojenattaki SOD enzimi tarafından engellenmesi esasına dayanır (Koçpınar, 2015). Reaksiyon karışımı ksantin oksidaz enzim solüsyonu, 0,6 mM EDTA, 0,18 mM NBT çözeltisi, 0,4 mM CuCl_2 , %0,1'lik albumin çözeltisi, 400 mM Na_2CO_3 çözeltisi ve 3 mM ksantin çözeltisi içermektedir. Uygun bir kap içine pipetlemeler yapılarak reaksiyon kokteyli hazırlanmıştır. Reaksiyon kokteyli 5 mL 3 mM ksantin çözeltisi, 45 mL saf su, 25 mL 0,6 mM EDTA, 25 mL 0,18 mM NBT çözeltisi, 15 mL 400 mM Na_2CO_3 çözeltisi, 7,5 mL %0,1'lik albumin çözeltisi olacak şekilde hazırlanmıştır (Çizelge 3.6). SOD enzim ünitesinin hesaplanması Eşitlik 5, 6 ve 7'ye göre yapılmıştır.



$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(\text{Abs}_k - \text{Abs}_k)}{\text{Abs}_k} \quad \text{Eşitlik 5}$$

$$\text{Aktivite (EU/mg)} = \frac{\% \text{ İnhibisyon}}{50 \times 0,05} \quad \text{Eşitlik 6}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (EU/mg)} = \frac{\text{Aktivite}}{\text{mg protein}} \quad \text{Eşitlik 7}$$

% inhibisyon : K r absorbansına karşı  rnek absorbansının d şme miktarının %'si

Abs_k : K r absorbansı

Abs_  :  rnek absorbansı

50 : N.B.T indirgenme hızının % 50 inhibisyonu

0,05 : Kullanılan  rnek miktarı (mL)

Kullanılan  zeltelerin hazırlanması;

a. 2 M (NH₄)₂SO₄  zeltisi: 2,643 gr (NH₄)₂SO₄ tartılıp 10 mL saf suda  z nd r lm şt r. -20  C'de buzlanmaya bırakılmıştır.

b. Ksantin oksidaz enzim sol syonu: Ksantin oksidaz enziminden 16,7  L alınarak 10 mL buzlu 2 M (NH₄)₂SO₄  zeltisi i erisinde  z nd r lm şt r.

c. 0,6 mM EDTA; 0,022 gr EDTA tartılıp 100 mL saf suda  z nd r lm şt r.

d. 0,18 mM NBT  zeltisi: 15 mg NBT tartılıp 100 mL saf suda  z nd r lm şt r.

e. 0,4 mM CuCl₂: 0,425 gr CuCl₂ tartılıp 20 mL saf suda  z nd r lm şt r.

f. %0,1'lik albumin  zeltisi: 0,01 gr albumin (BSA) tartılıp 10 mL saf suda  z nd r lm şt r.

g. 400 mM Na₂CO₃  zeltisi: 4,23 gr Na₂CO₃ tartılıp 100 mL saf suda  z nd r lm şt r.

h. 3 mM ksantin  zeltisi: 0,046 gr ksantin, 90 mL saf su i inde  z nd r lm ş, ksantinin tamamı  z nene kadar 1-2 damla 1N KOH ilave edilmiştir. Son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Çizelge 3.6. Süperoksit Dismutaz enzimi aktivite ölçüm protokolü

| Çözeltiler | Saf Su (µL) | Kör (µL) | Numune (µL) |
|--|-------------|------------|-------------|
| Reaksiyon kokteyli | - | 285 | 285 |
| Su | 310 | 5 | - |
| Homojenat | - | - | 5 |
| Ksantin oksidaz | - | 10 | 10 |
| Kuvars pleyt 20 °C'de 25 dk inkübasyona bırakılmıştır. | | | |
| 0,4 mM CuCl ₂ | - | 10 | 10 |
| Toplam | 310 | 310 | 310 |

3.2.7.3 Katalaz enziminin aktivite ölçümü

Katalaz enziminin aktivite ölçüm yönteminde Beers and Sizer (1952) ve Stern (1937)'in prosedürü laboratuvar şartlarımıza uygun olarak küçük modifikasyonlar gerçekleştirilerek kullanılmıştır. Bu prosedüre göre reaksiyon karışımı 50 mM KH₂PO₄ ve % 0,036 (w/w) hidrojen peroksit içermektedir (Çizelge 3.7). Bir enzim ünitesi 25°C pH 7'de, 1 dk'da H₂O₂ konsantrasyonunun 10,3 mM'dan 9,2 mM'a düşerken 1.0 µmol H₂O₂'in parçalanmasıdır. CAT enzim ünitesinin hesaplanması Eşitlik 8'e göre yapılmıştır.



$$\text{Spesifik Aktivite (EU/mg)} = \frac{\text{Abs}}{\epsilon \cdot t} \times \frac{V_t}{V_0} \times \text{SF} \times \frac{1}{\text{mg protein/mL}} \quad \text{Eşitlik 8}$$

Abs : 240 nm'de ölçülen absorbans değeri

ε : H₂O₂'nin 240 nm'deki ekstinksiyon katsayısı

t : Enzimin kinetik olarak ölçülme zamanı

V_t : Toplam hacim

V₀ : Kullanılan örnek hacmi

SF : Seyreltme Faktörü

Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı:

a. 50 mM KH₂PO₄ (25°C pH=7,0): 1,36 gr KH₂PO₄ 180 mL deiyonize su içerisinde çözüldürülüp 1 M KOH ile pH metre yardımıyla pH 7,0'ye ayarlandıktan sonra son hacim 200 mL'ye tamamlanmıştır.

b. %0,036 (w/w) H₂O₂ çözeltisi: %30'luk H₂O₂'den 7 µL alınarak A tamponu içinde çözüldürülüp hazırlanmıştır (A tamponu kör olarak kullanılarak 240 nm'de H₂O₂ absorbansı 0,550-0,520 arasında ayarlanmıştır. Ayrıca absorbansı azaltmak için A tamponu, artırmak için ise H₂O₂ eklenebilmektedir.).

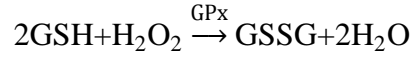
Çizelge 3.7. Katalaz enzimi aktivite ölçüm protokolü

| Çözeltiler | Kör (µL) | Numune (µL) |
|---------------------------------------|-----------------|--------------------|
| 50 mM KH ₂ PO ₄ | 150 | 150 |
| Homojenat | - | 10 |
| H ₂ O ₂ | 150 | 140 |
| Toplam | 300 | 300 |

H₂O₂ parçalanma miktarı 240 nm'de 15 sn aktivite ölçümü yapılmış absorbanstaki azalma oranı gözlemlenerek takip edilmiştir.

3.2.7.4 Glutasyon Peroksidaz enziminin aktivite ölçümü

GPx enziminin aktivite ölçüm yönteminde Wendel (1980)'nin prosedürü laboratuvar şartlarımıza uygun olarak küçük modifikasyonlar gerçekleştirilerek kullanılmıştır. Bu prosedüre göre reaksiyon karışımı 50 mM NaH₂PO₄, 0,4 mM EDTA, 0,12 mM β-NADPH, 1 mM NaN₃, 3,2 UN GR, 200 mM GSH, 1,0 mM DTT ve %0,042 (w/w) H₂O₂ içermektedir. Bir enzim ünitesi 25°C, pH 7'de, 1 dk'da 1.0 µmol GSH'ın H₂O₂ tarafından GSSG'ye oksitlenmesinin katalizlenmesidir. GPx enzim ünitesinin hesaplanması Eşitlik 9'a göre yapılmıştır.



Denklem 6

$$\text{Spesifik Aktivite (EU/mg)} = \frac{\text{Abs}}{6,22 \times t} \times \frac{V_t}{V_0} \times \text{SF} \times \frac{1}{\text{mg protein/mL}}$$

Eşitlik 9

Abs : 340 nm’de ölçülen absorbans değeri

6,22 : Ekstinksiyon katsayısı

t : Enzimin kinetik olarak ölçülme zamanı

Vt : Toplam hacim

Vö : Kullanılan örnek hacmi

SF : Seyreltme Faktörü

Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı:

a. 50 mM NaH₂PO₄ (25°C, pH:7)/0,4 mM EDTA tamponu; 0,6 gr NaH₂PO₄ tartılarak bir miktar deiyonize suda çözündürülüp 1 M NaOH ile pH metre yardımıyla pH'ı 7'ye ayarlandıktan sonra içine 0,015 gr EDTA eklenip pH tekrar kontrol edilerek son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

b. 1 mM NaN₃ çözeltisi; 0,00325 gr NaN₃ (sodyum azid) tartılıp 50 mL'lik A tamponunda çözündürülmüştür.

c. 0,12 mM NADPH; 10 mg NADPH tartılarak 93,5 mL reaksiyon karışımının içine ilave edilmiştir.

d. GR enzim çözeltisi; Soğuk deiyonize su içinde GR enzim çözeltisi 100 unit/mL olacak şekilde kullanmadan hemen önce hazırlanmıştır.

e. **200 mM glutatyon (GSH)**; 0,3072 gr GSH 5 mL deiyonize su içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.

f. **10,0 mM NaH₂PO₄ tamponu (25°C pH:7)/1,0 mM DTT**; 0,12 gr NaH₂PO₄ tartılarak bir miktar deiyonize suda çözündürülüp 1 M NaOH ile pH metre yardımıyla pH'ı 7'ye ayarlandıktan sonra içine 0,015 gr DTT eklenip pH tekrar kontrol edilerek son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

g. **%0,042 (w/w) H₂O₂**; %30 H₂O₂ çözeltisinden 7 µL alınarak deiyonize su içinde çözündürülüp son hacim 5 mL'ye tamamlanmıştır (Kullanmadan hemen önce taze olarak hazırlanmıştır).

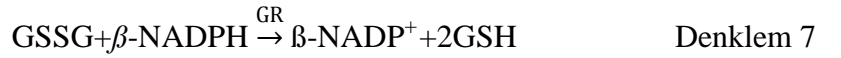
Reaksiyon kokteyli için; 92 mL b çözeltisi, 1 mL GR enzim çözeltisi, 0,05 mL GSH, 10 mg NADPH alındıktan sonra pH kontrol edilmiş, gerektiğinde 1 M HCl ya da 1 M NaOH ilave edilerek pH 7'de sabitlenmiş, ardından 96 kuyucuklu kuvars küvete pipetlenmiştir (Çizelge 3.8). µdrop spektrofotometrede kinetik olarak 340'nm de 5 dk içindeki absorbans azalışı kaydedilmiştir.

Çizelge 3.8. Glutatyon Peroksidaz enzimi aktivite ölçüm protokolü

| Çözeltiler | Kör (µL) | Numune (µL) |
|---|-----------------|--------------------|
| Reaksiyon kokteyli (92 mL b çözeltisi + 1 mL GR enzimi + 0,5 mL GSH +10 mg NADPH) | 300 | 300 |
| 10,0 mM NaH ₂ PO ₄ tamponu+1,0 mM DTT | 5 | - |
| Homojenat | - | 5 |
| Pipetlemeler yapıldıktan sonra kuvars küvet 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. | | |
| H ₂ O ₂ | 5 | 5 |
| Toplam | 310 | 310 |

3.2.7.5. Glutasyon Redüktaz enziminin aktivite ölçümü

Glutasyon Redüktaz enziminin aktivite ölçüm yönteminde Mavis and Stellwagen (1968), ve Carlberg and Mannervik (1985)'in prosedürü, laboratuvar şartlarımıza uygun olarak küçük modifikasyonlar gerçekleştirilerek kullanılmıştır. Glutasyon redüktaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde, reaksiyona giren NADPH 340 nm'de maksimum absorbans vermektedir. Reaksiyon ortamına katılan GR enzimi NADPH'ın azalmasına sebep olmaktadır. Bu azalma µdrop spektrofotometrede kinetik olarak 340 nm'de takip edilmiştir (Carlberg and Mannervik 1985). Bu prosedüre göre reaksiyon karışımı 0,4 M KH₂PO₄, 15,6 mM EDTA, 6 mM GSSG, 0,6 mM NADPH ve %1 Bovine Serum Albumin (BSA) içermektedir (Çizelge 3.9). Bir enzim ünitesi 25°C'de pH 7,6'da, 1 dk 1 µmol GSSG'nin indirgenmesidir. GR enzim ünitesinin hesaplanması Eşitlik 10'a göre yapılmıştır.



$$\text{Spesifik Aktivite (EU/mg)} = \frac{\text{Abs}}{\epsilon \cdot t} \times \frac{V_t}{V_0} \times \text{SF} \times \frac{1}{\text{mg protein/mL}} \quad \text{Eşitlik 10}$$

Abs : 340 nm'de ölçülen absorbans değeri

ε : 340 nm'de 1 mM NADPH'ın ekstinksiyon katsayısı

t : Enzim aktivitesinin toplam ölçüm zamanı

V_t : Toplam hacim

V₀ : Kullanılan örnek hacmi

SF : Seyreltme Faktörü

Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı:

A. 0,4 M KH₂PO₄ (25°C pH:7,6)/15,6 mM EDTA: 5,44 gr KH₂PO₄ tartılarak 80 mL saf su içerisinde çözündürülüp 1 M KOH ile pH metre yardımıyla pH 7,6'ya ayarlandıktan sonra içine 0,581 gr EDTA eklenip pH tekrar kontrol edilerek son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

B. 6 mM GSSG çözeltisi: 18,56 mg okside glutatyon alınarak bir miktar saf suda çözündürülüp toplam hacim saf suyla 5 mL'ye tamamlanmıştır.

C. 0,6 mM NADPH çözeltisi: 2,49 mg NADPH alınarak bir miktar saf suda çözündürülüp toplam hacim saf suyla 5 mL'ye tamamlanmıştır.

D. %1.0 (w/v) BSA: 1 gr BSA, A tamponu içinde çözündürülüp son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

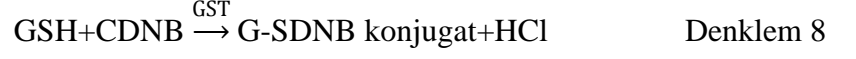
Çizelge 3.9. Glutatyon Redüktaz enzimi aktivite ölçüm protokolü

| Çözeltiler | Kör (µL) | Numune (µL) |
|--|-----------------|--------------------|
| 0,4M KH ₂ PO ₄ /15,6 mM EDTA | 50 | 50 |
| Su | 150 | 140 |
| 6 mM GSSG çözeltisi | 50 | 50 |
| Homojenat | - | 10 |
| 0,6 mM NADPH çözeltisi | 50 | 50 |
| Toplam | 300 | 300 |

3.2.7.6. Glutatyon-S-Transferaz enziminin aktivite ölçümü

Glutatyon-S-Transferaz enziminin aktivite ölçüm yönteminde Habig (1974) ve Simons (1977)'un prosedürü laboratuvar şartlarımıza uygun olarak küçük modifikasyonlar gerçekleştirilerek kullanılmıştır. Bu prosedüre göre reaksiyon karışımı 0,1 M KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 50 mM GSH, 100 mM CDNB ve %1,9 etanol içermektedir (Çizelge 3.10).

Bir enzim ünitesi 25°C de pH 6,5'ta, 1 dk 1.0 µmol GSH ile CDNB'nin 1.0 µmol'ün birleşmesidir. GST enzim ünitesinin hesaplanması Eşitlik 11'a göre yapılmıştır.



$$\text{Spesifik Aktivite (EU/mg)} = \frac{\text{Abs}}{\epsilon \cdot t} \times \frac{V_t}{V_0} \times \text{SF} \times \frac{1}{\text{mg protein/mL}} \quad \text{Eşitlik 11}$$

Abs : 340 nm'de ölçülen absorbans değeri

ε : 340 nm'de 1 mM CDNB-SG'nin ekstinksiyon katsayısı

t : Enzim aktivitesinin ölçüldüğü toplam zaman

V_t : Toplam küvet hacmi

V₀ : Kullanılan örnek hacmi

SF : Seyreltme Faktörü

Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı:

a. 0,1 M KH₂PO₄ (25°C pH:6,5)/1 mM EDTA: 1,36 gr KH₂PO₄ (0,01 mol) tartılarak 80 mL saf su içerisinde çözündürülmüş 1 M KOH ile pH metre yardımıyla pH'ı 6,5'a ayarlandıktan sonra içine 0,041 gr (0,0001 mol) EDTA eklenip pH tekrar kontrol edilerek son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

b. 50 mM GSH çözeltisi: 0,154 gr indirgenmiş glutatyon alınarak bir miktar saf suda çözündürülmüş ve hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

c. 100 mM CDNB çözeltisi: 0,202 gr 1-cloro-2,4-dinitrobenzene alınarak bir miktar %95'lik etanol içerisinde çözündürülmüş ve hacmi etanol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

Çizelge 3.10. Glutasyon-S-Transferaz enzimi aktivite ölçüm protokolü

| Çözeltiler | Kör (µL) | Numune (µL) |
|---|-----------------|--------------------|
| 0,1 M KH ₂ PO ₄ | 50 | 50 |
| Su | 150 | 147 |
| 100 mM CDNB | 50 | 50 |
| Pipetlemeler yapıldıktan sonra kuvars küvet 3 dk inkübasyona bırakılmıştır. | | |
| Homojenat | - | 3 |
| 50 mM GSH | 50 | 50 |
| Toplam | 300 | 300 |

µdrop spektrofotometrede kinetik olarak 340'nm de 5 dk içindeki absorbans artışı kaydedilmiştir.

3.2.8. İstatistiksel analizler

İstatistiki analizler SPSS 17.0 paket programında ANOVA yöntemi ve varyans analizi yapılmıştır. ANOVA testi ve varyans analizleri sonucunda önemli çıkan grup ortalamaları arasındaki farklılığı tespit etmek için Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır ($p < 0,05$). Tüm istatistiksel hesaplamalara başlangıç örnekleri dahil edilmemiştir. Gen ekspresyon analizleri için 3 tekerrür ($n=3$) diğer tüm analizlerde 5 tekerrür ($n=5$) kullanılmış olup değerler \pm SEM (Standard Error of Mean-Ortalamanın Standart Hatası) şeklinde verilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Su Parametre Değerleri

Çalışmadaki Hipoksia, normoksia ve hiperoksia gruplarının su parametre değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Oksijen değişkenliğine bağlı sudaki fiziksel ve kimyasal parametreler

| Parametre | Gruplar | | |
|--|----------|-----------|------------|
| | Hipoksia | Normoksia | Hiperoksia |
| Çözünmüş O ₂ miktarı (mg/L) | 4,0±0,5 | 7,5±0,5 | 12±1,2 |
| Doygunluk (%) | 80 | 90 | 130 |
| pH | 7,2±0,1 | 7,4±0,1 | 7,4±0,1 |
| Sıcaklık (°C) | 16±0,8 | 16±0,5 | 16±0,5 |
| NH ₃ miktarı (mg/L) | 5,21±0,2 | 3,58±0,6 | Eser |

4.2. Glutasyon Seviyelerine İlişkin Bulgular

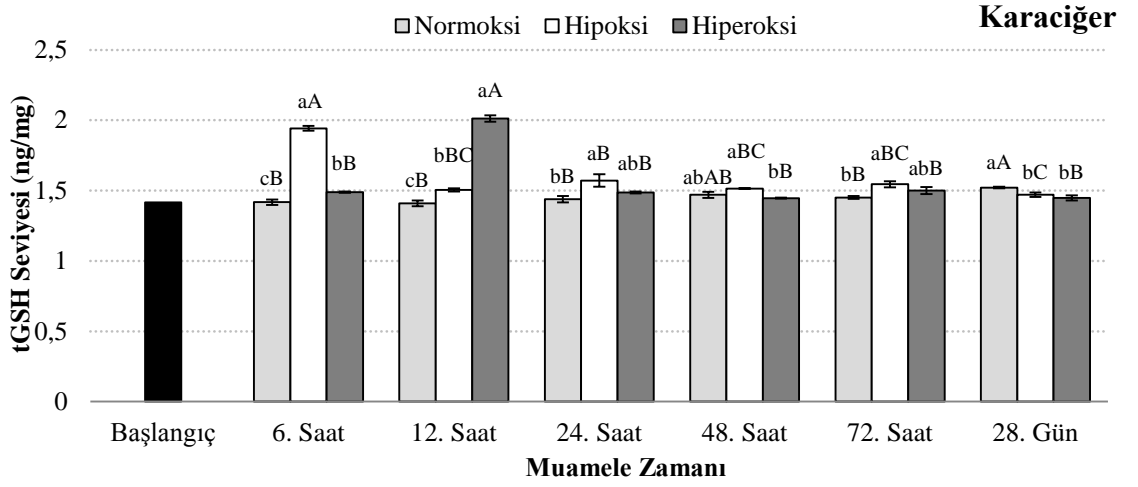
4.2.1. Karaciğer dokusunda glutasyon seviyelerine ilişkin bulgular

4.2.1.1. Karaciğer dokusunda toplam glutasyon seviyelerine ilişkin bulgular

Karaciğer dokusundaki total glutasyon (tGSH) seviyesi kontrole (normoksi) göre kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi ($1,94 \pm 0,02^{aA}$ ng/mg) ve hiperoksi ($1,49 \pm 0,01^{bB}$ ng/mg) kontrole göre kıyaslandığında bir artış gözlemlenmiş ve istatistiki açıdan fark önemli bulunmuştur. En yüksek tGSH seviyesi hipoksi grubunda gözlenirken en düşük tGSH kontrol ($1,42 \pm 0,02^{cB}$ ng/mg) grubunda gözlenmiştir. 12. saatte hiperoksi ($2,01 \pm 0,02^{aA}$ ng/mg) uygulaması en yüksek tGSH seviyesini

göstermektedir. En düşük tGSH seviyesinin ise kontrol ($1,41 \pm 0,02^{cB}$ ng/mg) grubunda görüldüğü ve bu azalışın istatistiki açıdan önemli olduğu karşımıza çıkmaktadır. 24. saatte hipoksi ($1,57 \pm 0,04^{aB}$ ng/mg) uygulaması kontrole kıyasla istatistiki açıdan önemli bir artış göstermiştir. En yüksek tGSH değeri hipoksi uygulamasında olup en düşük kontrol ($1,44 \pm 0,02^{bB}$ ng/mg) grubunda görülmektedir. Hiperoksi grubunda ise kontrole göre fark önemli değildir. 48. saatte karaciğer dokusundaki tGSH değeri istatistiki açıdan dikkate alındığında en yüksek tGSH seviyesi hipoksi ($1,52 \pm 0,0^{aBC}$ ng/mg) grubunda görülmüş ve bu artışın kontrole göre önemli olmadığı ancak hiperoksi uygulaması ile artan tGSH seviyesine kıyasla önemli olduğu bulunmuştur. 72. saatte en yüksek tGSH değeri hipoksi ($1,55 \pm 0,02^{aBC}$ ng/mg) grubundadır ve bu artışın kontrole göre önemli derecede olduğu bulunmuştur. Hiperoksi ($1,50 \pm 0,03^{abB}$ ng/mg) grubunda kontrole ($1,45 \pm 0,01^{bB}$ ng/mg) ve hipoksi uygulamalarına kıyasla önemli bir değişimin olmadığı bulunmuştur. 28. günde Total GSH değeri kontrole göre hipoksi ve hiperoksi grubunda azalış göstermiştir. Hipoksi ($1,47 \pm 0,02^{bC}$ ng/mg) ve hiperoksi ($1,45 \pm 0,02^{bB}$ ng/mg) muameleleri arasında istatistiki açıdan bir fark gözlenmemiştir.

Tüm zamanlardaki hipoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek tGSH değeri 6. saatte karşımıza çıkmaktadır. Diğer zamanlar bu saatten önemli bir azalış sergilerken 24. saat hipoksi uygulaması ise 12., 48. ve 72. saat tGSH değerinden daha yüksek bulunmuştur. Bu farklar istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. 12, 48. ve 72. saatteki hipoksi tGSH değerleri arasındaki fark ise önemsiz olarak karşımıza çıkmaktadır. 28. günde ise en düşük tGSH seviyesinin olduğu belirlenmiş, 6. ve 24. Saatlere kıyasla anlamlı bir artışın olduğu görülmüştür. Hiperoksi uygulamasında ise 12. saat tGSH değeri tüm zamanlardan önemli olarak yüksek bulunmuştur. 6. ve 12. saatlerdeki tGSH değerleri birbirlerinden önemli olarak farklı bulunmuştur. 6., 24., 48., 72. saat ve 28. gün arasındaki hiperoksi tGSH değeri değişimi önemsiz olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 4.1 ve Çizelge 4.2).



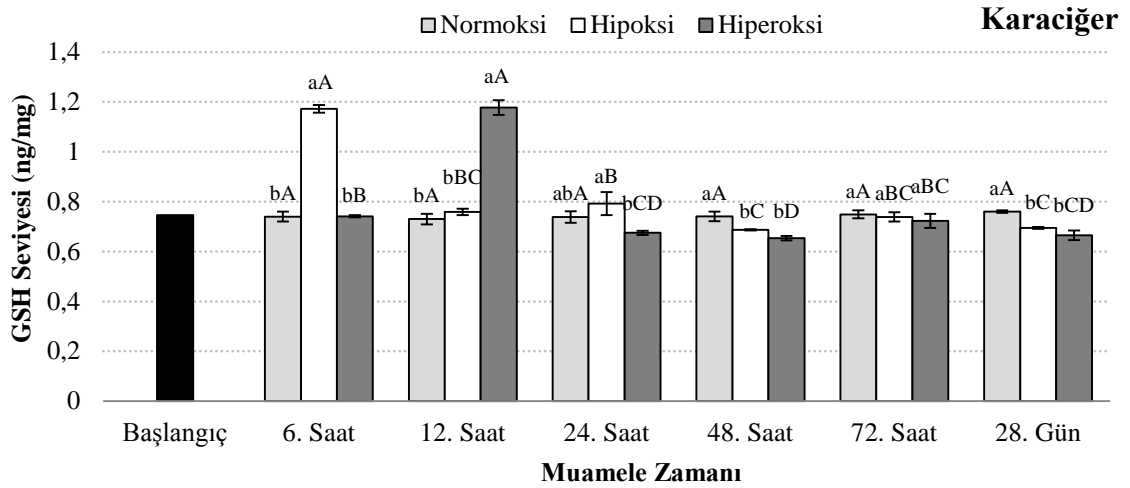
Şekil 4.1. Karaciğer dokusunda tGSH seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.2.1.2. Karaciğer dokusunda redükte glutasyon seviyelerine ilişkin bulgular

Karaciğer dokusundaki GSH seviyesi kontrole (normoksi) göre kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi ($1,17 \pm 0,02^{aA}$ ng/mg) ile GSH seviyesi hem kontrole hem de hiperoksiye göre önemli derecede artmıştır. Kontrol ($0,74 \pm 0,02^{bA}$ ng/mg) ve hiperoksi ($0,74 \pm 0,02^{bB}$ ng/mg) uygulamaları arasında istatistiki açıdan fark yoktur. 12. saatte GSH değeri istatistiki açıdan dikkate alındığında kontrol ($0,73 \pm 0,02^{bA}$ ng/mg) ve hipoksi ($0,76 \pm 0,01^{bBC}$ ng/mg) muamelelerinde farkın önemsiz olduğu görülmüştür. Önemli derecede en yüksek GSH seviyesi hiperoksi ($1,18 \pm 0,03^{aA}$ ng/mg) grubundadır. 24. saatte hipoksi uygulamasında ($0,79 \pm 0,05^{abB}$ ng/mg) GSH seviyesi kontrole ($0,74 \pm 0,02^{abA}$ ng/mg) kıyasla artış göstermiş fakat bu artış istatistiki açıdan değerlendirildiğinde önemsiz olarak belirlenmiştir. Hiperoksi ($0,67 \pm 0,01^{bCD}$ ng/mg) grubu kontrole ($0,74 \pm 0,02^{abA}$ ng/mg) göre kıyaslandığında düşüş gözlenirken istatistiki açıdan da fark önemsizdir. 48. saatte GSH değeri en düşük hiperoksi ($0,65 \pm 0,0^{bD}$ ng/mg) grubunda görülüp hipoksi ($0,69 \pm 0,0^{bC}$ ng/mg) ile aralarında istatistiki açıdan fark gözlenmemiştir. En yüksek değer kontrol grubundadır ($0,74 \pm 0,02^{abA}$ ng/mg). Her iki uygulamanın da

kontrole göre anlamlı bir azalış gösterdiği bulunmuştur. 72. saatte hipoksi ($0,75 \pm 0,02^{aBC}$ ng/mg) ve hiperoksi ($0,72 \pm 0,03^{aBC}$ ng/mg) gruplarında kontrole ($0,75 \pm 0,02^{aA}$ ng/mg) göre önemli bir azalış gözlemlenmişken bu azalış istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. Tüm muameleler arasında da istatistiki açıdan bir fark olmadığı gözlenmiştir. 28. günde karaciğer dokusunda en yüksek GSH değeri kontrol grubundadır. Hipoksi ($0,69 \pm 0,0^{bC}$ ng/mg) ve hiperoksi ($0,67 \pm 0,02^{bCD}$ ng/mg) gruplarında kontrole ($0,76 \pm 0,0^{aA}$ ng/mg) kıyasla önemli bir azalış gözlenmiştir. En düşük GSH seviyesi ise hiperoksi grubunda görülmektedir.

Tüm zamanlardaki hipoksi uygulaması dikkate alındığında istatistiki açıdan GSH değerlerinin önemsiz olduğu gözlenmiştir. Hiperoksi uygulamasında ise 12. saatin GSH değeri tüm zamanlardan önemli olarak yüksek bulunmuştur. 6. ve 72. saatlerdeki GSH seviyesi değerleri birbirlerinden önemsiz olarak Ancak 24. 48. Saat ve 28. Günde GSH seviyeleri 6. Saate göre önemli derecede azalış gösterdikleri bulgular arasındadır. En düşük Seviyenin ise 48. Saatte olduğu bulunmuştur (Şekil 4.2 ve Çizelge 4.2).

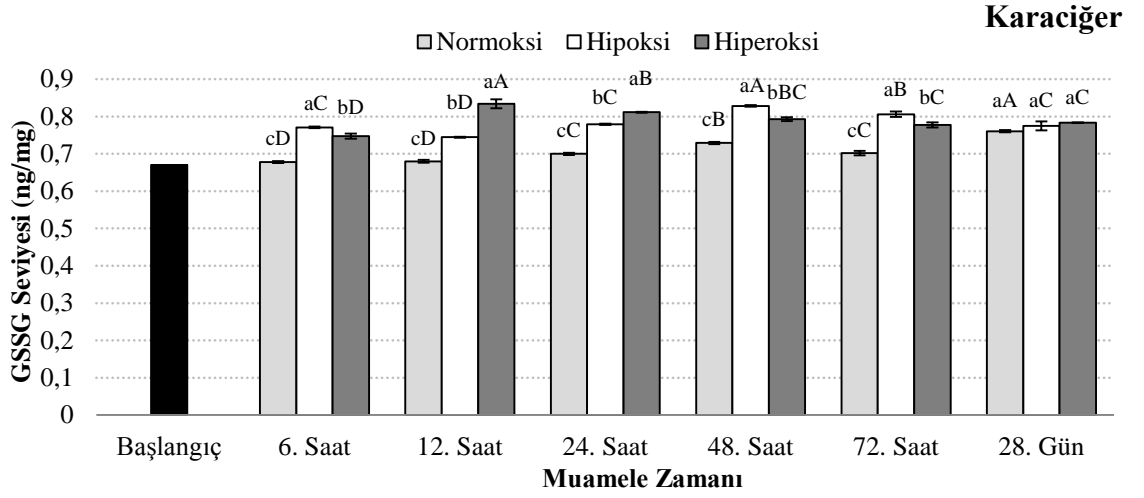


Şekil 4.2. Karaciğer dokusunda GSH seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.2.1.3. Karaciğer dokusunda okside glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular

Karaciğer dokusundaki okside glutatyon (GSSG) kontrole (normoksi) göre kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte kontrole göre tüm muamelelerde bir artış gözlenmiştir ve istatistiki açıdan dikkate alındığında tüm muameleler arasında farkın önemli olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ($0,68 \pm 0,0^{cD}$ ng/mg) en düşük GSSG seviyesini gösterirken hipoksi ($0,77 \pm 0,0^{aC}$ ng/mg) en yüksek seviyeyi göstermektedir. 12. saatte böbrek dokusundaki GSSG değeri istatistiki açıdan dikkate alındığında tüm muameleler arasında farkın önemli olduğu görülmüştür. Kontrole ($68 \pm 0,0^{cD}$ ng/mg) göre hipoksi ($0,74 \pm 0,0^{bD}$ ng/mg) ve hiperoksi ($0,83 \pm 0,01^{aA}$ ng/mg) gruplarında artış gözlenmiştir. En düşük GSSG seviyesini kontrol grubu gösterirken hiperoksi en yüksek GSSG seviyesini göstermektedir. 24. saatte hipoksi ($0,78 \pm 0,0^{bC}$ ng/mg) ve hiperoksi ($0,81 \pm 0,0^{aB}$ ng/mg) uygulamasında GSSG seviyesi kontrole ($0,70 \pm 0,0^{cC}$ ng/mg) kıyasla artış göstermiş ve bu artış istatistiki açıdan değerlendirildiğinde tüm uygulamalarda önemli olarak belirlenmiştir. 48. saatte hipoksi ($0,83 \pm 0,0^{aA}$ ng/mg) ve hiperoksi ($0,79 \pm 0,0^b$ ng/mg) gruplarında kontrole ($0,73 \pm 0,0^{cB}$ ng/mg) göre önemli bir artış gözlemlenmiş ve bu artış istatistiki açıdan önemli olarak belirlenmiştir. En yüksek seviye hipoksi en düşük seviye normoksi grubunda olduğu bulunmuştur. 72. saatte en yüksek GSSG seviyesi hipoksi ($0,81 \pm 0,01^{aB}$ ng/mg) grubundadır. Tüm gruplara bakıldığında kontrole ($0,70 \pm 0,01^{cC}$ ng/mg) göre artış meydana gelmiş ve istatistiki açıdan bir fark olduğu gözlenmiştir. 28. günde tüm gruplara bakıldığında aralarında istatistiki açıdan fark olmadığı görülmüştür.

Tüm zamanlardaki hipoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek GSSG seviyesi 48. saatte görülmüştür. İstatistiki açıdan değerlendirildiğinde 6., 24. saat ve 28. gündeki seviyelerin aralarındaki farkı önemsiz bulunmuş diğer tüm uygulama zamanlarında fark önemli bulunmuştur. Hiperoksi uygulamasında ise 12. saatte GSSG seviyesi tüm zamanlardan önemli olarak yüksek bulunmuştur. 24. ve 48. saatlerdeki GSSG seviyesi birbirlerinden önemli olarak farklı olmadığı bulunmuştur. 72. saat ile 28. gün hiperoksi GSSG seviyesi değişimi önemsiz olarak karşımıza çıkmaktadır. En düşük GSSG seviyesi ise 6. saat (Şekil 4.3 ve Çizelge 4.2).



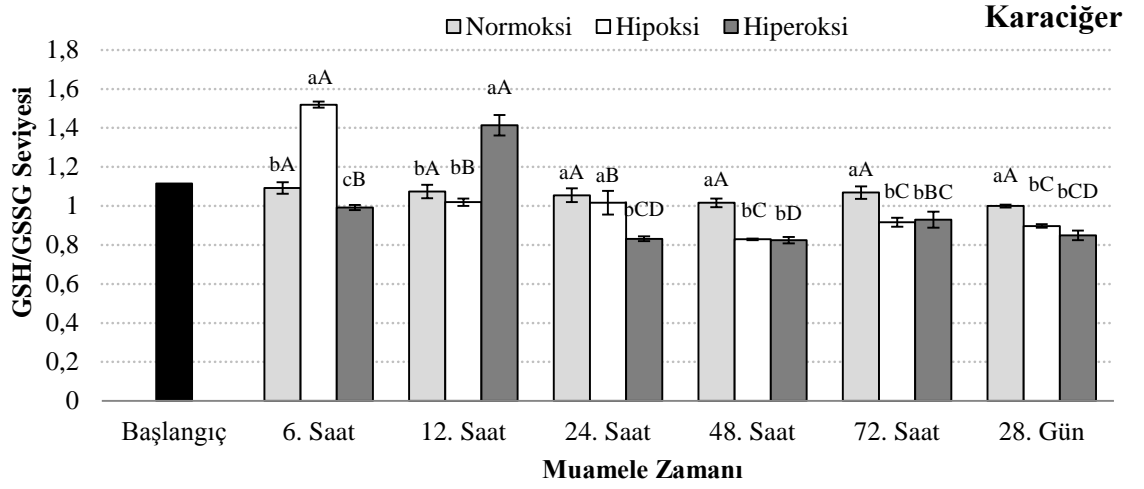
Şekil 4.3. Karaciğer dokusunda GSSG seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.2.1.4. Karaciğer dokusunda redükte glutatyonun okside glutatyona oranının seviyelerine ilişkin bulgular

Karaciğer dokusundaki redükte glutatyonun okside glutatyona oranı (GSH/GSSG) kontrole (normoksi) göre kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi ($1,52 \pm 0,02^{aA}$) kontrole ($1,09 \pm 0,03^{bA}$) göre kıyaslandığında bir artış gözlenmiş ve istatistiki açıdan fark önemli bulunmuştur. Hiperoksi grubu ($0,99 \pm 0,01^{cB}$) en düşük GSH/GSSG seviyesini gösterirken diğer muamelelerden istatistiki açıdan fark yine önemlidir. 12. saatte karaciğer dokusundaki GSH/GSSG değeri istatistiki açıdan dikkate alındığında kontrole ($1,07 \pm 0,03^{bA}$) kıyasla hipoksi ($1,02 \pm 0,02^{bB}$) muamelesinde önemli bir fark gözlenmez iken hiperoksi ($1,41 \pm 0,05^{aA}$) muamelesinde farkın önemli olduğu görülmüştür. Hiperoksi grubu en yüksek GSH/GSSG seviyesini göstermiştir. 24. saatte hipoksi ($1,02 \pm 0,06^{aB}$) ve hiperoksi ($0,83 \pm 0,01^{bCD}$) uygulamasında GSH/GSSG seviyesi kontrole ($1,05 \pm 0,04^{aA}$) kıyasla düşüş göstermiş ve bu düşüş istatistiki açıdan değerlendirildiğinde hipoksi grubunda önemsiz iken hiperoksi grubunda önemli olarak belirlenmiştir. 48. saatte hipoksi ($0,83 \pm 0,0^{bC}$) ve hiperoksi ($0,82 \pm 0,02^{bD}$) gruplarında kontrole

($1,02 \pm 0,02^{aA}$) göre önemli bir azalış gözlemlenmişken en yüksek GSH/GSSG seviyesi kontrol grubunda gözlemlenmiştir. 72. saatte en yüksek GSH/GSSG seviyesi kontrol ($1,07 \pm 0,03^{aA}$) grubundadır. Tüm gruplara bakıldığında kontrole göre azalış meydana gelmiş ve istatistiki açıdan bir fark olduğu gözlenmiştir. Hipoksi ve hiperoksi grupları arasındaki GSH/GSSG seviyesi farkı önemli bulunmamıştır. 28. günde hipoksi ($0,90 \pm 0,01^{bC}$) ve hiperoksi ($0,85 \pm 0,02^{bCD}$) gruplarında GSH/GSSG seviyesi kontrole ($1,00 \pm 0,01^{Aa}$) kıyasla önemli bir azalış gözlenmiştir. Hipoksi ve hiperoksi grupları arasındaki GSH/GSSG seviyesi farkı ise önemli bulunmamıştır.

Tüm zamanlardaki hipoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek GSH/GSSG seviyesi 6. saatte görülmüştür. İstatistiki açıdan değerlendirildiğinde 12. saat ile 24. saat, arasındaki fark önemsiz bulunmuş iken 6. saate göre önemli derecede azaldığı gözlenmiştir. 48., 72. saat ve 28. gün zamanları dikkate alındığında aralarındaki farkın anlamsız olduğu bulunmuş ancak diğer zamanlara göre önemli derecede azaldığı gözlenmiştir. Hiperoksi uygulamasında ise 12. saatte GSH/GSSG seviyesi tüm zamanlardan önemli olarak yüksek bulunmuştur. En düşük seviyenin 48. saatte olduğu bulunmuştur. Bunun 24. saat ile arasında önemli bir farkın olmadığı gözlenmiş ancak diğer zamanlara kıyasla önemli bir azalış gösterdiği görülmüştür. 24. saat ile 28. gün arasındaki hiperoksi GSH/GSSG seviyesi değişimi önemsiz olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 4.4 ve Çizelge 4.2).



Şekil 4.4. Karaciğer dokusunda GSH/GSSG seviyeleri

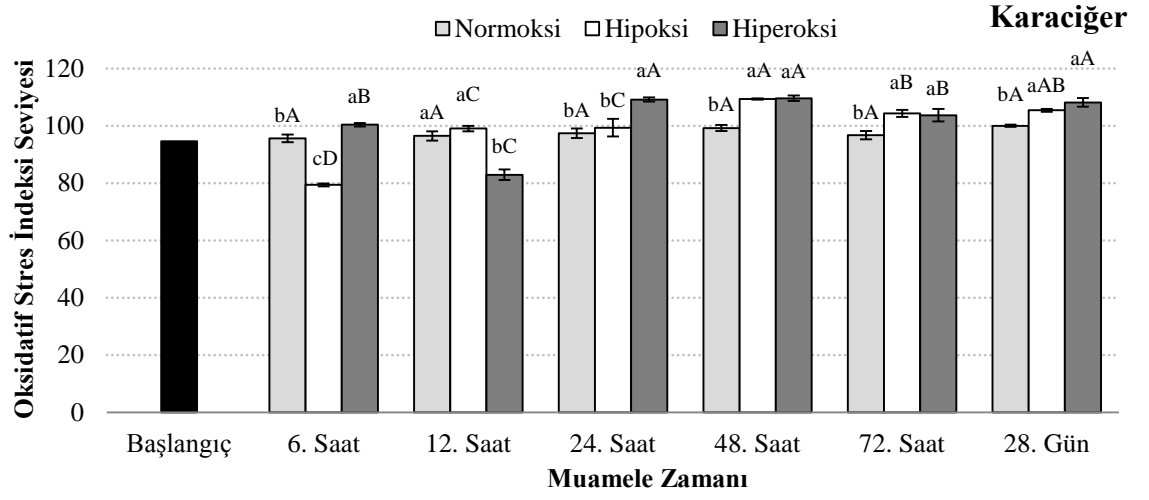
(Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.2.1.5. Karaciğer dokusunda oksidatif stres indeksi seviyelerine ilişkin bulgular

Karaciğer dokusundaki oksidatif stres indeksi (OSİ) kontrole (normoksi) göre kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hiperoksi ($100,40 \pm 0,64^{aB}$) kontrole ($95,65 \pm 1,36^{bA}$) göre kıyaslandığında önemli derecede bir artış, hipoksi ($79,39 \pm 0,51^{cD}$) kontrole göre kıyaslandığında ise önemli derecede azalış gözlemlenmiş ve bu değişimlerde istatistiki açıdan fark önemli bulunmuştur. En yüksek oksidatif stres indeksi hiperoksi grubunda, en düşüğü ise hipokside görülmektedir. 12. saatte hipoksi ($99,05 \pm 0,92^{aC}$) kontrole ($96,48 \pm 1,60^{aA}$) göre kıyaslandığında bir artış gözlemlenmesine rağmen istatistiki açıdan önemli olmadığı bulunmuştur. En düşük oksidatif stres hiperoksi ($82,94 \pm 1,84^{bC}$) grubunda görülürken istatistiki açıdan diğer gruplardan farklı bulunmuştur. 24. saatte en yüksek oksidatif stres indeksi hiperoksi ($109,20 \pm 0,74^{aA}$) uygulamasında olup hipoksi ($99,38 \pm 3,08^{bC}$) uygulaması kontrole ($97,39 \pm 1,68^{bA}$) kıyasla istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. Hipoksi ve hiperoksi gruplarına istatistiki açıdan bakıldığında ise önemli bulunmuştur. 48. saatte karaciğer dokusundaki oksidatif stres indeksi hipoksi ($109,36 \pm 0,23^{aA}$) ve hiperoksi ($109,64 \pm 0,97^{aA}$) gruplarında kontrole ($99,24 \pm 1,08^{bA}$) göre

artış göstermiştir. Hipoksi ve hiperoksi grupları istatistiki açıdan dikkate alındığında fark önemsiz bulunmuştur. 72. saatte kontrole göre hipoksi ($104,38 \pm 1,24^{aB}$) ve hiperoksi ($103,74 \pm 2,22^{aB}$) gruplarında artış gözlemlenmişken hipoksi ve hiperoksi grupları arasındaki fark istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. En düşük oksidatif stres indeksi kontrol ($96,74 \pm 1,48^{bA}$) grubundadır. 28. günde oksidatif stres indeksi en düşük kontrol grubunda, en yüksek hiperoksi grubunda gözlemlenip hipoksi ($105,45 \pm 0,50^{aAB}$) ve hiperoksi ($108,21 \pm 1,47^{aA}$) grupları arasında istatistiksel açıdan farkın önemli olmadığı görülmektedir. Hipoksi ve hiperoksi muameleleri kontrole ($100,04 \pm 0,40^{bA}$) göre kıyaslandığında istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur.

Tüm zamanlardaki hipoksi uygulaması dikkate alındığında istatistiki açıdan 12. ve 24. saatler arasında bir fark olmadığı ve en yüksek oksidatif stres indeksinin 48. saatte olduğu görülmektedir. 6., 12., 48., 72. Saatlerde hipoksi uygulamalarına istatistiki açıdan bakıldığında farkın önemli olduğu görülmektedir. En düşük stres indeksinin 6. saate olduğu ve diğer zamanlara göre farkın önemli olduğu bulunmuştur. Hiperoksi uygulamasında ise 24., 48. saatler ve 28. gün oksidatif stres indeksi tüm zamanlardan önemli olarak yüksek bulunmuştur. 6., ve 72. saatler oksidatif stres indeksleri istatistiki olarak birbirlerinden farkı önemsiz bulunmuştur. 12. saatte diğer zamanlara göre önemli derecede en düşük stres indeksi seviyesi görülmüş (Şekil 4.5 ve Çizelge 4.2).



Şekil 4.5. Karaciğer dokusunda Oksidatif Stres İndeksi seviyeleri
(Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

Çizelge 4.2. Karaciğer dokusunda tGSH, GSH, GSSG, GSH/GSSG ve OSI değerleri

| Genler | Muamele | Akut etki | | | | | Kronik etki | |
|--------------|-----------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|--|
| | | Saatler | | | | | Gün | |
| | | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 | 28 | |
| tGSH (ng/mg) | Normoksi | 1,42±0,02 ^{cB} | 1,41±0,02 ^{cB} | 1,44±0,02 ^{bB} | 1,47±0,02 ^{abAB} | 1,45±0,01 ^{bB} | 1,52±0,01 ^{aA} | |
| | Hipoksi | 1,94±0,02 ^{aA} | 1,50±0,01 ^{bBC} | 1,57±0,04 ^{aB} | 1,52±0,0 ^{aBC} | 1,55±0,02 ^{aBC} | 1,47±0,02 ^{bC} | |
| | Hiperoksi | 1,49±0,01 ^{bB} | 2,01±0,02 ^{aA} | 1,49±0,01 ^{abB} | 1,45±0,0 ^{bB} | 1,50±0,03 ^{abB} | 1,45±0,02 ^{bB} | |
| GSH (ng/mg) | Normoksi | 0,74±0,02 ^{bA} | 0,73±0,02 ^{bA} | 0,74±0,02 ^{abA} | 0,74±0,02 ^{aA} | 0,75±0,02 ^{aA} | 0,76±0,0 ^{aA} | |
| | Hipoksi | 1,17±0,02 ^{aA} | 0,76±0,01 ^{bBC} | 0,79±0,05 ^{aB} | 0,69±0,0 ^{bC} | 0,75±0,02 ^{aBC} | 0,69±0,0 ^{bC} | |
| | Hiperoksi | 0,74±0,0 ^{bB} | 1,18±0,03 ^{aA} | 0,67±0,01 ^{bCD} | 0,65±0,0 ^{bD} | 0,72±0,03 ^{aBC} | 0,67±0,02 ^{bCD} | |
| GSSG (ng/mg) | Normoksi | 0,68±0,0 ^{cD} | 68±0,0 ^{cD} | 0,70±0,0 ^{cC} | 0,73±0,0 ^{cB} | 0,70±0,01 ^{cC} | 0,76±0,0 ^{aA} | |
| | Hipoksi | 0,77±0,0 ^{aC} | 0,74±0,0 ^{bD} | 0,78±0,0 ^{bC} | 0,83±0,0 ^{aA} | 0,81±0,01 ^{aB} | 0,78±0,01 ^{aC} | |
| | Hiperoksi | 0,75±0,01 ^{bD} | 0,83±0,01 ^{aA} | 0,81±0,0 ^{aB} | 0,79±0,0 ^b | 0,78±0,01 ^b | 0,78±0,0 ^a | |
| GSH/GSSG | Normoksi | 1,09±0,03 ^{bA} | 1,07±0,03 ^{bA} | 1,05±0,04 ^{aA} | 1,02±0,02 ^{aA} | 1,07±0,03 ^{aA} | 1,00±0,01 ^{Aa} | |
| | Hipoksi | 1,52±0,02 ^{aA} | 1,02±0,02 ^{bB} | 1,02±0,06 ^{aB} | 0,83±0,0 ^{bC} | 0,92±0,02 ^{bC} | 0,90±0,01 ^{bC} | |
| | Hiperoksi | 0,99±0,01 ^{cB} | 1,41±0,05 ^{aA} | 0,83±0,01 ^{bCD} | 0,82±0,02 ^{bD} | 0,93±0,04 ^{bBC} | 0,85±0,02 ^{bCD} | |
| OSI | Normoksi | 95,65±1,36 ^{bA} | 96,48±1,60 ^{aA} | 97,39±1,68 ^{bA} | 99,24±1,08 ^{bA} | 96,74±1,48 ^{bA} | 100,04±0,40 ^{bA} | |
| | Hipoksi | 79,39±0,51 ^{cD} | 99,05±0,92 ^{aC} | 99,38±3,08 ^{bC} | 109,36±0,23 ^{aA} | 104,38±1,24 ^{aB} | 105,45±0,50 ^{aAB} | |
| | Hiperoksi | 100,40±0,64 ^{aB} | 82,94±1,84 ^{bC} | 109,20±0,74 ^{aA} | 109,64±0,97 ^{aA} | 103,74±2,22 ^{aB} | 108,21±1,47 ^{aA} | |

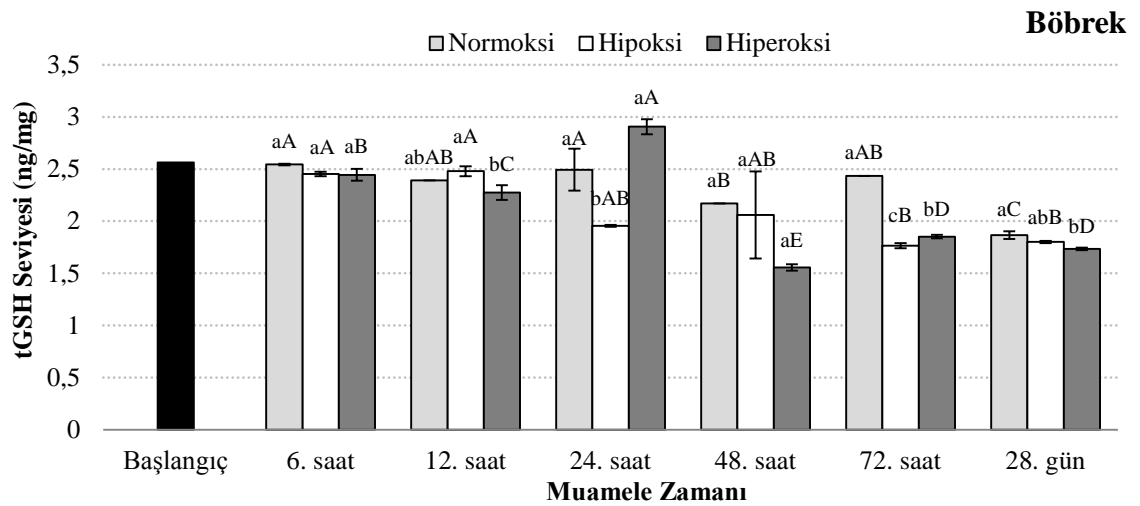
4.2.2. Böbrek dokusunda glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular

4.2.2.1. Böbrek dokusunda toplam glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular

Böbrek dokusundaki toplam glutatyon (tGSH) kontrole (normoksi) kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi ($2,45 \pm 0,02^{aA}$ ng/mg) ve hiperoksi ($2,44 \pm 0,04^{aB}$ ng/mg) kontrole ($2,44 \pm 0,04^{aB}$ ng/mg) göre kıyaslandığında bir düşüş gözlemlenmesine rağmen istatistiki açıdan fark önemsiz bulunmuştur. 12. saatte hipoksi ($2,48 \pm 0,05^{aA}$ ng/mg) uygulaması en yüksek tGSH seviyesini göstermektedir. En düşük tGSH seviyesini ise kontrole ($2,39 \pm 0,0^{abAB}$ ng/mg) kıyasla hiperoksi ($2,27 \pm 0,07^{bC}$ ng/mg) grubunda görüldüğü ve istatistiki açıdan önemli olduğu karşımıza çıkmaktadır. 24. saatte hipoksi ($1,96 \pm 0,01^{bAB}$ ng/mg) uygulaması kontrole ($2,49 \pm 0,20^{aA}$ ng/mg) kıyasla azalış göstermiş ve bu azalış istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. En yüksek tGSH değeri ise hiperoksi ($2,91 \pm 0,07^{aA}$ ng/mg) uygulamasında olup kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan fark yoktur. 48. saatte böbrek dokusundaki tGSH değeri istatistiki açıdan dikkate alındığında hipoksi ($2,06 \pm 0,42^{aAB}$ ng/mg) ve hiperoksi ($1,55 \pm 0,03^{aE}$ ng/mg) gruplarında kontrole ($2,17 \pm 0,0^{aB}$ ng/mg) göre önemli bir azalış gözlemlenmişken bu azalış istatistiki açıdan önemsiz olarak belirlenmiştir. 72. saatte en yüksek tGSH değeri kontrol ($2,44 \pm 0,0^{aAB}$ ng/mg) grubundadır. Hipoksi ($1,77 \pm 0,02^{cB}$ ng/mL) ve hiperoksi ($1,85 \pm 0,02^{bD}$ ng/mL) grubunda kontrole kıyasla önemli bir azalış gözlenmiş ve istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Hipoksi ile tGSH seviyesi hiperoksiye göre önemli derecede azalmıştır. 28. günde tGSH değeri kontrole ($1,87 \pm 0,04^{aC}$ ng/mg) göre hipoksi ($1,80 \pm 0,01^{abB}$ ng/mg) grubunda azalış gözlenmişken istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. En düşük tGSH değeri hiperoksi ($1,73 \pm 0,01^{bD}$ ng/mg) grubunda görülmekte ve bu düşüşün istatistiksel açıdan hem kontrole hem de hipoksiye kıyasla önemli olduğu görülmektedir.

Tüm zamanlardaki hipoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek tGSH değeri 6. ve 12. saatte karşımıza çıkmaktadır. Diğer zamanlar bu saatten önemli bir azalış sergilerken 24. ve 48. saat hipoksi uygulaması ise 72. saat ve 28. gündeki tGSH

değerinden daha yüksek bulunmuştur. Bu fark istatistiki açıdan önemli değildir. 72. saat ve 28. gündeki hipoksi tGSH değerleri kendi aralarında önemsiz bir fark olmasına rağmen 6. ve 12. saatlerdeki seviyelere göre önemli bir azalış sergilemiştir. Hiperoksi uygulamasında ise 24. saat tGSH değeri tüm zamanlardan önemli olarak yüksek bulunmuştur. 6., 12., 24., 48. ve 72. saatlerdeki tGSH değerleri birbirlerinden önemli olarak farklı bulunmuştur. 72. saat ve 28. gün arasındaki hiperoksi tGSH değeri değişimi önemsiz olarak karşımıza çıkmaktadır. En düşük seviye 48. saatte olup diğer zamanlardan önemli derecede azaldığı bulunmuştur (Şekil 4.6 ve Çizelge 4.3).



Şekil 4.6. Böbrek dokusunda tGSH seviyeleri

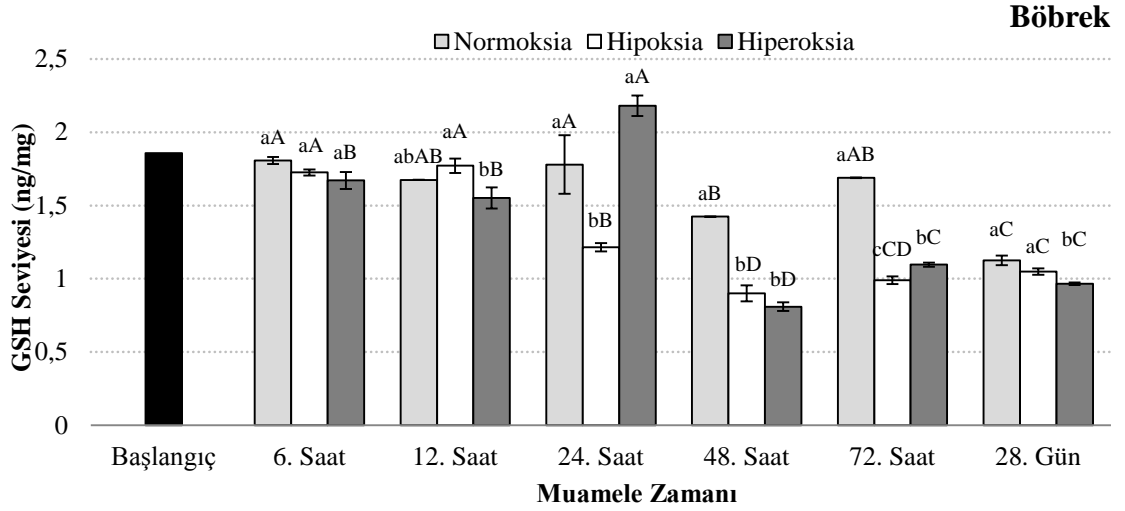
(Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.2.2.2. Böbrek dokusunda redükte glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki böbrek dokusu redükte glutatyon (GSH) seviyesi kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte normoksi ($1,81 \pm 0,02^{aA}$ ng/mg) hipoksi ($1,73 \pm 0,02^{aA}$ ng/mg) ve hiperoksi ($1,67 \pm 0,06^{aB}$ ng/mL) uygulamaları arasında istatistiksel olarak farkın olmadığı gözlenmiştir. 12. saatte hipoksi ($1,77 \pm 0,05^{aA}$ ng/mg) uygulaması normoksiye ($1,67 \pm 0,0^{abAB}$ ng/mg) göre GSH miktarında artış olmasına

rağmen istatistiksel farkın olmadığı gözlenmiş, hiperokside ($1,55 \pm 0,07^{bB}$ ng/mg) ise kontrol grubuna göre önemli olmayan ancak hipoksiye göre anlamlı bir azalma meydana geldiği gözlenmiştir. 24. saatte normoksi ($1,78 \pm 0,20^{aA}$ ng/mg) ve hiperoksi ($2,18 \pm 0,07^{aA}$ ng/mg) uygulamaları arasında istatistiksel fark gözlenmezken hipoksi ($1,22 \pm 0,03^{bB}$ ng/mg) uygulaması bunlardan anlamlı bir azalış göstermiştir. 48. saatte hipoksi ($0,90 \pm 0,05^{bD}$ ng/mg) ve hiperoksi ($0,81 \pm 0,03^{bD}$ ng/mg) uygulamaları normoksiye ($1,42 \pm 0,0^{aB}$ ng/mg) göre anlamlı bir azalış göstermişken kendi aralarında kıyaslandığında istatistiksel olarak fark anlamsız olarak karşımıza çıkmaktadır. 72. saatte hipoksi ($0,99 \pm 0,03^{cCD}$ ng/mg) ve hiperoksi ($1,10 \pm 0,01^{bC}$ ng/mg) uygulamaları normoksiye ($1,69 \pm 0,0^{aAB}$ ng/mg) göre anlamlı bir azalış göstermişken kendi aralarında kıyaslandığında ise hipoksinin önemli derecede daha düşük bir seviye gösterdiği bulunmuştur. 28. günde hipoksi ($1,05 \pm 0,02^{aD}$ ng/mg) uygulaması normoksiye ($1,13 \pm 0,03^{aC}$ ng/mg) göre istatistiksel olarak anlamsız bir azalış göstermiştir. Hiperokside ($1,97 \pm 0,01^{bC}$ ng/mg) ise bunlara göre önemli bir azalma meydana gelmiştir.

Tüm zamanlar dikkate alındığında hipoksi uygulamasında 6. ve 12. saatlerde anlamlı bir artış göstererek en yüksek değerde bulunmuştur. En düşük değer ise 48. saattedir. Hiperoksi uygulaması tüm saatlerde kendi içlerinde değerlendirildiğinde en yüksek GSH seviyesi 24. saatte en düşük GSH seviyesi ise 48. saatte anlamlı değişim göstermiştir (Şekil 4.7 ve Çizelge 4.3).



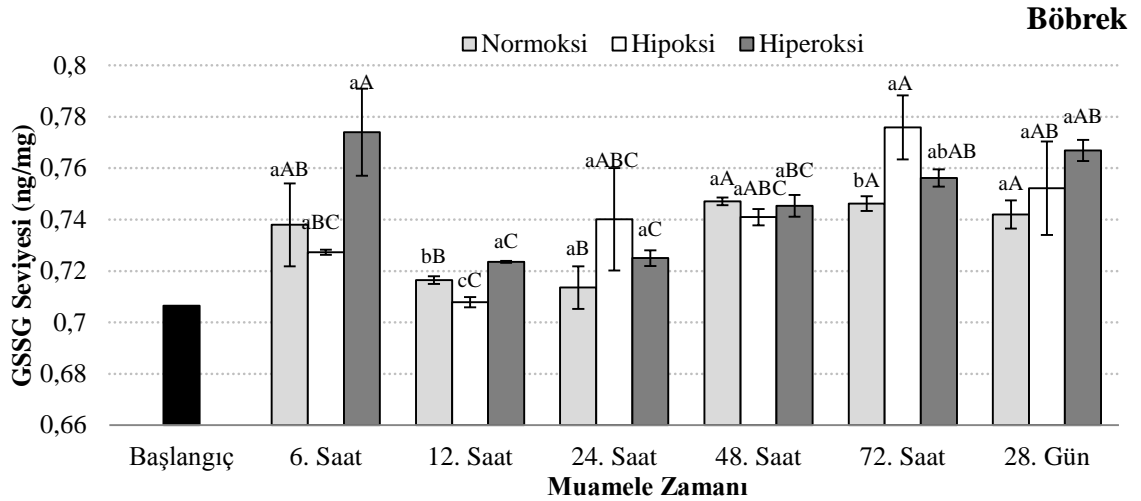
Şekil 4.7. Böbrek dokusunda GSH seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.2.2.3. Böbrek dokusunda okside glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki böbrek dokusu okside glutatyon (GSSG) seviyesi kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hiperoksi ($0,77 \pm 0,02^{aA}$ ng/mg) kontrole ($0,74 \pm 0,02^{aAB}$ ng/mg) göre kıyaslandığında bir artış gözlenmesine rağmen istatistiki açıdan fark önemsiz bulunmuştur. Hipoksi ($0,73 \pm 0,0^{aBC}$ ng/mg) grubu en düşük GSSG seviyesini gösterirken diğer muamelelerden istatistiki açıdan fark yine önemsizdir. 12. saatte böbrek dokusundaki GSSG değeri istatistiki açıdan dikkate alındığında tüm muameleler birbirleri arasında farkın önemli olduğu görülmüştür. Hipoksi ($0,71 \pm 0,0^{cC}$ ng/mg) grubu en düşük GSSG seviyesini gösterirken hiperoksi ($0,72 \pm 0,0^{aC}$ ng/mg) en yüksek GSSG seviyesini göstermektedir. 24. saatte hipoksi ($0,74 \pm 0,02^{aBC}$ ng/mg) ve hiperoksi ($0,72 \pm 0,0^{aC}$ ng/mg) uygulamasında GSSG seviyesi kontrole ($0,71 \pm 0,01^{aB}$ ng/mg) kıyasla artış göstermiş fakat bu artış istatistiki açıdan değerlendirildiğinde tüm uygulamalarda bu farkın önemsiz olarak belirlenmiştir. 48. saatte hipoksi ($0,74 \pm 0,0^{aABC}$ ng/mg) ve hiperoksi ($0,75 \pm 0,0^{aBC}$ ng/mg) gruplarında kontrole ($0,75 \pm 0,0^{aA}$ ng/mg) göre önemli bir azalış gözlemlenmişken bu azalış istatistiki açıdan önemsiz olarak

belirlenmiştir. 72. saatte en yüksek GSSG seviyesi hipoksi ($0,78\pm0,01^{aA}$ ng/mg) grubundadır. Tüm gruplara bakıldığında kontrole ($0,75\pm0,0^{bA}$ ng/mg) göre artış meydana gelmiş ve hipoksi uygulaması ile artan GSSG seviyesinin kontroldekine göre önemli olmasına rağmen hiperoksi uygulamasındaki seviyeye göre önemsiz olduğu görülmüştür. 28. günde hipoksi ($0,75\pm0,02^{aAB}$ ng/mg) ve hiperoksi ($0,77\pm0,0^{aAB}$ ng/mg) gruplarında GSSG seviyesi kontrole ($0,74\pm0,01^{aA}$ ng/mg) kıyasla önemli bir artış gözlenmiş ve bu artış istatistiki açıdan önemsiz bulunmuştur.

Tüm zamanlardaki hipoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek GSSG seviyesi 72. saatte görülmüştür. İstatistiki açıdan değerlendirildiğinde 24. ve 48. saatlerde fark önemsiz bulunmuş diğer tüm uygulama zamanlarında fark önemli bulunmuştur. En düşük seviye ise 12. saatte bulunmuştur. Hiperoksi uygulamasında ise 6. saatte GSSG seviyesi tüm zamanlardan önemli olarak yüksek bulunmuştur. 12. saat ile 24. saat ve 72. saat ile 28. gün arasındaki hiperoksi GSSG seviyesi değişimi önemsiz olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 4.8 ve Çizelge 4.3).

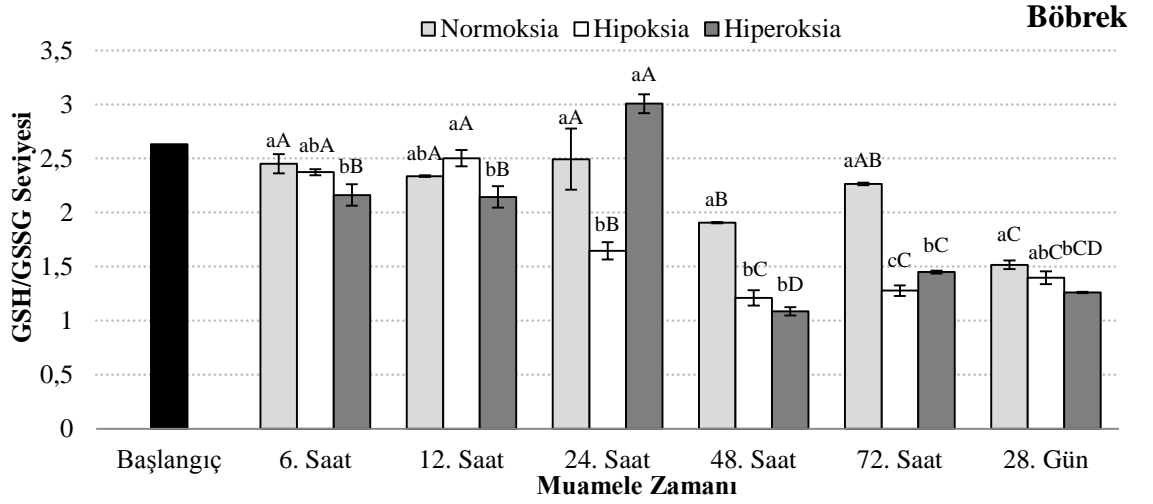


Şekil 4.8. Böbrek dokusunda GSSG seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p<0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.2.2.4. Böbrek dokusunda redükte glutatyonun okside glutatyona oranının seviyelerine ilişkin bulgular

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki böbrek dokusu redükte glutatyonun okside glutatyona oranı (GSH/GSSG) seviyesi kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saat istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde kontrol ($2,45 \pm 0,09^{aA}$) grubunda GSH/GSSG oranının en yüksek olduğu belirlenmiştir. En düşük GSH/GSSG oranının görüldüğü grup hiperoksi ($2,16 \pm 0,10^{bB}$) grubudur. Hipoksi ($2,37 \pm 0,03^{abAB}$) grubunun kontrole göre değişimi önemsizdir. 12. saati göz önünde bulundurduğumuzda ise GSH/GSSG oranı bakımından istatistiksel olarak en yüksek değer hipoksi ($2,50 \pm 0,08^{aA}$) grubunda gözlemlenmiştir. Bu değişim kontrole göre önemsiz iken hiperoksi uygulamasına göre önemlidir. En düşük GSH/GSSG oranı ise hiperoksi ($2,14 \pm 0,10^{bB}$) grubundadır. 24. saatte kontrol ($2,49 \pm 0,28^{aA}$) uygulaması ile hiperoksi ($3,00 \pm 0,09^{aA}$) uygulamaları arasında GSH/GSSG oranı bakımından istatistiksel olarak önemli bir değişim gözlenmemektedir. En düşük GSH/GSSG oranı hipoksi ($1,65 \pm 0,08^{bBC}$) uygulamasında görülmektedir. En yüksek oran ise kontrol ve hiperoksi uygulamalarında karşımıza çıkmaktadır. 48. saat dikkate alındığında istatistiki bakımdan en yüksek GSH/GSSG oranı kontrol ($1,91 \pm 0,01^{aB}$) grubundadır. En düşük GSH/GSSG oranı ise hipoksi ($1,78 \pm 0,58^{aABC}$) ve hiperoksi ($1,09 \pm 0,04^{aD}$) gruplarındadır. Hipoksi ve hiperoksi grupları arasındaki değişim ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. 72. saatte en yüksek GSH/GSSG oranı kontrol ($2,26 \pm 0,01^{aAB}$) grubundadır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında hipoksi ($1,28 \pm 0,05^{cC}$) ve hiperoksi ($1,45 \pm 0,01^{bC}$) gruplarının GSH/GSSG oranında anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir. En düşük GSH/GSSG oranı hipoksi grubunda gözlemlenmektedir. Kontrol, hipoksi ve hiperoksi grupları arasındaki GSH/GSSG oranı değişimi istatistiki açıdan anlamlıdır. 28. gün istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde kontrol ($1,52 \pm 0,04^{aC}$) grubunda GSH/GSSG oranının en yüksek olduğu belirlenmiştir. En düşük GSH/GSSG oranı ise hiperoksi ($1,26 \pm 0,01^{bCD}$) grubu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu azalış kontrole göre önemli iken hiperoksi uygulamasına kıyasla önemsizdir.

Tüm zamanlar dikkate alındığında hipoksi uygulamasında 6. ve 12. saatlerde GSH/GSSG oranının en yüksek olduğu görülmüştür. 24. saatteki GSH/GSSG oranı ise 6. ve 12. saatlere göre istatistiki açıdan önemli derecede düşüş göstermiştir. 48. ve 72. saatler ile 28. günde en düşük GSH/GSSG oranı karşımıza çıkmaktadır. Hiperoksi grubunda en yüksek GSH/GSSG oranı 24. saatte karşımıza çıkmaktayken en düşük GSH/GSSG oranı 48. saatte karşımıza çıkmaktadır. Diğer zamanlar ise GSH/GSSG oranları bakımından farklılık göstermektedir (Şekil 4.9 ve Çizelge 4.3).



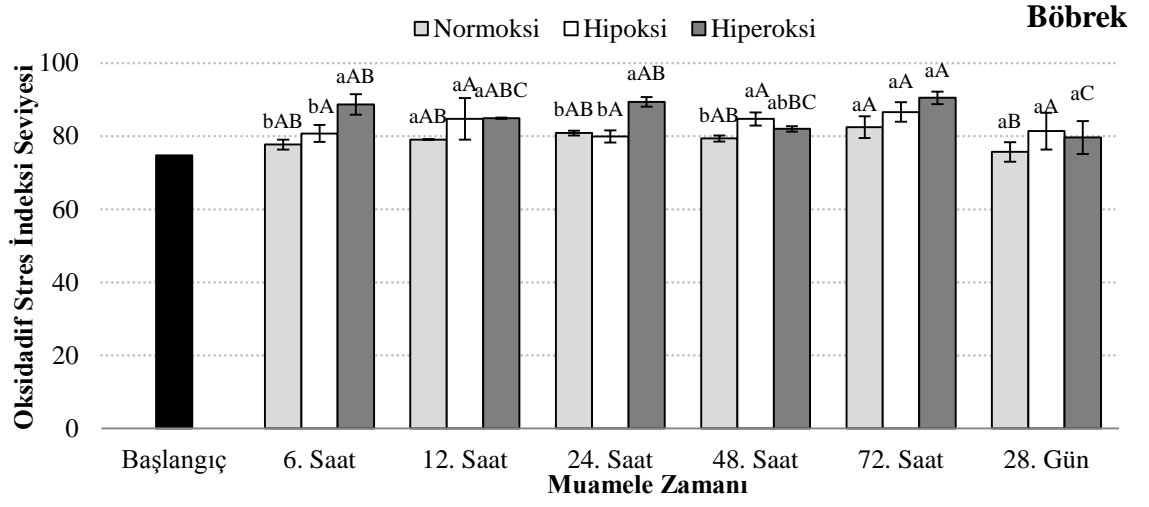
Şekil 4.9. Böbrek dokusunda GSH/GSSG seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.2.2.5. Böbrek dokusunda oksidatif stres indeksi seviyelerine ilişkin bulgular

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki böbrek dokusu oksidatif stres indeksi (OSİ) seviyesi kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi ($80,77 \pm 2,32^{bA}$) ve hiperoksi ($88,72 \pm 2,84^{aAB}$) kontrole ($77,72 \pm 1,38^{bAB}$) göre kıyaslandığında bir artış gözlemlenmiştir. Kontrol ile hipoksi grubunda istatistiki açıdan fark önemsiz bulunmuşken kontrol ile hiperoksi arasında fark önemli bulunmuştur. 12. saatte hipoksi ($84,80 \pm 5,71^{aA}$) ve hiperoksi ($84,96 \pm 0,17^{aABC}$) kontrole ($79,12 \pm 0,07^{aAB}$) göre

kıyaslandığında bir artış gözlemlenmesine rağmen istatistiki açıdan önemli olmadığı karşımıza çıkmaktadır. 24. saatte en yüksek oksidatif stres indeksi hiperoksi ($89,43 \pm 1,34^{aAB}$) uygulamasında olup hipoksi ($79,96 \pm 1,67^{bA}$) uygulaması kontrole ($80,90 \pm 0,66^{bAB}$) kıyasla istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. Hipoksi ve hiperoksi gruplarına istatistiki açıdan bakıldığında ise önemli bulunmuştur. 48. saatte böbrek dokusundaki oksidatif stres indeksi hipoksi ($84,74 \pm 1,80^{aA}$) ve hiperoksi ($82,02 \pm 0,77^{abBC}$) gruplarında kontrole ($79,41 \pm 0,81^{bAB}$) göre artış gözlemlenmiştir. Aralarındaki fark istatistiki açıdan önemsiz olmasına rağmen hipoksinin kontrole göre önemli olduğu bulunmuştur. 72. saatte kontrole ($82,48 \pm 3,00^{aA}$) göre hipoksi ($86,64 \pm 2,67^{aA}$) ve hiperoksi ($90,54 \pm 1,70^{aA}$) gruplarında artış gözlemlenmişken istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. En yüksek oksidatif stres indeksi hiperoksi grubundadır. 28. günde oksidatif stres indeksi en düşük kontrol ($75,72 \pm 2,68^{aB}$) grubunda, en yüksek hipoksi ($81,41 \pm 5,04^{aA}$) grubunda gözlemlenip istatistiksel açıdan önemli olmadığı görülmektedir.

Tüm zamanlardaki hipoksi uygulaması dikkate alındığında istatistiki açıdan bir fark olmadığı görülmektedir. Hiperoksi uygulamasında ise 72. saat oksidatif stres indeksi en yüksek bulunmuştur. 6. ve 24. saatlerde hiperoksi grubunda oksidatif stres indeksi değişimi önemsiz olarak karşımıza çıkmıştır. En düşük OSİ 28. günde olup 48. saat hariç tüm zamanlara kıyasla bu azalmanın önemli olduğu bulunmuştur (Şekil 4.10 ve Çizelge 4.3).



Şekil 4.10. Böbrek dokusunda Oksidatif Stres İndeksi seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

Çizelge 4.3. Böbrek dokusunda tGSH, GSH, GSSG, GSH/GSSG ve OSI değerleri

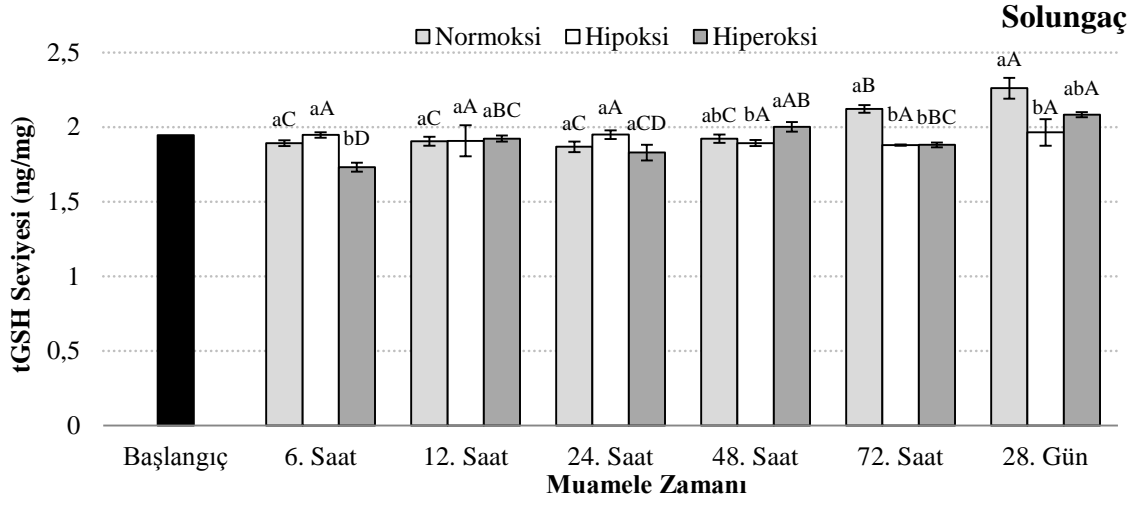
| Genler | Muamele | Akut etki | | | | | Kronik etki |
|-------------------------|-----------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | Saatler | | | | | Gün |
| | | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 | 28 |
| tGSH (ng/mg) | Normoksi | 2,54±0,01 ^{aA} | 2,39±0,0 ^{abAB} | 2,49±0,20 ^{aA} | 2,17±0,0 ^{aB} | 2,44±0,0 ^{aAB} | 1,87±0,04 ^{aC} |
| | Hipoksi | 2,45±0,02 ^{aA} | 2,48±0,05 ^{aA} | 1,96±0,01 ^{bAB} | 2,06±0,42 ^{aAB} | 1,77±0,02 ^{cB} | 1,80±0,01 ^{abB} |
| | Hiperoksi | 2,44±0,04 ^{aB} | 2,27±0,07 ^{bC} | 2,91±0,07 ^{aA} | 1,55±0,03 ^{aE} | 1,85±0,02 ^{bD} | 1,73±0,01 ^{bD} |
| GSH (ng/mg) | Normoksi | 1,81±0,02 ^{aA} | 1,67±0,0 ^{abAB} | 1,78±0,20 ^{aA} | 1,42±0,0 ^{aB} | 1,69±0,0 ^{aAB} | 1,13±0,03 ^{aC} |
| | Hipoksi | 1,73±0,02 ^{aA} | 1,77±0,05 ^{aA} | 1,22±0,03 ^{bB} | 0,90±0,05 ^{bD} | 0,99±0,03 ^{cCD} | 1,05±0,02 ^{aD} |
| | Hiperoksi | 1,67±0,06 ^{aB} | 1,55±0,07 ^{bB} | 2,18±0,07 ^{aA} | 0,81±0,03 ^{bD} | 1,10±0,01 ^{bC} | 1,97±0,01 ^{bC} |
| GSSG (ng/mg) | Normoksi | 0,74±0,02 ^{aAB} | 0,72±0,0 ^{bB} | 0,71±0,01 ^{aB} | 0,75±0,0 ^{aA} | 0,75±0,0 ^{bA} | 0,74±0,01 ^{aA} |
| | Hipoksi | 0,73±0,0 ^{aBC} | 0,71±0,0 ^{cC} | 0,74±0,02 ^{aABC} | 0,74±0,0 ^{aABC} | 0,78±0,01 ^{aA} | 0,75±0,02 ^{aAB} |
| | Hiperoksi | 0,77±0,02 ^{aA} | 0,72±0,0 ^{aC} | 0,72±0,0 ^{aC} | 0,75±0,0 ^{aBC} | 0,76±0,0 ^{abAB} | 0,77±0,0 ^{aAB} |
| GSH/GSSG | Normoksi | 2,45±0,09 ^{aA} | 2,34±0,01 ^{abA} | 2,49±0,28 ^{aA} | 1,91±0,01 ^{aB} | 2,26±0,01 ^{aAB} | 1,52±0,04 ^{aC} |
| | Hipoksi | 2,37±0,03 ^{abA} | 2,50±0,08 ^{aA} | 1,65±0,08 ^{bB} | 1,21±0,07 ^{bC} | 1,28±0,05 ^{cC} | 1,40±0,06 ^{abC} |
| | Hiperoksi | 2,16±0,10 ^{bB} | 2,14±0,10 ^{bB} | 3,00±0,09 ^{aA} | 1,09±0,04 ^{bD} | 1,45±0,01 ^{bC} | 1,26±0,01 ^{bCD} |
| OSI | Normoksi | 77,72±1,38 ^{bAB} | 79,12±0,07 ^{aAB} | 80,90±0,66 ^{bAB} | 79,41±0,81 ^{bAB} | 82,48±3,00 ^{aA} | 75,72±2,68 ^{aB} |
| | Hipoksi | 80,77±2,32 ^{bA} | 84,80±5,71 ^{aA} | 79,96±1,67 ^{bA} | 84,74±1,80 ^{aA} | 86,64±2,67 ^{aA} | 81,41±5,04 ^{aA} |
| | Hiperoksi | 88,72±2,84 ^{aAB} | 84,96±0,17 ^{aABC} | 89,43±1,34 ^{aAB} | 82,02±0,77 ^{abBC} | 90,54±1,70 ^{aA} | 79,65±4,48 ^{aC} |

4.2.3 Solungaç dokusunda glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular

4.2.3.1. Solungaç dokusunda toplam glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki solungaç dokusu toplam glutatyon (tGSH) seviyesi kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi ($1,95 \pm 0,02^{aA}$ ng/mg) kontrole ($1,89 \pm 0,02^{aC}$ ng/mL) göre kıyaslandığında bir artış gözlenmesine rağmen istatistiki açıdan fark önemsiz bulunmuştur. Hiperoksi ($1,73 \pm 0,03^{bC}$ ng/mg) en düşük tGSH seviyesini gösterirken diğer muamelelerden istatistiki açıdan fark önemlidir. 12. saatte solungaç dokusundaki tGSH değeri istatistiki açıdan dikkate alındığında tüm muameleler arasında farkın önemsiz olduğu görülmüştür. 24. saatte hipoksi ($1,95 \pm 0,03^{aA}$ ng/mg) ve hiperoksi ($1,83 \pm 0,05^{aB}$ ng/mg) uygulamaları tGSH seviyesi kontrole ($1,87 \pm 0,03^{aC}$ ng/mg) kıyasla artış göstermiş fakat bu artış istatistiki açıdan değerlendirildiğinde tüm uygulamalarda önemsiz olarak belirlenmiştir. 48. saatte tGSH değeri en düşük hipoksi ($1,89 \pm 0,02^{bA}$ ng/mg) grubunda görülürken en yüksek hiperoksi ($2,00 \pm 0,03^{aA}$ ng/mg) grubunda görülmüştür. Bunlar kontrole göre önemsiz bir farka sahip iken kendi aralarında ise önemlidir. 72. saatte hipoksi ($1,88 \pm 0,01^{bA}$) ve hiperoksi ($1,88 \pm 0,02^{bB}$ ng/mg) gruplarında kontrole ($2,12 \pm 0,03^{aB}$ ng/mg) göre önemli bir azalış gözlemlenmiştir. Hipoksi ve hiperoksi grupları arasında ise istatistiki açıdan bir fark olmadığı gözlenmiştir. 28. günde en yüksek tGSH değeri kontrol ($2,26 \pm 0,07^{aA}$ ng/mg) grubundadır. Hipoksi ($1,97 \pm 0,09^{bA}$ ng/mg) ve hiperoksi ($1,88 \pm 0,02^{bB}$ ng/mg) gruplarında kontrole kıyasla önemli bir azalış gözlenmiş ve istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. En düşük tGSH değeri ise hipoksi grubunda görülmektedir.

Tüm zamanlardaki hipoksi uygulaması dikkate alındığında istatistiki açıdan tGSH değerleri önemsiz bulunmuştur. Hiperoksi uygulamasında ise 28. gün tGSH değeri tüm zamanlardan önemli olarak yüksek bulunmuştur. En düşük seviye 6. saatte olup diğer gruplara göre istatistiki açıdan önemli bulunmuştur (Şekil 4.11 ve Çizelge 4.4).



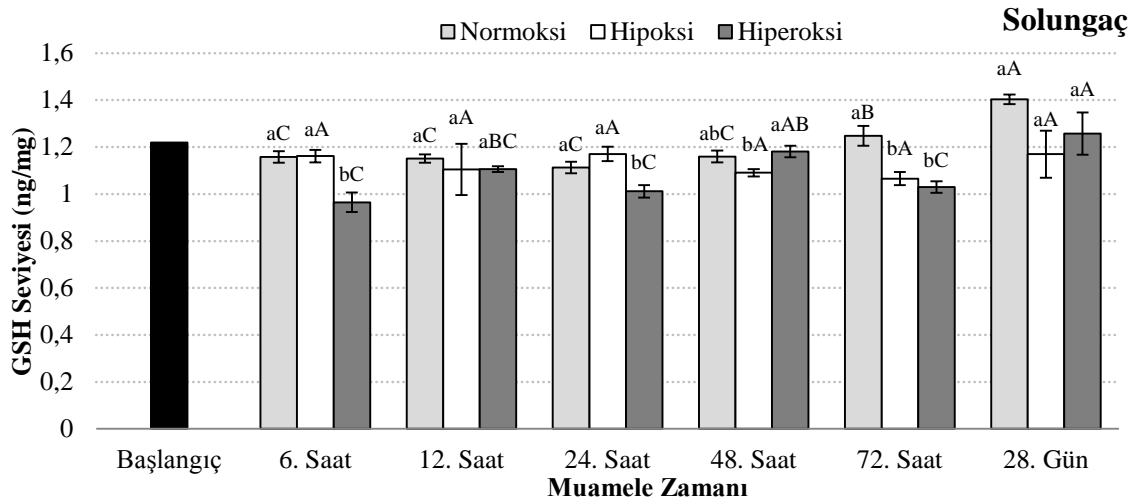
Şekil 4.11. Solungaç dokusunda tGSH seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.2.3.2. Solungaç dokusunda redükte glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki solungaç dokusu redükte glutatyon (GSH) seviyesi kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saate bakıldığında, istatistiksel olarak en yüksek GSH seviyesi, kontrol ($1,16 \pm 0,02^{aC}$ ng/mg) ve hipoksi ($1,16 \pm 0,03^{aA}$ ng/mg) gruplarında görülmektedir. En düşük GSH seviyesi ise hiperoksi ($0,10 \pm 0,04^{bC}$ ng/mg) grubunda gözlenmiştir. 12. saat göz önünde bulundurulduğunda ise kontrol ($1,16 \pm 0,02^{aC}$ ng/mg), hipoksi ($1,10 \pm 0,11^{aA}$ ng/mg) ve hiperoksi ($1,11 \pm 0,01^{aBC}$ ng/mg) grupları arasında istatistiki açıdan GSH seviyelerinde anlamlı bir değişim görülmemiştir. 24. saatte istatistiki açıdan ve hipoksi ($1,17 \pm 0,03^{aA}$ ng/mg) uygulaması kontrole ($1,11 \pm 0,02^{aC}$ ng/mg) göre en yüksek GSH seviyesine sahiptir. Kontrol ve hipoksi uygulamalarının GSH seviyeleri istatistiki açıdan bir fark içermemektedir. Hiperoksi ($1,01 \pm 0,03^{bC}$ ng/mg) uygulamasının GSH seviyesi, kontrol ve hipoksi uygulamalarına göre daha düşük bulunmuş ve istatistiki açıdan aralarındaki fark önemli görülmüştür. 48. saatte istatistiki açıdan en yüksek GSH seviyesini ihtiva eden grup hiperoksi ($1,18 \pm 0,02^{aAB}$ ng/mg) grubu olarak karşımıza çıkmaktayken en düşük GSH seviyesini gösteren grup

ise hipoksi ($1,09 \pm 0,02^{bA}$) grubudur. Kontrol grubu ($1,16 \pm 0,03^{abC}$) ise hem hipoksi hem de hiperoksiye göre önemli olmayan farka sahiptir. 72. saatte istatistiki açıdan en yüksek GSH seviyesi, kontrol uygulamasında görülmektedir. Hipoksi ($1,07 \pm 0,03^{bA}$ ng/mg) ve hiperoksi ($1,03 \pm 0,02^{bC}$ ng/mg) uygulamalarındaki GSH seviyeleri kontrol grubuna ($1,25 \pm 0,04^{ab}$ ng/mg) nazaran önemli derecede azalış göstermiştir. En düşük GSH seviyesi hipoksi ve hiperoksi uygulamalarında görülmektedir. 28. gün değerlendirildiğinde kontrol ($1,40 \pm 0,02^{aA}$ ng/mg), hipoksi ($1,17 \pm 0,10^{aA}$ ng/mg) ve hiperoksi ($1,26 \pm 0,09^{aA}$ ng/mg) grupları arasında istatistiksel açıdan GSH seviyelerindeki değişim önemli görülmemiştir.

Tüm zamanlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde kontrol uygulamasında hipoksi uygulamasında ise tüm zamanlardaki GSH seviyeleri arasındaki değişim önemsiz bulunmuştur. Hiperoksi uygulamasında en yüksek GSH seviyesi 28. günde en düşük GSH seviyesi ise 6., 24. ve 72. saatlerde görülmektedir. 6., 24. ve 72. saatler arasında GSH seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (Şekil 4.12 ve Çizelge 4.4).

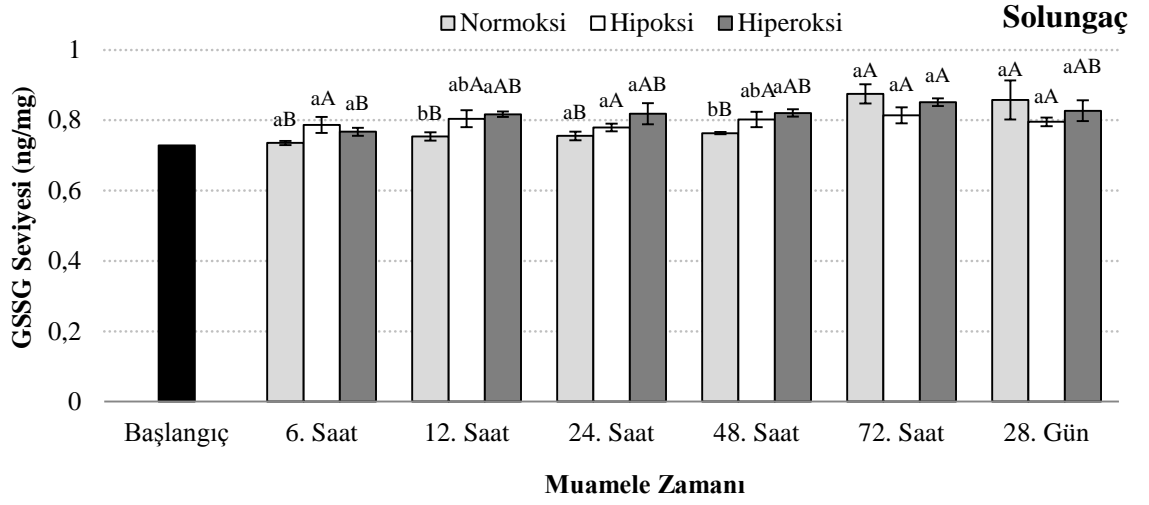


Şekil 4.12. Solungaç dokusunda GSH seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.2.3.3. Solungaç dokusunda okside glutatyon seviyelerine ilişkin bulgular

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki solungaç dokusu okside glutatyon (GSSG) seviyesi kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saate hipoksi ($0,79 \pm 0,02^{aA}$ ng/mg) ve hiperoksi ($0,77 \pm 0,01^{aB}$ ng/mg) gruplarında GSSG seviyesinde kontrol ($0,74 \pm 0,01^{aB}$ ng/mg) grubuna göre artış olduğu görülmektedir fakat bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. 12. saat istatistiksel olarak değerlendirildiğinde en yüksek GSSG seviyesi hiperoksi ($0,82 \pm 0,01^{aAB}$ ng/mg) uygulamasında görülmektedir. En düşük GSSG seviyesi kontrol ($0,75 \pm 0,01^{bB}$ ng/mg) uygulamasında karşımıza çıkmaktadır. Hipoksi ($0,80 \pm 0,02^{abA}$ ng/mg) uygulamasının kontrole göre farkı önemsiz iken hiperoksi uygulamasının kontrole göre farkı önemlidir. 24. saatte GSSG seviyeleri kontrole ($0,76 \pm 0,01^{aB}$ ng/mg) göre hipoksi ($0,78 \pm 0,01^{aA}$ ng/mg) ve hiperoksi ($0,82 \pm 0,03^{aAB}$ ng/mg) gruplarında artış sergilemektedir fakat istatistiksel açıdan bir anlam teşkil etmemektedir. 48. saat değerlendirildiğinde istatistiksel olarak en yüksek GSSG seviyesi hiperoksi ($0,82 \pm 0,01^{aAB}$ ng/mg) grubundadır. Kontrol ($0,76 \pm 0,0^{bB}$ ng/mg) grubunun GSSG seviyesi en düşük GSSG seviyesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Hipoksi ($0,80 \pm 0,02^{abA}$ ng/mg) grubunun GSSG seviyesi ise kontrol ve hiperoksi gruplarının GSSG seviyelerine kıyasla önemsiz bir farka sahiptir. 72. saat ve 28. güne bakıldığında hipoksi ve hiperoksi gruplarında kontrol grubuna nazaran GSSG seviyelerinde düşüş gözlemlenmiştir fakat bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Hipoksi uygulaması için tüm zamanlar dikkate alındığında GSSG seviyesinin zamanlara göre değişimi istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Hiperoksi uygulamasında en yüksek GSSG seviyesi 72. saatte görülürken en düşük GSSG seviyesi 6. saatte karşımıza çıkmaktadır (Şekil 4.13 ve Çizelge 4.4).



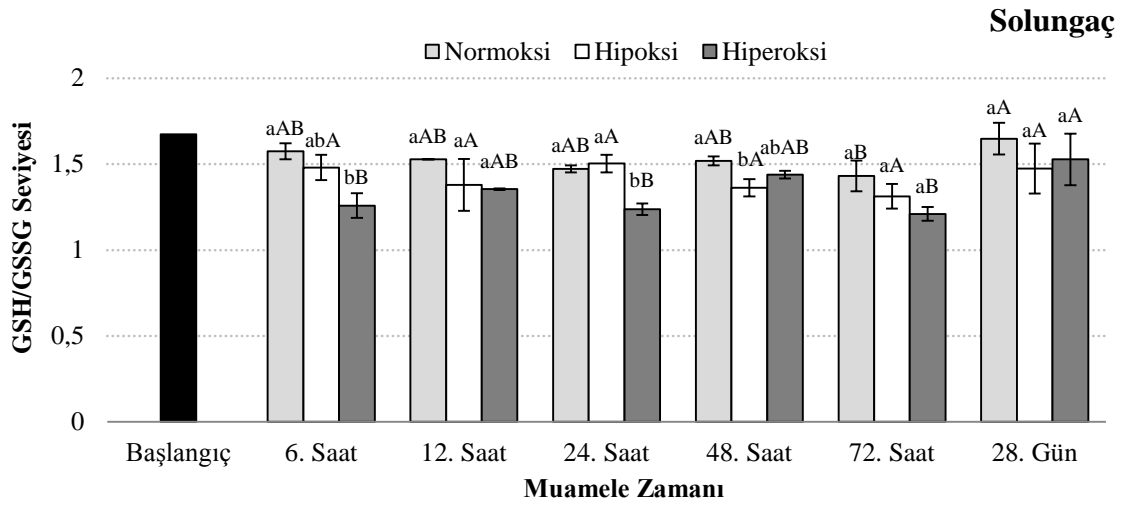
Şekil 4.13. Solungaç dokusunda GSSG seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.2.3.4. Solungaç dokusunda redükte glutatyonun okside glutatyona oranının seviyelerine ilişkin bulgular

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki solungaç dokusu redükte glutatyonun okside glutatyona oranı (GSH/GSSG) seviyesi kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saat istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde kontrol grubunda ($1,58 \pm 0,05^{aAB}$) GSH/GSSG oranının en yüksek olduğu belirlenmiştir. En düşük GSH/GSSG oranının görüldüğü grup hiperoksi ($1,26 \pm 0,07^{bB}$) grubudur ve kontrole göre değişim anlamlı iken hipoksi uygulamasına göre değişimi anlamsızdır. 12. saati göz önünde bulundurduğumuzda ise GSH/GSSG oranı bakımından kontrol ($1,53 \pm 0,0^{aAB}$), hipoksi ($1,38 \pm 0,15^{aA}$) ve hiperoksi ($1,35 \pm 0,0^{aAB}$) grupları arasında istatistiksel açıdan farklılık olmadığı tespit edilmiştir. 24. saatte kontrol ($1,47 \pm 0,02^{aAB}$) uygulaması ile hipoksi ($1,50 \pm 0,05^{aA}$) uygulamaları arasında GSH/GSSG oranı bakımından istatistiksel olarak önemli bir değişim gözlenmemektedir. En düşük GSH/GSSG oranı hiperoksi ($1,24 \pm 0,03^{bB}$) uygulamasında görülmüş hipoksi ve kontrol uygulamalarına kıyasla anlamlı bir azalış sergilemiştir. 48. saat dikkate alındığında istatistiki bakımdan en yüksek GSH/GSSG

oranı kontrol ($1,52 \pm 0,03^{aAB}$) grubunda olup en düşük GSH/GSSG oranına sahip grup ise hipoksi ($1,36 \pm 0,05^{bA}$) grubudur. Hiperoksi ($1,44 \pm 0,02^{abAB}$) grubu ise istatistiksel açıdan kontrol ve hipoksi grupları ile farklılık göstermemiştir. 72. saat ile 28. günlerde hipoksi, hiperoksi ve kontrol grupları arasında GSH/GSSG oranı bakımında istatistiksel olarak anlamlı değişimler meydana gelmemiştir.

Tüm zamanlar dikkate alındığında hipoksi uygulamasında GSH/GSSG oranının istatistiksel açıdan anlamlı bir değişime uğramadığı görülmektedir. Hiperoksi uygulamasını ele alacak olursak 28. günde en yüksek GSH/GSSG oranını görüyoruz. 6., 24. ve 72. saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.14 ve Çizelge 4.4).



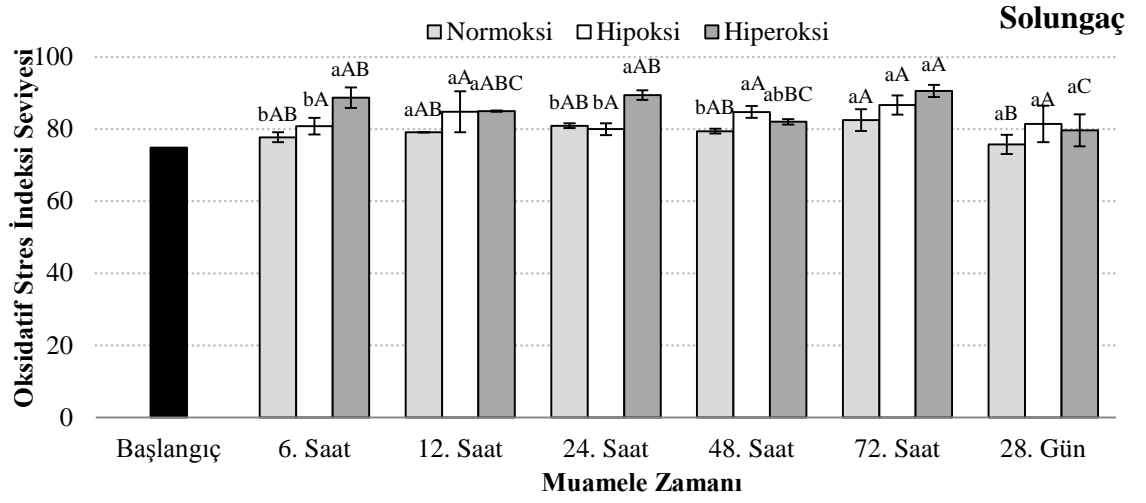
Şekil 4.14. Solungaç dokusunda GSH/GSSG seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.2.3.5. Solungaç dokusunda oksidatif stres indeksi seviyelerine ilişkin bulgular

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki solungaç dokusu oksidatif stres indeksi (OSI) seviyesi kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi ($80,77 \pm 2,32^{bA}$) ve hiperoksi

($88,72 \pm 2,84^{aA}$) kontrole ($77,72 \pm 0,38^{bAB}$) göre kıyaslandığında bir artış gözlemlenmiştir. Kontrol ile hipoksi grubunda istatistiki açıdan fark önemsiz bulunmuşken kontrol ile hiperoksi arasında fark önemli bulunmuştur. 12. saatte hipoksi ($84,80 \pm 5,71^{aA}$) ve hiperoksi ($84,96 \pm 0,17^{aAB}$) kontrole ($79,11 \pm 0,07^{aAB}$) göre kıyaslandığında bir artış gözlemlenmesine rağmen istatistiki açıdan önemli olmadığı karşımıza çıkmaktadır. 24. saatte önemli derecede en yüksek oksidatif stres indeksi hiperoksi ($89,43 \pm 1,34^{aA}$) uygulamasında olup hipoksi ($79,97 \pm 1,67^{bA}$) uygulaması kontrole ($80,90 \pm 0,66^{bAB}$) kıyasla istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. 48. saatte solungaç dokusundaki oksidatif stres indeksi hipoksi ($79,96 \pm 1,67^{bA}$) ve hiperoksi ($89,43 \pm 1,34^{aA}$) gruplarında kontrole ($80,90 \pm 0,66^{bAB}$) göre artış gözlemlenmiştir. Kontrolün hipoksi ile farkı önemli iken hiperoksi ile önemsiz olarak bulunmuştur. 72. saatte kontrole ($82,48 \pm 3,00^{aA}$) göre hipoksi ($86,64 \pm 2,67^{aA}$) ve hiperoksi ($90,54 \pm 1,70^{aA}$) gruplarında artış gözlemlenmişken istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. En yüksek oksidatif stres indeksi hiperoksi grubundadır. 28. günde oksidatif stres indeksi en düşük kontrol ($75,72 \pm 2,68^{aB}$) grubunda, en yüksek hipoksi ($81,41 \pm 5,04^{aA}$) grubunda gözlemlenip istatistiksel açıdan önemli olmadığı görülmektedir.

Tüm zamanlardaki hipoksi uygulaması dikkate alındığında istatistiki açıdan bir fark olmadığı görülmektedir. Hiperoksi uygulamasında ise 6., 12., 24. ve 48. saatlerde oksidatif stres indeksi birbirlerine kıyasla farkları önemsiz bulunmuştur. En düşük OSİ 28. günde, en yüksek ise 72. saatte olup aralarındaki fark istatistiki açıdan önemli bulunmuştur (Şekil 4.15 ve Çizelge 4.4).



Şekil 4.15. Solungaç dokusunda Oksidatif Stres İndeksi seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

Çizelge 4.4. Solungaç dokusunda tGSH, GSH, GSSG, GSH/GSSG ve OSI değerleri

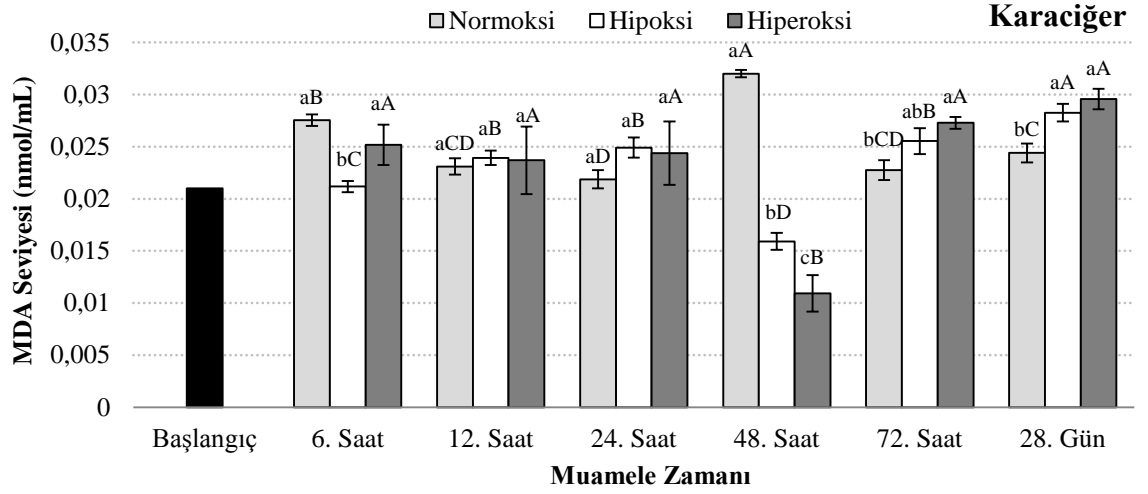
| Genler | Muamele | Akut etki | | | | | Kronik etki |
|-----------------|-----------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | Saatler | | | | | Gün |
| | | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 | 28 |
| tGSH (ng/mg) | Normoksi | 1,89±0,02 ^{aC} | 0,91±0,03 ^{aC} | 1,87±0,03 ^{aC} | 1,92±0,03 ^{abC} | 2,12±0,03 ^{aB} | 2,26±0,07 ^{aA} |
| | Hipoksi | 1,95±0,02 ^{aA} | 0,91±0,10 ^{aA} | 1,95±0,03 ^{aA} | 1,89±0,02 ^{bA} | 1,88±0,01 ^{bA} | 1,97±0,09 ^{bA} |
| | Hiperoksi | 1,73±0,03 ^{bC} | 0,92±0,02 ^{aAB} | 1,83±0,05 ^{aB} | 2,00±0,03 ^{aA} | 1,88±0,02 ^{bB} | 1,88±0,02 ^{bB} |
| GSH (ng/mg) | Normoksi | 1,16±0,02 ^{aC} | 1,16±0,02 ^{aC} | 1,11±0,02 ^{aC} | 1,16±0,03 ^{abC} | 1,25±0,04 ^{aB} | 1,40±0,02 ^{aA} |
| | Hipoksi | 1,16±0,03 ^{aA} | 1,10±0,11 ^{aA} | 1,17±0,03 ^{aA} | 1,09±0,02 ^{bA} | 1,07±0,03 ^{bA} | 1,17±0,10 ^{aA} |
| | Hiperoksi | 0,10±0,04 ^{bC} | 1,11±0,01 ^{aBC} | 1,01±0,03 ^{bC} | 1,18±0,02 ^{aAB} | 1,03±0,02 ^{bC} | 1,26±0,09 ^{aA} |
| GSSG (ng/mg) | Normoksi | 0,74±0,01 ^{aB} | 0,75±0,01 ^{bB} | 0,76±0,01 ^{aB} | 0,76±0,0 ^{bB} | 0,88±0,03 ^{aA} | 0,86±0,06 ^{aA} |
| | Hipoksi | 0,79±0,02 ^{aA} | 0,80±0,02 ^{abA} | 0,78±0,01 ^{aA} | 0,80±0,02 ^{abA} | 0,81±0,02 ^{aA} | 0,80±0,01 ^{aA} |
| | Hiperoksi | 0,77±0,01 ^{aB} | 0,82±0,01 ^{aAB} | 0,82±0,03 ^{aAB} | 0,82±0,01 ^{aAB} | 0,85±0,01 ^{aA} | 0,83±0,03 ^{aAB} |
| GSH/GSSG | Normoksi | 1,58±0,05 ^{aAB} | 1,53±0,0 ^{aAB} | 1,47±0,02 ^{aAB} | 1,52±0,03 ^{aAB} | 1,43±0,09 ^{aB} | 1,65±0,09 ^{aA} |
| | Hipoksi | 1,48±0,07 ^{abA} | 1,38±0,15 ^{aA} | 1,50±0,05 ^{aA} | 1,36±0,05 ^{bA} | 1,31±0,07 ^{aA} | 1,47±0,15 ^{aA} |
| | Hiperoksi | 1,26±0,07 ^{bB} | 1,35±0,0 ^{aAB} | 1,24±0,03 ^{bB} | 1,44±0,02 ^{abAB} | 1,21±0,04 ^{aB} | 1,53±0,15 ^{aA} |
| OSI | Normoksi | 77,72±0,38 ^{bAB} | 79,11±0,07 ^{aAB} | 80,90±0,66 ^{bAB} | 80,90±0,66 ^{bAB} | 82,48±3,00 ^{aA} | 75,72±2,68 ^{aB} |
| | Hipoksi | 80,77±2,32 ^{bA} | 84,80±5,71 ^{aA} | 79,97±1,67 ^{bA} | 79,96±1,67 ^{bA} | 86,64±2,67 ^{aA} | 81,41±5,04 ^{aA} |
| | Hiperoksi | 88,72±2,84 ^{aAB} | 84,96±0,17 ^{aABC} | 89,43±1,34 ^{aAB} | 82,01±0,76 ^{aBC} | 90,54±1,70 ^{aA} | 79,65±4,48 ^{aC} |

4.3. Malondialdehit Seviyelerine İlişkin Bulgular

4.3.1. Karaciğer dokusunda malondialdehit seviyelerine ilişkin bulgular

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki karaciğer dokusunda malondialdehit (MDA) seviyeleri birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi uygulaması ($0,02 \pm 0,00^{bC}$ nmol/mL) kontrol ($0,03 \pm 0,00^{aB}$ nmol/mL) ve hiperoksi uygulamasına ($0,03 \pm 0,00^{aA}$ nmol/mL) göre önemli derecede düşük bulunmuştur. Hiperoksi uygulamasının kontrole göre azalması istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. 12. saatte kontrol ($0,02 \pm 0,00^{aCD}$ nmol/mL), hipoksi ($0,02 \pm 0,00^{aB}$ nmol/mL) ve hiperoksi ($0,02 \pm 0,00^{aA}$ nmol/mL) grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. 24. saatte yine kontrol ($0,02 \pm 0,00^{aD}$ nmol/mL), hipoksi ($0,02 \pm 0,00^{aB}$ nmol/mL) ve hiperoksi ($0,02 \pm 0,00^{aA}$ nmol/mL) grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. 48. saatte hipoksi muamele grubu ($0,02 \pm 0,00^{bD}$ nmol/mL) kontrole ($0,03 \pm 0,00^{aA}$ nmol/mL) göre önemli derecede azalmıştır. Hiperoksi muamelesi ile MDA seviyesi ($0,01 \pm 0,00^{cB}$ nmol/mL) hem hipoksi hem de kontrol gruplarına göre önemli derecede azalış göstermiştir. 72. saatte hiperoksi ($0,03 \pm 0,00^{aA}$ nmol/mL) kontrole ($0,02 \pm 0,00^{bCD}$ nmol/mL) göre önemli derecede artmış iken hipoksi ($0,03 \pm 0,00^{abB}$ nmol/mL) ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Hipoksi grubu kontrole göre artışı anlamlı değildir. 28. günde hem hipoksi ($0,03 \pm 0,00^{aA}$ nmol/mL) hem de hiperoksi ($0,03 \pm 0,00^{aA}$ nmol/mL) grubunda MDA seviyesi kontrole ($0,02 \pm 0,00^{bC}$ nmol/mL) göre önemli derecede bir artış göstermiş ancak aralarındaki fark anlamsız olarak bulunmuştur.

Tüm zamanlarda hipoksi uygulamasında en yüksek MDA seviyesinde 28. günde ve en düşük 48. saatte önemli olarak bulunmuştur. 12., 24. ve 72. saatlerdeki MDA seviyeleri aralarındaki farklar istatistiki açıdan önemli değildir. Hiperoksi grubunun tüm zamanları dikkate alındığında en düşük MDA seviyesi 48. saatte ve diğer zamanlara kıyasla önemli olduğu bulunmuş olup diğer zamanlar arasındaki değişim önemsizdir (Şekil 4.16 ve Çizelge 4.5).



Şekil 4.16. Karaciğer dokusuna ilişkin MDA seviyeleri

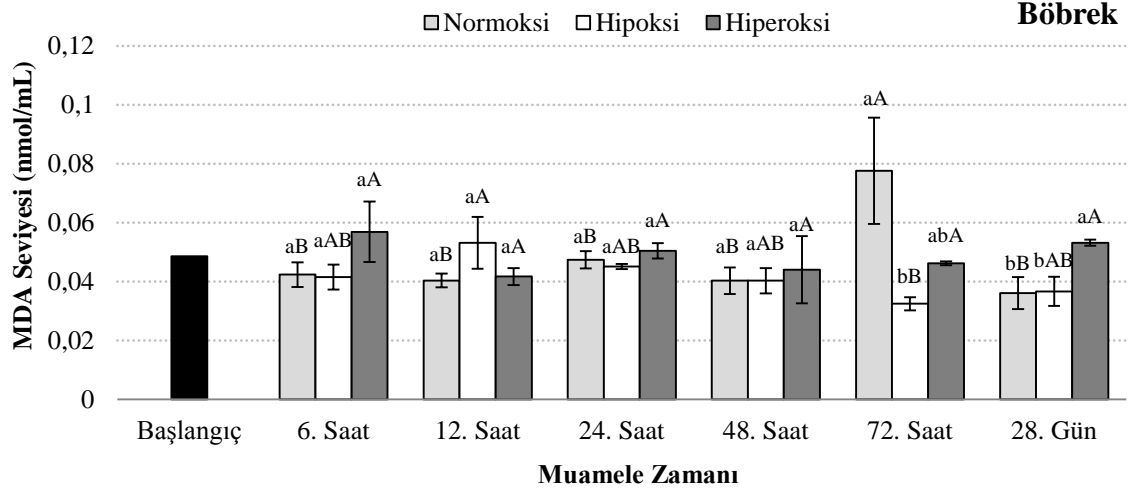
(Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.3.2. Böbrek dokusunda malondialdehit seviyelerine ilişkin bulgular

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki böbrek dokusunda malondialdehit (MDA) seviyeleri birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6., 12., 24. ve 48. saatlerde kontrol, hipoksi ve hiperoksi muameleleri arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir. 72. saatte hipoksi muamelesi ($0,03 \pm 0,00^{bB}$ nmol/mL) ile MDA seviyesi kontrole göre önemli derecede azalmışken hiperoksi muamelesi ($0,05 \pm 0,00^{abA}$ nmol/mL) kontrole ($0,08 \pm 0,02^{aA}$ nmol/mL) göre önemli bir değişim göstermemiştir. 28. günde kontrol ($0,04 \pm 0,01^{bB}$ nmol/mL) ve hipoksi ($0,04 \pm 0,00^{bAB}$ nmol/mL) arasındaki fark istatistiki açıdan önemsiz bulunmuş iken hiperoksi muamelesi ($0,05 \pm 0,00^{aA}$ nmol/mL) ile MDA seviyesi kontrole göre önemli derecede artmıştır.

Tüm zamanlar dikkate alındığında hipoksi muamelesinde en yüksek lipid peroksidasyonu 12. saatte en düşük ise 72. saatte gözlenmiştir. Bu iki zaman arasındaki

fark istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Hiperoksi muamelesinde tüm zamanlarda lipit peroksidasyon seviyeleri arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.17; Çizelge 4.5).



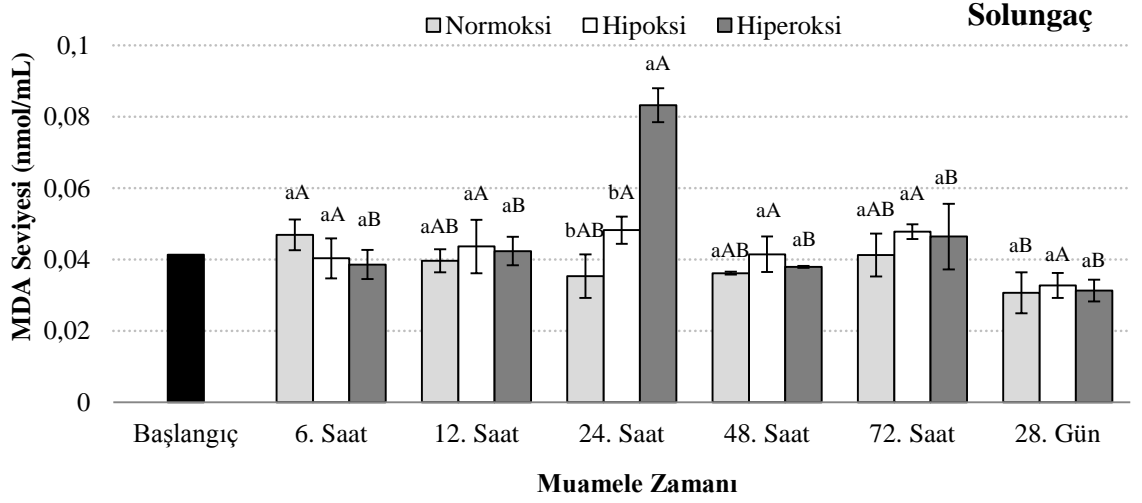
Şekil 4.17. Böbrek dokusuna ilişkin MDA seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.3.3. Solungaç dokusunda malondialdehit seviyelerine ilişkin bulgular

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki solungaç dokusu malondialdehit (MDA) seviyeleri birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6., 12., 48., 72. saatler ve 28. gündeki kontrol hipoksi ve hiperoksi muameleleri birbirleri ile kıyaslandığında farkın anlamlı olmadığı bulunmuştur. 24. saatte hipoksi muamelesi ($0,05 \pm 0,00^{bA}$ nmol/mL) kontrole ($0,04 \pm 0,01^{bAB}$ nmol/mL) göre artış göstermesine rağmen istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. Ancak hiperoksi ($0,08 \pm 0,00^{aA}$ nmol/mL) ile lipit peroksidasyonu hem kontrol hem de hipoksi muamelesine göre önemli derecede artış göstermiştir.

Tüm zamanlar dikkate alındığında; hipoksi muamelesindeki lipit peroksidasyonu seviyeleri farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Hiperoksi muamelesi ile

24. saatteki lipit peroksidasyon seviyesi diğer tüm zamanlara nazaran önemli derecede artış göstermiştir. Diğer zamanlarda ise aralarındaki farklar anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.18; Çizelge 4.5).



Şekil 4.18. Solungaç dokusuna ilişkin MDA seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

Çizelge 4.5. Tüm dokularda MDA seviyelerine ilişkin değerler (nmol/mL)

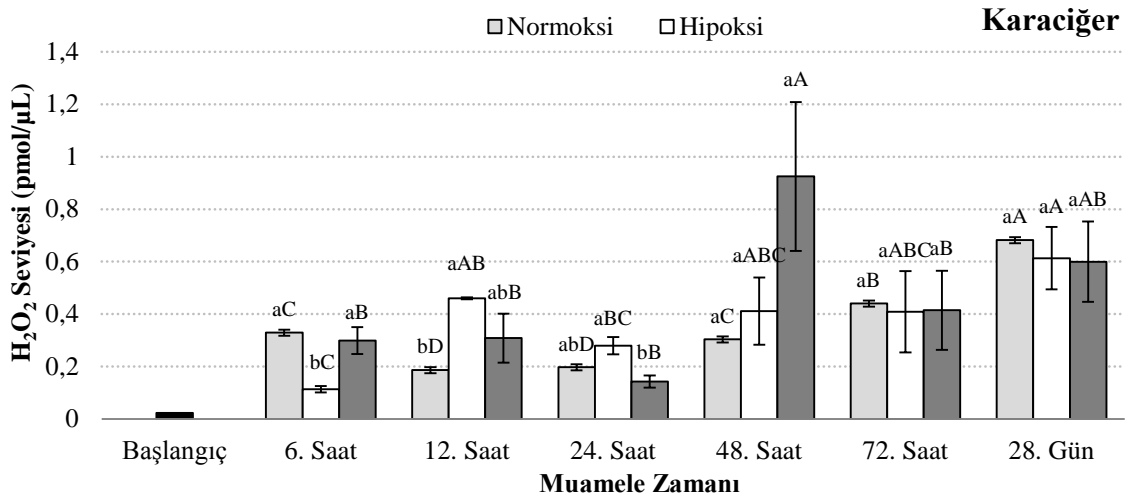
| Doku | Muamele | Akut etki | | | | Kronik etki | |
|-----------|-----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | Saatler | | | | Gün | |
| | | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 | 28 |
| Karaciğer | Normoksi | 0,03±0,00 ^{aB} | 0,02±0,00 ^{aCD} | 0,02±0,00 ^{aD} | 0,03±0,00 ^{aA} | 0,02±0,00 ^{bCD} | 0,02±0,00 ^{bC} |
| | Hipoksi | 0,02±0,00 ^{bC} | 0,02±0,00 ^{aB} | 0,02±0,00 ^{aB} | 0,02±0,00 ^{bD} | 0,03±0,00 ^{abB} | 0,03±0,00 ^{aA} |
| | Hiperoksi | 0,03±0,00 ^{aA} | 0,02±0,00 ^{aA} | 0,02±0,00 ^{aA} | 0,01±0,00 ^{cB} | 0,03±0,00 ^{aA} | 0,03±0,00 ^{aA} |
| Böbrek | Normoksi | 0,04±0,00 ^{aB} | 0,04±0,00 ^{aB} | 0,05±0,00 ^{aB} | 0,04±0,00 ^{aB} | 0,08±0,02 ^{aA} | 0,04±0,01 ^{bB} |
| | Hipoksi | 0,04±0,00 ^{aAB} | 0,05±0,01 ^{aA} | 0,05±0,00 ^{aAB} | 0,04±0,00 ^{aAB} | 0,03±0,00 ^{bB} | 0,04±0,00 ^{bAB} |
| | Hiperoksi | 0,06±0,01 ^{aA} | 0,04±0,00 ^{aA} | 0,05±0,00 ^{aA} | 0,04±0,01 ^{aA} | 0,05±0,00 ^{abA} | 0,05±0,00 ^{aA} |
| Solungaç | Normoksi | 0,05±0,00 ^{aA} | 0,04±0,00 ^{aAB} | 0,04±0,01 ^{bAB} | 0,04±0,00 ^{aAB} | 0,04±0,01 ^{aAB} | 0,03±0,01 ^{aB} |
| | Hipoksi | 0,04±0,01 ^{aA} | 0,04±0,01 ^{aA} | 0,05±0,00 ^{bA} | 0,04±0,00 ^{aA} | 0,05±0,00 ^{aA} | 0,03±0,00 ^{aA} |
| | Hiperoksi | 0,04±0,00 ^{aB} | 0,04±0,00 ^{aB} | 0,08±0,00 ^{aA} | 0,04±0,00 ^{aB} | 0,05±0,01 ^{aB} | 0,03±0,00 ^{aB} |

4.4. Hidrojen Peroksit Seviyelerine İlişkin Bulgular

4.4.1. Karaciğer dokusunda hidrojen peroksit seviyelerine ilişkin bulgular

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki karaciğer dokusunda hidrojen peroksit Seviyeleri birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi uygulaması ($0,11 \pm 0,01^{bc}$ pmol/ μ L) ile kontrole ($0,33 \pm 0,01^{ac}$ pmol/ μ L) göre önemli derecede azalış göstermiştir. hiperoksi uygulamasının ($0,30 \pm 0,05^{ab}$ pmol/ μ L) kontrolden anlamlı bir farklılığı olmamıştır. 12. saatte hipoksi uygulaması ($0,46 \pm 0,00^{aAB}$ pmol/ μ L) ile hidrojen peroksit miktarı kontrole ($0,19 \pm 0,01^{bD}$ pmol/ μ L) göre önemli derecede artmıştır. Hiperoksi uygulaması ($0,31 \pm 0,09^{abB}$ pmol/ μ L) ile hidrojen peroksit seviyesi hem kontrole hem de hiperoksi uygulamasına kıyasla değişmemiştir. 24., 48., 72. saatler ve 28. gündeki kontrol, hipoksi ve hiperoksi uygulamaları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır.

Tüm zamanlarda hipoksi uygulamasının etkisi incelendiğinde en yüksek seviyenin 28. günde, en düşük seviyenin ise 6 saatte olduğu belirlenmiştir. Hiperoksi uygulamasında en yüksek seviye 48. saatte en düşük seviyenin ise 24. saatte olduğu görülmüştür. diğer zamanlarda birbirleri ile aralarındaki farkın istatistiki olarak önemsiz olduğu görülmüştür (Şekil 4.19; Çizelge 4.6).



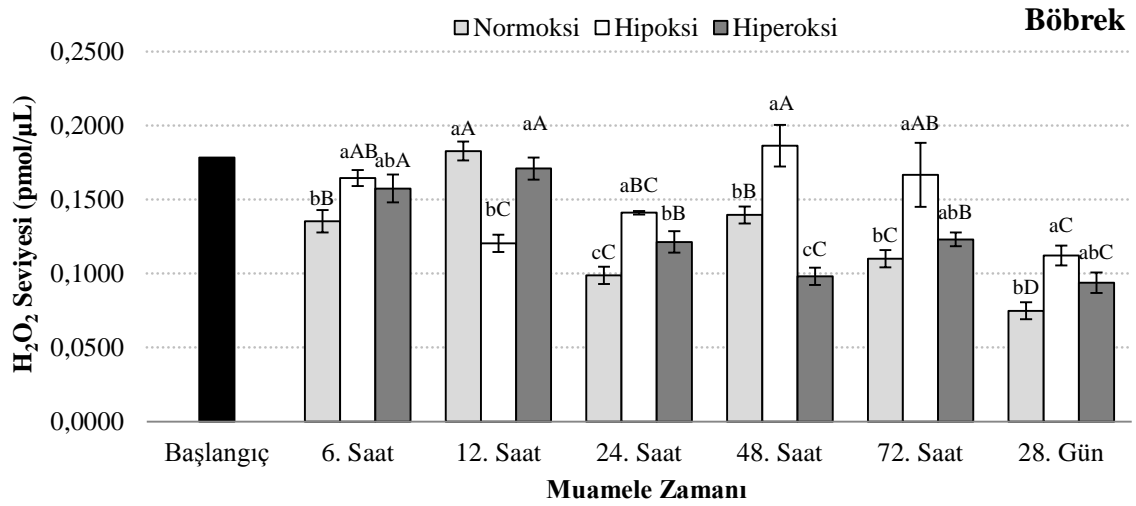
Şekil 4.19. Karaciğer dokusuna ilişkin hidrojen peroksit seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.4.2. Böbrek dokusunda hidrojen peroksit seviyelerine ilişkin bulgular

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki karaciğer dokusunda hidrojen peroksit seviyeleri birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi muamelesi ($0,16 \pm 0,01^{aAB}$ pmol/μL) ile hidrojen peroksit seviyesi kontrole ($0,14 \pm 0,01^{bB}$ pmol/μL) göre önemli derecede artmıştır. Hiperoksi muamelesi ($0,16 \pm 0,01^{abA}$ pmol/μL) ile seviye kontrole göre artmış ancak hem kontrole hem de hipoksi muamelesine göre önemli olmadığı bulunmuştur. 12. saatte hipoksi ($0,12 \pm 0,01^{bC}$ pmol/μL) ile hidrojen peroksit seviyesi hem kontrol ($0,18 \pm 0,01^{aA}$ pmol/μL) hem de hiperoksiye ($0,17 \pm 0,01^{aA}$ pmol/μL) göre önemli derecede azalmıştır ancak hiperoksi ile kontrol arasındaki seviye farkı istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. 24. saatte hiperoksi kontrole ($0,10 \pm 0,01^{cC}$ pmol/μL) göre önemli derecede artmış iken hipoksi muamelesi ($0,14 \pm 0,00^{aBC}$) ile seviye hiperoksi muamelesine ($0,12 \pm 0,01^{bB}$ pmol/μL) göre önemli derecede artmıştır. 48. saatte hipoksi ($0,19 \pm 0,01^{aA}$ pmol/μL) ile hidrojen peroksit seviyesi kontrole ($0,14 \pm 0,01^{bB}$ pmol/μL) göre önemli derecede artarken hiperoksi ($0,10 \pm 0,01^{cC}$ pmol/μL) ile önemli derecede azalmıştır. 72. saatte hipoksi ($0,17 \pm 0,02^{aAB}$

pmol/ μ L) ile hidrojen peroksit seviyesi kontrole ($0,11\pm 0,01^{bC}$ pmol/ μ L) kıyasla önemli derecede artmış iken hiperoksi muamelesi ($0,12\pm 0,00^{abB}$ pmol/ μ L) ile aralarındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. 28. günde hipoksi ($0,11\pm 0,01^{aC}$ pmol/ μ L) ile hidrojen peroksit seviyesi kontrole ($0,07\pm 0,01^{bD}$ pmol/ μ L) kıyasla önemli derecede artmış iken hiperoksi muamelesi ($0,09\pm 0,01^{abC}$ pmol/ μ L) ile seviye farkı hem hipoksi hem de hipoksi muamelesi ile farkı anlamsız bulunmuştur.

Tüm zamanlar dikkate alındığında hipoksi muamelesinde en yüksek hidrojen peroksit seviyesi 48. saatte olup 12., 24. saatler ve 28. güne kıyasla önemli derecede fazla bulunmuştur. En düşük seviye 12. saat ve 28. günde bulunmuştur ve 6., 48. ve 72. saatler kıyasla farkı önemlidir. Hiperoksi muamelesinde en yüksek hidrojen peroksit seviyesi 6. ve 12. saatlerde olup aralarındaki fark önemsiz iken diğer zamanlara kıyasla önemli bir artış gözlenmiştir. En düşük seviye 48. saat ve 28. günde meydana gelmiş olup aralarındaki fark anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.20; Çizelge 4.6).

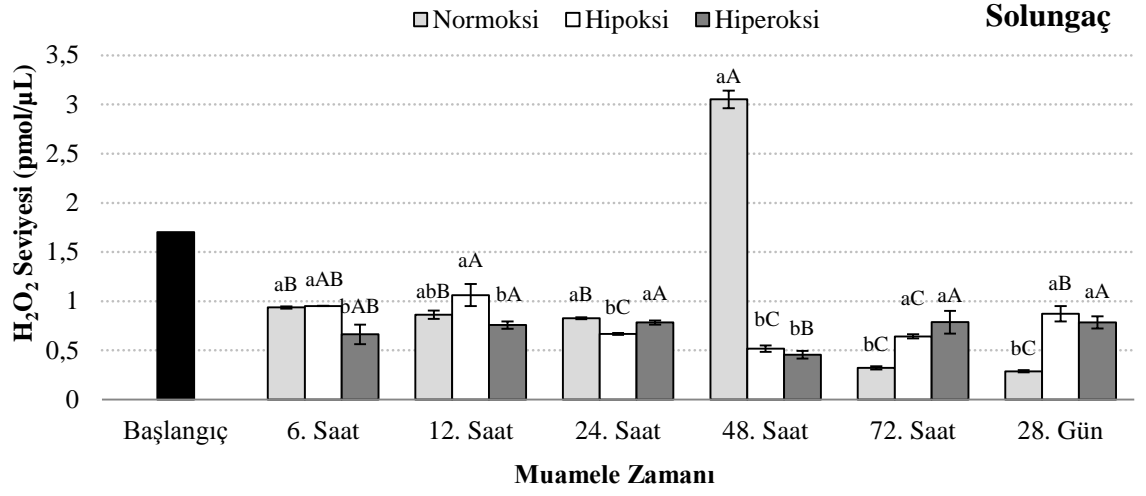


Şekil 4.20. Böbrek dokusuna ilişkin hidrojen peroksit seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.4.3. Solungaç dokusunda hidrojen peroksit seviyelerine ilişkin bulgular

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki karaciğer dokusunda hidrojen peroksit seviyeleri birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi uygulaması ($0,95 \pm 0,00^{aAB}$ pmol/ μ L) ile hidrojen peroksit seviyesi kontrole ($0,94 \pm 0,01^{aB}$ pmol/ μ L) kıyasla değişmemiştir. Ancak hiperoksi muamelesi ($0,66 \pm 0,10^{bAB}$ pmol/ μ L) dikkate alındığında diğer gruplara kıyasla önemli derecede azalış gösterdiği bulunmuştur. 12. saatte hem hipoksi ($1,06 \pm 0,11^{aA}$ pmol/ μ L) hem de hiperoksi ($0,76 \pm 0,04^{bA}$ pmol/ μ L) muamelelerindeki hidrojen peroksit seviye farkları kontrole ($0,86 \pm 0,04^{abB}$ pmol/ μ L) kıyasla önemli olmadığı ancak aralarındaki farkın ise önemli derecede olduğu bulunmuş olup hipoksi muamelesi hiperoksi muamelesine kıyasla artmıştır. 24. saate hiperoksi muamelesi ($0,78 \pm 0,02^{aA}$ pmol/ μ L) ile kontrol ($0,83 \pm 0,01^{aB}$ pmol/ μ L) arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. Hipoksi muamelesi ($0,68 \pm 0,01^{bC}$ pmol/ μ L) ile hidrojen peroksit seviyesi bunlara kıyasla önemli derecede azalmıştır. 48. saatte hem hipoksi ($0,52 \pm 0,03^{bC}$ pmol/ μ L) hem de hiperoksi muamelesi ($0,45 \pm 0,04^{bB}$ pmol/ μ L) kontrole ($3,05 \pm 0,09^{aA}$ pmol/ μ L) kıyasla önemli derecede azalmış iken aralarındaki seviye farkı anlamlı bulunmamıştır. 72. saatte hem hipoksi ($0,64 \pm 0,02^{aC}$ pmol/ μ L) hem de hiperoksi ($0,79 \pm 0,11^{aA}$ pmol/ μ L) muamelesi kontrole ($0,32 \pm 0,02^{bC}$ pmol/ μ L) kıyasla önemli derecede artmış iken aralarındaki seviye farkı anlamlı bulunmamıştır. 28. günde de hem hipoksi ($0,87 \pm 0,08^{aB}$ pmol/ μ L) hem de hiperoksi ($0,78 \pm 0,06^{aA}$ pmol/ μ L) muamelesi kontrole ($0,29 \pm 0,01^{bC}$ pmol/ μ L) kıyasla önemli derecede artmış iken aralarındaki seviye farkı anlamlı bulunmamıştır.

Tüm zamanlar dikkate alındığında hipoksi muamelesinde en yüksek hidrojen peroksit seviyesi 12. saatte bulunmuştur. En düşük seviye ise 24. 48. ve 72. saatlerde olup kendi aralarındaki fark istatistiki açıdan önemsiz olduğu bulunmuştur. Hiperoksi uygulamasında en düşük seviye 48. saattedir. Diğer zamanlara kıyasla önemli bir azalış sergilemiştir (Şekil 4.21; Çizelge 4.6).



Şekil 4.21. Böbrek dokusuna ilişkin hidrojen peroksit seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

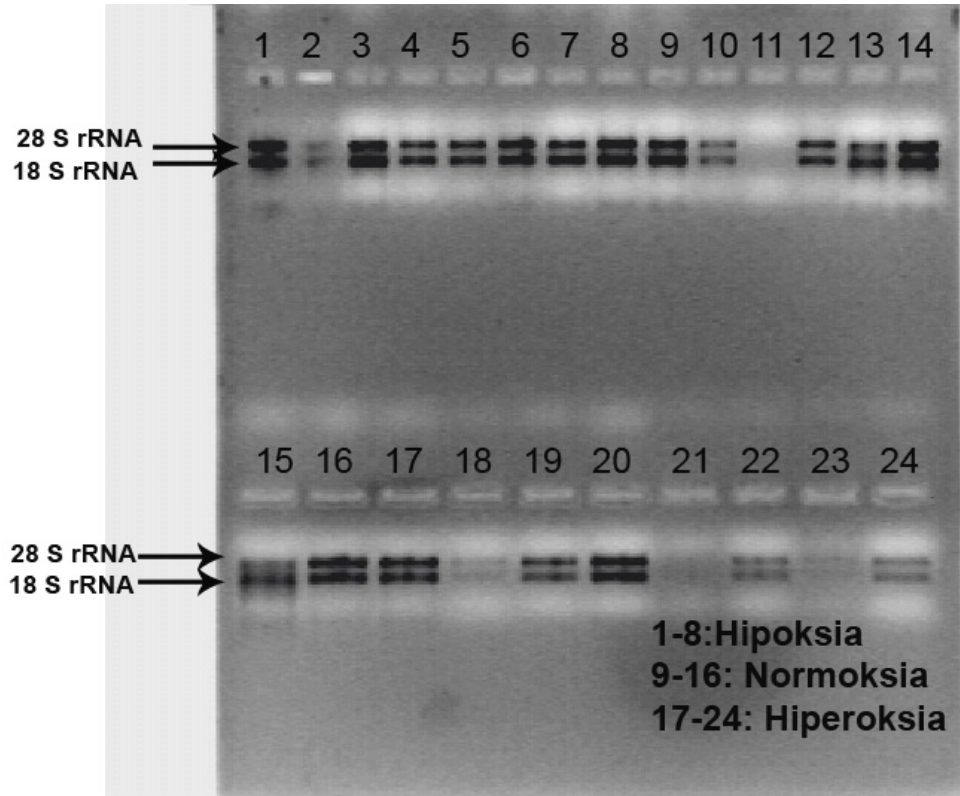
Çizelge 4.6. Tüm dokularda Hidrojen Peroksit seviyelerine ilişkin değerler (pmol/mL)

| Doku | Muamele | Akut etki | | | | | Kronik etki |
|-----------|-----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | | Saatler | | | | | Gün |
| | | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 | 28 |
| Karaciğer | Normoksi | 0,33±0,01 ^{aC} | 0,19±0,01 ^{bD} | 0,20±0,01 ^{abD} | 0,30±0,01 ^{aC} | 0,44±0,01 ^{aB} | 0,68±0,01 ^{aA} |
| | Hipoksi | 0,11±0,01 ^{bC} | 0,46±0,00 ^{aAB} | 0,28±0,03 ^{aBC} | 0,41±0,13 ^{aABC} | 0,41±0,15 ^{aABC} | 0,61±0,12 ^{aA} |
| | Hiperoksi | 0,30±0,05 ^{aB} | 0,31±0,09 ^{abB} | 0,14±0,02 ^{bB} | 0,92±0,28 ^{aA} | 0,41±0,15 ^{aB} | 0,60±0,15 ^{aAB} |
| Böbrek | Normoksi | 0,14±0,01 ^{bB} | 0,18±0,01 ^{aA} | 0,10±0,01 ^{cC} | 0,14±0,01 ^{bB} | 0,11±0,01 ^{bC} | 0,07±0,01 ^{bD} |
| | Hipoksi | 0,16±0,01 ^{aAB} | 0,12±0,01 ^{bC} | 0,14±0,00 ^{aBC} | 0,19±0,01 ^{aA} | 0,17±0,02 ^{aAB} | 0,11±0,01 ^{aC} |
| | Hiperoksi | 0,16±0,01 ^{abA} | 0,17±0,01 ^{aA} | 0,12±0,01 ^{bB} | 0,10±0,01 ^{cC} | 0,12±0,00 ^{abB} | 0,09±0,01 ^{abC} |
| Solungaç | Normoksi | 0,94±0,01 ^{aB} | 0,86±0,04 ^{abB} | 0,83±0,01 ^{aB} | 3,05±0,09 ^{aA} | 0,32±0,02 ^{bC} | 0,29±0,01 ^{bC} |
| | Hipoksi | 0,95±0,00 ^{aAB} | 1,06±0,11 ^{aA} | 0,68±0,01 ^{bC} | 0,52±0,03 ^{bC} | 0,64±0,02 ^{aC} | 0,87±0,08 ^{aB} |
| | Hiperoksi | 0,66±0,10 ^{bAB} | 0,76±0,04 ^{bA} | 0,78±0,02 ^{aA} | 0,45±0,04 ^{bB} | 0,79±0,11 ^{aA} | 0,78±0,06 ^{aA} |

4.5. Moleküler Çalışmalara İlişkin Bulgular

4.5.1. RNA'nın kalitatif tayini bulgusu

Çalışmada RNA izolasyon robotunda izole edilen RNA'ların jel elektroforezi ile yürütülmesi sonucu jelin UV görüntüleyicisi altında çekilmiş görüntüsü Şekil 2.34 'da gösterildi. Şekilde uygulama grupları arasındaki tekerrürler de gösterildi. Bu doğrultuda 1-8 arası örnekler hipoksia, 9-16 arası 8 örnek normoksia ve 17-24 arası 8 örnek hiperoksia örneklerine ilişkindir.



Şekil 4.22. Total RNA ların jel elektroforezinde yürütülmesi sonucu elde edilen jel görüntüsü

4.5.2. RNA ve elde edilen cDNA'nın kantitatif tayini bulgusu

Her gruptaki balıklardan alınan dokulardan izole edilen Total RNA ve bu RNA örnekleri kullanılarak elde edilen cDNA örneklerinin μ drop spektrofotometrede ng/ μ l cinsinden konsantrasyonları ve $\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$ saflık oranları Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. RNA ve cDNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri (ng/µl)

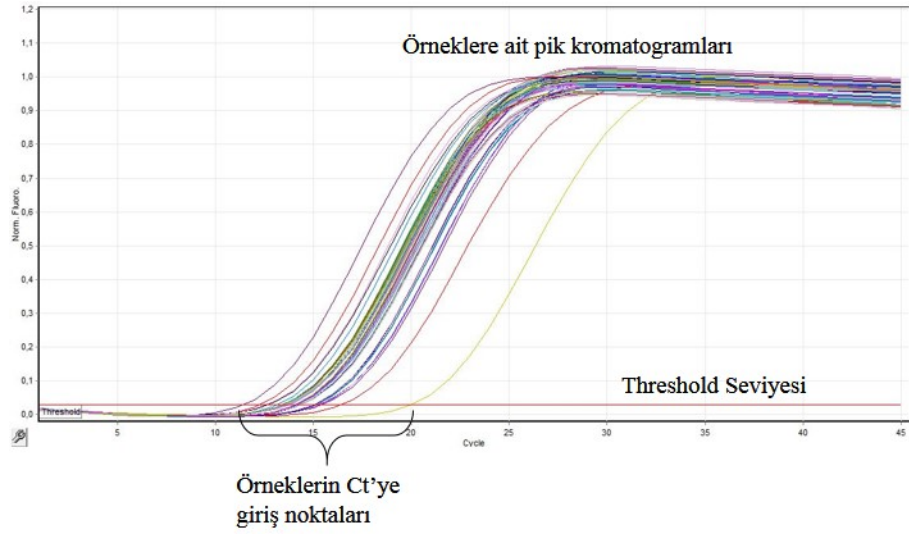
| Gruplar | Zaman | Tekerrür | Total RNA | | cDNA | | |
|----------|-----------|----------|---------------|---------|---------------|---------|------|
| | | | Konsantrasyon | Saflık | Konsantrasyon | Saflık | |
| Hipoksia | 6. saat | 1 | 1892,38 | 2,16 | 1174,42 | 1,84 | |
| | | 2 | 1102,85 | 2,14 | 1223,17 | 1,85 | |
| | | 3 | 1960,46 | 2,15 | 1108,26 | 1,84 | |
| | 12. saat | 1 | 1723,84 | 2,18 | 1167,50 | 1,84 | |
| | | 2 | 1765,92 | 2,17 | 1080,38 | 1,84 | |
| | | 3 | 1854,62 | 2,14 | 1125,65 | 1,85 | |
| | 24. saat | 1 | 1802,65 | 2,09 | 1158,47 | 1,83 | |
| | | 2 | 1756,42 | 2,13 | 1096,21 | 1,84 | |
| | | 3 | 2093,92 | 2,12 | 1067,11 | 1,85 | |
| | 48. saat | 1 | 1406,76 | 2,20 | 945,19 | 1,85 | |
| | | 2 | 528,91 | 2,10 | 916,34 | 1,82 | |
| | | 3 | 1518,53 | 2,18 | 1160,67 | 1,83 | |
| | 72. saat | 1 | 1776,53 | 2,15 | 1224,61 | 1,83 | |
| | | 2 | 2049,63 | 2,12 | 1187,34 | 1,83 | |
| | | 3 | 1587,61 | 2,08 | 1271,37 | 1,85 | |
| | 28. gün | 1 | 1996,35 | 2,06 | 982,76 | 1,84 | |
| | | 2 | 1178,00 | 2,17 | 1145,67 | 1,83 | |
| | | 3 | 964,46 | 2,09 | 1107,59 | 1,85 | |
| | Normoksia | 6. saat | 1 | 1761,25 | 1,93 | 1047,21 | 1,83 |
| | | | 2 | 2108,30 | 2,14 | 1167,33 | 1,87 |
| | | | 3 | 647,88 | 2,18 | 1249,99 | 1,83 |
| | | 12. saat | 1 | 1259,67 | 2,04 | 1186,74 | 1,84 |
| | | | 2 | 655,27 | 2,16 | 1042,21 | 1,82 |
| | | | 3 | 1579,38 | 2,18 | 926,53 | 1,83 |
| | | 24. saat | 1 | 2319,15 | 2,06 | 1118,36 | 1,80 |
| | | | 2 | 1720,46 | 2,17 | 1148,04 | 1,83 |
| | | | 3 | 686,15 | 2,17 | 1099,24 | 1,86 |
| 48. saat | | 1 | 2488,46 | 1,97 | 1154,87 | 1,88 | |
| | | 2 | 1984,69 | 2,15 | 1037,55 | 1,83 | |
| | | 3 | 2167,76 | 2,11 | 1153,35 | 1,82 | |
| 72. saat | | 1 | 1933,15 | 2,15 | 1004,98 | 1,87 | |
| | | 2 | 1690,38 | 2,17 | 1145,48 | 1,84 | |
| | | 3 | 1738,61 | 2,17 | 1225,13 | 1,83 | |
| 28. gün | | 1 | 1240,38 | 2,19 | 1198,56 | 1,83 | |
| | | 2 | 933,76 | 2,20 | 1127,44 | 1,75 | |
| | | 3 | 1320,61 | 2,18 | 1180,83 | 1,85 | |

Çizelge 4.7. (devamı) RNA ve cDNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri (ng/µl)

| | | | | | | |
|------------|----------|---|----------|------|---------|------|
| Hiperoksia | 6. saat | 1 | 775,92 | 2,18 | 1098,64 | 1,83 |
| | | 2 | 1132,92 | 2,19 | 1185,43 | 1,85 |
| | | 3 | 1174,92 | 2,17 | 1197,75 | 1,81 |
| | 12. saat | 1 | 1120,02 | 2,09 | 1166,11 | 1,89 |
| | | 2 | 11647,65 | 2,06 | 1208,84 | 1,83 |
| | | 3 | 1842,37 | 2,14 | 1165,37 | 1,86 |
| | 24. saat | 1 | 1910,08 | 2,19 | 1109,72 | 1,87 |
| | | 2 | 1782,36 | 2,18 | 1177,57 | 1,83 |
| | | 3 | 1855,07 | 2,01 | 1121,54 | 1,87 |
| | 48. saat | 1 | 983,20 | 1,96 | 1147,59 | 1,83 |
| | | 2 | 1678,88 | 2,14 | 1180,89 | 1,88 |
| | | 3 | 2147,03 | 2,03 | 1195,14 | 1,82 |
| | 72. saat | 1 | 1635,54 | 2,08 | 1038,44 | 1,86 |
| | | 2 | 1893,91 | 2,11 | 1199,13 | 1,87 |
| | | 3 | 1865,36 | 2,13 | 1047,41 | 1,89 |
| | 28. gün | 1 | 1759,22 | 2,15 | 1167,14 | 1,84 |
| | | 2 | 1839,41 | 2,00 | 1118,94 | 1,86 |
| | | 3 | 1753,30 | 2,16 | 1196,38 | 1,89 |

4.6. Real-Time PCR Uygulamalarına İlişkin Bulgular

Gen ekspresyonunun kantitatif tayininde TaqMan Prob yöntemi kullanılmıştır. Örneklerin gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi deneyi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.8’de tez çalışmasına ait örnek bir ekspresyon profili görülmektedir.



Şekil 4.23. Real Time PCR’da elde edilen örnek bir pik kromatogramı

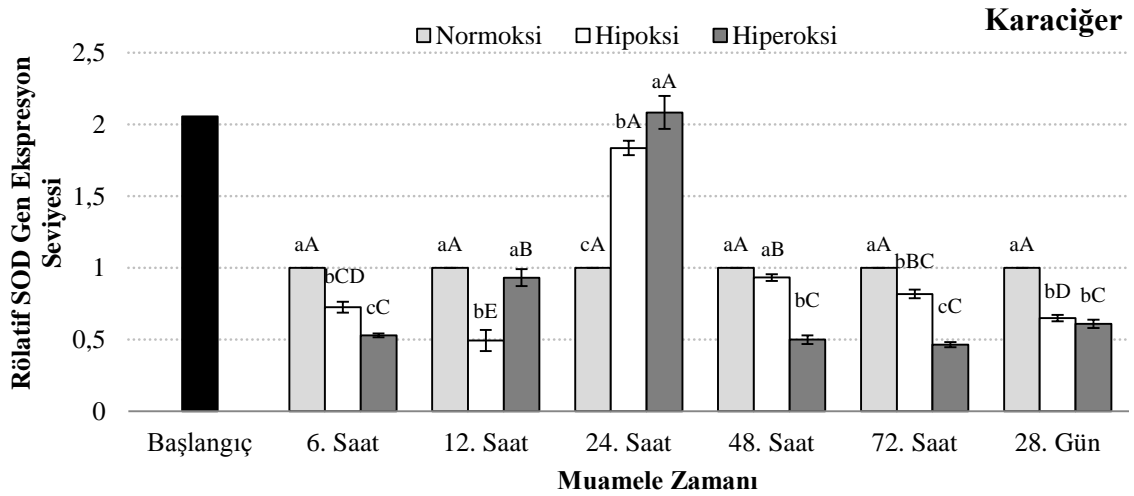
4.6.1. Karaciğer dokusuna ilişkin gen ekspresyon bulguları

4.6.1.1. Karaciğer dokusunda Süperoksit Dismütaz genine ilişkin ekspresyon bulguları

Karaciğer dokusunda SOD geninin kontrol, hipoksi ve hiperoksi muameleleri ile ekspresyonlarındaki değişimler birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi ($0,73 \pm 0,04^{bCD}$) ve hiperoksi ($0,53 \pm 0,01^{cC}$) muamelesi ile SOD ekspresyonu kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre önemli derecede azalış göstermiştir. Hiperoksi de hipoksi uygulamasına kıyasla gen ifadesinin önemli derecede azaldığı bulunmuştur. 12. saatte hipoksi ($0,49 \pm 0,07^{bE}$) ile kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre gen ifadesinde önemli derecede azalış görülmüş iken hiperoksi uygulaması ($0,93 \pm 0,06^{aB}$) ile kontrole göre gen ifadesindeki değişim önemsiz görülmüştür. 24. saatte en yüksek ekspresyon hiperoksi muamelesinde ($2,08 \pm 0,12^{aA}$) görülmüş ve diğer muamelelere göre önemli derecede artmış bulunmuştur. Hipoksi uygulaması ($1,84 \pm 0,05^{bA}$) ile ekspresyon hiperoksiden önemli derecede az iken kontrolden ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) önemli derecede fazla bulunmuştur. 48. saatte hipoksi ekspresyon seviyesi ($0,93 \pm 0,02^{aB}$) kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre önemli değişim göstermez iken hiperoksi muamelesi ile ekspresyon önemli derecede azalmıştır

($0,50 \pm 0,03^{bC}$). 72. saatte hipoksi uygulaması ile ekspresyon ($0,82 \pm 0,03^{bBC}$) kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre önemli derece azalmış iken hiperoksi ekspresyonu ($0,46 \pm 0,02^{cC}$) çok daha fazla azaltmıştır. 28. günde hipoksi ($0,65 \pm 0,02^{bD}$) ve hiperoksi ($0,61 \pm 0,03^{bC}$) uygulamaları farkı arasında istatistiksel olarak önemsiz bulunmuş iken her ikisi de kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre önemli derecede azaldığı bulunmuştur.

Tüm zamanlar dikkate alındığında hipoksinin etkilediği en yüksek ekspresyon 24. saatte gözlenmiş iken en düşük ekspresyonun 6. saat ve 28. günde diğer zamanlara göre önemli derecede olduğu bulunmuştur. hiperoksi ile en yüksek gen ifadesi yine 24. saatte gözlenmiş iken en düşük gen ifadesi ise 6., 48., 72. saatlerde ve 28. günde kendi aralarında istatistiksel olarak anlamsız olacak şekilde diğer zamanlardan anlamlı olarak farklı bulunmuştur (Şekil 4.24; Çizelge 4.8).

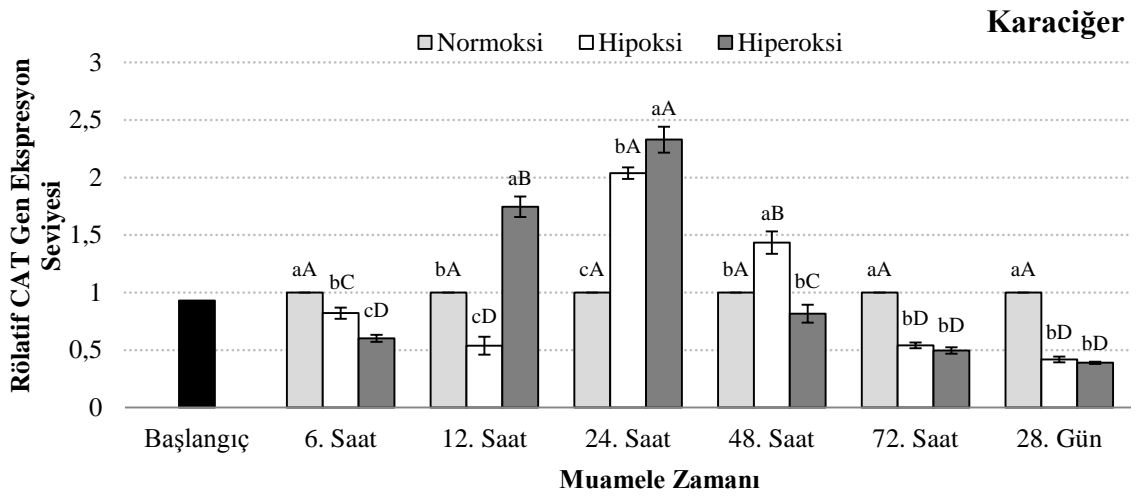


Şekil 4.24. Karaciğer dokusuna ilişkin SOD geni rölatif ekspresyon seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.6.1.2. Karaciğer dokusunda Katalaz genine ilişkin ekspresyon bulguları

Karaciğer dokusunda CAT geninin kontrol, hipoksi ve hiperoksi muameleleri ile ekspresyonlarındaki değişimler birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi ($1,49 \pm 0,12^{aAB}$) ve hiperoksi ($0,88 \pm 0,05^{bB}$) muamelesi ile CAT ekspresyonu kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre önemli derecede azalış göstermiştir. Hiperoksi de hipoksi uygulamasına kıyasla gen ifadesinin önemli derecede azaldığı bulunmuştur. 12. saatte hipoksi uygulaması ile ekspresyon seviyesi ($0,77 \pm 0,06^{bC}$) kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre azalmış ise de hiperoksi uygulaması ile önemli derecede artmıştır ($0,94 \pm 0,06^{aB}$). 24. saatte hem hipoksi ($1,57 \pm 0,05^{aA}$) hem de hiperoksi ($1,60 \pm 0,04^{aA}$) uygulaması ile gen ifadesi kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre önemli derecede artmış ise de hiperoksi uygulaması hipoksi uygulamasından önemli derecede daha fazla gen ifadesine neden olmuştur. 48. saatte hipoksi uygulaması ($1,43 \pm 0,11^{aAB}$) ile gen ifadesi kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre önemli derecede artmış ise de hiperoksi ($0,91 \pm 0,02^{bB}$) uygulamasının kontrol ile arasındaki farkı istatistiki açıdan önemsiz olarak bulunmuştur. 72. saatte hem hipoksi ($0,82 \pm 0,03^{bC}$) hem de hiperoksi ($0,70 \pm 0,02^{cC}$) uygulaması ile gen ifadesi kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre önemli derecede azalmıştır. Kendi aralarındaki fark ise önemli değildir. 24. günde hem hipoksi ($2,87 \pm 0,12^{aB}$) hem de hiperoksi ($1,79 \pm 0,05^{bB}$) uygulaması ile gen ifadesi kontrole ($1,00 \pm 0,00^{cA}$) göre önemli derecede azalmış iken kendi aralarındaki fark ise istatistiki açıdan önemli değildir.

Tüm zamanlar dikkate alındığında hipoksi uygulamasında en yüksek gen ifadesinin 24. saatte en düşük ifadenin ise 12., 72. saatler ve 28. günde meydana geldiği bulunmuştur. Hiperoksi uygulamasında ise en yüksek ifadenin 24. saatte en düşük ifadenin ise 6., 72. saatler ve 28. günde meydana geldiği bulunmuştur (Şekil 4.25; Çizelge 4.8).



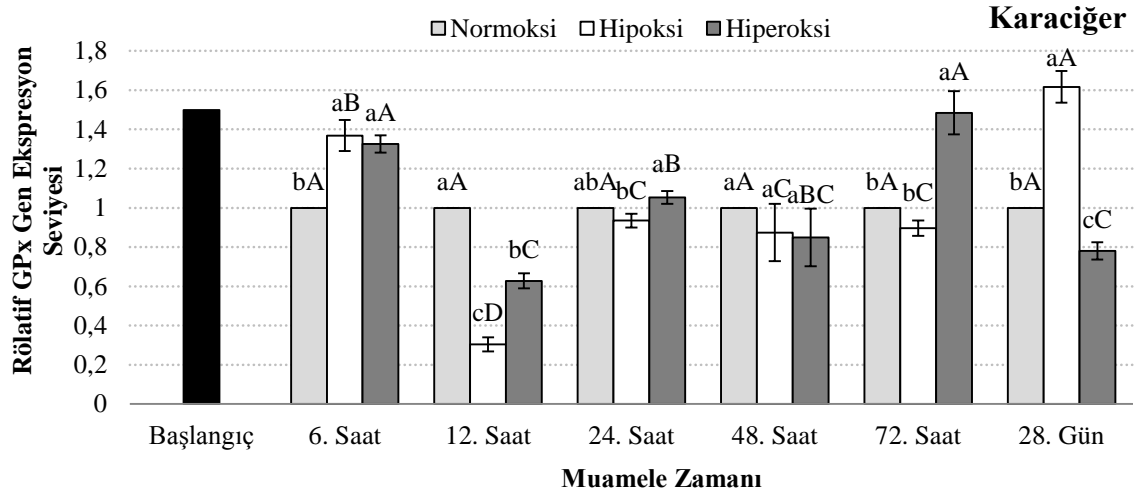
Şekil 4.25. Karaciğer dokusuna ilişkin CAT geni rölatif ekspresyon seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.6.1.3. Karaciğer dokusunda Glutasyon Peroksidaz genine ilişkin ekspresyon bulguları

Karaciğer dokusunda GPx geninin kontrol, hipoksi ve hiperoksi muameleleri ile ekspresyonlarındaki değişimler birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hem hipoksi ($1,37 \pm 0,08^{aB}$) hem de hiperoksi ($1,33 \pm 0,04^{aA}$) uygulaması ile gen ifadesi kontrolden $1,00 \pm 0,00^{bA}$ önemli derecede artmıştır. Aralarındaki gen ifadesi farkı ise istatistiksel olarak anlamsızdır. 12. saatte hipoksi ($0,30 \pm 0,04^{cD}$) hem kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) hem de hiperoksi ($0,63 \pm 0,04^{bC}$) uygulamasına kıyasla önemli derecede düşük gen ifadesine sahiptir. Hiperoksi uygulaması ile gen ifadesi kontrole göre azalmış ancak hipoksi uygulamasına göre önemli derecede artmıştır. 24. saatte hipoksi ($0,93 \pm 0,03^{bC}$) ve hiperoksi ($1,05 \pm 0,03^{aB}$) uygulamaları ile gen ifadesi kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre değişmemiştir. 48. saatte muameleler arasında herhangi bir önemli farklılık gözlenmemiştir. 72. saatte hipoksi ($0,90 \pm 0,04^{bC}$) uygulaması ile değişen gen ifadesi kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre anlamsız bulunmuştur. Hiperoksi ($1,48 \pm 0,11^{aA}$) uygulaması ile gen ifadesi hem kontrole hemde hipoksiye göre önemli derecede

artmıştır. 28. günde hipoksi uygulaması ($1,62 \pm 0,08^{aA}$) ile gen ifadesi kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre önemli derecede artarken hiperoksi uygulamasında ($0,78 \pm 0,04^{cC}$) kontrole göre önemli derecede azalma meydana gelmiştir.

Tüm zamanlar dikkate alındığında hipoksi uygulamasında en yüksek gen ifadesi 28. günde bulunmuştur. En düşük gen ifadesi ise 12. saatte karşımıza çıkmıştır. Hiperoksi uygulamasında en yüksek gen ifadesi 6. ve 72. saatlerde en düşük gen ifadesi ise 12. saatte meydana gelmiştir (Şekil 4.26; Çizelge 4.8).



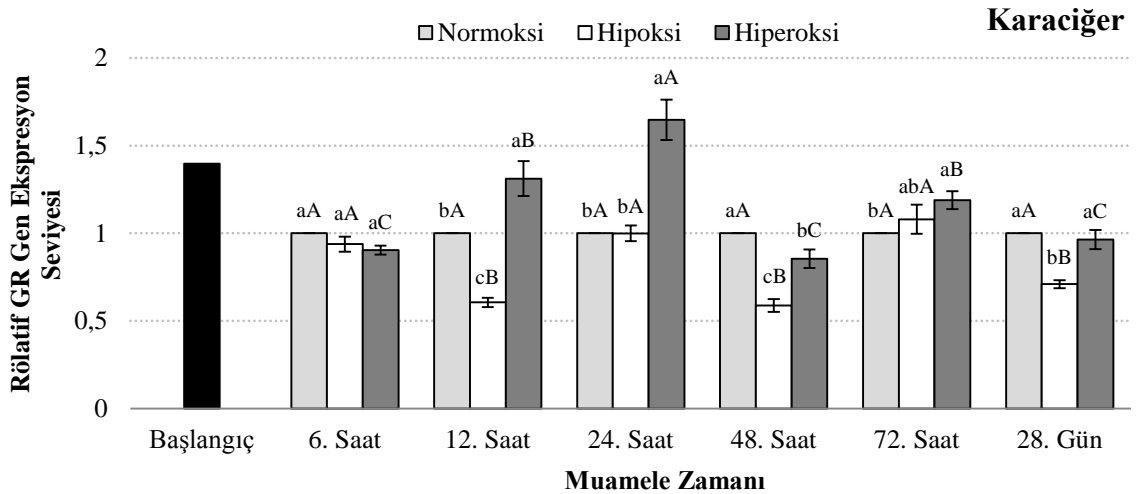
Şekil 4.26. Karaciğer dokusuna ilişkin GPx geni rölatif ekspresyon seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.6.1.4. Karaciğer dokusunda Glutasyon Redüktaz genine ilişkin ekspresyon bulguları

Karaciğer dokusunda GR geninin kontrol, hipoksi ve hiperoksi muameleleri ile ekspresyonlarındaki değişimler birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte uygulamalar arasında herhangi önemli bir fark gözlenmemiştir. 12. saatte hipoksi uygulaması ($0,61 \pm 0,03^{cB}$) ile gen ifadesi kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre önemli derecede

azalmışken hiperoksi ($1,31 \pm 0,10^{aB}$) uygulamasında kontrole göre önemli derecede artış bulunmuştur. 24. saatte hipoksi ($1,00 \pm 0,05^{bA}$) ile kontrol ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) arasında önemli bir fark gözlenmemiştir. Hiperoksi uygulaması ($1,65 \pm 0,11^{aA}$) ile bunlara göre önemli bir artış meydana gelmiştir. 48. saatte hem hipoksi ($0,59 \pm 0,04^{cB}$) hemde hiperoksi ($0,85 \pm 0,05^{bC}$) uygulamaları kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre önemli derecede azalma göstermiştir. En düşük gen ifadesi hipoksi uygulaması ile meydana gelmiştir. 72 saatte hipoksi ($1,08 \pm 0,08^{abA}$) kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre önemli bir fark göstermez iken hiperoksi ($1,19 \pm 0,05^{aB}$) kontrole göre önemli derecede artmıştır. 28. günde hiperoksi ($0,96 \pm 0,06^{aC}$) kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre değişmez iken hipoksi ($0,71 \pm 0,02^{bB}$) bunlardan önemli derecede azalmıştır.

Tüm zamanlar dikkate alındığında en yüksek gen ifadesi 6., 24.ve 72. saatlerde gözlenmişken aralarındaki fark gözlenmiştir. En düşük gen ifadesi 12. 48. saatlerde ve 28. günde meydana gelmiştir. Hiperoksi uygulamasında ise en yüksek gen ifadesi 24. saatte iken en düşük gen ifadesi 6. 48. saatlerde ve 28 gündedir (Şekil 4.27; Çizelge 4.8).

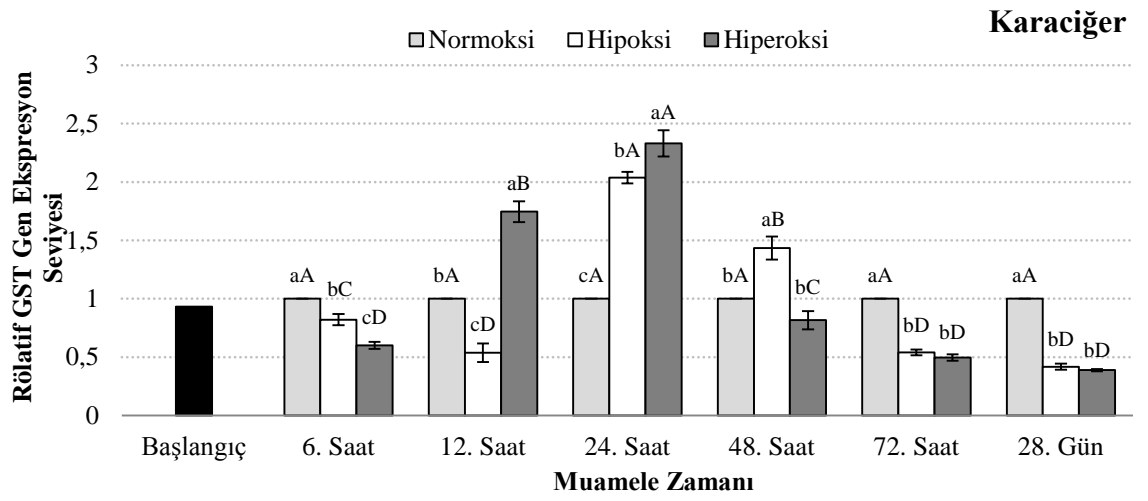


Şekil 4.27. Karaciğer dokusuna ilişkin GR geni rölatif ekspresyon seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.6.1.5. Karaciğer dokusunda Glutatyon-S-Transferaz genine ilişkin ekspresyon bulguları

Karaciğer dokusunda GST geninin kontrol, hipoksi ve hiperoksi muameleleri ile ekspresyonlarındaki değişimler birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi ($0,82 \pm 0,05^{bC}$) ve hiperoksi ($0,60 \pm 0,03^{cD}$) uygulamaları kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre önemli derecede azalmıştır. En düşük gen ifadesi ise hiperoksi () uygulamalarından önemli derecede olduğu bulunmuştur. 12. saatte hipoksi uygulaması ($0,54 \pm 0,08^{cD}$) ile gen ifadesi önemli derecede azalmışken hiperoksi uygulaması ($1,75 \pm 0,09^{aB}$) ise önemli derecede artmıştır. 24. saatte hem hipoksi ($2,04 \pm 0,05^{bA}$) hemde hiperoksi ($2,33 \pm 0,11^{aA}$) kontrole ($1,00 \pm 0,00^{cA}$) göre önemli derecede artmıştır. En yüksek gen ifadesini hiperoksi uygulamasında olduğu bulunmuştur. 48. saatte hipoksi ($1,43 \pm 0,10^{aB}$) uygulaması ile gen ifadesi kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre artmış iken hiperoksi ($0,82 \pm 0,08^{bC}$) uygulaması kontrole göre istatistiki olarak önemsiz bir farka sahiptir. 72. saatte hem hipoksi ($0,54 \pm 0,03^{bD}$) hemde hiperoksi ($0,50 \pm 0,03^{bD}$) uygulamaları kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre azalmıştır. 28. günde de hem hipoksi ($0,42 \pm 0,03^{bD}$) hemde hiperoksi ($0,39 \pm 0,01^{bD}$) uygulamaları kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre azalmıştır.

Tüm zamanlar dikkate alındığında hipoksi uygulamasında en yüksek gen ifadesi 24. saatte en düşük gen ifadesi ise 12., 72 saatler ve 28 günde meydana gelmiştir. hiperoksi uygulamasında ise en yüksek gen ifadesi 24. saatte en düşük gen ifadesi ise 6. ve 72. saatler ve 28 günde meydana gelmiştir (Şekil 4.28; Çizelge 4.8).



Şekil 4.28. Karaciğer dokusuna ilişkin GST geni rölatif ekspresyon seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

Çizelge 4.8. Karaciğer dokusuna ilişkin SOD, CAT, GPx, GR ve GST genlerinin β -Aktin'e kıyasla uygulama zamanlarında rölatif ekspresyon değerleri

| Genler | Muamele | Akut etki | | | | | Kronik etki |
|------------|-----------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | | Saatler | | | | | Gün |
| | | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 | 28 |
| SOD | Normoksi | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{cA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{aA} |
| | Hipoksi | 0,73±0,04 ^{bCD} | 0,49±0,07 ^{bE} | 1,84±0,05 ^{bA} | 0,93±0,02 ^{aB} | 0,82±0,03 ^{bBC} | 0,65±0,02 ^{bD} |
| | Hiperoksi | 0,53±0,01 ^{cC} | 0,93±0,06 ^{aB} | 2,08±0,12 ^{aA} | 0,50±0,03 ^{bC} | 0,46±0,02 ^{cC} | 0,61±0,03 ^{bC} |
| CAT | Normoksi | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{cA} |
| | Hipoksi | 1,49±0,12 ^{aAB} | 0,77±0,06 ^{bC} | 1,57±0,05 ^{aA} | 1,43±0,11 ^{aAB} | 0,82±0,03 ^{bC} | 2,87±0,12 ^{aB} |
| | Hiperoksi | 0,88±0,05 ^{bB} | 0,94±0,06 ^{aB} | 1,60±0,04 ^{aA} | 0,91±0,02 ^{bB} | 0,70±0,02 ^{cC} | 1,79±0,05 ^{bB} |
| GPx | Normoksi | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{abA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{bA} |
| | Hipoksi | 1,37±0,08 ^{aB} | 0,30±0,04 ^{cD} | 0,93±0,03 ^{bC} | 0,87±0,15 ^{aC} | 0,90±0,04 ^{bC} | 1,62±0,08 ^{aA} |
| | Hiperoksi | 1,33±0,04 ^{aA} | 0,63±0,04 ^{bC} | 1,05±0,03 ^{aB} | 0,85±0,15 ^{aBC} | 1,48±0,11 ^{aA} | 0,78±0,04 ^{cC} |
| GR | Normoksi | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{aA} |
| | Hipoksi | 0,94±0,04 ^{aA} | 0,61±0,03 ^{cB} | 1,00±0,05 ^{bA} | 0,59±0,04 ^{cB} | 1,08±0,08 ^{abA} | 0,71±0,02 ^{bB} |
| | Hiperoksi | 0,90±0,03 ^{aC} | 1,31±0,10 ^{aB} | 1,65±0,11 ^{aA} | 0,85±0,05 ^{bC} | 1,19±0,05 ^{aB} | 0,96±0,06 ^{aC} |
| GST | Normoksi | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{cA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{aA} |
| | Hipoksi | 0,82±0,05 ^{bC} | 0,54±0,08 ^{cD} | 2,04±0,05 ^{bA} | 1,43±0,10 ^{aB} | 0,54±0,03 ^{bD} | 0,42±0,03 ^{bD} |
| | Hiperoksi | 0,60±0,03 ^{cD} | 1,75±0,09 ^{aB} | 2,33±0,11 ^{aA} | 0,82±0,08 ^{bC} | 0,50±0,03 ^{bD} | 0,39±0,01 ^{bD} |

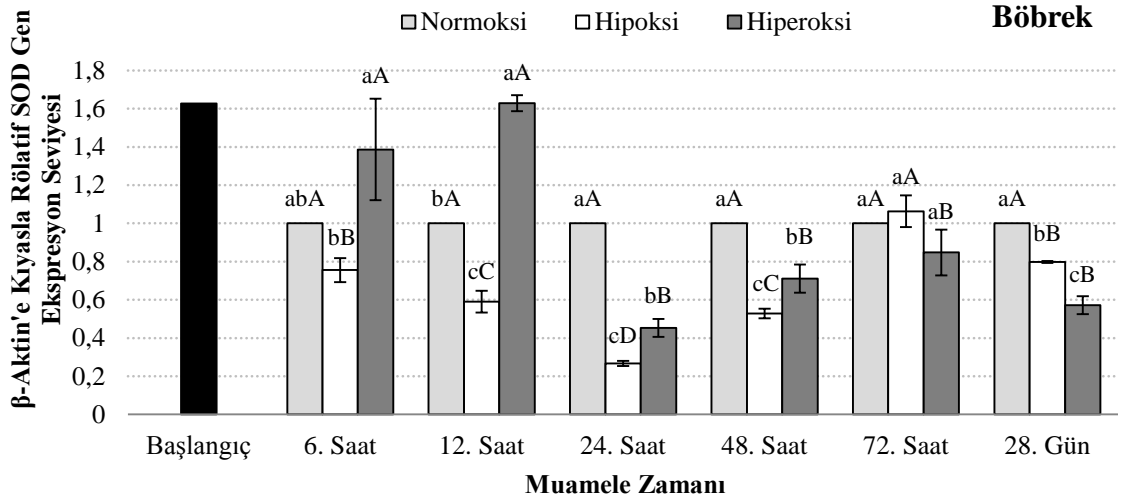
4.6.2 Böbrek dokusuna ilişkin gen ekspresyonu bulguları

4.6.2.1. Böbrek dokusunda Süperoksit Dismütaz genine ilişkin ekspresyon bulguları

SOD geni zamanlar arasındaki ve zamanlar içi ekspresyon değişimleri istatistikî açıdan göz önünde bulundurulduğunda ($p < 0,05$): 6. saatte hiperoksi uygulaması ($1,39 \pm 0,27^{aA}$) kontrole ($1,00 \pm 0,00^{abA}$) ve hipoksi ($0,76 \pm 0,06^{bB}$) uygulamasına göre yüksek bulunmasına rağmen kontrole göre farkı önemsiz, hipoksi uygulamasına göre önemli oranda değişim göstermiştir. Hipoksi uygulamasının ise kontrole göre değişimi önemsizdir. 12. saatte grup içerisindeki muameleler arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bu bağlamda hiperoksi uygulaması ($1,63 \pm 0,04^{aA}$) kontrolden ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) yüksek hipoksi uygulaması ($0,59 \pm 0,06^{cC}$) ise kontrole nazaran düşük bulunmuştur. 24. saatte muameleler arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bu bağlamda hiperoksi ($0,45 \pm 0,05^{bB}$) ve hipoksi ($0,27 \pm 0,01^{cD}$) uygulaması kontrolden ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) düşük olarak bulunmuştur. Hipoksi uygulaması ise hiperoksi uygulamasına göre düşük bulunmuştur. 48. saatte yine muameleler arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Hipoksi ($0,53 \pm 0,03^{cC}$) ve hiperoksi ($0,71 \pm 0,07^{bB}$) uygulamaları kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre düşük olarak bulunmuştur. Hipoksi uygulaması ise hiperoksiye göre daha düşük ekspresyon seviyesi göstermiştir. 72. saat göz önünde bulundurulduğunda ise kontrol ($1,00 \pm 0,00^{aA}$), hipoksi ($1,06 \pm 0,08^{aA}$) ve hiperoksi ($0,85 \pm 0,12^{abB}$) uygulamaları arasındaki ekspresyon değişimi farkları önemsizdir. 28. günde hipoksi ve hiperoksi kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre daha düşük bir ekspresyon grafiği göstermiştir. Kendi aralarında değerlendirildiğinde ise hipoksi $0,80 \pm 0,01^{bB}$ ekspresyon değerine sahip olup $0,57 \pm 0,05^{cB}$ olan hiperoksiden daha yüksek ekspresyona sahiptir ve bu fark önemli olarak bulunmuştur.

SOD enzimi hipoksi uygulamaları tüm zamanların tamamı göz önünde bulundurularak incelendiğinde ise en yüksek ekspresyon değeri 72. saatte görülmüştür. Bu fark önemlidir. 6. saat ve 28. günde ikinci büyük ekspresyon miktarına sahip olup kendi

aralarındaki fark önemsiz diğerleri ile farkı önemli olarak bulunmuştur. 12. ve 48. saatlerde ise üçüncü büyük ekspresyon miktarına sahip olup kendi aralarındaki fark önemsiz diğerleri ile farkı önemli olarak bulunmuştur. 24. saatte hipoksinin en düşük gen ekspresyonu gözlenmiştir. Hiperoksi uygulaması dikkate alındığında 6. ve 12. saatlerde diğer tüm zamanlara göre yüksek ekspresyon göstermesi ile birlikte bu artış önemlidir. 24, 48, 72. saat ve 28. günlerdeki ekspresyon değerleri arasındaki değişimler ise anlamsız olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 4.29 ve Çizelge 4.9).



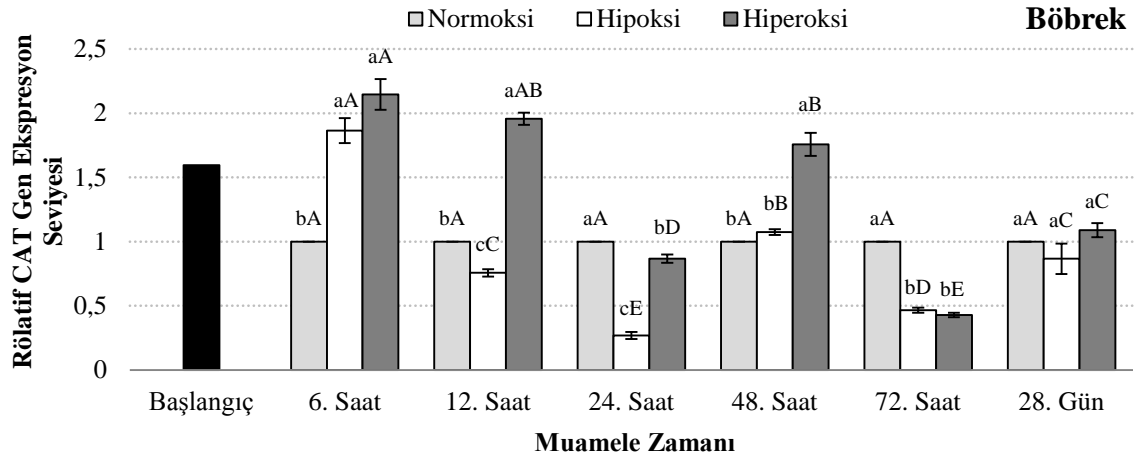
Şekil 4.29. Böbrek dokusuna ilişkin SOD geni rölatif ekspresyon seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.6.2.2. Böbrek dokusunda Katalaz genine ilişkin ekspresyon bulguları

CAT geni zamanlar arasındaki ve zamanlar içi ekspresyon değişimleri istatistiki açıdan göz önünde bulundurulduğunda ($p < 0,05$): 6. saatte hem hipoksi ($1,86 \pm 0,1^{aA}$) hem de hiperoksi ($2,15 \pm 0,12^{aA}$) gen ekspresyonu kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre önemli derecede artmıştır. Ancak hipoksi uygulaması ile gen ifadesi hiperoksiye göre önemli derecede düşük bulunmuştur. 12. saatte kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre hipoksi uygulaması

($0,76 \pm 0,03^{cC}$) ile gen ifadesi önemli derecede azalmış ancak hiperoksi uygulaması ($1,96 \pm 0,05^{aAB}$) ile önemli derecede artış göstermiştir. 24. saatte hem hipoksi ($0,27 \pm 0,03^{cE}$) hem de hiperoksi ($0,87 \pm 0,03^{bD}$) gen ekspresyonu kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre önemli derecede azalmıştır. Ancak hipoksi uygulaması ile gen ifadesi hiperoksiye göre önemli derecede daha düşük bulunmuştur. 48. saatte hipoksi ($1,07 \pm 0,02^{bB}$) ile gen ifadesi kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre değişiklik göstermemiş hiperoksi uygulaması ($1,76 \pm 0,09^{aB}$) ise önemli derecede daha yüksek bulunmuştur. 72. saatte hem hipoksi ($0,47 \pm 0,02^{bD}$) hem de hiperoksi ($0,43 \pm 0,02^{bE}$) uygulamasında kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre önemli derecede azalış görülmüştür. Birbirleri arasındaki fark ise önemsiz bulunmuştur. 28. günde uygulamalar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemsizdir.

Tüm zamanlarda hipoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek gen ifadesi 6. saatte en düşük gen ifadesi ise 24. saatte bulunmuştur. Hiperoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek gen ifadesi 6. saatte en düşük gen ifadesi ise 72. saatte bulunmuştur (Şekil 4.30 ve Çizelge 4.9).



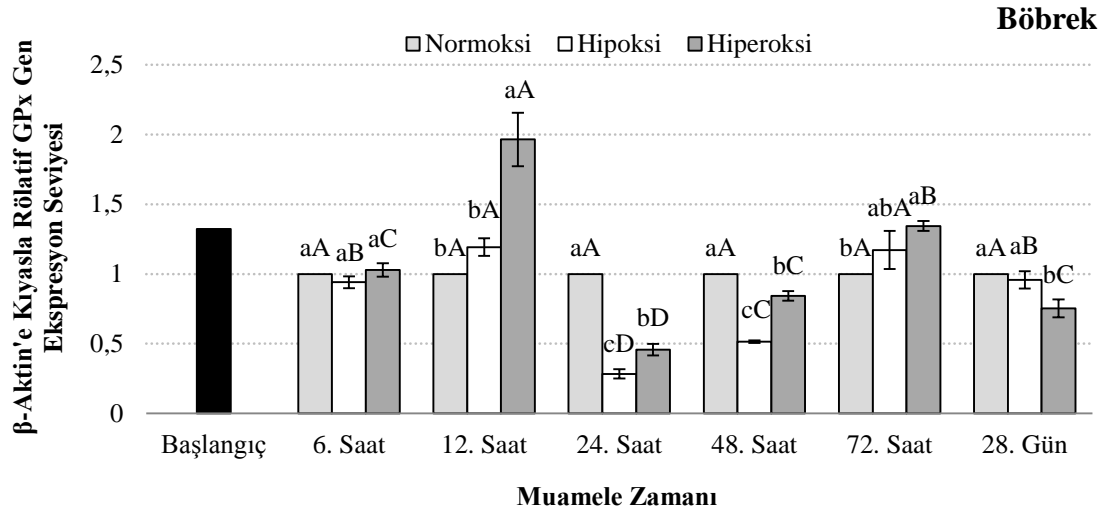
Şekil 4.30. Böbrek dokusuna ilişkin CAT geni rölative ekspresyon seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.6.2.3. Böbrek dokusunda Glutasyon Peroksidaz genine ilişkin ekspresyon bulguları

GPx geni zamanlar arasındaki ve zamanlar içi ekspresyon değişimleri istatistiki açıdan göz önünde bulundurulduğunda ($p < 0,05$): 6. saatte kontrol ($1,00 \pm 0,00^{aA}$), hipoksi ($0,94 \pm 0,04^{aB}$) ve hiperoksi ($1,03 \pm 0,05^{aC}$) uygulamaları arasındaki ekspresyon farkının önemsiz olduğu bulunmuştur. 12. saatte hiperoksidede gen ekspresyonu ($1,96 \pm 0,19^{aA}$), kontrol ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) ve hipoksiya ($1,19 \pm 0,06^{bA}$) göre önemli derecede yükselmiş olarak göze çarpmaktadır. Kontrol ve hipoksi aralarındaki değişimin ise önemsiz olduğu bulunmuştur. 24. saatte hipoksi ($0,28 \pm 0,03^{cD}$) ve hiperoksi ($0,46 \pm 0,04^{bD}$) muameleleri kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre düşük ekspresyon seviyesi göstermiş, hipoksi ise hiperokside düşük bir ekspresyon grafiği çizmiştir. Bu değişimler istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. 48. saatte kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre hiperoksi ($0,84 \pm 0,03^{bC}$) önemli derecede azalmışken hipoksi uygulaması ($0,52 \pm 0,01^{cC}$) bunlardan daha düşük ekspresyon grafiği çizmiş olup değişimin önemli olduğu bulunmuştur. 72. saatte kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre hiperoksi muamelesinin ekspresyon seviyesi ($1,34 \pm 0,04^{aB}$) önemli sayılabilecek bir artış göstermesine rağmen hipoksi uygulamasında ($1,17 \pm 0,14^{abA}$) ise kontrole göre hiperoksi muamelesine göre değerlendirildiğinde ekspresyon farkının önemsiz olduğu bulunmuştur. 28. günde hipoksi gen ifadesi ($0,96 \pm 0,06^{aB}$) seviyesindeki azalış kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) kıyasla önemsiz olduğu bulunmuşken hiperoksidedeki ($0,75 \pm 0,06^{bC}$) değişimin ise hem kontrole hem de hipoksi uygulamasındaki ekspresyon değerine göre önemli derecede azaldığı bulunmuştur.

Hipoksi ve hiperoksidedeki tüm zamanlar muamele bazında ele alındığında ise; Hipoksidede en düşük gen ifadesi 24. saatte bulunmuştur. 48. saatte 24. saate göre önemli bir artış göstermiştir. 6. saat ve 28. gündeki gen ifadesi seviyeleri arasındaki fark önemsiz olup, 24. ve 48. saatlerdeki gen ifadelerine kıyasla önemli bir artış göstermektedir. 12. ve 72. saatler ise hipoksi uygulaması içerisindeki en yüksek gen ifadesine sahiptir ancak kendi aralarındaki farklılık önemsiz olarak bulunmuştur. Hiperoksidede en düşük gen ifadesi 24. saatte bulunmuştur. 6., 48. saatler ve 28. günde gen ifadeleri farklılıkları önemsiz olarak

bulunmuşken, 24. saatteki gen ifadesine göre önemli derecede yüksek gözlenmiştir. 72. saatteki gen ifadesi seviyesi 6., 24., 48. saatler ve 28. gündeki gen ifadesi seviyelerinden yüksek bulunmuş ve bu artışın önemli olduğu kaydedilmiştir. 12. saatte ise en yüksek gen ekspresyon seviyesinin olduğu ve bu farkın önemli olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.31 ve Çizelge 4.9).



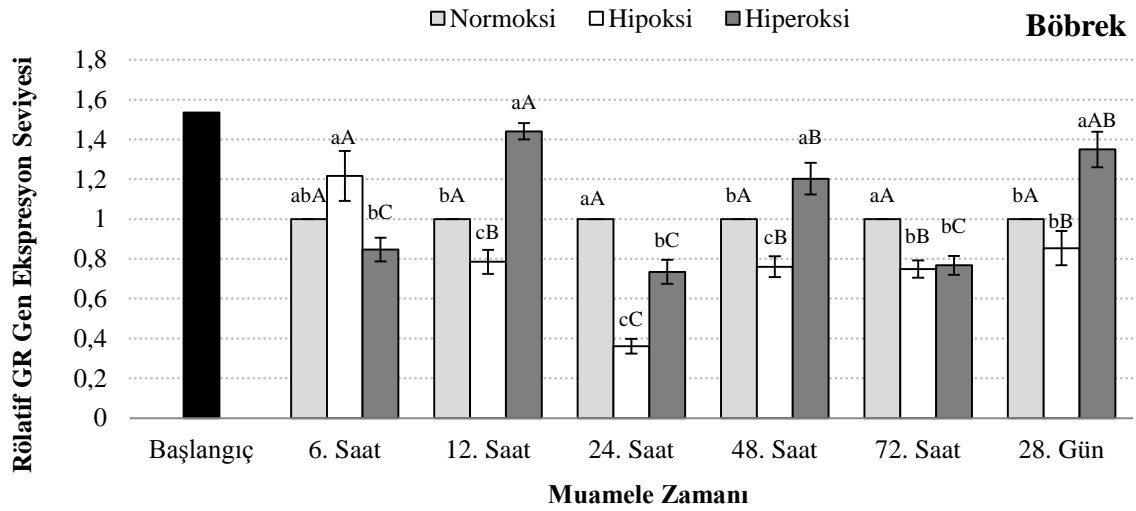
Şekil 4.31. Böbrek dokusuna ilişkin SOD geni rölatif ekspresyon seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.6.2.4. Böbrek dokusunda Glutasyon Redüktaz genine ilişkin ekspresyon bulguları

GR geni zamanlar arasındaki ve zamanlar içi ekspresyon değişimleri istatistiki açıdan göz önünde bulundurulduğunda ($p < 0,05$): 6. saatte kontrole ($1,00 \pm 0,00^{abA}$) göre hipoksi uygulaması ($1,22 \pm 0,13^{aA}$) ile gen ifadesi yükselmiş hiperoksi uygulaması ($0,85 \pm 0,06^{bC}$) ile azalmıştır. Ancak aralarında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. 12. saatte kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre hipoksi uygulaması ($0,79 \pm 0,06^{cB}$) ile gen ifadesi önemli derecede azalmış, hiperoksi uygulaması ($1,44 \pm 0,04^{aA}$) ile önemli derecede artmıştır. 24. saatte kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre hiperoksi ($0,73 \pm 0,06^{bC}$) önemli derecede azalmışken

hipoksi uygulaması ($0,36 \pm 0,04^{cC}$) bunlardan daha düşük ekspresyon grafiği çizmiş olup değişimin önemli olduğu bulunmuştur. 48. saatte kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre hipoksi uygulaması ($0,76 \pm 0,05^{cB}$) ile gen ifadesi önemli derecede azalmış ancak hiperoksi uygulaması ($1,20 \pm 0,08^{aB}$) ile önemli derecede artış göstermiştir. 72. saatte hem hipoksi ($0,75 \pm 0,04^{bB}$) hem de hiperoksi uygulamasında ($0,77 \pm 0,05^{bC}$) kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre önemli derecede azalış görülmüştür. Birbirleri arasındaki fark ise önemsiz bulunmuştur. 28. günde hipoksi ($0,85 \pm 0,09^{bB}$) ile gen ifadesi kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre değişiklik göstermemiş hiperoksi uygulaması ($1,35 \pm 0,09^{aAB}$) ise önemli derecede daha yüksek bulunmuştur.

Tüm zamanlarda hipoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek gen ifadesi 6. saatte en düşük gen ifadesi ise 24. saatte bulunmuştur. Hiperoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek gen ifadesi 12. saatte en düşük gen ifadesi ise 24. saatte bulunmuştur (Şekil 4.32 ve Çizelge 4.9).



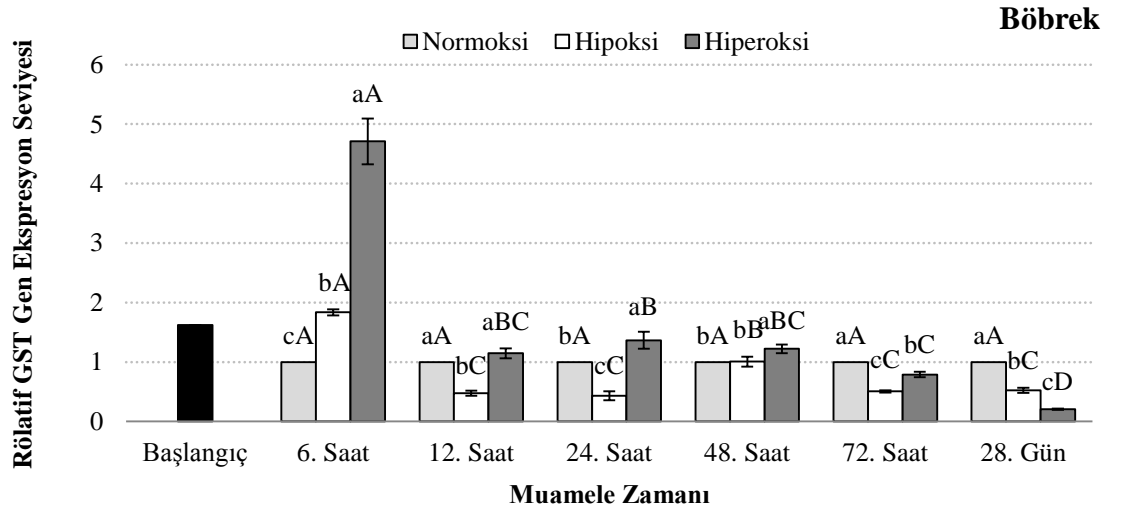
Şekil 4.32. Böbrek dokusuna ilişkin GR geni rölatif ekspresyon seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.6.2.5. Böbrek dokusunda Glutatyon-S-Transferaz genine ilişkin ekspresyon bulguları

Böbrek dokusunda GST gen ekspresyonu muamele saatleri içi kontrole (normoksi) kıyasla ve muamele saatleri arası her bir uygulama kendi arasında istatistiki açıdan kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hiperoksi uygulaması en yüksek ekspresyon seviyesini ($4,71 \pm 0,39^{aA}$) göstermektedir. Bu artış kontrolün ekspresyon seviyesine ($1,00 \pm 0,00^{cA}$) kıyasla önemli bir artış (yaklaşık 5 kat) olarak bulunmuştur. Yine Hipoksi uygulaması da kontrole göre önemli bir artış ($1,84 \pm 0,05^{bA}$) sergilemiştir. 12. saatte kontrole göre ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) hiperoksideki gen ifadesi farklılığı ($1,15 \pm 0,08^{aBC}$) önemsiz olarak bulunmasına rağmen hipoksideki azalış ($0,48 \pm 0,04^{bC}$) önemlidir. 24. saatte hiperoksi uygulaması ($1,37 \pm 0,14^{aB}$) en yüksek ekspresyon değerine sahiptir. Hipoksi ($0,43 \pm 0,07^{cC}$) uygulaması ise kontrole kıyasla ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) azalış göstermiş ve en düşük ekspresyon değerine sahip olarak görülmektedir. Bu değişimler istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. 48. saatte hipoksi ($1,01 \pm 0,08^{bB}$) ve kontrol arasındaki değişim önemsiz olarak bulunurken hiperoksi uygulamasındaki ekspresyon değişimi ($1,22 \pm 0,07^{aBC}$) önemli olarak karşımıza çıkmıştır. 72. saatte hipoksi ve hiperoksi uygulamalarındaki ekspresyon seviyeleri kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) önemli seviyede azalmıştır. Kendi aralarında değerlerinde ise hiperoksi $0,79 \pm 0,05^{bC}$ seviyesinde hipoksiye ($0,51 \pm 0,02^{cC}$) göre daha yüksek bir seviye göstermiştir. 28. günde hipoksi ve hiperoksi uygulamaları kontrole göre ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) azalmış bir ekspresyon grafiği çizmiştir. hiperoksi uygulaması ($0,21 \pm 0,01^{cD}$) hipoksi uygulamasına göre ($0,52 \pm 0,04^{bC}$) daha düşük bir ekspresyon seviyesi göstermiştir.

Tüm zamanlardaki hipoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek ekspresyon seviyesi 6. saatte karşımıza çıkmaktadır. Diğer zamanlar bu saatten önemli bir azalış sergilerken 48. saat Hipoksi uygulaması ise 12, 24, 72. saat ve 28. gündeki ekspresyon seviyelerinden daha yüksek olarak bulunmuştur. Bu fark istatistiki açıdan da önemlidir. 12, 24, 72. saat ve 28. gündeki hipoksi ekspresyon değerleri arasındaki fark ise önemsiz olarak karşımıza çıkmaktadır. Hiperoksi uygulamasında ise 6. saatteki ekspresyon

değeri tüm zamanlardan önemli olarak yüksek bulunmuştur. 24., 72. saat ve 28. günlerdeki ekspresyon değerleri birbirlerinden önemli olarak farklı bulunmuştur. Bu bağlamda 24. saat 72. saatten yüksek ve 28. günde ise en düşük ekspresyon değeri görülmüştür. 12., 24. ve 48. saatler arasındaki hiperoksi ekspresyon değişimi önemsiz olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 4.33 ve Çizelge 4.9).



Şekil 4.33. Böbrek dokusuna ilişkin GST geni rölatif ekspresyon seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

Çizelge 4.9. Böbrek dokusuna ilişkin SOD, CAT, GPx, GR ve GST genlerinin β -Aktin'e kıyasla uygulama zamanlarında rölatif ekspresyon değerleri

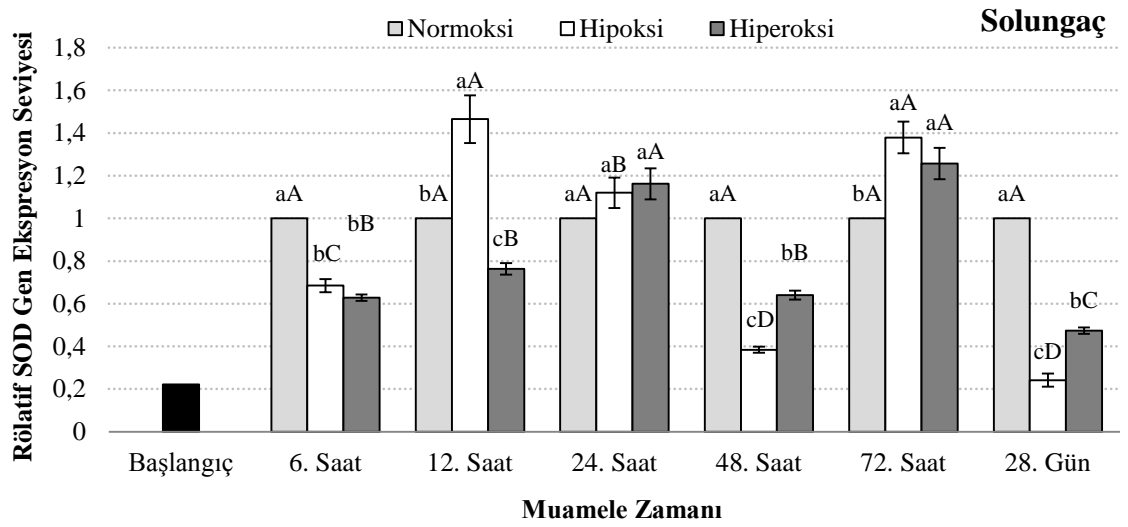
| Genler | Muamele | Akut etki Saatler | | | | | Kronik etki Gün |
|--------|-----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 | 28 |
| SOD | Normoksi | 1,00±0,00 ^{abA} | 1,00±0,00 ^{baA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{aA} |
| | Hipoksi | 0,76±0,06 ^{bB} | 0,59±0,06 ^{cC} | 0,27±0,01 ^{cD} | 0,53±0,03 ^{cC} | 1,06±0,08 ^{aA} | 0,80±0,01 ^{bB} |
| | Hiperoksi | 1,39±0,27 ^{aA} | 1,63±0,04 ^{aA} | 0,45±0,05 ^{bB} | 0,71±0,07 ^{bB} | 0,85±0,12 ^{aB} | 0,57±0,05 ^{cB} |
| CAT | Normoksi | 1,00±0,00 ^{baA} | 1,00±0,00 ^{baA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{baA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{aA} |
| | Hipoksi | 1,86±0,1 ^{aA} | 0,76±0,03 ^{cC} | 0,27±0,03 ^{cE} | 1,07±0,02 ^{bB} | 0,47±0,02 ^{bD} | 0,87±0,12 ^{aC} |
| | Hiperoksi | 2,15±,12 ^{aA} | 1,96±0,05 ^{aAB} | 0,87±0,03 ^{bD} | 1,76±0,09 ^{aB} | 0,43±0,02 ^{bE} | 1,09±0,05 ^{aC} |
| GPx | Normoksi | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{baA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{baA} | 1,00±0,00 ^{aA} |
| | Hipoksi | 0,94±0,04 ^{aB} | 1,19±0,06 ^{baA} | 0,28±0,03 ^{cD} | 0,52±0,01 ^{cC} | 1,17±0,14 ^{abA} | 0,96±0,06 ^{aB} |
| | Hiperoksi | 1,03±0,05 ^{aC} | 1,96±0,19 ^{aA} | 0,46±0,04 ^{bD} | 0,84±0,03 ^{bC} | 1,34±0,04 ^{aB} | 0,75±0,06 ^{bC} |
| GR | Normoksi | 1,00±0,00 ^{abA} | 1,00±0,00 ^{baA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{baA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{baA} |
| | Hipoksi | 1,22±0,13 ^{aA} | 0,79±0,06 ^{cB} | 0,36±0,04 ^{cC} | 0,76±0,05 ^{cB} | 0,75±0,04 ^{bB} | 0,85±0,09 ^{bB} |
| | Hiperoksi | 0,85±0,06 ^{bC} | 1,44±0,04 ^{aA} | 0,73±0,06 ^{bC} | 1,20±0,08 ^{aB} | 0,77±0,05 ^{bC} | 1,35±0,09 ^{aAB} |
| GST | Normoksi | 1,00±0,00 ^{cA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{baA} | 1,00±0,00 ^{baA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{aA} |
| | Hipoksi | 1,84±0,05 ^{baA} | 0,48±0,04 ^{bC} | 0,43±0,07 ^{cC} | 1,01±0,08 ^{bB} | 0,51±0,02 ^{cC} | 0,52±0,04 ^{bC} |
| | Hiperoksi | 4,71±0,39 ^{aA} | 1,15±0,08 ^{aBC} | 1,37±0,14 ^{aB} | 1,22±0,07 ^{aBC} | 0,79±0,05 ^{bC} | 0,21±0,01 ^{cD} |

4.6.3 Solungaç dokusuna ilişkin gen ekspresyonu bulguları

4.6.3.1. Solungaç dokusunda Süperoksit Dismütaz genine ilişkin ekspresyon bulguları

Solungaç dokusunda SOD gen ekspresyonu muamele saatleri içi kontrole (normoksi) kıyasla ve muamele saatleri arası her bir uygulama kendi arasında istatistiki açıdan kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hem hipoksi ($0,69 \pm 0,03^{bC}$) hem de hiperoksi ($0,63 \pm 0,02^{bB}$) uygulamasında kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre önemli derecede azalış görülmüştür. Birbirleri arasındaki fark ise önemsiz bulunmuştur. 12. saatte kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre hiperoksi uygulaması ($0,76 \pm 0,03^{cB}$) ile gen ifadesi önemli derecede azalmış ancak hipoksi uygulaması ($1,46 \pm 0,11^{aA}$) ile önemli derecede artış göstermiştir. 24. saatte uygulamalar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemsizdir. 48. saatte hipoksi ($1,12 \pm 0,07^{aB}$) ve hiperoksi ($1,16 \pm 0,07^{aA}$) muameleleri kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre düşük ekspresyon seviyesi göstermiş, hipoksi ise hiperokside düşük bir ekspresyon grafiği çizmiştir. Bu değişimler istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. 72. saatte hem hipoksi ($1,38 \pm 0,07^{aA}$) hem de hiperoksi ($1,26 \pm 0,07^{aA}$) gen ekspresyonu kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre önemli derecede artmıştır. Ancak hipoksi uygulaması ile gen ifadesi hiperoksiye göre önemli derecede düşük bulunmuştur. 28. günde hipoksi ($0,24 \pm 0,03^{cD}$) ve hiperoksi ($0,47 \pm 0,01^{bC}$) muameleleri kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre düşük ekspresyon seviyesi göstermiş, hipoksi ise hiperokside düşük bir ekspresyon grafiği çizmiştir. Bu değişimler istatistiki açıdan önemli bulunmuştur.

Tüm zamanlarda hipoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek gen ifadesi 12. saatte en düşük gen ifadesi ise 28. günde bulunmuştur. Hiperoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek gen ifadesi 72. saatte en düşük gen ifadesi ise 28. günde bulunmuştur (Şekil 4.34 ve Çizelge 4.10).



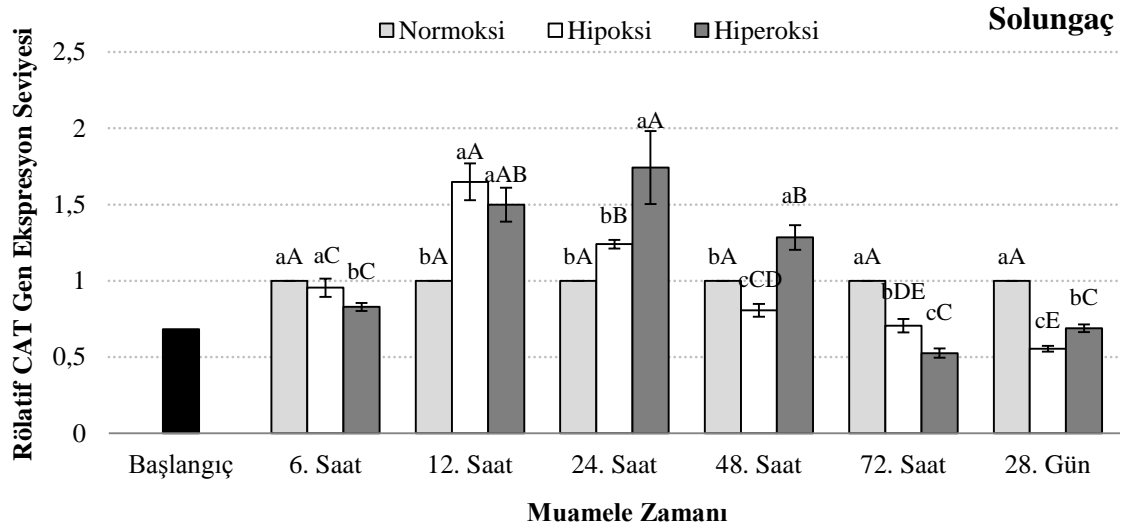
Şekil 4.34. Solungaç dokusuna ilişkin SOD geni rölatif ekspresyon seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.6.3.2. Solungaç dokusunda Katalaz genine ilişkin ekspresyon bulguları

Solungaç dokusunda CAT gen ekspresyonu muamele saatleri içi kontrole (normoksi) kıyasla ve muamele saatleri arası her bir uygulama kendi arasında istatistiksel açıdan kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi gen ifadesi ($0,95 \pm 0,06^{aC}$) seviyesindeki azalış kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) kıyasla önemsiz olduğu bulunmuşken hiperoksidedeki ($0,83 \pm 0,03^{bC}$) değişimin ise hem kontrole hem de hipoksi uygulamasındaki ekspresyon değerine göre önemli derecede azaldığı bulunmuştur. 12. saatte hem hipoksi ($1,65 \pm 0,12^{aA}$) hem de hiperoksi ($1,50 \pm 0,11^{aAB}$) gen ekspresyonu kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre önemli derecede artmıştır. Ancak hipoksi uygulaması ile gen ifadesi hiperoksiye göre önemli derecede düşük bulunmuştur. 24. saatte hipoksi ($1,24 \pm 0,03^{bB}$) ile gen ifadesi kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre değişiklik göstermemiş hiperoksi uygulaması ($1,74 \pm 0,24^{aA}$) ise önemli derecede daha yüksek bulunmuştur. 48. saatte grup içerisindeki muameleler arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bu bağlamda hiperoksi uygulaması ($1,28 \pm 0,08^{aB}$) kontrolden ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) yüksek hipoksi

uygulaması ($0,81\pm0,04^{cCD}$) ise kontrole nazaran düşük bulunmuştur. 72. saatte hipoksi ($0,71\pm0,04^{bDE}$) ve hiperoksi ($0,53\pm0,03^cC$) kontrole ($1,00\pm0,00^{aA}$) göre daha düşük bir ekspresyon grafiği göstermiştir. Kendi aralarında değerlendirildiğinde ise hipoksi hiperoksiden daha yüksek ekspresyona sahiptir ve bu fark önemli olarak bulunmuştur. 28. günde hipoksi ve hiperoksi kontrole ($1,00\pm0,00^{aA}$) göre daha düşük bir ekspresyon grafiği göstermiştir. Kendi aralarında değerlendirildiğinde ise hipoksi ($0,56\pm0,02^{cE}$) hiperoksiden ($0,69\pm0,02^{bC}$) önemli derecede daha düşüktür.

Tüm zamanlarda hipoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek gen ifadesi 12. saatte en düşük gen ifadesi ise 28. günde bulunmuştur. Hiperoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek gen ifadesi 24. saatte en düşük gen ifadesi ise 72. saatte bulunmuştur (Şekil 4.35 ve Çizelge 4.10).

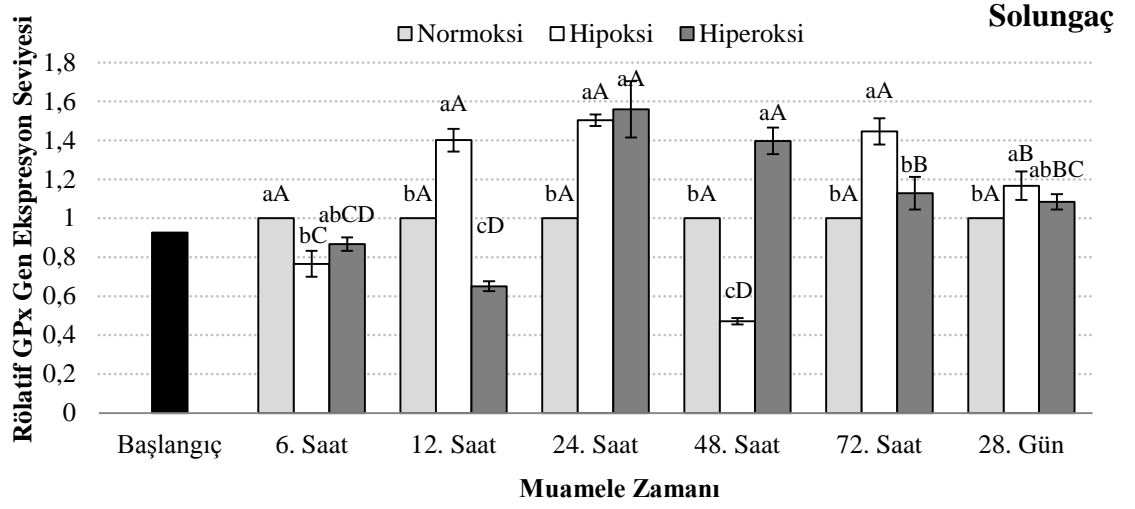


Şekil 4.35. Solungaç dokusuna ilişkin CAT geni rölatif ekspresyon seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p<0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.6.3.3. Solungaç dokusunda Glutatyon Peroksidaz genine ilişkin ekspresyon bulguları

Solungaç dokusunda GPx gen ekspresyonu muamele saatleri içi kontrole (normoksi) kıyasla ve muamele saatleri arası her bir uygulama kendi arasında istatistiki açıdan kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi uygulaması ($0,77 \pm 0,07^{bC}$) ile gen ifadesi kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre önemli derecede azalmıştır. Hiperoksi uygulamasının ($0,87 \pm 0,03^{bB}$) hem hipoksi hem de kontrole göre farkı önemsiz bulunmuştur. 12. saatte hipoksi uygulaması ($1,40 \pm 0,06^{aA}$) ile gen ifadesi kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre önemli derecede artmış ancak hiperoksi uygulaması ($0,65 \pm 0,03^{cB}$) gen ifadesini hem kontrole hem de hipoksi uygulamasına göre önemli derecede düşürmüştür. 24. saatte hem hipoksi ($1,5 \pm 0,03^{aB}$) hem de hiperoksi ($1,56 \pm 0,14^{aA}$) gen ekspresyonu kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre önemli derecede artmıştır. Ancak hipoksi uygulaması ile gen ifadesi hiperoksiye göre önemli derecede düşük bulunmuştur. 48. saatte grup içerisindeki muameleler arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bu bağlamda hiperoksi uygulaması ($1,4 \pm 0,07^{bB}$) kontrolden ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) yüksek hipoksi uygulaması ($0,47 \pm 0,02^{cD}$) ise kontrole nazaran düşük bulunmuştur. 72. saatte hiperoksi uygulaması ($1,13 \pm 0,08^{aA}$) ile gen ifadesi kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre farkı önemsizdir. Hipoksi uygulaması ($1,45 \pm 0,07^{aA}$) ise gen ifadesini bunlara kıyasla önemli derecede artırmıştır. 28. günde hipoksi uygulaması ($1,17 \pm 0,07^{cD}$) ile gen ifadesi kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre önemli derecede artmıştır. Hiperoksi uygulamasının ($1,08 \pm 0,04^{bC}$) hem hipoksi hem de kontrole göre farkı önemsiz bulunmuştur.

Tüm zamanlarda hipoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek gen ifadesi 12. saatte en düşük gen ifadesi ise 28. günde bulunmuştur. Hiperoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek gen ifadesi 24. saatte en düşük gen ifadesi ise 72. saatte bulunmuştur (Şekil 4.36 ve Çizelge 4.10).



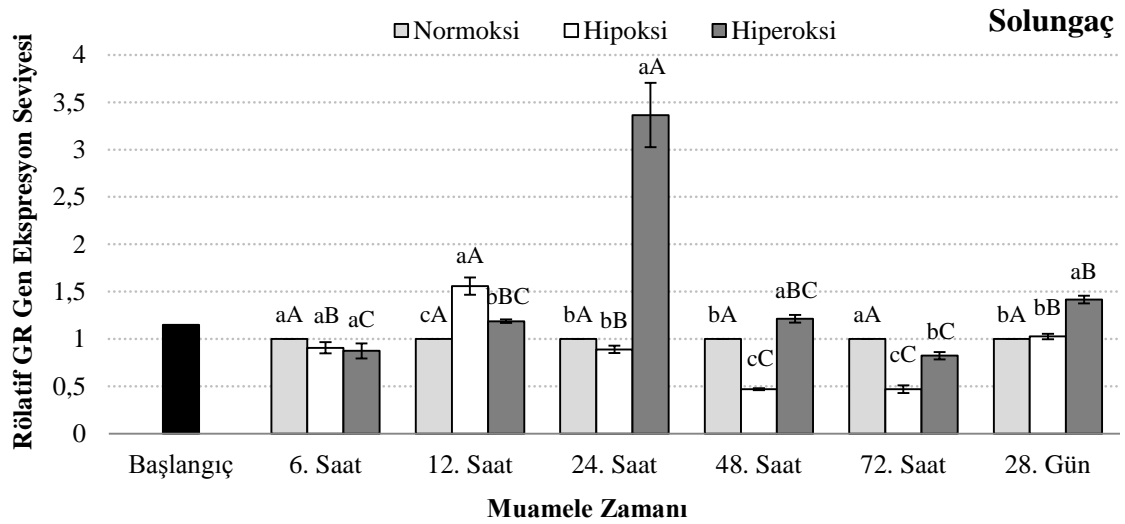
Şekil 4.36. Solungaç dokusuna ilişkin GPx geni rölatif ekspresyon seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.6.3.4. Solungaç dokusunda Glutasyon Redüktaz genine ilişkin ekspresyon bulguları

Solungaç dokusunda GR gen ekspresyonu muamele saatleri içi kontrole (normoksi) kıyasla ve muamele saatleri arası her bir uygulama kendi arasında istatistiki açıdan kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. Saatte gruplar arasında istatistiksel fark gözlenmemiştir. 12. saatte hem hipoksi ($1,56 \pm 0,09^{aA}$) hem de hiperoksi ($1,19 \pm 0,02^{bBC}$) kontrole ($1,00 \pm 0,00^{cA}$) göre gen ifadesini artırmış iken hipoksi uygulamasında gen ifadesi hiperoksi uygulamasından önemli derecede daha yüksek bulunmuştur. 24. saatte hiperoksidede gen ekspresyonu ($3,36 \pm 0,34^{aA}$), kontrol ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) ve hipoksiye ($0,89 \pm 0,04^{bB}$) göre önemli derecede yükselmiş olarak göze çarpmaktadır. Kontrol ve hipoksi aralarındaki değişimin ise önemsiz olduğu bulunmuştur. 48. saatte grup içerisindeki muameleler arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bu bağlamda hiperoksi uygulaması ($1,21 \pm 0,04^{aBC}$) kontrolden ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) yüksek hipoksi uygulaması ($0,47 \pm 0,01^{cC}$) ise kontrole nazaran düşük bulunmuştur. 72. saatte kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre hiperoksi ($0,82 \pm 0,04^{bC}$) önemli derecede azalmışken hipoksi

uygulaması ($0,47 \pm 0,04^{cC}$) bunlardan daha düşük ekspresyon grafiği çizmiş olup değişimin önemli olduğu bulunmuştur. 28. günde hiperokside gen ekspresyonu ($1,42 \pm 0,04^{aB}$), kontrol ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) ve hipoksiye ($1,03 \pm 0,03^{bB}$) göre önemli derecede yükselmiş olarak göze çarpmaktadır. Kontrol ve hipoksi aralarındaki değişimin ise önemsiz olduğu bulunmuştur.

Tüm zamanlarda hipoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek gen ifadesi 12. saatte en düşük gen ifadesi ise 48. saatte bulunmuştur. Hiperoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek gen ifadesi 24. saatte en düşük gen ifadesi ise 72. saatte bulunmuştur (Şekil 4.37 ve Çizelge 4.10).

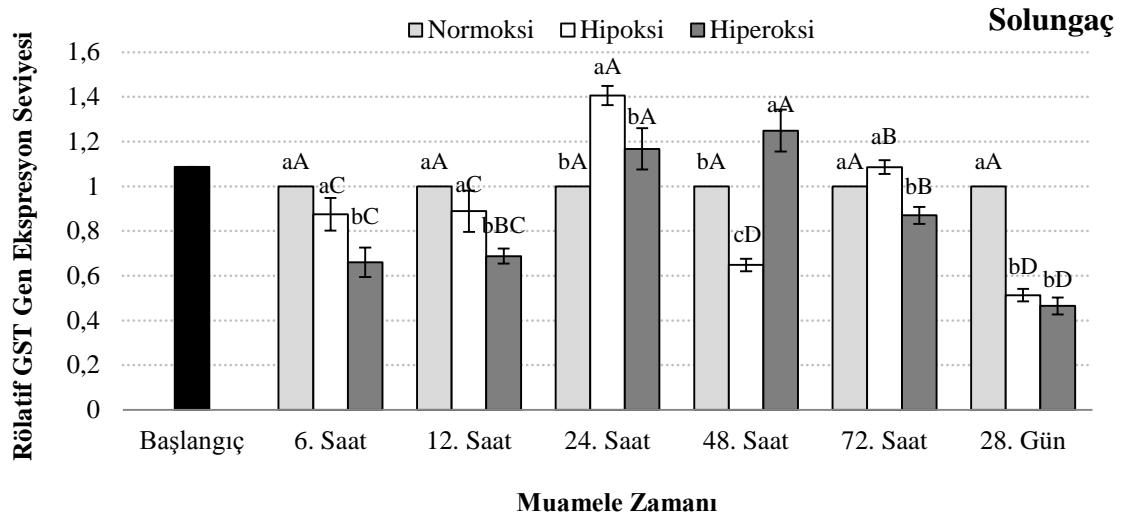


Şekil 4.37. Solungaç dokusuna ilişkin GR geni rölatif ekspresyon seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.6.3.5. Solungaç dokusunda Glutasyon-S-Transferaz genine ilişkin ekspresyon bulguları

Solungaç dokusunda GST gen ekspresyonu muamele saatleri içi kontrole (normoksi) kıyasla ve muamele saatleri arası her bir uygulama kendi arasında istatistiki açıdan kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6., 12. ve 72. saatte hipoksi gen ifadesi seviyesindeki azalış kontrole kıyasla önemsiz olduğu bulunmuşken hiperoksidedekideğişimin ise hem kontrole hem de hipoksi uygulamasındaki ekspresyon değerine göre önemli derecede azaldığı bulunmuştur. 24. saatte hiperoksi uygulaması ($1,17 \pm 0,09^{bA}$) ile gen ifadesi kontrole ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) göre farkı önemsizdir. Hipoksi uygulaması ($1,41 \pm 0,04^{aA}$) ise gen ifadesini bunlara kıyasla önemli derecede artırmıştır. 48. saatte grup içerisindeki muameleler arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bu bağlamda hiperoksi uygulaması ($1,25 \pm 0,09^{aA}$) kontrolden ($1,00 \pm 0,00^{bA}$) yüksek hipoksi uygulaması ($0,65 \pm 0,03^{cD}$) ise kontrole nazaran düşük bulunmuştur. 28. günde hem hipoksi ($0,51 \pm 0,03^{bD}$) hem de hiperoksi uygulamasında ($0,46 \pm 0,04^{bD}$) kontrole ($1,00 \pm 0,00^{aA}$) göre önemli derecede azalış görülmüştür. Birbirleri arasındaki fark ise önemsiz bulunmuştur.

Tüm zamanlarda hipoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek gen ifadesi 24. saatte en düşük gen ifadesi ise 28. günde bulunmuştur. Hiperoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek gen ifadesi 48. saatte en düşük gen ifadesi ise 28. günde bulunmuştur (Şekil 4.38 ve Çizelge 4.10).



Şekil 4.38. Solungaç dokusuna ilişkin GST geni rölatif ekspresyon seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

Çizelge 4.10. Solungaç dokusuna ilişkin SOD, CAT, GPx, GR ve GST genlerinin β -Aktin'e kıyasla uygulama zamanlarında rölatif ekspresyon değerleri

| Genler | Muamele | Akut etki | | | | | Kronik etki |
|------------|-----------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | | Saatler | 12 | 24 | 48 | 72 | Gün |
| | | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 | 28 |
| SOD | Normoksi | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{aA} |
| | Hipoksi | 0,69±0,03 ^{bC} | 1,46±0,11 ^{aA} | 1,12±0,07 ^{aB} | 0,38±0,01 ^{cD} | 1,38±0,07 ^{aA} | 0,24±0,03 ^{cD} |
| | Hiperoksi | 0,63±0,02 ^{bB} | 0,76±0,03 ^{cB} | 1,16±0,07 ^{aA} | 0,64±0,02 ^{bB} | 1,26±0,07 ^{aA} | 0,47±0,01 ^{bC} |
| CAT | Normoksi | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{aA} |
| | Hipoksi | 0,95±0,06 ^{aC} | 1,65±0,12 ^{aA} | 1,24±0,03 ^{bB} | 0,81±0,04 ^{cD} | 0,71±0,04 ^{bDE} | 0,56±0,02 ^{cE} |
| | Hiperoksi | 0,83±0,03 ^{bC} | 1,50±0,11 ^{aAB} | 1,74±0,24 ^{aA} | 1,28±0,08 ^{aB} | 0,53±0,03 ^{cC} | 0,69±0,02 ^{bC} |
| GPx | Normoksi | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{bA} |
| | Hipoksi | 0,77±0,07 ^{bC} | 1,40±0,06 ^{aA} | 1,5±0,03 ^{aB} | 0,47±0,02 ^{cD} | 1,45±0,07 ^{aA} | 1,17±0,07 ^{cD} |
| | Hiperoksi | 0,87±0,03 ^{bB} | 0,65±0,03 ^{cB} | 1,56±0,14 ^{aA} | 1,4±0,07 ^{bB} | 1,13±0,08 ^{aA} | 1,08±0,04 ^{bC} |
| GR | Normoksi | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{cA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{bA} |
| | Hipoksi | 0,91±0,06 ^{aB} | 1,56±0,09 ^{aA} | 0,89±0,04 ^{bB} | 0,47±0,01 ^{cC} | 0,47±0,04 ^{cC} | 1,03±0,03 ^{bB} |
| | Hiperoksi | 0,87±0,08 ^{aC} | 1,19±0,02 ^{bBC} | 3,36±0,34 ^{aA} | 1,21±0,04 ^{aBC} | 0,82±0,04 ^{bC} | 1,42±0,04 ^{aB} |
| GST | Normoksi | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{bA} | 1,00±0,00 ^{aA} | 1,00±0,00 ^{aA} |
| | Hipoksi | 0,87±0,07 ^{aC} | 0,89±0,09 ^{aC} | 1,41±0,04 ^{aA} | 0,65±0,03 ^{cD} | 1,09±0,03 ^{aB} | 0,51±0,03 ^{bD} |
| | Hiperoksi | 0,67±0,07 ^{bC} | 0,69±0,03 ^{bBC} | 1,17±0,09 ^{bA} | 1,25±0,09 ^{aA} | 0,87±0,04 ^{bB} | 0,46±0,04 ^{bD} |

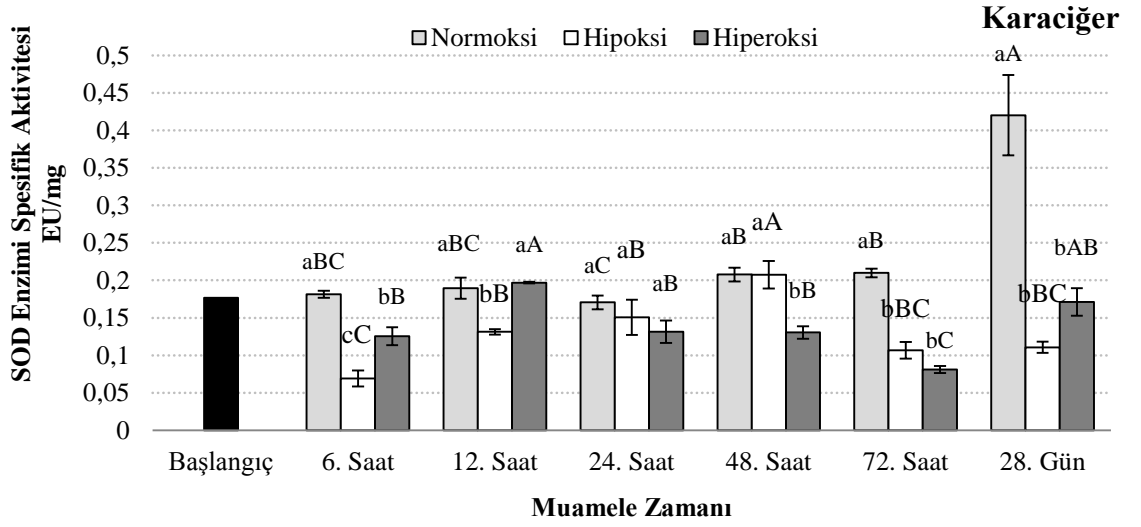
4.7. Enzim Spesifik Aktivitelerine İlişkin Bulgular

4.7.1. Karaciğer dokusuna ilişkin antioksidan enzimlerin spesifik aktivite bulguları

4.7.1.1. Karaciğer dokusuna ilişkin Süperoksit Dismütaz enzimi spesifik aktivite bulguları

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki karaciğer dokusunda SOD enzimi spesifik aktiviteleri birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hem hipoksi ($0,07 \pm 0,01^{cC}$ EU/mg) hem de hiperoksi ($0,13 \pm 0,01^{bB}$ EU/mg) uygulaması için önemli derecede düşük spesifik aktivite görülmüştür. 12. saatte hipoksi uygulamasıyla spesifik aktivite seviyesi ($0,13 \pm 0,0^{bB}$ EU/mg) önemli derecede azalmıştır. Hiperoksi grubunda ($0,20 \pm 0,0^{aA}$ EU/mg) ise kontrole kıyasla istatistiki açıdan önemsiz bir değişim söz konusudur. 24. saatte kontrole kıyasla hipoksi ($0,15 \pm 0,02^{aB}$ EU/mg) ve hiperoksi uygulamalarında azalış görülmüş ancak bu istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. 48. saatte spesifik aktivitesi istatistiki açıdan dikkate alındığında hipoksi grubu kontrole kıyaslandığında istatistiki açıdan önemsiz bulunmuştur. Kontrole kıyaslandığında hiperoksi gruplarında ise önemli derecede azalış gözlemlenmiştir. 72. saatte hem hipoksi ($0,11 \pm 0,01^{bBC}$ EU/mg) hem de hiperoksi ($0,08 \pm 0,0^{bC}$ EU/mg) grubunda kontrole kıyasla önemli bir azalış gözlemlenmiştir. 28. günde kontrole göre hipoksi ve hiperoksi gruplarında spesifik aktivite kontrole göre azalmıştır. Hipoksi ve hiperoksi arasında istatistiksel olarak değişimler önemsiz bulunmuştur.

Tüm zamanlardaki hipoksi uygulaması dikkate alındığında en düşük enzim aktivitesinin 6. saatte olduğu en yüksek enzim aktivitesinin ise ($0,21 \pm 0,02^{aA}$ EU/mg) 48. saatte olduğu bulunmuştur. Tüm zamanlara göre hiperoksi uygulaması dikkate alındığında en düşük enzim aktivitesi 72. saatte bulunmuştur ve diğerlerine kıyasla önemli olarak belirlenmiştir. 6., 24. ve 48. saatlerde hiperoksi grubu enzim aktiviteleri aynı olup aralarında herhangi bir fark yoktur. En yüksek aktivite 12. saatte gözlemlenmiştir (Şekil 4.39 ve Çizelge 4.11).



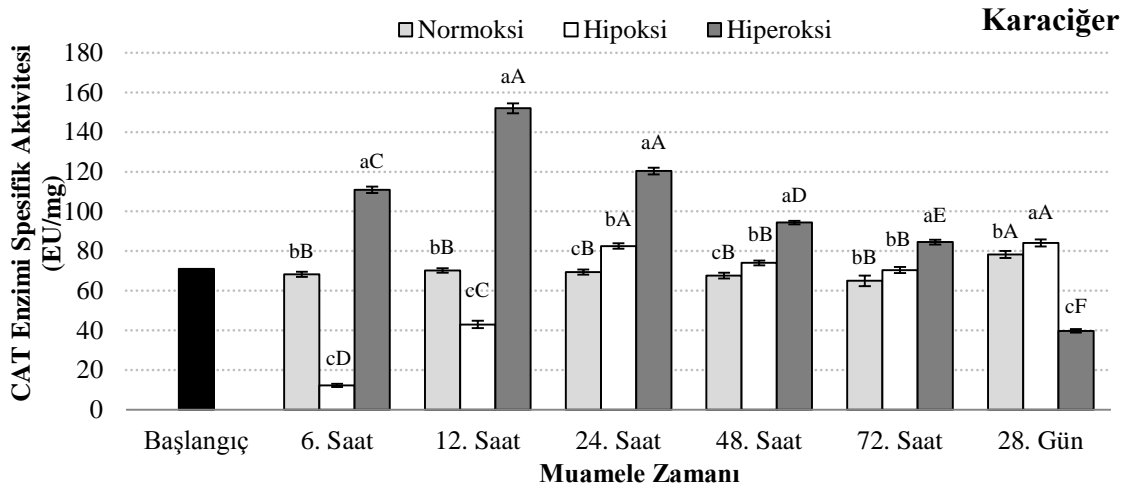
Şekil 4.39. Karaciğer dokusuna ilişkin SOD enzimi spesifik aktivite seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.7.1.2. Karaciğer dokusuna ilişkin Katalaz enzimi spesifik aktivite bulguları

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki karaciğer dokusunda CAT enzimi spesifik aktiviteleri birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi uygulamasında spesifik aktivite seviyesi ($12,27 \pm 0,82^{cD}$ EU/mg) kontrole göre önemli derecede azaldığı bulunmuştur. Hiperoksi uygulaması ise kontrole göre önemli derecede artış ($110,90 \pm 1,59^{aC}$ EU/mg) sergilemiştir. 12. saatte hipoksi grubunda spesifik aktivite seviyesi ($43,01 \pm 1,86^{cC}$ EU/mg) kontrole göre önemli derecede azalmıştır. En yüksek spesifik aktivitenin ise kontrole kıyasla ($151,97 \pm 2,53^{aA}$ EU/mg) hiperoksi grubunda olduğu ve istatistiki açıdan önemli olduğu bulunmuştur. 24. saatte hipoksi uygulamasında spesifik aktivite kontrole kıyasla ($82,56 \pm 1,38^{bA}$ EU/mg) artış göstermiş ve bu artış istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. En yüksek spesifik aktivite değeri hiperoksi uygulamasıdır ($120,37 \pm 1,67^{aA}$ EU/mg) ve farkı önemli bulunmuştur. 48. saatte hipoksi uygulamasında spesifik aktivite kontrole kıyasla ($74,06 \pm 1,21^{bB}$ EU/mg) önemli derecede artış göstermiştir. En yüksek spesifik aktivite değeri hiperoksi uygulamasıdır ($94,37 \pm 0,86^{aD}$ EU/mg) ve farkı önemli bulunmuştur. 72. saatte hipoksi

grubunda ($70,42 \pm 1,53^{bB}$ EU/mg) kontrole kıyasla önemsiz bir artış gözlenmiştir. Hiperoksi grubunda ($84,52 \pm 1,27^{aE}$ EU/mg) istatistiki açıdan önemli bir artış meydana geldiği gözlemlenmiştir. 28. günde spesifik aktivite kontrole göre en yüksek hipoksi grubunda ($84,13 \pm 1,78^{aA}$) olup istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. En düşük enzim spesifik aktivitesi hiperoksi grubunda ($39,78 \pm 0,91^{cF}$ EU/mg) görülmüş ve bu düşüşün istatistiksel açıdan önemli olduğu bulunmuştur.

Tüm zamanlardaki enzim aktiviteleri kıyasladığımızda; Hipoksi uygulamasında en düşük enzim spesifik aktivitesi 6. saatte olup diğer zamanlara göre farkı önemli bulunmuştur. En yüksek enzim aktivitesinin ise 28. gün olduğu ve bu artışın istatistiksel açıdan 24. saat hariç diğerleri ile kıyaslandığında önemli olduğu bulunmuştur. Hiperoksi uygulamasında en düşük aktivite 28. günde gözlemlenmiş ve fark önemli bulunmuştur. En fazla aktivite ise 12. saatte gözlenmiş olup 24. saat hariç diğerlerinden önemli derecede farklılık göstermiştir (Şekil 4.40 ve Çizelge 4.11).



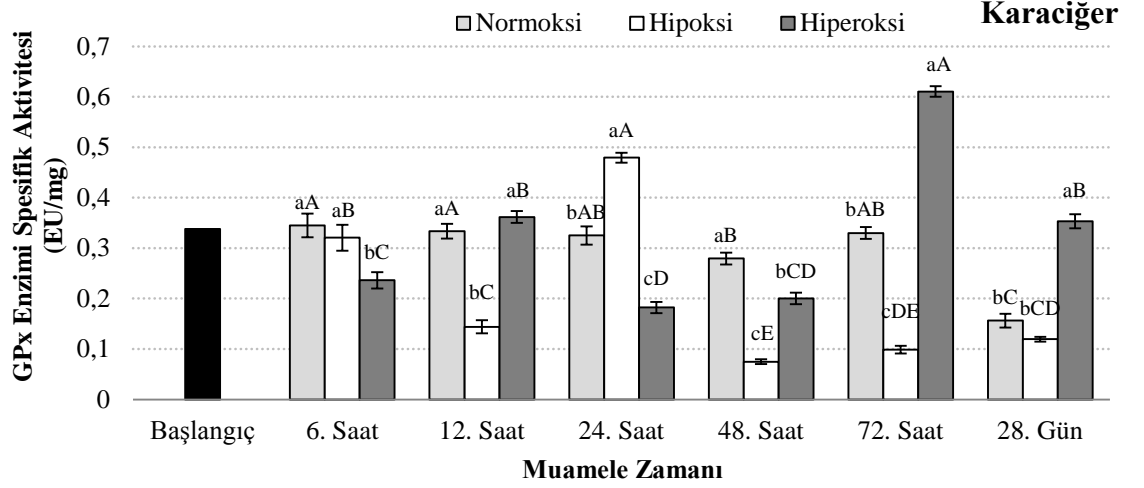
Şekil 4.40. Karaciğer dokusuna ilişkin CAT enzimi spesifik aktivite seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.7.1.3. Karaciğer dokusuna ilişkin Glutatyon Peroksidaz enzimi spesifik aktivite bulguları

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki karaciğer dokusunda GPx enzimi spesifik aktiviteleri birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi uygulamasında spesifik aktivite seviyesi kontrole göre ($0,32 \pm 0,03^{aB}$ EU/mg) farkı önemsizdir. Hiperoksi uygulaması da kontrole göre önemli bir azalış ($0,23 \pm 0,12^{bC}$ EU/mg) sergilemiştir. 12. saatte hipoksi uygulaması en yüksek spesifik aktivite seviyesini ($0,14 \pm 0,01^{bC}$ EU/mg) göstermektedir. En yüksek spesifik aktivitenin ise kontrole kıyasla ($0,36 \pm 0,01^{aB}$ EU/mg) hiperoksi grubunda önemli bir şekilde olduğu ve istatistiki açıdan önemli olduğu karşımıza çıkmaktadır. 24. saatte hipoksi uygulaması kontrole kıyasla ($0,48 \pm 0,01^{aA}$ EU/mg) önemli derecede artış göstermiştir. hiperoksi uygulamasında ($0,18 \pm 0,01^{cD}$ EU/mg) ise önemli derecede azalış meydana gelmiştir. 48. saatte spesifik aktivite istatistiki açıdan dikkate alındığında hipoksi ($0,07 \pm 0,0^{cE}$ EU/mg) ve hiperoksi ($0,20 \pm 0,01^{bCD}$ EU/mg) grubunda azalış gözlemlenmiş ve bu değerler istatistiki açıdan önemli olarak belirlenmiştir. 72. saatte hipoksi grubunda ($0,10 \pm 0,01^{cDE}$ EU/mg) kontrole kıyasla önemli bir azalış gözlenmiş iken hiperoksi grubunda ($0,61 \pm 0,01^{aA}$ EU/mg) önemli bir artış meydana geldiği gözlemlenmiştir. 28. günde GPx enzimi spesifik aktivitesi kontrole göre en yüksek hiperoksi grubunda ($0,35 \pm 0,01^{aB}$ EU/mg) olup farkı istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. En düşük enzim aktivitesi hipoksi grubunda ($0,12 \pm 0,01^{bCD}$ EU/mg) görülmüş ve bu düşüş istatistiksel açıdan önemsiz olduğu bulunmuştur.

Tüm zamanlardaki hipoksi muamelelerinin enzim aktiviteleri kıyaslanırsa; en düşük enzim aktivitesi 48. saatte olup diğer zamanlara göre farkı önemli bulunmuştur. 6. ve 24. saatlerdeki enzim aktiviteleri diğer saatlerdeki aktivitelere göre önemli derecede artış göstermişlerdir. En yüksek aktivitenin ise 24. saatte olduğu ve bu artışın istatistiksel açıdan önemli olduğu bulunmuştur. Hiperoksi uygulamasında en düşük aktivite 24. saatte gözlemlenmiş ve diğer gruplara göre farkı önemli bulunmuştur. En

fazla aktivite ise 72. saatte gözlenmiş olup diğerlerinden önemli derecede farklılık göstermiştir (Şekil 4.41 ve Çizelge 4.11).



Şekil 4.41. Karaciğer dokusuna ilişkin GPx enzimi spesifik aktivite seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

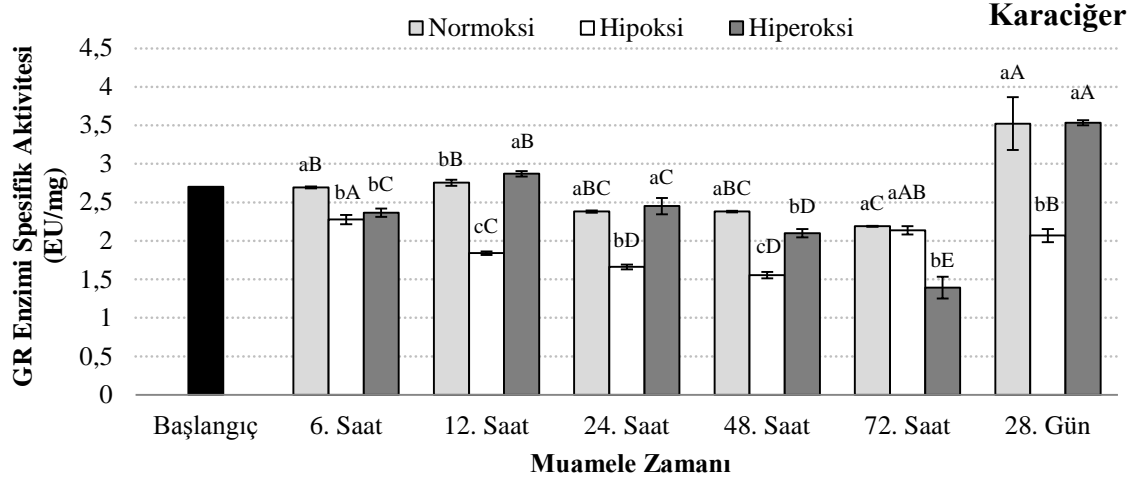
4.7.1.4. Karaciğer dokusuna ilişkin Glutasyon Redüktaz enzimi spesifik aktivite bulguları

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki karaciğer dokusunda GR enzimi spesifik aktiviteleri birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte enzim spesifik aktivitesi bakımından en yüksek aktivite gösteren grup kontrol grubu ($2,69 \pm 0,01^{aB}$ EU/mg) olmuştur. Hipoksi ($2,28 \pm 0,06^{bA}$ EU/mg) ve hiperoksi ($2,37 \pm 0,05^{bC}$ EU/mg) grupları arasında istatistiki açıdan anlamlı bir değişim gözlemlenmezken enzim aktiviteleri kontrol grubuna nazaran anlamlı bir azalış göstermektedir. 12. saat göz önünde bulundurulduğunda en yüksek enzim spesifik aktivitesine sahip uygulama hiperoksi ($2,87 \pm 0,04^{aB}$ EU/mg) grubu olup en düşük enzim spesifik aktivitesine sahip uygulama ise hipoksi ($1,84 \pm 0,02^{cC}$ EU/mg) grubudur. Kontrol ($2,76 \pm 0,04^{bB}$ EU/mg), hipoksi ve hiperoksi uygulamaları arasında istatistiki açıdan önemli değişimler mevcuttur. 24.

saatte kontrol ($2,35\pm 0,02^{aBC}$ EU/mg) ve hiperoksi ($2,45\pm 0,11^{aC}$ EU/mg) uygulamaları en yüksek enzim spesifik aktivite değerlerine sahip olup aralarında istatistiki açıdan anlamlı bir değişim yoktur. Hipoksi ($1,66\pm 0,03^{bD}$ EU/mg) uygulaması en düşük enzim spesifik aktivitesine sahiptir. Hipoksi uygulamasının kontrol ve hiperoksi uygulamalarına göre aktivite değerlerindeki azalış anlamlı olarak bulunmuştur. 48. saatte en yüksek enzim aktivitesi gösteren uygulama kontrol ($2,38\pm 0,01^{aBC}$ EU/mg) grubu görülmekteyken en düşük enzim aktivitesi gösteren grup ise hipoksi ($1,56\pm 0,04^{cD}$ EU/mg) olarak karşımıza çıkmaktadır. Her bir uygulama arasındaki enzim spesifik aktivite değerleri kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı değişimler göstermiştir. 72. saatte kontrol ($2,19\pm 0,01^{aC}$ EU/mg) ve hipoksi ($2,14\pm 0,05^{aAB}$ EU/mg) grupları hiperoksiye göre yüksek enzim spesifik aktivite gösteren uygulamalardır. Kontrol ve hipoksi uygulamaları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Kontrol ve hipoksi uygulamalarına göre hiperoksi ($1,39\pm 0,14^{bE}$ EU/mg) uygulamasının enzim spesifik aktivite değerinde bir azalma meydana gelmiş ve bu istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. 28. günde kontrol ($3,52\pm 0,34^{aA}$ EU/mg) ve hiperoksi ($3,53\pm 0,03^{aA}$ EU/mg) uygulamaları en yüksek enzim spesifik aktivite değerlerini gösterirken hipoksi ($2,07\pm 0,08^{bB}$ EU/mg) uygulaması ise en düşük aktiviteyi göstermiştir. İstatistiki bakımdan kontrol ve hiperoksi uygulamaları arasında anlamlı bir değişim gözlenmezken hipoksi uygulamasında kontrol ve hiperoksiye nazaran anlamlı bir düşüş gözlenmiştir.

Tüm zamanlarda hiperoksi uygulamasına bakıldığında en düşük enzim spesifik aktivitesini 72. saatte görmekteyiz. 48. saatte enzim spesifik aktivitesi 72. saate göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak artmıştır. 48. saatteki enzim spesifik aktivitesine göre 6. ve 24. saatlerdeki aktivite artışı anlamlı bulunmuştur. 6. ve 24. saatler arasında istatistiksel olarak spesifik aktivite bakımından önemli bir değişim gözlenmeyip 12. saatteki spesifik enzim aktivite değerinde 6. ve 24. saatlere göre anlamlı bir artış gözlenmektedir. En yüksek enzim spesifik aktivitesi 28. günde anlamlı bir artış olarak görülmüştür. Hipoksi uygulamasını ele aldığımızda ise 6. saatte en yüksek enzim spesifik aktivitesi görülmüştür. En düşük enzim spesifik aktivite gösteren 24. ile 48.

saatler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmezken diğer gruplar arasındaki fark önemli bulunmuştur (Şekil 4.42 ve Çizelge 4.11).



Şekil 4.42. Karaciğer dokusuna ilişkin GR enzimi spesifik aktivite seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

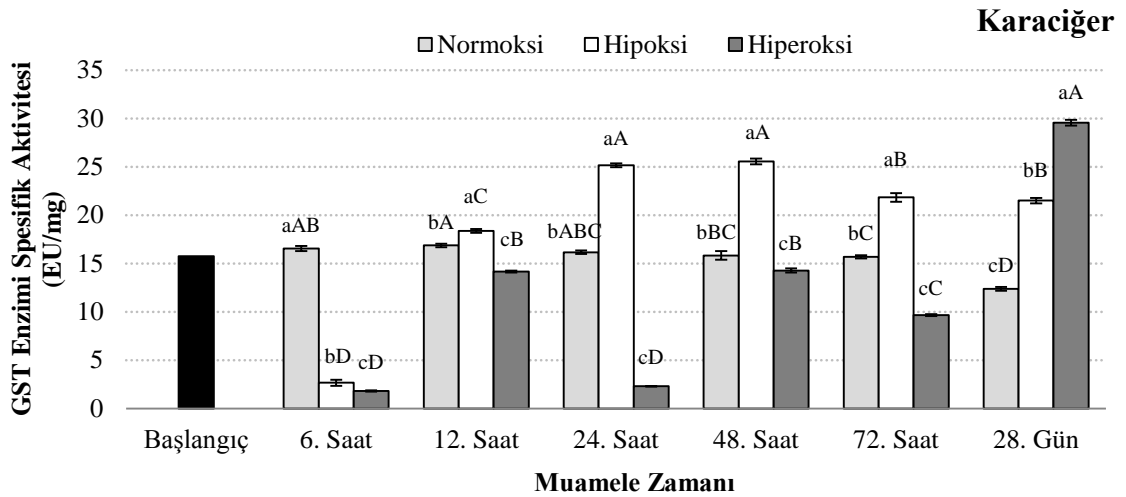
4.7.1.5. Karaciğer dokusuna ilişkin Glutatyon-S-Transferaz enzimi spesifik aktivite bulguları

Karaciğer dokusunda GST enzimi spesifik aktiviteleri kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saat göz önünde bulundurulduğunda kontrol ($16,54 \pm 0,27^{aAB}$ EU/mg) grubuna nazaran hipoksi ($2,66 \pm 0,30^{bD}$ EU/mg) ve hiperoksi ($1,82 \pm 0,07^{cD}$ EU/mg) uygulamalarının spesifik enzim aktivite değerlerinde önemli derecede azalma gözlemlenmiştir. En yüksek enzim spesifik aktivitesi kontrol uygulamasında gözlenirken en düşük enzim spesifik aktivite değeri ise hiperoksi uygulamasında görülmektedir. İstatistiki açıdan hipoksi ($2,66 \pm 0,30^{bD}$ EU/mg), hiperoksi ($1,82 \pm 0,07^{cD}$ EU/mg) ve kontrol ($16,54 \pm 0,27^{aAB}$ EU/mg) uygulamaları arasındaki spesifik enzim aktivite değişimleri önemli bulunmuştur. 12. saatte hipoksi ($18,36 \pm 0,19^{aC}$ EU/mg) uygulamasının enzim spesifik

aktivite değeri kontrol ($16,87 \pm 0,19^{bA}$ EU/mg) uygulamasına kıyasla yüksek bulunmuştur. Hiperoksi ($14,17 \pm 0,09^{cB}$ EU/mg) uygulamasının spesifik enzim aktivite değeri kontrol ve hipoksi uygulamalarının spesifik enzim aktivite değerlerinden anlamlı derecede düşük bulunmuştur. En düşük enzim aktivitesi gösteren grup hiperoksi olup en yüksek enzim aktivitesi gösteren grup ise hipoksi grubu olmuştur. 24. saatte en yüksek aktivite gösteren uygulama hipoksi ($25,16 \pm 0,19^{aA}$ EU/mg) uygulaması olup en düşük aktivite gösteren uygulama ise hiperoksi ($2,30 \pm 0,01^{cD}$ EU/mg) uygulamasıdır. İstatistiksel anlamda her bir uygulamanın enzim spesifik aktivite değerleri arasında önemli derecede fark olduğu belirlenmiştir. 48. saatte hipoksi ($25,56 \pm 0,29^{aA}$ EU/mg) uygulaması, kontrol ($15,83 \pm 0,44^{bBC}$ EU/mg) uygulaması ile kıyaslandığında enzim spesifik aktivite ölçüm değeri önemli derecede yüksek bulunmuştur. En düşük enzim spesifik aktivitesi gösteren uygulama hiperoksi ($14,27 \pm 0,22^{cB}$ EU/mg) uygulaması olup en yüksek spesifik enzim aktivitesi gösteren uygulama hipoksi uygulaması olmuştur. Uygulamalar arasındaki fark istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. 72. saatte enzim spesifik aktivite değerleri bakımından hipoksi ($21,83 \pm 0,44^{aB}$ EU/mg) uygulaması kontrol ($15,68 \pm 0,16^{bC}$ EU/mg) uygulamasına nazaran artarken, hiperoksi ($9,65 \pm 0,10^{cC}$ EU/mg) uygulaması ise azalmaktadır. En yüksek enzim aktivitesi gösteren grup hipoksi olurken en düşük enzim aktivitesi gösteren grup ise hiperoksi olmuştur. İstatistiki açıdan farklılıkların önemli olduğu bulgular arasındadır. 28. günde kontrol uygulamasına göre hipoksi ($21,50 \pm 0,29^{bB}$ EU/mg) ve hiperoksi ($29,55 \pm 0,30^{aA}$ EU/mg) uygulamalarının enzim spesifik aktivite değerlerinin arttığı gözlemlenmiştir. En düşük enzim spesifik aktivitesi gösteren uygulama kontrol ($12,38 \pm 0,20^{cD}$ EU/mg) uygulaması olmuştur. En yüksek enzim aktivitesi hiperoksi uygulamasında görülmüştür. İstatistiksel anlamda uygulamalar arasındaki enzim spesifik aktivite değerlerinde önemli değişmelerin mevcut olduğu belirlenmiştir.

Tüm zamanlardaki hiperoksi uygulamaları dikkate alındığında en yüksek ekspresyon seviyesi 28. günde görülmektedir. 6. saat ile 24. saatteki hiperoksi uygulamaları en düşük enzim spesifik aktivite değerlerine sahip olduğu belirlenip aralarındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. 6. ve 24. saatlere kıyasla 72. saatte enzim

aktivitesinde önemli derecede artış meydana gelmiştir. 12. ve 48. saatler arasında enzim aktivitesinde önemli bir değişim gözlemlenmeyip 72. saatteki enzim aktivitesine oranla önemli derecede artış olduğu görülmektedir. Hipoksi uygulamasında ise en yüksek enzim aktivitesi 24. ile 48. saatlerde görülmüş olup bu saatler arasında istatistiksel açıdan önemli bir değişim olmadığı tespit edilmiştir. İstatistiksel açıdan 72. saat ile 28. gün arasındaki enzim spesifik aktivitesinde önemli bir değişim bulunmazken 24. ve 48. saatler ile kıyaslandığında enzim aktivitesinde önemli bir düşüş gözlemlenmiştir. 12. saatteki enzim aktivitesi istatistiki bakımdan 72. saat ve 28. güne kıyasla önemli derecede düşüş göstermiştir. En düşük enzim aktivitesi 6. saatte karşımıza çıkmaktadır. 6. saat istatistiksel olarak değerlendirildiğinde diğer zamanlara kıyasla önemli derecede düşük enzim aktivitesi göstermektedir. Kontrol uygulaması için tüm zamanlara bakıldığında en düşük spesifik enzim aktivite değeri 28. günde karşımıza çıkmaktadır. En yüksek enzim aktivite değeri ise 12. saatte görülmektedir. Diğer zamanlarda ise spesifik enzim aktivite değerleri arasında benzerlikler görülmektedir (Şekil 4.43 ve Çizelge 4.11).



Şekil 4.43. Karaciğer dokusuna ilişkin GST enzimi spesifik aktivite seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

Çizelge 4.11. Karaciğer dokusuna ilişkin SOD, CAT, GPx, GR ve GST enzimleri spesifik aktivite seviyeleri değerleri (EU/mg)

| Enzim | Muamele | Akut etki | | | | | Kronik etki |
|-------|-----------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | Saatler | | | | | Gün |
| | | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 | 28 |
| SOD | Normoksi | 0,18±0,0 ^{aAB} | 0,19±0,01 ^{aAB} | 0,17±0,01 ^{aB} | 0,21±0,01 ^{aA} | 0,21±0,01 ^{aA} | 0,42±0,05 ^{aA} |
| | Hipoksi | 0,07±0,01 ^{cC} | 0,13±0,0 ^{bB} | 0,15±0,02 ^{aB} | 0,21±0,02 ^{aA} | 0,11±0,01 ^{bBC} | 0,11±0,01 ^{bBC} |
| | Hiperoksi | 0,13±0,01 ^{bB} | 0,20±0,0 ^{aA} | 0,13±0,01 ^{aB} | 0,13±0,01 ^{bB} | 0,08±0,0 ^{bC} | 0,17±0,02 ^{bAB} |
| CAT | Normoksi | 68,26±0,27 ^{bB} | 70,18±1,15 ^{bB} | 69,41±1,24 ^{cB} | 67,67±1,45 ^{cB} | 65,00±2,65 ^{bB} | 78,33±1,76 ^{bA} |
| | Hipoksi | 12,27±0,82 ^{cD} | 43,01±1,86 ^{cC} | 82,56±1,38 ^{bA} | 74,06±1,21 ^{bB} | 70,42±1,53 ^{bB} | 84,13±1,78 ^{aA} |
| | Hiperoksi | 110,90±1,59 ^{aC} | 151,97±2,53 ^{aA} | 120,37±1,67 ^{cB} | 94,37±0,86 ^{aD} | 84,52±1,27 ^{aE} | 39,78±0,91 ^{cF} |
| GPx | Normoksi | 0,34±0,02 ^{aA} | 0,33±0,01 ^{aA} | 0,33±0,02 ^{bAB} | 0,28±0,01 ^{aB} | 0,33±0,01 ^{bAB} | 0,16±0,01 ^{bC} |
| | Hipoksi | 0,32±0,03 ^{aB} | 0,14±0,01 ^{bC} | 0,48±0,01 ^{aA} | 0,07±0,0 ^{cE} | 0,10±0,01 ^{cDE} | 0,12±0,01 ^{bCD} |
| | Hiperoksi | 0,23±0,12 ^{bC} | 0,36±0,01 ^{aB} | 0,18±0,01 ^{cD} | 0,20±0,01 ^{bCD} | 0,61±0,01 ^{aA} | 0,35±0,01 ^{aB} |
| GR | Normoksi | 2,69±0,01 ^{aB} | 2,76±0,04 ^{bB} | 2,35±0,02 ^{aBC} | 2,38±0,01 ^{aBC} | 2,19±0,01 ^{aC} | 3,52±0,34 ^{aA} |
| | Hipoksi | 2,28±0,06 ^{bA} | 1,84±0,02 ^{cC} | 1,66±0,03 ^{bD} | 1,56±0,04 ^{cD} | 2,14±0,05 ^{aAB} | 2,07±0,08 ^{bB} |
| | Hiperoksi | 2,37±0,05 ^{bC} | 2,87±0,04 ^{aB} | 2,45±0,11 ^{aC} | 2,10±0,06 ^{bD} | 1,39±0,14 ^{bE} | 3,53±0,03 ^{aA} |
| GST | Normoksi | 16,54±0,27 ^{aAB} | 16,87±0,19 ^{bA} | 16,17±0,17 ^{bABC} | 15,83±0,44 ^{bBC} | 15,68±0,16 ^{bC} | 12,38±0,20 ^{cD} |
| | Hipoksi | 2,66±0,30 ^{bD} | 18,36±0,19 ^{aC} | 25,16±0,19 ^{aA} | 25,56±0,29 ^{aA} | 21,83±0,44 ^{aB} | 21,50±0,29 ^{bB} |
| | Hiperoksi | 1,82±0,07 ^{cD} | 14,17±0,09 ^{cB} | 2,30±0,01 ^{cD} | 14,27±0,22 ^{cB} | 9,65±0,10 ^{cC} | 29,55±0,30 ^{aA} |

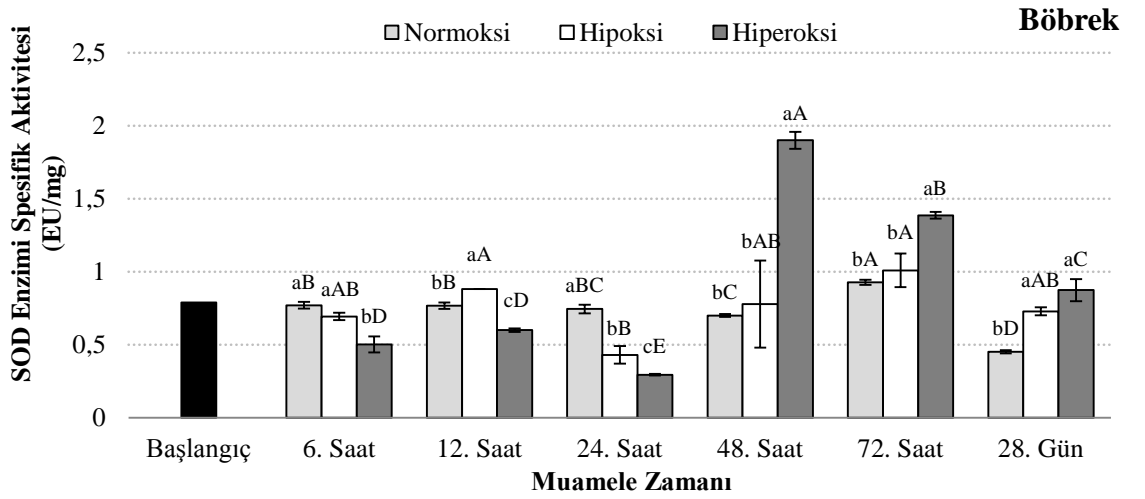
4.7.2. Böbrek dokusuna ilişkin antioksidan enzimleri spesifik aktivite bulguları

4.7.2.1. Böbrek dokusuna ilişkin Süperoksit Dismütaz enzimi spesifik aktivite bulguları

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki böbrek dokusu SOD enzimi spesifik aktiviteleri birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte enzim spesifik aktivitesi en düşük olan grup hiperoksi ($0,50 \pm 0,05^{bD}$ EU/mg) grubu olup en yüksek enzim spesifik aktivitesi gösteren gruplar ise kontrol ($0,77 \pm 0,02^{aB}$ EU/mg) ve hipoksi ($0,69 \pm 0,02^{aAB}$ EU/mg) grupları olmuştur. Kontrol ve hipoksi grupları arasında istatistiki açıdan önemli bir fark gözlemlenmemiştir. 12. saatte ise hipoksi ($0,88 \pm 0,0^{aA}$ EU/mg) uygulamasında en yüksek enzim spesifik aktivitesi ölçülmüştür. En düşük enzim spesifik aktivitesi hiperoksi ($0,60 \pm 0,01^{cD}$ EU/mg) olarak karşımıza çıkmaktadır. Kontrol ($0,77 \pm 0,02^{bB}$ EU/mg), hipoksi ($0,88 \pm 0,0^{aA}$ EU/mg) ve hiperoksi ($0,60 \pm 0,01^{cD}$ EU/mg) istatistiksel olarak değerlendirildiğinde aralarındaki değişim önemli bulunmuştur. 24. saatte en yüksek enzim spesifik aktivitesi kontrol ($0,74 \pm 0,03^{aBC}$ EU/mg) grubudur. Hiperoksi ($0,29 \pm 0,01^{cE}$ EU/mg) ise en düşük enzim spesifik aktivitesine sahiptir. Gruplar arasındaki değişimler istatistiksel açıdan önemlidir. 48. saatte en yüksek enzim spesifik aktivitesi hiperoksi ($0,90 \pm 0,06^{aA}$ EU/mg) grubunda görülmektedir. Kontrol ($0,70 \pm 0,01^{bC}$ EU/mg) ve hipoksi ($0,78 \pm 0,30^{bAB}$ EU/mg) grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık gözlenmezken hiperoksi grubu bunlardan önemli derecede yükselmiş olarak bulunmuştur. 72. saatte en yüksek enzim spesifik aktivitesi hiperoksi ($1,39 \pm 0,02^{aB}$ EU/mg) grubunda görülmektedir. Hiperoksi grubu ile kıyaslandığında hipoksi ($1,01 \pm 0,11^{bA}$ EU/mg) ve kontrol ($0,93 \pm 0,02^{bA}$ EU/mg) gruplarının enzim aktivite değerlerinde önemli düşüş meydana gelmiştir. Kontrol ve hipoksi grupları arasındaki fark önemsizdir. 28. günde hipoksi ($0,73 \pm 0,03^{aAB}$ EU/mg) ve hiperoksi ($0,87 \pm 0,08^{aC}$ EU/mg) en yüksek enzim spesifik aktivitesinin görüldüğü gruplar olup aralarındaki değişim istatistiki açıdan önemsizdir. Kontrol ($0,45 \pm 0,01^{bD}$ EU/mg) grubu ise en düşük enzim spesifik aktivitesini gösteren gruptur.

Hiperoksi uygulaması için tüm zamanlara bakıldığında en düşük enzim spesifik aktivitesi 24. saatte görülmüştür. 6. ve 12. saatlerde enzim spesifik aktiviteleri aralarında istatistiksel olarak önemli bir değişme gözlenmezken 24. saate oranla önemli derecede artmıştır. 28. günde enzim aktivitesi 6. ve 12. saatlere oranla önemli derecede artmıştır. 72. saatte 28. güne kıyasla enzim aktivitesi önemli derecede artış göstermiştir. En yüksek enzim aktivitesi gösteren zaman 48. saattir.

Hipoksi uygulamasında en yüksek enzim spesifik aktivitesi 12. saat ile 28. günde gözlemlenmekteyken en düşük enzim spesifik aktivitesi 24. saatte gözlemlenmiştir. Diğer zamanlarda ise spesifik enzim aktivite değerleri arasında benzerlikler görülmektedir. Kontrol gruplarında 28. gün en düşük enzim spesifik aktiviteye sahiptir. En yüksek enzim spesifik aktivite ise 72. saatte görülmektedir. Diğer zamanlarda ise spesifik enzim aktivite değerleri arasında benzerlikler görülmektedir (Şekil 4.44 ve Çizelge 4.12).



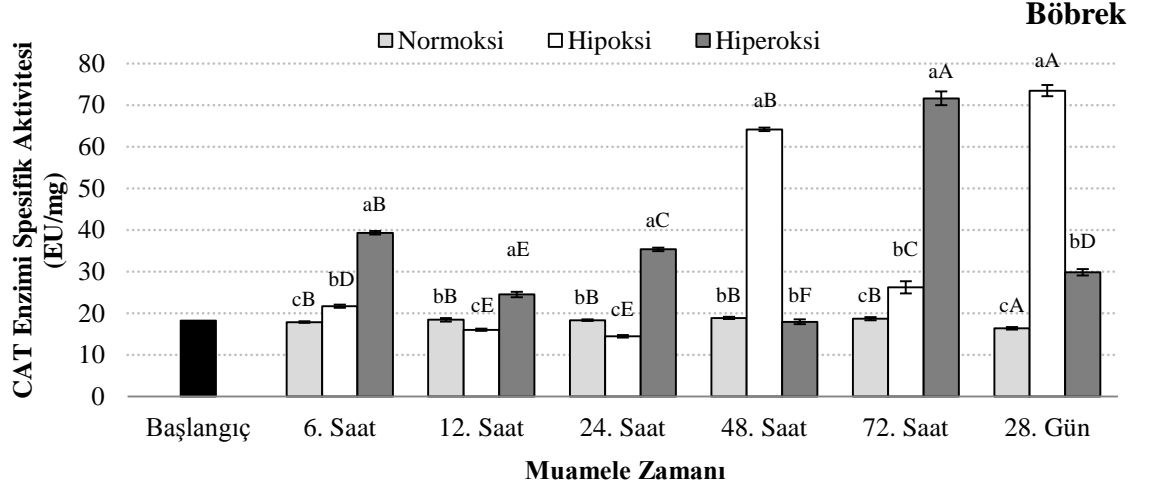
Şekil 4.44. Böbrek dokusuna ilişkin SOD enzimi spesifik aktivite seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.7.2.2. Böbrek dokusuna ilişkin Katalaz enzimi spesifik aktivite bulguları

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki böbrek dokusu CAT enzimi spesifik aktiviteleri birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi uygulamasında kontrole kıyasla yüksek spesifik aktivite seviyesi ($21,68 \pm 0,40^{bD}$ EU/mg) görülürken istatistiki açıdan önemli olduğu bulunmuştur. Hiperoksi uygulaması da kontrole göre önemli derecede artış ($39,32 \pm 0,40^{aB}$ EU/mg) sergilemiştir. 12. saatte hipoksi uygulaması ($16,04 \pm 0,27^{cE}$ EU/mg) kontrole göre önemli derecede azalış göstermiştir. En yüksek spesifik aktivitenin ise kontrole kıyasla ($24,51 \pm 0,64^{aE}$ EU/mg) ile hiperoksi grubunda istatistiki açıdan önemli olduğu karşımıza çıkmaktadır. 24. saatte hipoksi uygulaması kontrole kıyasla ($14,46 \pm 0,28^{cE}$ EU/mg) azalış göstermiş ve bu azalış istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. En yüksek spesifik aktivite değeri hiperoksi uygulamasıdır ($35,35 \pm 0,43^{aC}$ EU/mg) ve bu fark önemli bulunmuştur. 48. saatte böbrek dokusundaki CAT enzimi spesifik aktivitesi istatistiki açıdan dikkate alındığında hipoksi de önemli derecede artış gözlenmiştir. Hiperoksi gruplarında ise azalış gözlemlenmiş ve bu değerler istatistiki açıdan önemsiz olarak belirlenmiştir. 72. saatte hipoksi grubunda ($26,21 \pm 0,47^{bC}$ EU/mg) kontrole kıyasla bir önemli derecede artış gözlenmiştir. Hiperoksi grubunda ($71,63 \pm 1,64^{aA}$ EU/mg) bir artış meydana geldiği gözlemlenmiştir. Aktivite farkı ise istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. 28. günde CAT enzimi spesifik aktivitesi kontrole göre en yüksek hipoksi grubunda ($73,48 \pm 1,37^{aA}$ EU/mg) olup istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Hiperoksi grubunda ($29,84 \pm 0,74^{bD}$ EU/mg) artış görülmekte ve bu değer istatistiksel açıdan önemli olduğu görülmektedir.

Tüm zamanlardaki hipoksi muamelelerinin enzim aktiviteleri kıyaslandığında; En düşük enzim aktivitesi 24. saat olup 12. saat hariç diğer zamanlara göre farkı önemli bulunmuştur. 48. saat ve 28. gün enzim aktivitesi diğer saatlerdeki enzim aktivitelerine göre önemli olarak artış göstermişlerdir. En yüksek enzim aktivitesinin ise 28. günde olduğu ve bu artışın istatistiksel açıdan önemli olduğu bulunmuştur. Hiperoksi uygulamasında en düşük aktivite 48. saatte gözlemlenmiş ve fark önemli bulunmuştur.

En fazla aktivite ise 72. saatte gözlenmiş olup diğerlerinden önemli derecede farklılık göstermiştir. Tüm zamanlardaki enzim aktivitesi birbirleri ile kıyaslandığında istatistiksel değerlerin önemli olduğu bulunmuştur (Şekil 4.45 ve Çizelge 4.12).



Şekil 4.45. Böbrek dokusuna ilişkin CAT enzimi spesifik aktivite seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

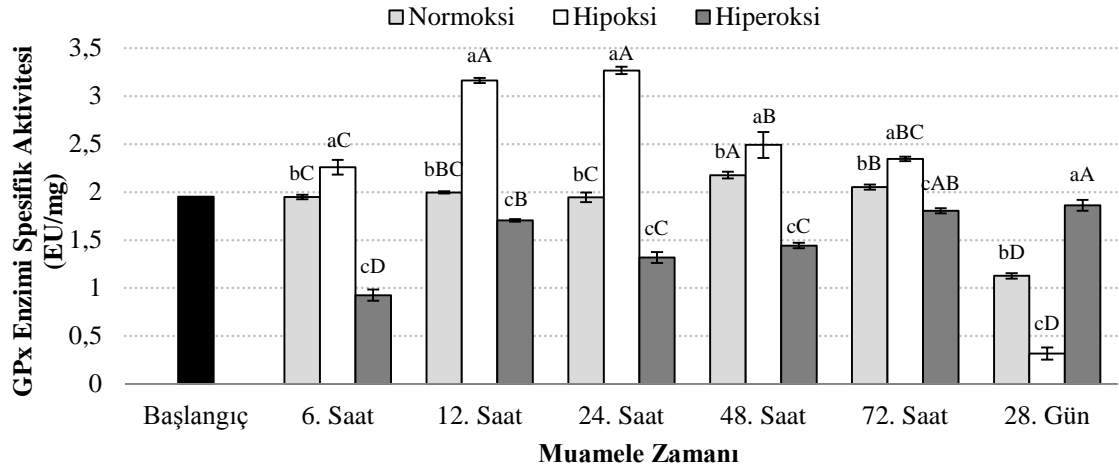
4.7.2.3. Böbrek dokusuna ilişkin Glutasyon Peroksidaz enzimi spesifik aktivite bulguları

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki böbrek dokusu GPx enzimi spesifik aktiviteleri birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi uygulamasında en yüksek spesifik aktivite seviyesi ($2,26 \pm 0,08^{aC}$ EU/mg) görülürken istatistiki açıdan önemli olduğu bulunmuştur. Hiperoksi ($0,93 \pm 0,06^{cD}$ EU/mg) uygulaması da kontrole ($1,95 \pm 0,02^{bC}$ EU/mg) göre azalış sergilemiş olup en düşük enzim aktivitesine sahiptir. 12. saatte hipoksi uygulaması en yüksek spesifik aktivite seviyesini ($3,16 \pm 0,03^{aA}$ EU/mg) göstermektedir. En düşük spesifik aktivitenin ise kontrole kıyasla $1,71 \pm 0,01^{cB}$ EU/mg ile hiperoksi grubunda önemli bir şekilde olduğu ve istatistiki açıdan önemli olduğu karşımıza çıkmaktadır. 24. saatte hipoksi ($3,27 \pm 0,04^{aA}$ EU/mg) uygulaması

kontrole kıyasla artış göstermiş ve en yüksek spesifik aktiviteye sahip grup bulunmuştur. En düşük spesifik aktivite değeri hiperoksi uygulamasıdır ($1,32 \pm 0,06^{cC}$ EU/mg). İstatistiki açıdan fark önemli bulunmuştur. 48. saatte böbrek dokusundaki GPx enzimi spesifik aktivitesinde hipoksi ($2,49 \pm 0,13^{aB}$ EU/mg) en yüksek aktiviteye sahip grup olup istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Tüm gruplara bakıldığında en düşük enzim spesifik aktivitesi hiperoksi ($1,44 \pm 0,03^{cC}$ EU/mg) grubu olduğu gözlenmiştir. 72. saatte hiperoksi grubunda ($1,81 \pm 0,03^{cAB}$ EU/mg) kontrole kıyasla bir azalış gözlenmiş iken hipoksi grubunda ($2,35 \pm 0,02^{aBC}$ EU/mg) bir artış meydana geldiği gözlemlenmiştir. Aktivite farkı ise istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. 28. günde GPx enzimi spesifik aktivitesi kontrole göre en yüksek hiperoksi grubunda ($1,86 \pm 0,06^{aA}$ EU/mg) olup istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. En düşük enzim aktivitesi hipoksi grubunda ($0,32 \pm 0,06^{cD}$ EU/mg) görülmekte ve bu düşüşün istatistiksel açıdan önemli olduğu görülmektedir.

Tüm zamanlardaki hipoksi muamelelerinin spesifik enzim aktivitesi kıyaslanırsa; En düşük aktivite 28. günde olup diğer zamanlara göre farkı önemli bulunmuştur. 12. ve 24. saatlerdeki aktivite değerleri diğer muamele gruplarına göre önemli olarak artış göstermişler ve kendi aralarında değerlendirildiğinde ise farkın önemli olduğu gözlenmiştir. En yüksek enzim aktivitesinin ise 12. ve 24. saatlerde olduğu ve bu artışın istatistiksel açıdan önemli olduğu bulunmuştur. Hiperoksi uygulamasında en düşük ekspresyon birbirleri arasında fark önemsiz olmaksızın 6., 24. ve 48. saatlerde bulunmuştur. 72. saat ve 28. gün spesifik enzim aktivitesi ise bunlardan önemli derecede artış göstermiştir. En yüksek aktivite $1,86 \pm 0,06^{aA}$ EU/mg olarak 28. günde gerçekleşmiştir. Tüm zamanlardaki enzim aktivitelerinden istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur (Şekil 4.46 ve Çizelge 4.12).

Böbrek



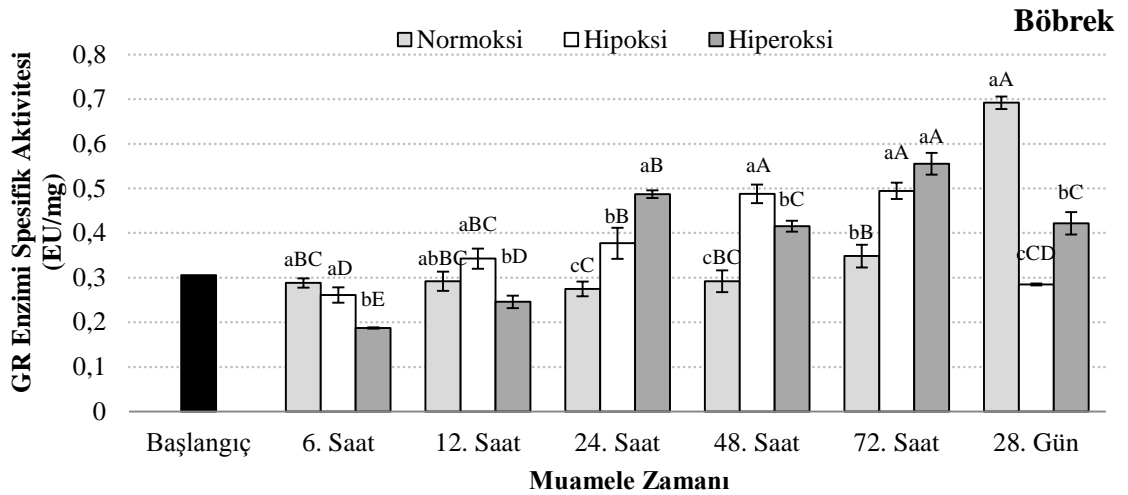
Şekil 4.46. Böbrek dokusunda GPx enzimi spesifik aktivite seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.7.2.4. Böbrek dokusuna ilişkin Glutatyon Redüktaz enzimi spesifik aktivite bulguları

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki böbrek dokusu GR enzimi spesifik aktiviteleri birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi uygulaması ($0,26 \pm 0,02^{aD}$ EU/mg) kontrole ($0,29 \pm 0,01^{aBC}$ EU/mg) kıyasla azalış göstermiş ve bu azalış istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. Hiperoksi ($0,19 \pm 0,0^{bE}$ EU/mg) uygulama ile kontrole göre önemli derecede azalış bulunmuştur. 12. saatte gruplar istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde enzim aktivite seviyelerinde hipoksi ve hiperoksi, kontrol ile karşılaştırıldığında önemli derecede farklılık gözlenmemiştir. En yüksek artışın $0,34 \pm 0,02^{aBC}$ EU/mg ile hipoksi grubunda, en düşük spesifik aktivite değerinin ise hiperoksidede ($0,25 \pm 0,01^{bD}$ EU/mg) olduğu gözlenmiştir. 24. saatte hipoksi ($0,38 \pm 0,03^{bB}$ EU/mg) ve hiperoksi ($0,49 \pm 0,01^{aB}$ EU/mg) gruplarında istatistiki açıdan fark gözlenirken kontrole kıyaslandığında önemli bir artış gözlenmiştir. 48. saatte hipoksi uygulaması ($0,49 \pm 0,02^{aA}$ EU/mg) hem kontrole hem de hiperoksiye göre önemli derecede artmıştır. Bu veriler ışığında görülmektedir ki en düşük spesifik aktivite

kontrol ($0,42 \pm 0,01^{bc}$ EU/mg) grubundadır ve istatistiki açıdan önemli bulunduğu karşımıza çıkmaktadır. 72. saatte hiperoksi ($0,56 \pm 0,02^{aA}$ EU/mg) grubunda en yüksek spesifik aktivite görülmektedir. Muameleler dikkate alındığında hipoksi ve hiperoksi, kontrole ($0,35 \pm 0,03^{bB}$ EU/mg) göre kıyaslandığında istatistiki açıdan önemli bir artış bulunmuştur. 28. günde muamele grupları arasından kontrol ($0,69 \pm 0,01^{aA}$ EU/mg) en yüksek enzim aktivitesine sahip gruptur. Hipoksi ve hiperoksi grupları kontrole göre kıyaslandığında istatistiki açıdan önemli derecede azaldığı gözlenmiştir. En düşük enzim aktivitesine sahip olan grup hipoksi ($0,28 \pm 0,0^{cCD}$ EU/mg)'dir.

Zamanlar arasındaki spesifik enzim aktivite değişimi muamelelere bağlı olarak değerlendirildiğinde; Hipoksi uygulamasında en yüksek spesifik aktivite değerini 48. ve 72. saatte görmekteyiz. Bu fark aralarında istatistiki olarak önemli bulunmamışken diğer muamele grupları arasında önemli bulunmuştur. En düşük ekspresyon ise 6. saatte gözlenmiş ve bu azalış diğer zamanlara göre önemli olarak karşımıza çıkmıştır. Hiperoksi uygulamasında en yüksek değer 72. saatte olup sonraki yüksek değer 24. saattedir. 48. saat ile 28. günün istatistiksel açıdan farkları önemsiz bulunmuştur. En düşük değer ise yine 6. saatte karşımıza çıkmaktadır (Şekil 4.47 ve Çizelge 4.12).



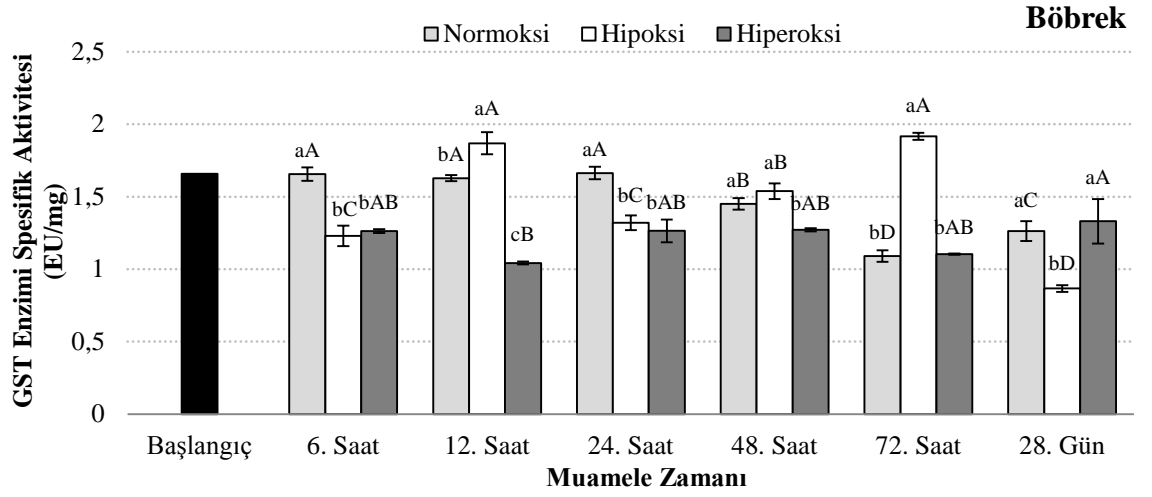
Şekil 4.47. Böbrek dokusuna ilişkin GR enzimi spesifik aktivite seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.7.2.5. Böbrek dokusuna ilişkin Glutatyon-S-Transferaz enzimi spesifik aktivite bulguları

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki böbrek dokusu GST enzimi spesifik aktiviteleri birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi ($1,23 \pm 0,07^{bC}$ EU/mg) ve hiperoksi ($1,26 \pm 0,01^{bAB}$ EU/mg) uygulamaları kontrole kıyasla ($1,66 \pm 0,05^{aA}$ EU/mg) önemli derecede azalış göstermiş iken aralarındaki fark önemsizdir. 12. saatte gruplar istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde enzim aktivite seviyelerinde kontrol ile karşılaştırıldığında farklılıklar gözlenmiştir. En yüksek artışın $1,87 \pm 0,08^{aA}$ EU/mg ile hipoksi grubunda olduğu görülmüştür. En düşük spesifik aktivite değeri ise hiperokside ($1,04 \pm 0,01^{cB}$ EU/mg) gözlenmiştir. 24. saatte hipoksi ($1,32 \pm 0,05^{bC}$ EU/mg) ve hiperoksi ($1,26 \pm 0,08^{bAB}$ EU/mg) gruplarında istatistiki açıdan bir fark gözlenmezken kontrole kıyaslandığında bir düşüş gözlenmiş ve kontrolle aralarında istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. 48. saatte hipoksi uygulaması en yüksek spesifik aktivite seviyesini ($1,54 \pm 0,05^{aB}$ EU/mg) göstermektedir ve kontrole göre fark önemsizdir. Kontrole ($1,45 \pm 0,04^{aB}$ EU/mg) kıyasla hiperoksi ($1,27 \pm 0,01^{bAB}$ EU/mg) grubundadır ve istatistiki açıdan önemli bulunduğu karşımıza çıkmaktadır. 72. saatte hipoksi ($1,92 \pm 0,02^{aA}$ EU/mg) grubunda önemli derecede en yüksek spesifik aktivite görülmektedir. Muameleler dikkate alındığında hiperoksi kontrole göre kıyaslandığında istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. 28. günde muamele grupları arasından hiperoksi grubu ($1,33 \pm 0,15^{aA}$ EU/mg) en yüksek enzim aktivitesine sahiptir. Hiperoksi grubu kontrole göre kıyaslandığında istatistiki açıdan önemsiz bulunduğu gözlenmiştir. En düşük enzim aktivitesine sahip olan grup $0,87 \pm 0,02^{bD}$ EU/mg sahip olan hipoksidir ve hem kontrol hem de hiperoksiye nazaran önemli derecede azalmıştır.

Tüm zamanlardaki hipoksi uygulaması dikkate alındığında en düşük spesifik enzim aktivitesi kendi aralarında farkın önemsiz olduğu 6., 24. saatler ve 28. gündedir. 12. ve 72. saatlerdeki aktiviteler 24. saat ve 28. gündeki enzim aktivitelerine göre anlamlı

olarak yüksek bulunmuş ancak kendi aralarında fark önemsiz bulunmuştur. 6. ve 48. saatlerdeki spesifik enzim aktivitesi, en yüksek değere sahip 12. ve 72. saatlerdeki spesifik aktiviteye göre düşük olmasına rağmen diğer tüm zamanlardan önemli seviyede yüksek olarak bulunmuştur. Hiperoksi uygulaması dikkate alındığında en düşük aktivite 12. saatte bulunmuştur. 6., 24., 48. ve 72. saatlerdeki aktiviteler arasında önemsiz bir değişim varken 12. saat ve 28. gündeki aktiviteleri kıyasladığımızda değişimin önemli olduğunu görmekteyiz. En yüksek spesifik enzim aktivitesi ise 28. günde karşımıza çıkmıştır (Şekil 4.48 ve Çizelge 4.12).



Şekil 4.48. Böbrek dokusuna ilişkin GST enzimi spesifik aktivite seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

Çizelge 4.12. Böbrek dokusuna ilişkin SOD, CAT, GPx, GR ve GST enzimi spesifik aktivite seviyeleri değerleri (EU/mg)

| Enzim | Muamele | Akut etki | | | | | Kronik etki |
|-------|-----------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | Saatler | | | | | Gün |
| | | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 | 28 |
| SOD | Normoksi | 0,77±0,02 ^{ab} | 0,77±0,02 ^{bb} | 0,74±0,03 ^{abc} | 0,70±0,01 ^{bc} | 0,93±0,02 ^{ba} | 0,45±0,01 ^{bd} |
| | Hipoksi | 0,69±0,02 ^{aAB} | 0,88±0,0 ^{aA} | 0,43±0,06 ^{bb} | 0,78±0,30 ^{baB} | 1,01±0,11 ^{ba} | 0,73±0,03 ^{aAB} |
| | Hiperoksi | 0,50±0,05 ^{bd} | 0,60±0,01 ^{cd} | 0,29±0,01 ^{ce} | 0,90±0,06 ^{aA} | 1,39±0,02 ^{aB} | 0,87±0,08 ^{aC} |
| CAT | Normoksi | 17,87±0,19 ^{ca} | 18,43±0,39 ^{ba} | 18,33±0,19 ^{ba} | 18,85±0,27 ^{ba} | 18,67±0,39 ^{ca} | 16,41±0,31 ^{cb} |
| | Hipoksi | 21,68±0,40 ^{bd} | 16,04±0,27 ^{ce} | 14,46±0,28 ^{ce} | 64,17±0,44 ^{ab} | 26,21±1,47 ^{bc} | 73,48±1,37 ^{aA} |
| | Hiperoksi | 39,32±0,40 ^{ab} | 24,51±0,64 ^{ae} | 35,35±0,43 ^{ac} | 17,95±0,58 ^{bf} | 71,63±1,64 ^{aA} | 29,84±0,74 ^{bd} |
| GPx | Normoksi | 1,95±0,02 ^{bc} | 2,00±0,01 ^{bbc} | 1,95±0,05 ^{bc} | 2,18±0,04 ^{ba} | 2,05±0,03 ^{bb} | 1,13±0,03 ^{bd} |
| | Hipoksi | 2,26±0,08 ^{ac} | 3,16±0,03 ^{aA} | 3,27±0,04 ^{aA} | 2,49±0,13 ^{ab} | 2,35±0,02 ^{abc} | 0,32±0,06 ^{cd} |
| | Hiperoksi | 0,93±0,06 ^{cd} | 1,71±0,01 ^{cb} | 1,32±0,06 ^{cc} | 1,44±0,03 ^{cc} | 1,81±0,03 ^{cAB} | 1,86±0,06 ^{aA} |
| GR | Normoksi | 0,29±0,01 ^{abc} | 0,29±0,02 ^{abBC} | 0,27±0,02 ^{cc} | 0,29±0,02 ^{cBC} | 0,35±0,03 ^{bb} | 0,69±0,01 ^{aA} |
| | Hipoksi | 0,26±0,02 ^{ad} | 0,34±0,02 ^{abC} | 0,38±0,03 ^{bb} | 0,49±0,02 ^{aA} | 0,49±0,02 ^{aA} | 0,28±0,0 ^{cd} |
| | Hiperoksi | 0,19±0,0 ^{be} | 0,25±0,01 ^{bd} | 0,49±0,01 ^{ab} | 0,42±0,01 ^{bc} | 0,56±0,02 ^{aA} | 0,42±0,03 ^{bc} |
| GST | Normoksi | 1,66±0,05 ^{aA} | 1,63±0,02 ^{ba} | 1,66±0,04 ^{aA} | 1,45±0,04 ^{ab} | 1,09±0,04 ^{bd} | 1,26±0,07 ^{ac} |
| | Hipoksi | 1,23±0,07 ^{bc} | 1,87±0,08 ^{aA} | 1,32±0,05 ^{bc} | 1,54±0,05 ^{ab} | 1,92±0,02 ^{aA} | 0,87±0,02 ^{bd} |
| | Hiperoksi | 1,26±0,01 ^{baB} | 1,04±0,01 ^{cb} | 1,26±0,08 ^{baB} | 1,27±0,01 ^{baB} | 1,10±0,0 ^{baB} | 1,33±0,15 ^{aA} |

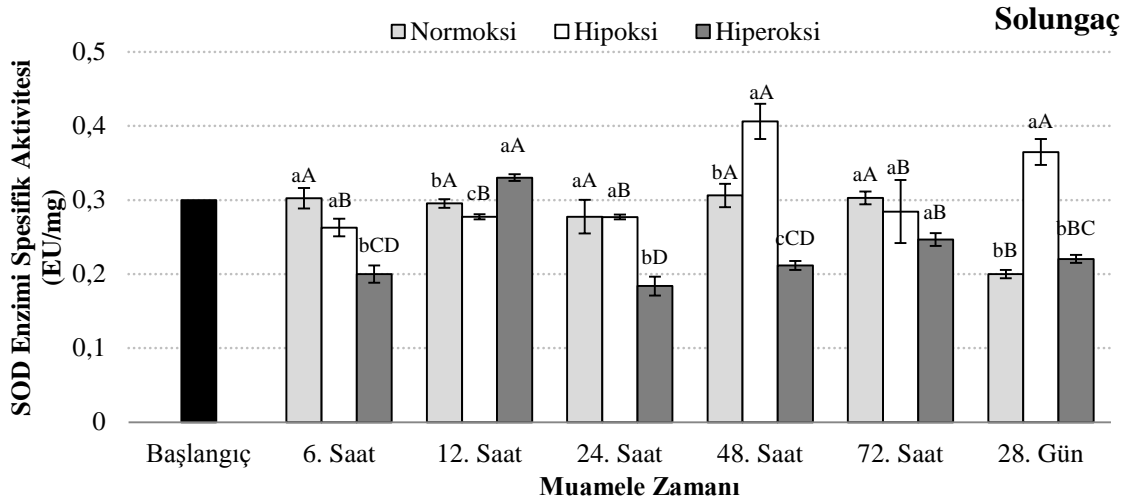
4.7.3. Solungaç dokusuna ilişkin antioksidan enzimleri spesifik aktivite bulguları

4.7.3.1. Solungaç dokusuna ilişkin Süperoksit Dismütaz enzim spesifik aktivite bulguları

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki solungaç dokusu SOD enzimi spesifik aktiviteleri birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi ($0,26 \pm 0,01^{ab}$ EU/mg) uygulaması kontrole ($0,30 \pm 0,01^{aa}$ EU/mg) kıyasla önemli olmayan bir azalış göstermiş fakat en düşük spesifik aktivite değeri ise hiperoksi uygulaması ($0,20 \pm 0,01^{bcd}$ EU/mg) olup kontrol ve hipoksi uygulamasına göre önemlidir. 12. saatte gruplar istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde enzim aktivite seviyelerinde kontrol ile karşılaştırıldığında farklılıklar gözlenmiştir. Kontrole göre önemli olarak en yüksek artışın $0,33 \pm 0,0^{aa}$ EU/mg ile hiperoksi grubunda olduğu görülmüştür. En düşük spesifik aktivite değeri ise hipokside gözlenmiştir ($0,28 \pm 0,0^{cb}$ EU/mg) ayrıca kontrole ve hiperoksiye göre önemli bulunmuştur. 24. saatte hipoksi grubu kontrole kıyaslandığında aralarında istatistiki bir fark olmadığı görülmüş ve en düşük spesifik aktivite değerinin hiperokside olduğu ve kontrole göre önemli olduğu gözlenmiştir ($0,18 \pm 0,01^{bd}$ EU/mg). 48. saatte hipoksi uygulaması en yüksek spesifik aktivite seviyesini ($0,41 \pm 0,02^{aa}$ EU/mg) göstermektedir. En düşük spesifik aktivite kontrole kıyasla hiperoksi ($0,21 \pm 0,01^{cd}$ EU/mg) grubundadır ve her ikisi de kontrole göre istatistiki açıdan önemli bulunduğu karşımıza çıkmaktadır. 72. saatte hipoksi ve hiperoksi gruplarında kontrole göre kıyaslandığında spesifik aktivite değerinde azalış gözlenirken bu azalış istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. 28. günde muamele grupları arasında hipoksi grubu ($0,36 \pm 0,02^{aa}$ EU/mg) en yüksek enzim aktivitesine sahiptir. Hiperoksi grubu kontrole göre kıyaslandığında istatistiki açıdan önemsiz bulunmuştur.

Zamanlar arasındaki spesifik enzim aktivitesi değişimi muamelelere bağlı olarak değerlendirildiğinde; hipoksi uygulamasında en yüksek spesifik enzim aktivitesi değerini 48. saatte görmekteyiz ve 28. gün ile aralarında istatistiki açıdan bir fark yoktur. 6., 12., 24. ve 72. saatlerdeki spesifik enzim aktivitesi değeri 48. saat ve 28.

gündekinden önemli bir azalış göstermişken aktivite değerleri önemsiz bir farklılık göstermiştir. Hiperoksi uygulamasında en yüksek değer 12. saatte olup sonraki yüksek değer 72 saattedir. 6. saat ile 48. saatin farklarının önemsiz olmasına rağmen en düşük enzim spesifik aktivitesi 24. saatte bulunmuştur (Şekil 4.49 ve Çizelge 4.13).



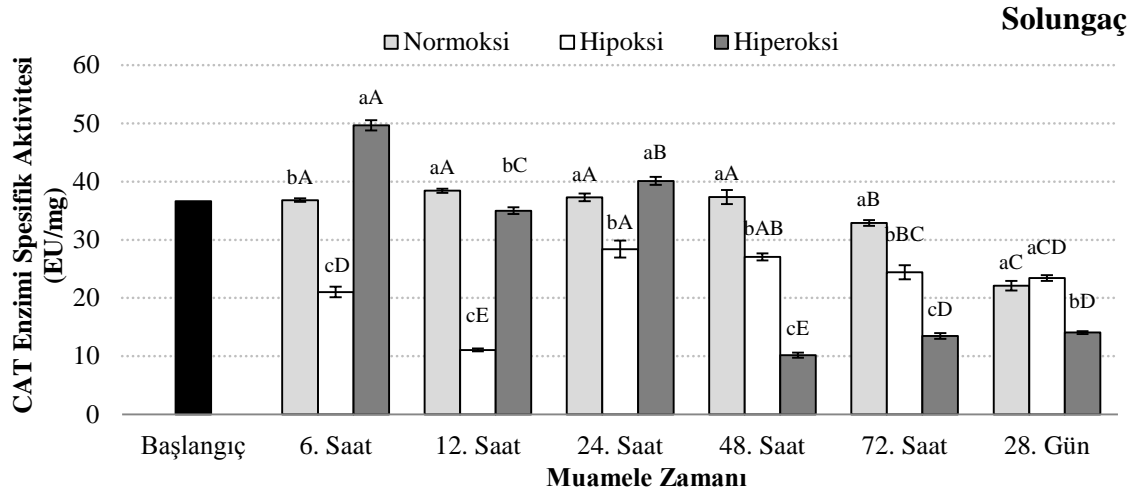
Şekil 4.49. Solungaç dokusuna ilişkin SOD enzimi spesifik aktivite seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.7.3.2. Solungaç dokusuna ilişkin Katalaz enzim spesifik aktivite bulguları

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki solungaç dokusu CAT enzimi spesifik aktiviteleri birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hiperoksi uygulaması en yüksek spesifik aktivite seviyesini ($49,67 \pm 0,88^{aA}$ EU/mg) göstermektedir. En düşük spesifik aktivitenin ise kontrole kıyasla $21,03 \pm 0,91^{cD}$ EU/mg ile hipoksi grubunda olduğu ve istatistiki açıdan önemli olduğu bulunmuştur. 12. saatte hipoksi ($11,06 \pm 0,24^{cE}$ EU/mg) ve hiperoksi ($35,00 \pm 0,58^{bC}$ EU/mg) grubunda kontrole kıyasla spesifik aktivitede bir azalış gözlenmiş ve aktivite farkı istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Hipoksi ile de aktivite hiperoksiye göre önemli derecede azaldığı görülmüştür. 24. saatte hiperoksi ($40,12 \pm 0,69^{aB}$ EU/mg) uygulamasında spesifik aktivite, kontrol

($37,29 \pm 0,64^{aA}$) ve hipoksiden ($28,39 \pm 1,47^{bA}$ EU/mg) önemli bir artış göstermişken kontrol ve hipoksi arasındaki spesifik aktivitenin farklı olması istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. 48. saat hipoksi ve hiperoksi kontrole ($37,33 \pm 1,20^{aA}$ EU/mg) göre daha düşük bir spesifik aktivite grafiği göstermiştir. Kendi aralarında değerlendirildiğinde ise hipoksi $27,06 \pm 0,63^{bAB}$ EU/mg enzim aktivitesi değerine sahip olup $10,18 \pm 0,45^{cE}$ EU/mg olan hiperoksiden daha yüksek aktiviteye sahiptir ve bu fark önemli olarak bulunmuştur. 72. saatte kontrol grubu en yüksek spesifik aktivite seviyesini ($32,88 \pm 0,48^{aB}$ EU/mg) göstermektedir. En düşük spesifik aktivite kontrole kıyasla önemli derecede hiperoksi ($13,45 \pm 0,50^{cD}$ EU/mg) grubundadır ve istatistiki açıdan önemli bulunduğu karşımıza çıkmaktadır. 28. günde hipoksi grubu kontrole kıyaslandığında aralarında istatistiki bir fark olmadığı görülmüş ve anlamlı olarak en düşük spesifik aktivite değerinin hiperoksidede olduğu gözlenmiştir ($14,07 \pm 0,25^{bD}$ EU/mg).

Tüm zamanlar içinde muameleler kendi aralarında değerlendirildiğinde hipoksidede en yüksek spesifik aktivite 24. saatte bulunmuştur ancak 48. saatte hipoksi değeri ile aralarında istatistiki olarak farkın önemsiz, diğer saatlerle ise farkın önemli olduğu bulunmuştur. 6. saatteki hipoksi örneklerinin spesifik aktivitesi ile 12. saatteki arasında değişimin önemli olduğu görülmüştür. En düşük spesifik aktivitenin ise 12. saatte olduğu bulunmuş diğer saatlere göre bu değer istatistiksel olarak düşük olduğu bulunmuştur. Hiperoksi muameleleri dikkate alındığında 6. saat ve 24. saatteki hiperoksi örneklerinin spesifik aktivite değerleri diğer zamanlardan yüksek bulunmasına rağmen kendi aralarındaki fark önemli bulunmuştur. Sonra dikkate değer bir yükseliş gösteren 12. saatte de 48., 72. saat ve 28. gündeki spesifik aktivite değerlerinden yüksek bir değer bulunmuştur. 72. saat ve 28. gün arasında istatistiksel farklılık gözlenmezken en düşük spesifik aktivite sergileyen 48. saate göre ise önemli bir aktivite artışı göstermişlerdir (Şekil 4.50 ve Çizelge 4.13).



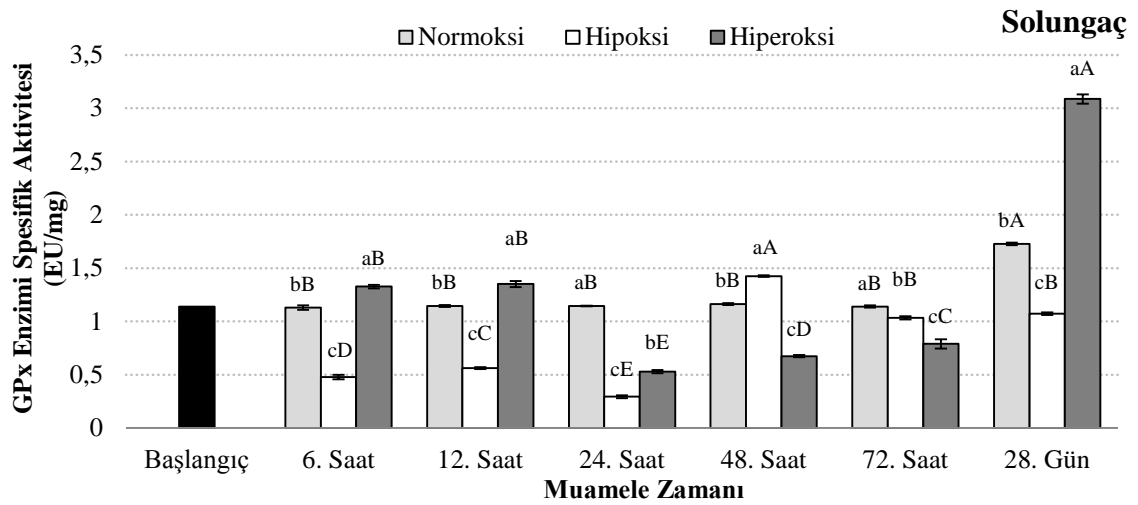
Şekil 4.50. Solungaç dokusuna ilişkin CAT enzimi spesifik aktivite seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.7.3.3. Solungaç dokusuna ilişkin Glutatyon Peroksidaz enzim spesifik aktivite bulguları

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki solungaç dokusu GPx enzimi spesifik aktiviteleri birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde kontrole göre hiperoksi önemli derecede artış gösterirken hipoksi grubunda önemli bir azalış meydana geldiği görülmüştür. 12. saatte spesifik aktivitenin kontrole göre ($1,14 \pm 0,01^{bB}$ EU/mg) önemli derecede arttığı muamele grubu hiperoksi ($1,35 \pm 0,03^{aB}$ EU/mg)'dir. Muameleler kendi aralarında kıyaslandığında yine hiperoksi grubunun en yüksek enzim aktivitesi seviyesine sahip olduğu görülmüştür. Bu artışın istatistiksel açıdan önemli olması ile birlikte kontrol grubuna göre en düşük enzim aktivitesi ise $0,56 \pm 0,01^{cC}$ EU/mg ile hipoksi grubunda tespit edilmiştir. 24. saatte solungaç dokusundaki GPx enzimi spesifik aktivitesi verileri istatistiksel olarak incelendiğinde muamele grupları genel olarak kontrol grubundan ($1,15 \pm 0,0^{aB}$ EU/mg) önemli derecede azaldığı gözlenmiş ve kendi aralarında hipoksi ($0,29 \pm 0,01^{cE}$ EU/mg) grubunun ise önemli derecede düşük aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. 48. saatte en

yüksek aktiviteye sahip grup hipoksi ($1,42 \pm 0,01^{aA}$)'dir. Kontrole ($1,16 \pm 0,01^{bB}$) göre en düşük grup ise hiperoksi ($0,67 \pm 0,01^{cD}$) grubudur. Farklar istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. 72. saatte kontrol grubu ($1,14 \pm 0,01^{aB}$ EU/mg) diğer muamele grupları ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan farklılıkların olduğu gözlemlenmiştir. Bu bağlamda kontrole göre hipoksi ($1,03 \pm 0,01^{bB}$) ve hiperoksi ($0,79 \pm 0,04^{cC}$) gruplarında azalış olduğu görülmüştür. 28. günde en yüksek GPx enzimi spesifik aktivitesi hiperoksi ($3,09 \pm 0,04^{cA}$) muamele grubunda görülmektedir. Kontrole ($1,73 \pm 0,01^{bA}$) göre hipoksi ($1,07 \pm 0,01^{aB}$) grubunda azalış meydana gelirken istatistiki açıdan farklılıkların önemli olduğu görülmüştür.

Hipoksi ve hiperoksideki tüm zamanlar muamele bazında ele alındığında ise; hipokside en düşük spesifik enzim aktivitesi 24. saatte bulunmuştur. 48. saat, 24. saate göre önemli bir artış göstermiştir. 72. saat ile 28. gündeki spesifik aktivite değerleri arasındaki fark önemsiz olup, 6., 12. ve 24. saatlerdeki enzim aktivitesine kıyasla önemli bir artış göstermektedir. 48. saat ise hipoksi uygulaması içerisindeki en yüksek spesifik enzim aktivitesine sahiptir. Hiperokside en düşük spesifik enzim aktivitesi 24. saatte bulunmuştur. 6. ve 12. saatlerde aktivite farklılıkları önemsiz olarak bulunmuşken, 24. saatteki spesifik aktiviteye göre önemli derecede yüksek gözlenmiştir. 28. gündeki spesifik enzim aktivitesi seviyesi diğer tüm muamele zamanlarından yüksek bulunmuş ve bu artışın önemli olduğu kaydedilmiştir (Şekil 4.51 ve Çizelge 4.13).



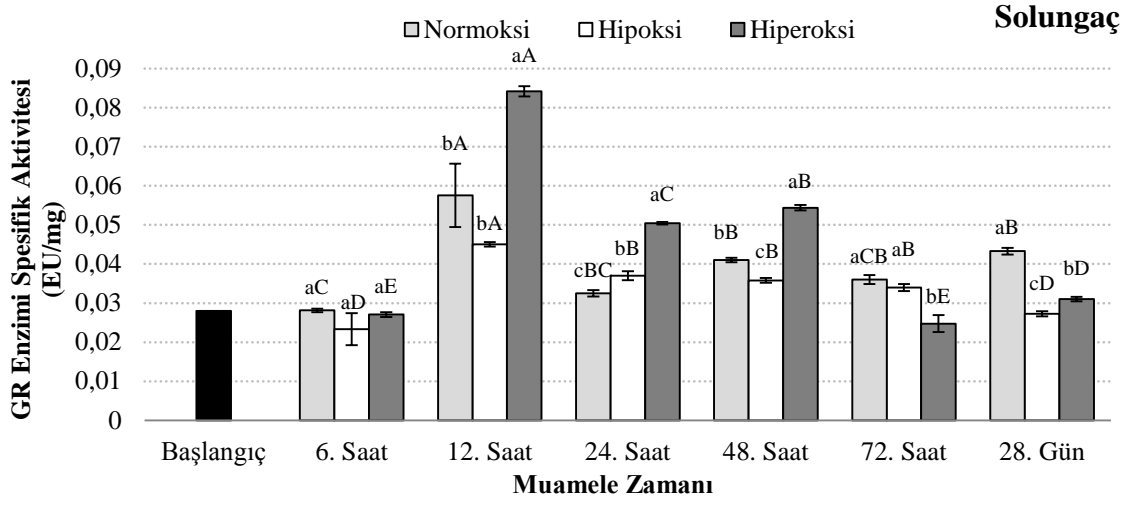
Şekil 4.51. Solungaç dokusuna ilişkin GPx enzimi spesifik aktivite seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.7.3.4. Solungaç dokusuna ilişkin Glutasyon Redüktaz enzim spesifik aktivite bulguları

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki solungaç dokusu GR enzimi spesifik aktiviteleri birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saat göz önünde bulundurulduğunda kontrol ($0,03 \pm 0,0^{aC}$ EU/mg), hipoksi ($0,02 \pm 0,0^{aC}$) ve hiperoksi ($0,03 \pm 0,0^{aE}$) uygulamaları arasındaki spesifik aktivite değişimi farkları önemsizdir. 12. saatte hiperoksi uygulaması ($0,08 \pm 0,0^{aA}$) kontrole ($0,06 \pm 0,01^{bA}$) ve hipoksi ($0,05 \pm 0,0^{bA}$) uygulamasına göre spesifik aktivite değeri önemli derecede yüksek bulunmuştur. Hipoksi uygulamasının ise kontrole göre değişimi önemsizdir. 24. saatte hiperoksi uygulaması en yüksek spesifik aktivitesini ($0,05 \pm 0,0^{aC}$) göstermektedir. Bu artış kontrolün spesifik aktivitesine ($0,03 \pm 0,0^{cBC}$) kıyasla önemli bir artış olarak bulunmuştur. Yine hipoksi uygulaması da kontrole göre önemli bir artış ($0,04 \pm 0,0^{bB}$) sergilemiştir. Hiperoksi hipoksi uygulamasına göre önemli derecede artmıştır. 48. saatte kontrol ($0,04 \pm 0,03^{bB}$ EU/mg), hipoksi ($0,04 \pm 0,0^{cB}$ EU/mg) ve hiperoksi ($0,05 \pm 0,0^{aB}$ EU/mg) uygulamaları arasındaki spesifik aktivite değişimi farkları önemli bulunmuştur.

Hiperoksi en yüksek spesifik aktivitesini göstermişken hipoksi en düşük spesifik aktiviteye sahiptir. 72. saatte hiperoksi ($0,02\pm 0,0^{bE}$) uygulamasında spesifik aktivite, kontrol ($0,04\pm 0,0^{aBC}$) ve hipoksiden ($0,03\pm 0,0^{aB}$) önemli bir azalış göstermişken kontrol ve hipoksi arasındaki spesifik aktivite farkı önemsiz olarak bulunmuştur. 28. günde grup içerisindeki muameleler arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bu bağlamda hiperoksi uygulaması ($0,03\pm 0,0^{bD}$) ve hipoksi uygulaması ($0,03\pm 0,0^{cC}$) kontrolden ($0,04\pm 0,0^{aB}$) düşük bulunmuş ve bununla birlikte hipoksi uygulaması ile aktivite hiperoksiden önemli derecede düşük bulunmuştur.

GR enzimi hipoksi uygulamaları tüm zamanların tamamı göz önünde bulundurularak incelendiğinde ise en yüksek spesifik enzim aktivitesi değeri 12. saatte görülmüştür. Diğer zamanlara kıyasla bu fark önemlidir. 24., 48. ve 72. saatte ikinci büyük spesifik aktiviteye sahip olup kendi aralarındaki fark önemli bulunmuştur. 6. saat ve 28. günde ise üçüncü büyük spesifik aktiviteye sahip olup kendi aralarındaki ve diğerleri arasındaki fark önemli bulunmuştur. 6. saatte hipoksinin en düşük spesifik aktivitesi gözlenmiştir. Hiperoksi uygulaması dikkate alındığında da 12. saatte diğer tüm zamanlara göre yüksek spesifik aktivite göstermesi ile birlikte bu artış önemlidir. 6. saat ve 72. saatlerde hiperoksi uygulamasında istatistiki açıdan fark yoktur. 24., 48. saat ve 28. günde ise istatistiki açıdan fark önemli bulunmuştur (Şekil 4.52 ve Çizelge 4.13).



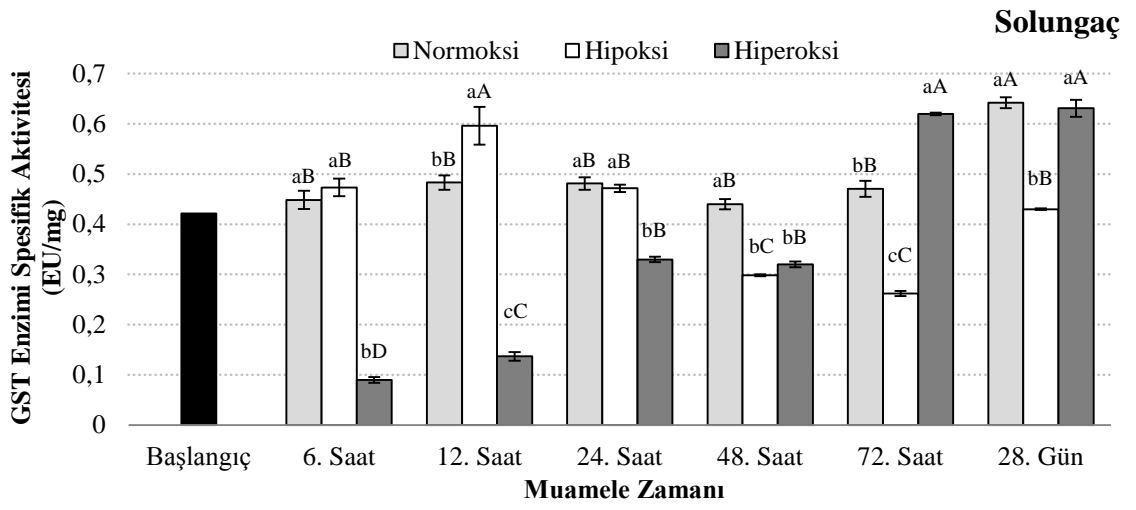
Şekil 4.52. Solungaç dokusuna ilişkin GR enzimi spesifik aktivite seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

4.7.3.5. Solungaç dokusuna ilişkin Glutatyon-S-Transferaz enzim spesifik aktivite bulguları

Kontrol, hipoksi ve hiperoksi gruplarındaki solungaç dokusunda GST enzimi spesifik aktiviteleri birbirleri ile kıyaslandığında ($p < 0,05$): 6. saatte hipoksi uygulamasında en yüksek spesifik aktivite seviyesi ($0,47 \pm 0,02^{aB}$ EU/mg) görülürken istatistiki açıdan önemli olmadığı bulunmuştur. Hiperoksi ($0,09 \pm 0,01^{bD}$) uygulaması da kontrole ($0,45 \pm 0,02^{aB}$) göre azalış sergilemiştir. 12. saatte hipoksi uygulaması en yüksek spesifik aktivite seviyesini ($0,60 \pm 0,04^{aA}$) göstermektedir. En düşük spesifik aktivitenin ise kontrole kıyasla $0,14 \pm 0,01^{cC}$ EU/mg ile hiperoksi grubunda önemli bir şekilde olduğu ve istatistiki açıdan önemli olduğu karşımıza çıkmaktadır. 24. saatte hipoksi uygulaması kontrole kıyasla ($0,47 \pm 0,01^{aB}$) azalış göstermiş fakat bu azalış istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. En düşük spesifik aktivite değeri ($0,33 \pm 0,01^{bB}$) hiperoksi uygulamasıdır. 48. saatte solungaç dokusundaki GST enzimi spesifik aktivitesi istatistiki açıdan dikkate alındığında hipoksi ve hiperoksi gruplarında kontrole göre önemli bir azalış gözlemlenmişken bu azalış istatistiki açıdan önemsiz olarak belirlenmiştir. Tüm

gruplara bakıldığında enzim spesifik aktiviteleri kontrole göre azalış meydana geldiği gözlenmiştir. 72. saatte hipoksi grubunda ($0,26 \pm 0,0^{cC}$) kontrole kıyasla bir azalış gözlenmiş iken hiperoksi grubunda ($0,62 \pm 0,0^{aA}$) bir artış meydana geldiği gözlemlenmiştir. Aktivite farkı ise istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. 28. günde GST enzimi spesifik aktivitesi kontrole göre en yüksek hiperoksi grubunda ($0,63 \pm 0,02^{aA}$) olup istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. En düşük enzim aktivitesi hipoksi grubunda ($0,43 \pm 0,0^{bB}$) görülmekte ve bu düşüşün istatistiksel açıdan önemli olduğu görülmektedir.

Tüm zamanlardaki hipoksi uygulaması dikkate alındığında en yüksek spesifik enzim aktivitesi 12. saatte karşımıza çıkmaktadır. Diğer zamanlar bu saatten önemli bir azalış sergilerken 6. ve 24. saat hipoksi uygulaması ise 48., 72. saat ve 28. gündeki spesifik enzim aktivitelerinden daha yüksek bulunmuştur. Bu fark istatistiki açıdan önemli değildir. 12, 72. saat ve 28. gündeki hipoksi spesifik enzim aktivite değerleri arasındaki fark ise önemli olarak karşımıza çıkmaktadır. Hiperoksi uygulamasında ise 72. saat ve 28. gün spesifik aktivite değeri tüm zamanlardan önemli olarak yüksek bulunmuştur. 6., 12., ve 24. saatlerdeki spesifik aktivite değerleri birbirlerinden önemli olarak farklı bulunmuştur. 24. ve 48. saatler arasındaki hiperoksi GST enzim spesifik aktivitesi değişimi önemsiz olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 4.53 ve Çizelge 4.13).



Şekil 4.53. Solungaç dokusuna ilişkin GST enzimi spesifik aktivite seviyeleri (Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0,05$ önem seviyesinde birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir. Küçük harfler grup içi istatistiksel farkı gösterirken büyük harfler gruplar arası istatistiksel farkı göstermektedir.)

Çizelge 4.13. Solungaç dokusuna ilişkin SOD, CAT, GPx, GR ve GST enzimleri spesifik aktivite seviyeleri değerleri (EU/mg)

| Enzim | Muamele | Akut etki | | | | | Kronik etki |
|-------|-----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | Saatler | | | | | Gün |
| | | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 | 28 |
| SOD | Normoksi | 0,30±0,01 ^{aA} | 0,30±0,01 ^{bA} | 0,28±0,02 ^{aA} | 0,31±0,02 ^{bA} | 0,30±0,01 ^{aA} | 0,20±0,01 ^{bB} |
| | Hipoksi | 0,26±0,01 ^{aB} | 0,28±0,0 ^{cB} | 0,28±0,0 ^{aB} | 0,41±0,02 ^{aA} | 0,28±0,04 ^{aB} | 0,36±0,02 ^{aA} |
| | Hiperoksi | 0,20±0,01 ^{bCD} | 0,33±0,0 ^{aA} | 0,18±0,01 ^{bD} | 0,21±0,01 ^{cCD} | 0,25±0,01 ^{aB} | 0,22±0,01 ^{bBC} |
| GST | Normoksi | 0,45±0,02 ^{aB} | 0,48±0,01 ^{bB} | 0,48±0,01 ^{aB} | 0,44±0,01 ^{aB} | 0,47±0,02 ^{bB} | 0,64±0,01 ^{aA} |
| | Hipoksi | 0,47±0,02 ^{aB} | 0,60±0,04 ^{aA} | 0,47±0,01 ^{aB} | 0,30±0,0 ^{bC} | 0,26±0,0 ^{cC} | 0,43±0,0 ^{bB} |
| | Hiperoksi | 0,09±0,01 ^{bD} | 0,14±0,01 ^{cC} | 0,33±0,01 ^{bB} | 0,32±0,01 ^{bB} | 0,62±0,0 ^{aA} | 0,63±0,02 ^{aA} |
| GR | Normoksi | 0,03±0,0 ^{aC} | 0,06±0,01 ^{bA} | 0,03±0,0 ^{cBC} | 0,04±0,03 ^{bB} | 0,04±0,0 ^{aBC} | 0,04±0,0 ^{aB} |
| | Hipoksi | 0,02±0,0 ^{aC} | 0,05±0,0 ^{bA} | 0,04±0,0 ^{bB} | 0,04±0,0 ^{cB} | 0,03±0,0 ^{aB} | 0,03±0,0 ^{cC} |
| | Hiperoksi | 0,03±0,0 ^{aE} | 0,08±0,0 ^{aA} | 0,05±0,0 ^{aC} | 0,05±0,0 ^{aB} | 0,02±0,0 ^{bE} | 0,03±0,0 ^{bD} |
| CAT | Normoksi | 36,81±0,31 ^{bA} | 38,43±0,36 ^{aA} | 37,29±0,64 ^{aA} | 37,33±1,20 ^{aA} | 32,88±0,48 ^{aB} | 22,11±0,83 ^{aC} |
| | Hipoksi | 21,03±0,91 ^{cD} | 11,06±0,24 ^{cE} | 28,39±1,47 ^{bA} | 27,06±0,63 ^{bAB} | 24,41±1,22 ^{bBC} | 23,44±0,50 ^{aDC} |
| | Hiperoksi | 49,67±0,88 ^{aA} | 35,00±0,58 ^{bC} | 40,12±0,69 ^{aB} | 10,18±0,45 ^{cE} | 13,45±0,50 ^{cD} | 14,07±0,25 ^{bD} |
| GPx | Normoksi | 1,13±0,02 ^{bB} | 1,14±0,01 ^{bB} | 1,15±0,0 ^{aB} | 1,16±0,01 ^{bB} | 1,14±0,01 ^{aB} | 1,73±0,01 ^{bA} |
| | Hipoksi | 0,48±0,02 ^{cD} | 0,56±0,01 ^{cC} | 0,29±0,01 ^{cE} | 1,42±0,01 ^{aA} | 1,03±0,01 ^{bB} | 1,07±0,01 ^{aB} |
| | Hiperoksi | 1,33±0,02 ^{aB} | 1,35±0,03 ^{aB} | 0,53±0,01 ^{bE} | 0,67±0,01 ^{cD} | 0,79±0,04 ^{cC} | 3,09±0,04 ^{cA} |

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Tartışma

5.1.1 Antioksidan Kapasitesine Bağlı Metabolitlere İlişkin Tartışma

Üç peptitli glutatyon (L-glutamil-L-Sisteinilglisin, GSH) ROS parçalayıcı, elektrofillerin detoksifikasyonu, tiol disülfid ve sinyal transdüksiyonunun sürekliliği gibi çok sayıda hayati hücre fonksiyonu içerisinde barındıran düşük molekül ağırlıklı bir antioksidandır (Dröge *et al.* 1994; Halliwell and Gutteridge 1999). GSH gibi disülfid GSH (GSSG)'da biyolojik olarak önemli hücre içi tiyolleridir (Berntssen *et al.* 2000). GSH, indirgeyici değerliklerini verici özelliği nedeniyle toksik reaktif türlerin hem doğrudan (kimyasal) hem de enzimatik olarak nötralize edilmesi ve özellikle oksidanlara karşı hücre savunma için şarttır (Wu *et al.* 2004). Balıklarda da oksidatif strese direnç için glutatyon seviyesi oldukça önemlidir. Stres koşulları altında glutatyon sentezi tümüyle yeniden yapılandırılır (Winston and Di Giulio 1991).

Literatürde birçok araştırmacı tarafından da oksidatif stresin düzeyini belirlemek için glutatyon seviyeleri bir markır olarak kullanılmıştır. Ritola *et al.* (2002a) hiperoksinin yavru gökkuşağı alabalıklarının (*O. mykiss*) hem karaciğer hem de solungaç GSSG seviyesinde azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. GSH seviyesi ise solungaçta hiperoksi ile birlikte çeşitli zamanlarda artış göstermiştir. Ritola *et al.* (2002c) gökkuşağı alabalığı karaciğerinde 14 günlük hiperoksi (%173±24 oksijen doygunluğuna sahip) muamelesi sonucunda tGSH seviyesinde önemli bir artışı kaydetmiştir. Ancak GSH ve GSSG değişimleri önemsiz olduğundan oksidatif stres ile sonuçlanmadığı fikrini ortaya koymuştur. Olsvik *et al.* (2006) Atlantik morinası karaciğer dokusu üzerinde yaptıkları çalışmada 6 hafta boyunca %46 (hipoksi), %76 (normoksi) ve %145 (hiperoksi) O₂ doygunluğunun, tGSH, GSH, GSSG ve OSI değerlerini kontrole göre değiştirmedikleri sonucuna varmışlardır. Olsvik *et al.* (2005) atlantik somonları üzerinde

yaptıkları çalışmada hiperoksi OSI ve GSSG miktarlarını normoksi balıklarına kıyasla önemli derecede düşürmüş, tGSH miktarını değiştirmemiştir.

Bu çalışmada karaciğerde hem hipoksi hem de hiperoksinin akut etkisi boyunca artan tGSH seviyesi 72. saat sonuna kadar artış gözlenmiş olup bu trend, Ritola *et al.* (2002c) alabalıklarda 14 günlük hiperoksi uygulamalarından elde ettiği veriyle uyum gösterdiği görülmüştür. 28. günde ise tGSH önemli derecede azaldığı görülmüş, olup bu azalma her ne kadar istatistiki olarak önemli görülmüş olsada azalmanın seyri oldukça düşük ve kontrol grubuna yakındır. Karaciğer GSH ve GSH/GSSG seviyelerinde ise birbirlerine benzer bir seyir gözlenmiştir. Ancak karaciğer GSSG seviyesinin akut muamele boyunca arttığı ve kronik muamelede ise seviyesinin normal seyrettiği görülmüştür. GSH ve GSSG, GR ve GPx enzimleri ile kombine çalışan metabolitlerdir. Hiperoksi baz alındığında; GSH seviyelerinin GPx aktivitesi ile akut muamele boyunca örtüşmesine rağmen kronik muamelede farklılık görülmüştür. Bu uyuşmazlığa oksidatif stresin neden olabileceği düşünülmüştür. Bu reaksiyondan meydana gelecek GSSG seviyelerinin artması, beklenen bir durumdur. Nitekim çalışmamızda GSSG seviyelerinin artışı görülmüştür. Hipoksi muamelesi ile başlangıçta yüksek olan GSH seviyesi özellikle 48. saatten sonra gittikçe azalmıştır. Kronik maruziyet sonucu da azalış göstermiştir. Aynı muamele ile GPx enzim aktivitesinin de 48. saatten sonra azalış seyretmesi dikkat çekmiştir. Bu reaksiyonda, oksidasyon koşulları altında, iki GSH molekülünün sülfür atomları her biri bir elektronu verir ve glutatyon disülfite (GSSG) dönüşürler ve bu da GSSG redüktaz (GR) etkisi ile tekrar GSH'ye indirgenebilir (Şekil 1.1). Bu nedenle, GSH'de ve GSH/GSSG oranında azalma, redoks dengesizliğinin kanıtı olarak yorumlanır (Dalle-Donne *et al.* 2008; Ballatori *et al.* 2009; Giustarini *et al.* 2009). Maruziyet süresi boyunca yüksek ve düşük O₂ konsantrasyonuna maruz bırakılan alabalıkların karaciğerinde OSI normoksi balıklarına kıyasla kronik maruziyet dahil olmak üzere belirgin şekilde arttığı belirlenmiştir. Yükselen GSSG ve OSI ve ayrıca GSH ve GSSG oranındaki (GSH/GSSG) değişimler biyolojik sistemlerde oksidatif stres indikatörüdür ve oksidatif stres maruziyetini hesaplamak için bir

biyomarkır olarak kullanılır (Armstrong 2002; Boehme *et al.* 1992; Hasspieler *et al.* 1994; Boehme *et al.* 1992; Hasspieler *et al.* 1994).

Bu çalışmada dūřuk veya yūksek oksijen konsantrasyonlarına maruz kalan bōbrek ve solungaç dokularındaki OSI seviyeleri, normoksi balıklarından önemli derecede farklı olmadığı gözlenmiştir. Bu dokularda GSSG konsantrasyonları için incelenen üç grup arasında da anlamlı bir farklılık görülmemiştir. tGSH seviyesi hem hipoksi hem de hiperoksi ile özellikle 72. saatten sonra önemli derecede azalış göstermiştir. Ancak GSH seviyelerinde bu zamanlarda bir azalma meydana gelmiş ise de (solungaç kronik etki hariç) bu sonuçlar GSSG seviyeleri ile korelasyon göstermemiştir. GSSG seviyelerinin bu farklılığı dolayısı ile GSH/GSSG ve OSI seviyelerini de etkilemiştir. GSSG'nin hücre tiplerine spesifik değişim göstermesi de belirlenen bir durumdur (Ishikawa *et al.* 1986). Yani okside GSH'nin toplam GSH' ye oranı tüm maruz kalma seviyelerinde oldukça kararlı olması durumu hücrelerin korunması için redükte formdaki GSH'nin yeterli miktarının muhafaza edildiğini düşündürmüştür. Bu hipoksi boyunca balığın oksidatif strese karşı koyabilmesini sağlayan koruyucu bir rol oynar. GSH dönüşümü normal şartlar altında düşüktür ve şayet sentez inhibe edilirse GSH seviyeleri bazı balık türlerinde birkaç gün boyunca değişmeden kalabilmektedir (Gallagher *et al.* 1992). İnsan hepatositlerinde, GPx-GR sistemi etkilenmediği sürece nispeten düşük miktarda GSH, H₂O₂ ve lipit hidroperoksitlerin GPx aracılı metabolizmasını destekleyerek hücreleri koruyabildiği gösterilmiştir (Eklow-Lastbom *et al.* 1986).

ROS'lar yüksek derecede düzensizdir ve yağlar gibi mokromoleküller ile kolayca reaksiyon (LPO) gösterebilir (Halliwell and Gutteridge 1989). Biyolojik zararın peroksidasyonundan kaynaklanan başlıca reaktif aldehit, malondialdehit (MDA)'tir (Vaca *et al.* 1988). MDA, serbest radikal ve doymamış yağ asitlerinin reaksiyonu ile üretilen oksidatif ürünlerdir. Bir dizi zincir reaksiyonu ile doku hasarının bir göstergesi olarak kullanılır (Ohkawa *et al.* 1979). Serbest radikallerin doğrudan değerlendirilmesi ve ölçülmesi, onların kısa yarılanma ömürlerinden, daha yüksek görecelilik ve kısa göç mesafesi nedeniyle engellenmektedir (Bergendi *et al.* 1999). PUFA'nın peroksidatif

bozunmasından kaynaklanan ürünlerin ölçümü yani 4-hidroksinonenal (4HNE) ve MDA gibi dolaylı yöntemler, reaktif oksijen türleri tarafından neden olunan hasarın tahmini için kullanılmaktadır (Esterbauer and Cheeseman 1990). MDA, DNA ile reaksiyona girer ve deoksiguanozin ve deoksiadenozinli ürünler oluşturur (Marnett 1999). Ayrıca MDA; RNA, proteinler ve diğer biyomolekülleri de değiştirebilir (Esterbauer and Cheeseman, 1990).

Literatürde çeşitli oksijen yoğunluklarının doku spesifik MDA seviyeleri üzerine etkilerinin açıklanmaya çalışıldığı bir takım çalışmalar mevcuttur. Zhang *et al.* (2016) yayın balıklarında karaciğerde 4 saatlik, beyinde ise 6,5 saatlik hipoksinin MDA düzeyini artırdığını bildirmişlerdir. Li *et al.* (2016) yaptıkları çalışmada Pasifik beyaz karidesi hepatopankreas ve hemolenf dokularında 3 ppm ve 1,5 ppm hipoksi altında MDA seviyelerinin arttığını ancak 3 ppm hipoksi altında solungaçta azalttığını bulmuşlardır. Ritola *et al.* (2002a) yavru gökkuşuğu alabalıklarında 48 saat boyunca hiperoksinin karaciğer ve solungaçlarda lipid peroksidasyonuna neden olmadığını bildirmişlerdir. Ritola *et al.* (2002d) gökkuşuğu alabalıklarında yaptıkları çalışmada *in vitro* hiperoksi muamelesi ile kan plazmasında MDA seviyesi değişmez iken kırmızı kan hücrelerinde 10 dakikalık hiperoksi MDA seviyesinde artışa neden olmuştur. Olsvik *et al.* 2005 karaciğer dokusunda %130 doygunlukta hiperoksinin TBARS seviyesini etkilemediğini bulmuşlardır. Lygren *et al.* (2000) yavru atlantik somonunda 6 haftalık orta ve 12 haftalık şiddetli hiperoksinin karaciğerde TBARS seviyesini yükselttiğini bulmuşlardır. Lushchak *et al.* (2005b) hiperoksinin karaciğerde TBARS seviyesini başta yükselttiği sonrasında ise düşürdüğünü, böbrekte ise düşürdüğünü bildirmişlerdir. Lushchak *et al.* (2005a) karaciğer dokusunda TBARS seviyesinin arttığını böbrek dokusunda ise değişmediğini gözlemişlerdir. Lushchak and Bagnyukova (2007) 6 ve 10 saatlik hipoksinin karaciğerde TBARS seviyesini düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Tez çalışmasının sonucunda karaciğer dokusunda hem hipoksi hem de hiperoksi uygulamalarında kontrol grubuna (normoksi) göre başta düşük (48. saat) ya da kontrol seviyelerinde olan MDA seviyeleri kronik etki ile artış göstermiştir. Bu, kronik hipoksi

ve hiperoksi maruziyetlerinin karaciğer dokusunda lipit peroksidasyonunu indükleyebileceğini ve oksidatif stresi arttırabileceğini göstermiştir. Bunun sonucu olarak da ROS'a karşı antioksidan savunmanın geliştirilmesi beklenen bir durumdur. GSH'nin azalmasını takiben artan lipit peroksidasyonu, pro-oksidan t-butil hidroperoksite maruz bırakılan kedi yayın balığına (*Ameiurus nebulosus*) da görülmüştür (Ploch *et al.* 1999). Bununla birlikte, hiperoksi ile elde edilen sonuçlar, protein veya DNA gibi diğer önemli biyolojik moleküllerde oksidatif hasar oluşabileceği olasılığını ortadan kaldırmaz. Bu lipit peroksidasyon ürününün karaciğerde başlangıçta azalışı ve daha sonra artış göstermesi, hiperoksinin, lipitlere karşı ROS hasarında bir artış başlattığının göstergesidir. Bu da ya lipitleri ROS saldırısına karşı savunan seçilmiş antioksidanlar ya da hasarlı lipitleri temizleme mekanizmalarında hızlı bir artış ile korunmanın başlatılması ile tolere edilebilir. Böbrek ve solungaç dokusunda MDA seviyeleri kontrole kıyaslandığında değişmemiştir. Yalnız böbrek dokusunda 72. saatte hipoksi ile azalmış, 28. günde hiperoksi ile artmıştır. Solungaç dokusunda ise 24. saatte hiperoksi muamelesi ile MDA seviyesi artmış sonrasında ise kontrol seviyelerinde seyretmiştir. Sebebi antioksidan metabolizma aracılığı ile iyileşme olabilir. Hem böbrek hem de solungaçta kronik hipoksi ve hiperoksi muamelelerinin (böbrekte hiperoksi muamelesi hariç) kontrol seviyesinde olması dikkat çekmektedir. Antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimler lipit peroksidasyon ürünlerinin detoksifikasyonunda önemli bir rol oynadığının göstergesidir. Böbrek dokusundaki kronik hiperoksi ile MDA seviyesinin artış göstermesi H₂O₂ seviyesinden kaynaklanmış olabilir. Bu metabolitin de yüksek olmasında SOD enziminin bu zamanda muhtemelen artış göstermesi sebep gösterilebilir. Dolayısı ile bu durum CAT ve GPx aktivitelerindeki artışın sebebini de açıklamaktadır.

5.1.2. Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve Gen İfadelerine İlişkin Tartışma

Lipid peroksidasyon ürünleri, AP-1 ve NF- β B gibi spesifik ROS duyarlı transkripsiyon faktörleri ile uyumlu olarak hareket ederek adaptif yanıtın düzenlenmesinde yer alabilir

(Lee and Choi 2003). Farklı antioksidan sistemler bunların hedefleri olabilir, ancak bu çalışmada sadece antioksidan savunma enzimlerinin gen ekspresyonu ve enzim aktivitelerine odaklanılmıştır. Bu değişiklikler ya enzim miktarındaki değişikliklerden (protein sentezi ya da bozunum) ya da post-translasyonel kovalent modifikasyondan kaynaklanabilir. Dolayısıyla burada bildirilen artmış aktiviteler artmış transkripsiyon ve/veya translasyonun muhtemel sonucudur (Das *et al.* 1999; Das *et al.* 2001; Lushchak 2002).

ROS'lara karşı iyi gelişmiş savunma metalloenzimleri olarak SOD'lar önemli antioksidan enzimlerdir. SOD'ların ekspresyon seviyeleri genellikle oksidatif stres için biyomarkır olarak kullanılır (Lushchak and Bagnyukova 2006a). Moleküler oksijen ve H_2O_2 üretmek üzere bunları dismutasyona tabi tutan iki O_2^- molekülünün katılımıyla redoks reaksiyonunu gerçekleştiren SOD enzimi tarafından bir elektronun O_2^- 'ye eklenmesi, H_2O_2 oluşumuna neden olur. H_2O_2 serbest radikal değildir ancak moleküler oksijenden daha aktiftir ve ROS diye adlandırılır (Halliwell and Gutteridge 1989). H_2O_2 diğer serbest radikallere nazaran daha kararlı olsa da özellikle hücre ve mitokondri membranına taşınıp lipidlerde çözünerek membran potansiyelini bozma ve kolay şekilde ilerleyebilen lipid peroksidasyonuna neden olma potansiyelindedir (Kowaltowski *et al.* 2009). Bu sebepten hücrel H_2O_2 oranı, lipid peroksidasyonunun bir kanıtı olarak gösterilebilir. ROS'lar antioksidan enzimler tarafından bir dizi metabolizmal reaksiyonlar ile süpürülür. Antioksidan enzimler olarak başlıca SOD, CAT, GPx, GR ve GST enzimleri işlev görürler. SOD, süperoksit anyonunun H_2O_2 ve O_2^- 'ye çevrilmesinden sorumludur. CAT enzimi, H_2O_2 'leri indirgeyerek H_2O 'ya dönüştürür. GPx, H_2O_2 varlığında indirgenmiş glutatyonu okside glutatyon oksidasyonunu katalizler (Halliwell and Gutteridge 1989). GR enzimi, NADPH varlığında okside glutatyonun indirgenmesini katalizleyen, metal içermeyen bir flavoproteindir. GST enziminin birincil görevi ksenebiyotik veya iç kaynaklı alkilleyici ajanlara karşı detoksikasyon işlemi olabileceği düşünülür (Mates 2000).

Yapılan literatür araştırmalarında antioksidan enzim aktiviteleri ve gen ekspresyonları ile ilgili erişilen veriler izelge 5.1 ve izelge 5.2’de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Hipoksi ve hiperoksiye maruz kalan çeşitli balıklarda redoks parametrelerine ilişkin bulgular (Enzim aktiviteleri)

| Latince İsim | İsim | Etki | Süre | Doku | Artış | Azalış | Değişim Yok | Kaynak |
|-----------------------------|----------------------|-------------------------------|--------|----------------|---------------------|----------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Gökkuşluğu alabalığı | Hiperoksi | 48 sa | Karaciğer | CAT | GSH, tGSH, GSSG, OSI | SOD, GPx, GR, LPO | Ritola <i>et al.</i> 2002a |
| | | | | Solungaç | SOD, CAT, GSH, tGSH | GSSG, OSI | GPx, GR, LPO | |
| | | | | Plazma | | GSSG, OSI | GSH, tGSH | |
| | | | | RBC | GSH, tGSH | | GSSG, OSI | |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Gökkuşluğu alabalığı | Hiperoksi | 14 g | Karaciğer | | tGSH | GSH, GSSG | Ritola <i>et al.</i> 2002c |
| <i>Carassius auratus</i> | Japon balığı | Anoksi | 8 sa | Beyin | GPx | | tGSH, SOD, CAT, GR, GST | Lushchak <i>et al.</i> 2001 |
| | | | | Karaciğer | CAT | | tGSH, SOD, GPx, GR, GST | |
| | | | | Böbrek | | tGSH, CAT | SOD, GPx, GR, GST | |
| | | | | Kas | | | tGSH, CAT, GPx, GR, GST | |
| <i>Cyprinus carpio</i> | Sazan balığı | Hipoksi | 5,5 sa | Beyin | CAT, GPX | GR | TBARS, SOD | Lushchak <i>et al.</i> 2005a |
| | | | | Karaciğer | TBARS | GPX | tGSH, SOD, CAT, GR | |
| | | | | Böbrek | | | TBARS, tGSH, SOD, CAT, GPX, GR | |
| | | | | Kas | | GPX | TBARS, SOD, CAT, GR | |
| <i>Carassius auratus</i> | Japon balığı | Hiperoksi | 12 sa | Beyin | | TBARS | CAT, GST | Lushchak <i>et al.</i> 2005b |
| | | | | Karaciğer | TBARS | | CAT | |
| | | | | Böbrek | | TBARS | CAT, GST | |
| | | | | Kas | TBARS | TBARS | CAT, GST | |
| <i>Danio rerio</i> | Zebra balığı | Orta Hipoksi Aşırı Hipoksi | 48 sa | Tüm iç organ | SOD | | CAT, GPx | Feng <i>et al.</i> 2016 |
| <i>Salmo salar</i> | Somon balığı | Hiperoksi | 6 sa | Karaciğer | TBARS | SOD, GPx | CAT, GSH | Lygren <i>et al.</i> 2000 |
| | | Aşırı Hiperoksi | 12 sa | | TBARS | GSH | SOD, CAT, GPx | |
| <i>Litopenaeus vannamei</i> | Beyaz karides | Orta Hipoksi | 24 sa | Hepatopankreas | SOD, GPx, MDA | | | Li <i>et al.</i> 2016 |
| | | | | Solungaç | SOD, GPx | MDA | | |
| | | Hemolenf | | SOD, GPx, MDA | | | | |
| | | Hepatopankreas | | SOD, GPx, MDA | | | | |
| | | Aşırı Hipoksi | | Solungaç | SOD, GPx | | MDA | |
| | | | | Hemolenf | SOD, GPx, MDA | | | |

Çizelge 5.1. (Devamı) Hipoksi ve hiperoksiye maruz kalan çeşitli balıklarda redoks parametrelerine ilişkin bulgular (Enzim aktiviteleri)

| Latince İsim | İsim | Etki | Süre | Doku | Artış | Azalış | Değişim Yok | Kaynak |
|-------------------------------|----------------------|----------------|--------|-----------|----------------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| <i>Palteobagrus vachelli</i> | Yayın balığı | Hipoksi | 6,5 sa | Karaciğer | SOD, CAT, GPx, GR, GST, LPO, MDA | | | Zhang <i>et al.</i> 2016 |
| | | | | Beyin | MDA | SOD, GPx, GR, GST | CAT, LPO | |
| <i>Salmo salar</i> | Somon balığı | Hiperoksi | 72 g | Karaciğer | | OSI, GSSG | TBARS | Olsvik <i>et al.</i> 2005 |
| <i>Gasterosteus aculeatus</i> | Dikenli balık | Hipoksi | 24 sa | Solungaç | CAT, GPx | | SOD | Lubiana <i>et al.</i> 2016 |
| | | | | Beyin | TBARS | SOD, GR | CAT, GPx, GST | |
| <i>Percottus glenii</i> | Rotan balığı | Hipoksi | 10 sa | Karaciğer | SOD | CAT, GR, TBARS | GPx, GST | Lushchak and Bagnyukova 2007 |
| | | | | Kas | GST | | SOD, CAT, GPx, GR, TBARS | |
| | | | | | | | | |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Gökkuşluğu alabalığı | Akut Hipoksi | 72 sa | Karaciğer | tGSH, GSH, GSSG CAT GPx GST | GSH, MDA, SOD CAT GPx GR GST | | Sonuçlara bakınız |
| | | | | Böbrek | GSSG SOD CAT GPx GR GST | tGSH, GSSG, MDA SOD CAT GST | | |
| | | | | Solungaç | SOD GPx GR GST | tGSH GSH SOD CAT GPx GR GST | GSSG, MDA | |
| | | | | Karaciğer | MDA CAT GST | tGSH, GSH GR | GSSG SOD GPx | |
| | | | | Böbrek | SOD CAT | GPx GR GST | tGSH GSSG, MDA | |
| | | | | Solungaç | SOD | tGSH GPx GR GST | GSH GSSG, MDA CAT | |
| | | Akut Hiperoksi | 28 g | Karaciğer | tGSH, GSH, GSSG, MDA CAT GPx GR | GSH, MDA SOD GPx GR GST | | |
| | | | | Böbrek | GSSG SOD CAT GR | tGSH SOD GPx GR GST | MDA | |
| | | | | Solungaç | GSSG, MDA SOD CAT GPx GR GST | tGSH GSH SOD CAT GPx GR GST | | |
| | | | | Karaciğer | MDA GPx GST | tGSH, GSH CAT | GSSG SOD GR | |
| | | | | Böbrek | MDA SOD CAT GPx | tGSH GR | GSSG GST | |
| | | | | Solungaç | GPx | CAT GR | tGSH GSH GSSG, MDA SOD GST | |

Çizelge 5.2. Hipoksi ve hiperoksiye maruz kalan çeşitli balıklarda gen ekspresyonlarına ilişkin bulgular

| Latince İsim | İsim | Etki | Süre | Doku | Artış | Azalış | Değişim Yok | Kaynak |
|------------------------------|----------------------|------------------|--------|----------------------------|--------------------|--------------------|----------------|------------------------------------|
| <i>Pandalus borealis</i> | Pembe karides | Aşırı Hipoksi | 1 h | Hepatopankreas | | | SOD, CAT, GPx | Pillet <i>et al.</i> 2016 |
| <i>Salmo salar</i> | Somon balığı | Hiperoksi | 72 g | Karaciğer | | | SOD, CAT, GPx, | Olsvik <i>et al.</i> 2005 |
| <i>Litopenaus vannamei</i> | Beyaz karides | Hipoksi | 24 sa | Hepatopankreas Solungaç | | | CAT CAT | Trasviña-Arenas <i>et al.</i> 2013 |
| <i>Palteobagrus vachelli</i> | Yayın balığı | Hipoksi | 6,5 sa | Karaciğer Beyin | SOD | | | Zhang <i>et al.</i> 2016 |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Gökkuşluğu alabalığı | Akut Hipoksi | 72 sa | Karaciğer | SOD CAT GPx GST | SOD CAT GPx GR GST | | Sonuçlara bakınız |
| | | | | Böbrek | CAT GPx GST | SOD CAT GPx GR GST | | |
| | | | | Solungaç | SOD CAT GPx GR GST | SOD CAT GPx GR GST | | |
| | | Kronik Hipoksi | | Karaciğer | GPx | SOD CAT GR GST | | |
| | | | | Böbrek | | SOD GST | CAT GPx GR | |
| | | | | Solungaç | GPx | SOD CAT GST | GR | |
| | | Akut Hiperoksi | 28 g | Karaciğer | SOD CAT GPx GR GST | SOD CAT GPx GR GST | | |
| | | | | Böbrek | SOD CAT GPx GR GST | SOD CAT GPx GR GST | | |
| | | | | Solungaç | SOD CAT GPx GR GST | SOD CAT GPx GR GST | | |
| | | Kronik Hiperoksi | | Karaciğer | | SOD CAT GPx GST | GR | |
| | | | | Böbrek | GR | SOD GPx GST | CAT | |
| | | | | Solungaç | GR | SOD CAT GST | GPx | |

Geniş çaplı literatür araştırmalarında hipoksik veya hiperoksik maruziyetin çeşitli canlıların aynı dokularında veya aynı canlının farklı dokularında antioksidan enzimlere aynı etkileri göstermediği görölmektedir. Örneğin, Zhang *et al.* (2016) ve Lushchak and Bagnyukova (2007) çalışmaları arasında hipoksi uygulaması ile farklı organizmaların karaciğer dokularında yapılan çalışmalarda antioksidan enzim aktiviteleri sırası ile birisi artmışken diğer azalmıştır. Ayrıca Ritola *et al.* (2002a) ve Lygren *et al.* (2000) tarafından yapılan çalışmalarda hiperoksi uygulamasının *O. mykiss* karaciğerinde antioksidan enzim aktiviteleri sırası ile birisinde azalmış iken diğerinde artmıştır. Bunun dışında aynı organizmada uygulanan hipoksinin organizmanın farklı dokularında farklı antioksidan aktivite gösterdiği de görölmektedir. Örneğin Lushchak and Bagnyukova (2007) çalışmasında aynı organizmaya ilişkin beyin, karaciğer ve kas dokularında farklı antioksidan enzim aktivite seviyeleri görölmüştür. Bu durum hipoksik ve hiperoksik uygulamaların hem organizma-spesifik hem de doku-spesifik olduklarının göstergesidir.

Bu çalışmada araştırılan her üç dokunun antioksidan seviyeleri ve gen ekspresyonlarında da hem hipoksi hem de hiperoksi uygulamaları dikkate alındığında çeşitli varyasyonlar gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda gelecek varsayımlar sunulmuştur. Ayrıca tez çalışmasında çalışılan dokulardaki tüm deneyler dikkate alındığında her zamandaki kontrol gruplarının seviyelerinin birbirlerine oldukça yakın olması dikkat çekmiştir. Bu olgu çalışmanın sıhhati ağıısından önemlidir.

5.1.2.1. Karaciğer dokusunda antioksidan enzim aktiviteleri ve gen ifadelerine ilişkin tartışma

Antioksidan enzimlerin yanında pek çok enzim türü bakımından zengin bir immun doku olan karaciğer; ksenobiyotikler, ilaç, viral enfeksiyonlar ve kronik alkolizm gibi ekzojen ve endojen sorunların detoksifikasyonun yanı sıra metabolik fonksiyonların devamlılığından sorumlu olan, antioksidan savunma statüsünü en iyi temsil eden hayati bir organdır (Di Giulio 1995; Abboud and Kaplowitz 2007; Di Naso *et al.* 2011). Ayrıca karaciğer balıkların stabil durumunu ve normal fizyolojik durumunu sürdürmesine

yardımcı olan organdır (Welker *et al.* 2012). Karaciğer dokusu ROS birikiminin neden olduğu oksidatif stres için en hassas dokudur (Ruppert *et al.* 2004). Özellikle aday doku olarak karaciğerin seçilmesindeki maksat metabolik olarak oldukça aktif organ olmasıdır. Bu durum, elde edilen sonuçların yorumlamasını bir o kadar da zorlaştırmaktadır.

Bu çalışmada karaciğer dokusunda elde edilen H₂O₂ seviyeleri başta düzensiz olduğu sonrasında ise normal seviyelerde seyrettiği bulunmuştur. Kontrol, hipoksi ve hiperoksi muamelelerinin birbirleri ile kıyaslandıktan sonra standart hata değerlerinin yüksek olması da istatistiksel farkı anlamsız kılmıştır. H₂O₂ ve SOD veya CAT aktivitesi birbirlerini destekler nitelikte olmadıkları bulunmuştur. Bunun yanında, bu metabolitin oluşmasında doğrudan etkisi olan SOD'a ilave olarak CAT ve GPx aktivitesinin de H₂O₂ seviyesinin değişimine etki ettiğinin bilinmesi gerekir. Ancak H₂O₂'nin detoksifikasyonunda GPx, düşük oksidan stresine karşı koruma sağlarken; CAT ciddi oksidan stresine karşı koruma sağlamaktadır (Yan and Harding 1997). Hem hipoksi hem de hiperoksinin kronik etkisi ile SOD aktivitesi normal seviyelerde iken H₂O₂ miktarı da benzerdir. Ayrıca hem hipoksik hem de hiperoksik uygulama ile SOD enzim aktivitesinin, gen ekspresyon şekilleri ile (24. saat ve 28. gün hariç) benzer olduğu da bulunmuştur. 28. günde gen ifadesinin düşük olduğu ancak enzim aktivitesinin normal seviyelerinde olduğu da dikkat çekmiştir. Tez çalışmasında antioksidan enzim aktiviteleri ve gen ifadeleri genel olarak birbirleri ile paralellik göstermediği görülmüştür. Bunun tahmin edilen sebebi solungaç dokusuna ait tartışma bölümünde bahsedilmiştir.

Her dokuda CAT enzimi aktivite seviyesi oldukça değişkenlik göstermektedir. Akciğer beyin kalp dokularına göre karaciğer dokusunda CAT oldukça yüksek aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Aebi 1984). CAT spesifik aktivite sonuçları dikkate alındığında karaciğer dokusunda, böbrek ve solungaç dokusundan daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada akut hiperoksi ile gökkuşağı alabalığı karaciğerinde CAT aktivitesi artış göstermiştir. Kronik hiperoksi etkisi ile aktivite azalmıştır. Bu veriler, Ritola *et al.*

(2002a)'nın alabalıklarda 48 saatlik hiperoksi uygulamalarından elde ettiği veriyle uyum gösterdiği görülmüştür. Hiperoksi uygulaması ile aktivitenin önce artıp sonradan giderek düşmesi kısmen gen ifadesinde de göze çarpmaktadır. Hipoksi maruziyeti ile başta düşük seyreden CAT aktivitesi ve gen ifadesi seviyeleri sonrasında kontrole göre yükselmiştir. Ancak gen ifadesindeki artan ekspresyon tekrar azalış göstermiştir. SOD aktivitesinin düşük olması ile oluşan ürün miktarının düşük olması metabolizmal bir sonuçtur. Buradan çıkan ürün CAT enziminin substratı olması münasebetiyle CAT aktivitesi ve/veya mRNA ifadesinin deneysel zaman süresince azalması beklenen bir durumdur. Her bir enzim kendi geninin transkripsiyonu sonrası bu transkriptin translasyonu ile oluşmaktadır (Klug *et al.* 2006). Dolayısı ile düşük aktivite gösteren enzimin gen ekspresyonunun düşük olması olası bir durumdur ya da enzimin substrat miktarı da bu enzimin aktivite miktarında etkilidir.

Karaciğerde hipoksi sonucu GPx aktivitesi düşük bulunmuştur. Hiperoksi muamelesi ile başta düşük olan GPx aktivitesi 72. saatten sonra yükselmiştir. Bu sonuçların gen ifadesi ile benzer olmadığı belirlenmiştir. GPx aktivitesi lipit peroksidasyonu ile doğrudan ilişkilidir (Fang *et al.* 2002). CAT ve GPx aktiviteleri ile oluşan grafikler incelendiğinde; stres koşullarının meydana getirdiği peroksitlerin tolere edilmesinde CAT enziminden ziyade GPx enziminin fonksiyon görebileceği fikrini doğurmaktadır. Çünkü H₂O₂ ve lipit peroksidasyon seviyeleri dikkate alındığında, CAT aktivitesinin artmasından ziyade GPx aktivitesinin düzensiz seyretmesi sebebi ile olabileceğini düşündürmüştür. Bu durum Izawa *et al.* (1996) tarafından öne sürülen GPx'in afinitesinin daha yüksek olması verileri ile uyum göstermektedir. Hem hipoksi hem de hiperoksi maruziyeti ile meydana gelen GPx ve GR enzim aktivite seviyeleri dikkate alındığında birbirlerine benzer oldukları görülmektedir. Nitekim birbirleri ile ortak çalışan bu enzimlerin aktivite seviyelerinin bu şekilde sonuçlanması beklenen bir durumdur. Hipoksi maruziyeti altında balıklarda azalan CAT ve GR aktiviteleri muhtemelen onların ROS tarafından inaktive edilmesinden dolayıdır. Çünkü bunların ROS muamelesi ile inaktive edildiği bilinmektedir (Halliwell and Gutteridge 1989). Hipoksik etki ile 6. saatte düşük olan GST aktivitesi sonraki zamanlarda kontrole göre

artış göstermiştir. Hiperoksi akut muamelesi ile düşük olan GST aktivitesi kronik muamele ile artış göstermiştir. Ayrıca hipoksik muamele 24. ve 48. saatlerde ve hiperoksik muamele 12. ve 24. saatlerde gen ifadesi artış göstermiştir. Bu zamanların dışında gen ifadesi azalmıştır. SOD, CAT ve GST gen ekspresyon grafiklerinin hemen hemen aynı olması dikkat çekmektedir. Hem hipoksi hem de hiperoksi muameleleri için özellikle 24. saatten sonra mRNA seviyelerindeki artış önemlidir, hatta tümü için en yüksek mRNA seviyeleri bu zamanda olmuştur.

Sonuç olarak, artmış ROS üretimini engellemek için bu proteinlerin aktivitesinde bir artış meydana gelmelidir. Bununla birlikte, Çizelge 5.1 ve Çizelge 5.2' de tasvir edilen çalışmalar temelinde, enzimlerin çoğunluğunun aktivitelerinin düşük ya da yüksek oksijen stresi için azalmış ya da tepkisiz olduğu görülmektedir. Bu da, redoks ile aktive olan antioksidan düzeylerinin fizyolojik olarak tüm balık türlerinde hipoksi veya hiperoksi olgusuna tepki olarak her zaman artmadığı sonucunu çıkarmış olduğumuzu ortaya koymaktadır.

Tez çalışması karaciğer dokusundaki antioksidan ve antioksidan kapasitesine bağlı bileşenlerin mekanizmaların, hipoksik ve hiperoksik strese karşı adapte olmada aktif rollerinin bulunduğunu göstermiştir.

Normoksideki aktivite varlığı potansiyel oksidatif stresten balıkları korumak için gerekli olmasıdır. Antioksidan enzimlerin seviyeleri oksidatif stresi yenebilmek için organizmaların kapasitesi ile bağlantılıdır (Hermes-Lima and Zenteno-Savin 2002; Hochachka and Lutz 2001; Lushchak 2011a; Martínez-Álvarez *et al.* 2005).

5.1.2.2. Böbrek dokusunda antioksidan enzim aktiviteleri ve gen ifadelerine ilişkin tartışma

Böbrek dokusunda H_2O_2 seviyesi hipoksi ile artmıştır. Hiperoksi maruziyetinde ise bazı zamanlarda (24. ve 48. saatler) önemli derecede değişim göstermesine rağmen antioksidan metabolizma tarafından tolere edildiği tahmin edilerek 72. saat ve 28. günde önemli derecede bir değişimin olmadığı görülmüştür. Geniş skalada oksijen varyasyonu uygulanan hayvanlarda, azalan oksijen koşulları altında antioksidan potansiyelinin artacağı belirtilmektedir (Hermes-Lima and Zenteno-Savin 2002). Bu artış fizyolojik bir oksidatif stres ile ilgili olduğu için bir hazırlık mekanizmasıdır. Böbrek dokusu üzerindeki hipoksi çalışmaları da bu bahsedilen konsepti destekler niteliktedir. Böbrek dokusunda hem hipoksi hem de hiperoksi maruziyetleri için H_2O_2 seviyeleri ve CAT enzim aktivite seviyeleri birbirini desteklemektedir. Genel olarak H_2O_2 miktarı arttığı zaman CAT aktivitesinin artması, azaldığı zaman ise aktivitenin azalması olması gereken bir durumdur. Nitekim CAT enzimi H_2O_2 'yi su ve oksijene katalizler. Hipoksik muamele ile GPx enzim aktivitesinin de H_2O_2 'deki gibi artış gösterdiği dikkat çekmektedir. Ancak kronik hipoksi etkisinin H_2O_2 seviyesini yükseltip GPx aktivitesinde düşüşe neden olması GPx'den ziyade CAT'ın H_2O_2 'nin parçalanmasında rol aldığı fikrini doğurmaktadır. Bu durum GPx'in daha çok glutatyon mekanizması ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür. Akut hipoksi muamelesinde GPx aktivitesinin yüksek olması sonucu GSSG seviyesinin de yüksek olması beklenirken aksine (72. saat hariç) düşük ya da normal seviyelerde bulunmuştur. Bunun nedeni bu muamele zamanlarında GR enzim aktivitesinin artışı olabilir. Akut hipoksinin sonuna doğru (72. saat) GSSG'nin birikime meyil etmesi bu hipotezi doğrulamaktadır. Ancak GR enzimi ile okside GSH redükte edilmiş olabilir. Kronik hipoksi muamelesi ile GPx ve GR aktivitelerinin normal seviyelerinin altına çekilmesi okside ve redükte GSH düzeylerinin bu zamanda normal seyretmesinden kaynaklanabilir. Böbrek dokusunda hiperoksi muamelesi ile MDA seviyesinde hiçbir değişikliğin olmaması, GPx aktivitesinin azalması, GR aktivitesinin giderek artış göstermesi birbirlerini destekler nitelikteki sonuçlardır. Hiperoksi muamelesi ile başta SOD aktivitesinin düşüş

göstermesine rağmen sonrasındaki artış dikkat çekmiştir. Ancak H₂O₂ miktarı ise ilk uygulama saatinden itibaren artmıştır. Hipoksi uygulamasında da hiperoksi uygulamasındaki gibi H₂O₂ ve SOD arasında paralellik görülmemiştir. Tez çalışmasında karaciğer dokusunda da benzer sonuca rastlanmıştır. Böbrek dokusundaki enzim aktivitelerinin gen ifadeleri ile örtüşmediği belirlenmiştir. Yalnızca kronik etki dikkate alındığında H₂O₂'in her iki uygulama için de yüksek olması SOD aktivitelerinin yüksek olmasından kaynaklanabilir. Dolayısı ile CAT aktivitelerinin de yüksek olması beklenen bir durumdur. Hiperoksik uygulamada MDA seviyesinin yüksek olması GPx aktivitesini etkilemiş olabilir.

Tez çalışması böbrek dokusundaki antioksidan ve antioksidan kapasitesine bağlı bileşenlerin mekanizmaların, hipoksik ve hiperoksik strese karşı adapte olmada aktif rollerinin bulunduğunu göstermiştir.

5.1.2.3. Solungaç dokusunda antioksidan enzim aktiviteleri ve gen ifadelerine ilişkin tartışma

Çevreye maruziyetten dolayı akut kirleticiler tarafından toksik etkilerin birincil hedefi solungaçlardır (Evans 1987). Akuakültürde H₂O₂ gibi pro-oksidanlar solungaç lezyonları gibi oksidatif hasarlara neden olabilir (Arndt and Wagner 1997; Speare *et al.* 1999) ve büyüme oranını azaltır (Speare *et al.* 1999). Hipoksi ve hiperoksi muameleleri sonucu dokular arasında H₂O₂ seviyelerindeki en bariz değişim solungaç dokusunda meydana gelmiştir. Solungaç dokusunda H₂O₂ ve SOD enzim aktivite seviyeleri hipoksi uygulaması için düşünüldüğünde 48. saat hariç birbirlerini destekler nitelikte olduğu bulunmuştur. GPx enziminde ise hipoksi uygulaması ile aktivite düşük iken yalnızca 48. saatte yüksek olması dikkat çekmiştir. H₂O₂ seviyesi hem hipoksi hem de hiperoksi uygulaması ile başta düşük ya da normal seyrederken sonrasında (72. saat ve 28. gün) yükselmiştir.

Hipoksik uygulama ile solungaç dokusunda GPx ve GR aktivitelerinin genel olarak düşük ve normal seyretmesi GSH ve GSSG seviyelerinin kontrol seviyelerinde olmasından kaynaklanabilir. Hiperoksi muamelesi ile GPx aktivitesi bazı zamanlarda up-regüle olmuştur. Özellikle kronik etki ile aktivitesi yaklaşık iki kat artmıştır. Bu zamanlarda aynı muamele ile GSH seviyeleri normal seviyelerdedir. Hiperoksik muamele ile GR aktivitesi normal seviyelerde iken etkilenerek artmış ancak 72. saatten itibaren tekrar azalış sergilemiştir. GR enzimi GSSG seviyesi ile paralellik göstermiştir ki bu beklenen bir durumdur. Karaciğer ve böbrek dokularında olduğu gibi solungaç dokusunda da enzim aktiviteleri ile gen ifadeleri arasında oldukça farklı bir şablon bulunmuştur. Antioksidan enzimlerin çok sayıda faktör tarafından düzenlendiği bilinmektedir ve antioksidan enzim aktivitesindeki değişiklikler, kendi mRNA seviyelerindeki değişikliklere paralel değildir (Tsan *et al.* 1990; Ho *et al.* 1996; Röhrdanz and Kahl 1998; Gómez *et al.* 2005). Bu enzimlerin mRNA bozunma hızındaki değişiklikler (mRNA stabilitesi), protein sentezi (translasyon) ve post-translasyonel modifikasyonlardaki (spesifik aktivite) değişimler tarafından önemli ölçüde post-transkripsiyonel seviyede düzenlendiğini bulunmuştur (Clerch 2000). RNA stabilitesi durumunda, RNA'yı bağlayan proteinler bir translasyonel güçlendirici olarak işlev görebilirler (Chung 1998). Genellikle, ilgili aktiviteye sahip antioksidan enzimlerin gen ifadesi ya daha fazla ya da daha az oranda artar (Yoshioka *et al.* 1994; Cowan *et al.* 1992), hatta mRNA seviyeleri yükseldiği (Yoshioka *et al.* 1994; Chung 1998; Clerch 2000; Gómez *et al.* 2005) veya düştüğü (Li *et al.* 2000) zaman bile değişmeden kalabilir. mRNA seviyesinde herhangi bir değişiklik olmadan enzim aktivitelerinde yükselmeler de bildirilmiş (Franco *et al.* 1999) olup bu durumun açıklanması çok güçtür (Cornejo-Garcia *et al.* 2006). Transkripsiyon sonrası etkiler, önceden oluşturulmuş antioksidan enzimlerin varlığı veya konformasyonel değişiklikler antioksidan enzim aktivitesinin artmasına neden olabilir (Harris 1992).

Ancak MDA seviyelerinin tartışıldığı kısımda da bahsedildiği gibi MDA seviyelerinin genel olarak (kronik maruziyetler de dahil olmak üzere) kontrol seviyelerinde seyretmesi, antioksidan enzim aktivitelerinin bu denli değişim göstermesinin, onların

oksidatif stresden doğan lipit peroksidasyon ürünlerini detoksifikasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Bu çalışma, solungaç dokusundaki antioksidan ve antioksidan kapasitesine bağlı bileşenlerin mekanizmaların, hipoksik ve hiperoksik strese karşı adapte olmada aktif rollerinin bulunduğunu göstermiştir.

5.1.3. Genel Değerlendirme

OSI, GSH/GSSG, H₂O₂ ve MDA seviyeleri dikkate alındığında; karaciğer ve solungaç dokusunda hipoksi ve hiperoksinin neredeyse benzer ölçüde bir stres faktörü oluşturmuşken böbrek dokusunda hipoksi maruziyeti hiperoksiden daha fazla oksidatif strese neden olduğu bulunmuştur. Böbrek ve solungaç dokularındaki glutasyon metabolizması oksijen farklılıklarından karaciğer dokusundaki kadar etkilenmemiştir. Tüm bunlar, hipoksi ve hiperoksi tepkisinin Lushchak and Bagnyukova (2006a)'nın da savunduğu gibi büyük ölçüde doku spesifik olduğunun göstergesidir. İşte bu dikkate alındığında sonuçlara göre hipoksi veya hiperoksi uygulamalarından, tüm gen ifadeleri ya da tüm antioksidan enzim aktiviteleri için genel bir sonuç elde etme fikri yanlış olabilir. Herbir doku için, her bir uygulama açısından ayrı değerlendirmek elzemdir. Çalışmadaki veriler birlikte ele alındığında, farklı sonuçlar şimdiye kadar incelenen balık türlerindeki bulgular şu yorumları da düşündürmektedir: Hipoksi ve hiperoksiye tepkinin doku spesifik olduğu kadar aktivite seviyeleri ile antioksidan savunma arasındaki sistematik ilişkinin de doku spesifik olduğu ve balıklar kendilerini oksidatif stresden korumak için genellikle belirlenemeyen farklı endojen antioksidanları da kullanabileceğidir.

Düşük ve yüksek oksijene maruz kalma, dokularda enzim aktivite ve gen ekspresyonlarında çeşitli değişimler ile sonuçlanırken, H₂O₂ ve MDA uzun süreli hipoksi ve hiperoksi stresi altında geçici olarak azalmış ya da değişmemiş ancak daha sonra önemli derecede artmıştır. Bu, hipoksi ve hiperoksinin lipid peroksidasyona karşı

savunma geliştirmesini veya telafi edemeyici bir etkiye sahip olduğu fikrini doğurmuştur.

SOD, CAT, GPx, GR ve GST aktiviteleri, dokuya özgü farklı oksijen muameleleri sırasında zamansal değişkenlik göstermiştir. Karaciğer, böbrek ve solungaç dokularında ilk ölçülen 6. saatten itibaren enzim aktivite değişimleri, GSH metabolizması, H₂O₂ ve MDA oksijen ile indüklenen ROS' a karşı organizmanın savunmasının ilk tepkisi olabilir. Tez çalışmasında hipoksi ve hiperoksiye verilen yanıtların balıklarda nasıl etkileşim kurabileceğini göstermektedir; bu da, zamansal değişime ve çevresel tepkilerin düzenlenmesindeki farklı seviyelere ilişkin daha fazla bilgi edinmenin gelecekteki araştırmalarda gerekli olduğunu düşündürmektedir. Sonularımızdaki bu derece farklı değişimler Dr. Hermes-Lima (1998)'nin oksidatif stres ile savaşmak için antioksidan seviyesinin, farklı indislerin ve gen ekspresyonlarının değişim göstereceği hipotezini desteklemektedir.

Genomik ve protein cevaplarındaki geçici farklılıklar, gen ekspresyon ve enzimatik aktivite seviyeleri için elde edilen farklı cevapları açıklamak için olabilir ayrıca translasyon mekanizmasındaki etkiler (protein sentezi)'de olabilmektedir (Everet *et al.* 2012; Nikinmaa and Rytknen 2011, 2012).

Tüm bu redoks tepkimeleri ile aktivitesi ve miktarları değiştirilen enzim ve metabolitlerin tek bir amacı vardır: Metabolizmal seviyeleri dengelemek. Aerobik dokular olan böbrek ve özellikle karaciğer, ROS oluşumunda yüksek bir potansiyele sahiptir. Bu dokular, hasara uğramış lipid ve proteinleri tamir etmek ve detoksifikasyonu için güçlü koruyucu mekanizmalar tarafından etkili bir şekilde dengelenmektedir (Lushchak and Bagnyukova 2006a). Antioksidan enzimler, mRNA seviyeleri, GSH, MDA ve H₂O₂ seviyelerinin değişimi metabolizmal çerçevede bu dengenin sağlanması ile ilgili olabileceği kanısındayız.

Solungaç, oksijen alımının ve taşımının yapıldığı ve karaciğer ise sindirim, depolama ve rezerv, lipit ve karbonhidrat metabolizmaları, detoksifikasyon ve absorpsiyon süreçleri ile ilgili (Parrilla-Taylor and Zenteno-Savín 2011) bir doku olduğu için olabilir. Nitekim bu dokular yüksek metabolizma oranına sahiptir ve oksidatif strese daha yatkındır. Ayrıca ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşebildiği de bilinmektedir. Bu dönüşüm ile ROS üretilebilir. Bu yüzden hipoksi altındaki ürünler elektron taşıma zincirinin taşıyıcılarının inaktivasyonu ile sonuçlanabileceği de unutulmamalıdır (Hochachka and Lutz 2001; Nilsson and Renshaw 2004; Lushchak and Bagnyukova 2007). İlave olarak spesifik sirkadiyen ritimler de enzim aktivite seviyelerinde farklılıklara neden olabilmektedir. Sirkadiyen ritim önemli rollere sahiptir ve hormonal düzenleme, enzim aktiviteleri ve gen ekspresyonları gibi fizyolojik vücut fonksiyonlarını etkilemektedir (Doherty and Kay 2010). Bunun dışında, antioksidan cevaptaki çeşitliliğin bazısı balıkların aktivite seviyelerinin bağlı oldukları çevre tarafından açıklanabilir ve fiziksel olarak aktif olan türler daha az aktif olan türlere göre daha yüksek SOD ve CAT konsantrasyonlarına sahip oldukları düşünülür (Wilhelm 1996). Sucul çevrelerde fotosentez tarafından üretilen oksijenin varlığı en yüksek olduğu zaman artan hücre içi ROS seviyeleri gün boyunca en yüksek aerobik solunumdan kaynaklanabilir. Düşük genel aktivite ve bir de azalan metabolik aktivite tarafından karakterize edilen gece boyunca enzim aktivitelerinin düşmesine izin verebilir (Halliwell and Gutteridge 1999). Tüm bunların organizmayı etkiledikleri yadsınamaz. Bu metabolizmanın kesin bir şekilde çözümlenebilmesi için antioksidan metabolizma ile birlikte birçok mekanizmanın da belirlenebilmesi çalışmanın sıhhati açısından önemlidir. Yani, antioksidan enzimlerinin haricinde diğer antioksidan savunma mekanizmaları ROS birikimini dengeleyebilmektedir (Halliwell and Gutteridge 1989). Bu sebeple antioksidan enzimlerin yanında antioksidan bağımlı tüm bileşenlerin oksidan-antioksidan yolağındaki durumları tamamen değerlendirilmeli ve sistemsel mekanizmanın doğası tümünden araştırılmalıdır. Aksi halde kesin bir yargıya varmak imkânsızdır. Nitekim tez çalışmasının birçok noktasında paralellik göstermeyen bulgular sadece antioksidan enzimlerin değil aynı zamanda farklı yolların da duruma müdahil olabileceği fikrini akıllara getirmektedir.

5.2. Sonuç

Tez çalışmasında akut ve kronik olarak hipoksi ve hiperoksi koşulları altında gökkuşaağı alabalığı karaciğer, böbrek ve solungaç dokularında tGSH, GSH, GSSG, GSH/GSSG, OSI, MDA ve H₂O₂ miktarlarının, CAT, SOD, GPx, GR ve GST gen ekspresyonlarının ve aktivitelerinin değiştii belirlendi. Bu bağlamda, sonuçlarımız hipoksi ve hiperoksi maruziyeti uygulamalarının bu indisler, genler ve aktiviteleri üzerinde önemli etkilere sahip olduğunu gösterdi.

Tez sonuçları birlikte ele alındığında, şu sonuçlar çıkarım yapılabilir:

(i) Bu veriler, akut veya kronik hipoksi ve hiperoksi maruziyetlerinin oksidatif stresin gelişmesine ve dokulardaki antioksidan enzimlerin dengeleyici değişimlerine neden olduğunu göstermektedir. Bu antioksidan enzimlerin aktivitelerinin değişimi hipoksi ve hiperoksinin ROS oluşumunu tetiklediği ve dolayısı ile de antioksidan enzimler ve antioksidan kapasitesine bağlı bileşenlerin (MDA, H₂O₂ ve GSH) miktarlarının antioksidan yolağındaki fonksiyonları göz önünde bulundurularak o nispette etkilediğinin bir göstergesi sayılabilir.

(ii) Çözünmüş oksijen, sucul organizmalar için en önemli çevresel faktörlerden biridir. Hipoksi ve hiperoksi, gökkuşaağı alabalığının büyümesi, gelişimi ve hayatta kalması için bir dezavantajdır. Bu nedenle, antioksidan enzim aktiviteleri, gen ifadeleri ve oksidatif stres hipoksi ve hiperoksinin etkilerini araştırmak, anti-hipoksi ve –hiperoksi mekanizmalarının geliştirilmesine yardımcı olacağı düşünülmektedir.

(iii) Tez sonuçları hem hipoksi hem de hiperoksi muameleleri antioksidan enzim aktivitesine bağlı bileşenler, glutatyon metabolizması, antioksidan enzim aktivitesi ve gen ekspresyonları üzerine doku-spesifik olduğunu göstermiştir.

(iv) Hipoksi ve hiperoksiye karşı organizmanın hem akut hem de kronik cevabı değişkenlik arz ederken, oksidatif stresi 12, 24 hatta 48 saatte kısmen tolere edebildiği, bazı antioksidan enzimlerde ise 28. günde dahi tolere edemediği belirlenmiştir.

(v) Antioksidan enzimler transkripsiyonel seviyede kontrol edilmeleri yanı sıra proteomik seviyede de kontrol edilmektedir. Transkriptomik seviyedeki etki anlık bir değişim göstermesine rağmen asıl düzenleme post-translasyonel modifikasyonlarla gerçekleşmektedir.

(vi) Tez çalışması karaciğer dokusundaki antioksidan ve antioksidan kapasitesine bağlı bileşenlerin mekanizmaların, hipoksik ve hiperoksik strese karşı adapte olmada aktif rollerinin bulunduğunu göstermiştir.

(vii) Tez sonuçları *O. mykiss*' in oksijen çalışmalarında kullanılması için elverişli bir model organizma olabileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

- Abboud, G., and Kaplowitz, N., 2007. Drug-induced liver injury. *Drug Safety*, 30, 277–294.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- Ahmad, S., 1995. Antioxidant mechanisms of enzymes and proteins. *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*, Ed: Ahmad, S. Chapman and Hall, New York, pp. 238–272.
- Almeida-Val, V. M. F., Val, A. L., Duncan, W. P., Souza, F. C. A., Paula-Silva, M. N., and Land, S., 2000. Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 125(2), 219-226.
- Alvarez-Pellitero, P., 2008. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet Immunol Immunopathol*, 126, 171–198.
- Ankeny, R.A., 2001. Model Organisms as Models: Understanding the ‘Lingua Franca’ of the Human Genome Project., *Philos. Sci.*, 68, 251-261.
- Armstrong, D., 2002. Oxidative stress, biomarkers and antioxidant protocols. *Methods in Molecular Biology*, In: Walker, J.M. (Ed.). Humana Press, Totowa, New Jersey, 1– 322.
- Armstrong, R. N., 1991. Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure, and function. *Chemical Research in Toxicology*, 4(2), 131-140.
- Arndt, R.E., Wagner, E.J., 1997. The toxicity of hydrogen peroxide to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and cutthroat trout *Oncorhynchus clarkii* fry and fingerlings. *J. World Aquacult. Soc.*, 28, 150–157.
- Ayer, A., Gourlay, C.W., and Dawes, I.W., 2014. Cellular redox homeostasis, reactive oxygen species and replicative ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 14(1), 60–72.
- Babior, B.M., 1984. The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest*, 73(3), 599–601.
- Babior, B.M., Curnutte, J.T., and Kipnes, R.S., 1975. Biological defense mechanisms. Evidence for the participation of superoxide in bacterial killing by xanthine oxidase. *J Lab Clin Med*, 85, 235–244.
- Babior, B.M., Kipnes, R.S., and Curnutte, J.T., 1973. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest*, 52, 741–744.
- Baldrige, C.W., and Gerard, R.W., 1933. The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol*, 103(1), 235–236.
- Ballatori, N., Krance, S.M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., and Hammond, C.L., 2009. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biological chemistry*, 390(3), 191-214.
- Bartosz, G., 2009. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol*, 77(8), 1303–1315.

- Beers, R.F. Jr., and Sizer, I.W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 195, 133-140.
- Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., and Ferencik, M., 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences*, 65, 1865-1874.
- Berntssen, M.H., Lundebye, A.K., and Hamre, K., 2000. Tissue lipid peroxidative responses in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) parr fed high levels of dietary copper and cadmium. *Fish Physiology and Biochemistry*, 23(1), 35-48.
- Bocci, V., Borrelli, E., Travagli, V., and Zanardi, I., 2009. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med. Res. Rev.*, 29, 646-682
- Boehme, D.S., Hotchkiss, J.A., and Henderson, R.F., 1992. Glutathione and GSH-dependent enzymes in bronchoalveolar lavage fluid cells in response to ozone. *Experimental and molecular pathology*, 56(1), 37-48.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brannian, J.D., Zhao, Y., and Burbach, J.A., 1997. Localization of lipid peroxidation-derived protein epitopes in the porcine corpus luteum. *Biol. Reprod.*, 57, 1461-1466.
- Briggs, R.T., Karnovsky, M.L., and Karnovsky, M.J., 1977. Hydrogen peroxide production in chronic granulomatous disease. A cytochemical study of reduced pyridine nucleotide oxidases. *J Clin Invest*, 59, 1088-1098.
- Britigan, B.E., Cohen, M.S., and Rosen, G.M., 1987. Detection of the production of oxygen-centered free radicals by human neutrophils using spin trapping techniques: a critical perspective. *J Leukoc Biol*, 41, 349-362.
- Buxton, G.V., Greenstock, C.L., Helman, W.P., and Ross, A.B., 1988. Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}/\text{O}^-$ in aqueous solution. *Journal of physical and chemical reference data*, 17(2), 513-886.
- Cabiscol, E., and Levine, R.L., 1995. Carbonic anhydrase III. Oxidative modification in vivo and loss of phosphatase activity during aging. *Journal of Biological Chemistry*, 270(24), 14742-14747.
- Carlberg, I., and Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Research Support, Non-U.S. Gov't. Methods Enzymol*, 113, 484-490.
- Chernyak, B.V., 1997. Redox regulation of the mitochondrial permeability transition pore. *Biosci Rep* 17, 293-302.
- Christman, M.F., Morgan, R.W., Jacobson, F.S., and Ames, B.N., 1985. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell*, 41, 753-762.
- Chung, D.J., Wright, A.E., and Clerch, L.B., 1998. The 3' Untranslated Region of Manganese Superoxide Dismutase RNA Contains a Translational Enhancer Element. *Biochemistry*, 37(46), 16298-16306.
- Clerch, L.B., 2000. Post-Transcriptional Regulation of Lung Antioxidant Enzyme Gene Expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 103-111.

- Collins, F.S., Patrinos, A., Jordan, E., Chakravarti, A., Gesteland, R., and Walters, L. 1998. New goals for the US human genome project: 1998-2003. *Science*, 282(5389), 682-689.
- Commoner, B., Townsend, J., and Pake, G.E. 1954. Free radicals in biological materials. *Nature*, 174, 689-691.
- Cooper, R.U., Clough, L.M., Farwell, M.A., and West, T. L., 2002. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 279(1), 1-20.
- Cornejo-Garcia, J.A., Mayorga, C., Torres, M.J., Fernandez, T.D., Bravo, I., Mates, J.M., and Blanca, M., 2006. Anti-oxidant enzyme activities and expression and oxidative damage in patients with non-immediate reactions to drugs. *Clinical & Experimental Immunology*, 145(2), 287-295.
- Cowan, D.B., Weisel, R.D., Williams, W.G., and Mickle, D.A.G., 1992. The regulation of glutathione peroxidase gene expression by oxygen tension in cultured human cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 24(4), 423-433.
- Curnutte, J.T., Babior, B.M., and Karnovsky, M.L., 1979. Fluoride-mediated activation of the respiratory burst in human neutrophils. A reversible process. *J Clin Invest*, 63(4), 637-647.
- Çavaş, T., 2004. Endüstriyel Atıkların Genotoksik Etkilerinin Mikronükleus ve AgNOR Analiz Teknikleri Kullanılarak in-Situ ve Laboratuvar Koşulları Altında Araştırılması. Doktora Tezi, MÜ Fen Bil. Enst., Mersin.
- Dalle-Donne, I., Milzani, A., Gagliano, N., Colombo, R., Giustarini, and D., Rossi, R., 2008. Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antioxidants and redox signaling*, 10(3), 445-474.
- Das, K. C., Pahl, P.M., Guo, X.L., and White, C.W., 2001. Induction of peroxiredoxin gene expression by oxygen in lungs of newborn primates. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 25, 226-232.
- Das, K.C., Guo, X.L., and White, C.W., 1999. Induction of thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in lungs of newborn primates by oxygen. *American Journal of Physiology*, 276, L530-L539.
- Dasgupta, S., Di Giulio, R.T., Drollette, B.D., Plata, D., Brownawell, B.J., and McElroy, A. E., 2016. Hypoxia depresses CYP1A induction and enhances DNA damage, but has minimal effects on antioxidant responses in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) larvae exposed to dispersed crude oil. *Aquatic Toxicology*. 177, 250-260
- Davies, K.J.A., 2000. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.*, 61, 1-31.
- Demple, B., 1991. Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annu Rev Genet*, 25, 315-337.
- Demple, B., and Amabile-Cuevas, C.F., 1991. Redox redux: the control of oxidative stress responses. *Cell*, 67, 837-839.
- Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., and Fobert, P.R., 2000. The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell*, 12, 279-290.

- Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M., and Van Veld, P.A., 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. *Fundamentals of aquatic toxicology*, 2, 523-560.
- Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W., and Jewell, C.S., 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8(12), 1103-1123.
- Di Naso, F.C., Simoes Dias, A., Porawski, M., and Marroni, N.A., 2011. Exogenous superoxide dismutase: action on liver oxidative stress in animals with streptozotocin-induced diabetes. *Research Support, Non-U.S. Gov't. Exp Diabetes Res*, 2011, 754132. doi: 10.1155/2011/754132
- Doherty, C.J., and Kay, S.A., 2010. Circadian control of global gene expression patterns. *Annual review of genetics*, 44, 419-444.
- Drath, D.B., Karnovsky, M.L., 1975. Superoxide production by phagocytic leukocytes. *J Exp Med*, 141, 257-262.
- Dröge, W., Schulze-Osthoff, K.L.A.U.S., Mihm, S., Galter, D., Schenk, H.E., Eck, H.P., Roth, S., and Gmünder, H., 1994. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *The FASEB journal*, 8(14), 1131-1138.
- Eklow-Lastbom, L., Rossi, L., Thor, H., and Orrenius, S., 1986. Effects of oxidative stress caused by hyperoxia and diquat. A study in isolated hepatocytes. *Free Radic. Res. Commun.*, 2, 57-68.
- Esterbauer, H., and Cheeseman, K.H., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynoneal. *Methods in Enzymology*, 186, 407-421.
- Evans, D.H., 1987. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 71, 47-58.
- Everett, M.V., Antal, C.E., and Crawford, D.L., 2012. The effect of short-term hypoxic exposure on metabolic gene expression. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 317(1), 9-23.
- Fang, Y.Z., Yang, S., and Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.
- Felton, G.W., 1995. Oxidative stress of vertebrates and invertebrates. *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*, In: Ahmad, S. (Ed.). Chapman and Hall, New York, 356-434.
- Feng, J., Guo, Y., Gao, Y., and Zhu, L., 2016. Effects of Hypoxia on the Physiology of Zebrafish (*Danio rerio*): Initial Responses, Acclimation and Recovery. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 96(1), 43-48.
- Finucane, D.M., Bossy-Wetzel, E., Waterhouse, N.J., Cotter, T.G., and Green, D.R., 1999. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Biol Chem*, 274, 2225-2233.
- Franco, A.A., Odom, R.S., and Rando, T.A., 1999. Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9), 1122-1132.
- Fritsche, K.L., and Johnston, P.V., 1988. Rapid autoxidation of fish oil in diets without added antioxidants. *J Nutr*, 118(4), 425-426.

- Fukunaga, K., Nakazono, N., Suzuki, T., and Takama, K., 1999. Mechanism of oxidative damage to fish red blood cells by ozone. *IUBMB Life*, 48, 631–634.
- Furchgott, R.F., and Vanhoutte, P.M., 1989. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*, 3, 2007–2018.
- Furchgott, R.F., and Zawadzki, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 373–376.
- Gallagher, E.P., Hasspieler, B.M. and Di Giulio, R.T., 1992. Effects of buthionine sulfoximine and diethyl maleate on glutathione turnover in the channel catfish. *Biochem. Pharmacol*, 43, 2209-2215.
- Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P., and Fenn, W.O., 1954. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science*, 119, 62362–62366.
- Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Tsikas, D., and Rossi, R., 2009. Oxidative stress and human diseases: origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 46(5-6), 241-281.
- Gomberg, M., 1900. An instance of trivalent carbon: triphenylmethyl. *J Am Chem Soc*, 22, 757–771.
- Gómez, M., Esparza, J.L., Nogués, M.R., Giralt, M., Cabré, M., and Domingo, J.L., 2005. Pro-oxidant activity of aluminum in the rat hippocampus: gene expression of antioxidant enzymes after melatonin administration. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(1), 104-111.
- Gonzalez, M.J., Gray, J.I., Schemmel, R.A., Dugan, L. Jr, and Welsch, C.W., 1992. Lipid peroxidation products are elevated in fish oil diets even in the presence of added antioxidants. *J Nutr*, 122(11), 2190–2195.
- Griguer, C.E., Oliva, C.R., Kelley, E.E., Giles, G.I., Lancaster, J.R., and Jr, Gillespie, G.Y., 2006. Xanthine oxidase-dependent regulation of hypoxia-inducible factor in cancer cells. *Cancer Res*, 66, 2257–2263.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Handy, D.E., Lubos, E., Yang, Y., Galbraith, J.D., Kelly, N., Zhang, Y.Y., and Loscalzo, J., 2009. Glutathione peroxidase-1 regulates mitochondrial function to modulate redox-dependent cellular responses. *Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't. J Biol Chem*, 284(18), 11913-11921.
- Harman, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11,298–300.
- Harman, D., 2009. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009. *Biogerontology*, 10, 773–781.
- Harris, E.D., 1992. Regulation of antioxidant enzymes. *The FASEB Journal*, 6(9), 2675-2683.

- Hasspieler, B.M., Behar, J.V., and DiGiulio, R.T., 1994. Glutathione-dependent defense in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 28(1), 82-90.
- Hébert, N., Gagné, F., Cejka, P., Bouchard, B., Hausler, R., Cyr, D.G., Blaise, C., and Fournier, M., 2008. Effects of ozone, ultraviolet and peracetic acid disinfection of a primary-treated municipal effluent on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol*, 148, 122–127
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional metabolism: Regulation and adaptation*, 1, 319-68.
- Hermes-Lima, M., and Zenteno-Savín, T., 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology*, 133(4), 537-556.
- Hermes-Lima, M., Storey, J.M., Storey, K.B., 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 120, 437–448.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., and Storey, K.B., 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. *Free Radic Biol Med*, 19, 271–280.
- Ho, Y.S., Dey, M.S., and Crapo, J.D., 1996. Antioxidant enzyme expression in rat lungs during hyperoxia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 270(5), L810-L818.
- Hochachka, P.W., and Lutz, P.L., 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 130, 435–459.
- Hochachka, P.W., Buck, L.T., Doll, C.J., and Land, S.C., 1996. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18), 9493-9498.
- Hoeberichts, F.A., and Woltering, E.J., 2003. Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessays*, 25, 47–57.
- Ishikawa, T., Zimmer, M., and Sies, H., 1986. Energy-linked cardiac transport system for glutathione disulfide. *FEBS Lett.*, 200, 128– 132.
- Itoh, K., Ishii, T., Wakabayashi, N., and Yamamoto, M., 1999. Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress. *Free. Radic. Res.*, 31, 319–324.
- Iwama, K.G., 2004. Stress in fish. *Fish Biol. Fisheries*, 8(1), 35-56.
- 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, 61–67.
- Jensen, F.B., Nikinmaa, M., and Weber, R.E., 1993. Environmental perturbations of oxygen transport in teleost fishes: causes, consequences and compensations. In *Fish ecophysiology*, 9, 161-179.

- Johannsson, O.E., Bergman, H.L., Wood, C.M., Laurent, P., Kavembe, D.G., Bianchini, A., Maina, J.N., Chevalier, C., Bianchini, L.F., Papah, M.B., and Ojoo, R.O., 2014. Air breathing in the Lake Magadi tilapia *Alcolapia grahami*, under normoxic and hyperoxic conditions, and the association with sunlight and ROS. *J Fish Biol*, 84, 844–863.
- Johansen, K.A., and Overturf, K., 2005. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Marine Biotechnology*, 7, 576–587.
- Kelly, K.A., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H., and Levin, E.D., 1998. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental Health Perspectives*, 106(7), 375–384.
- Klug, W.S., Cumming, M.R., Spencer, C.A., 2006. Genetik şifre ve transkripsiyon. *Genetik kavramlar*, (Çev. ed.) Öğüş, A. Palme Yayıncılık, Ankara, p: 306-333.
- Koçpınar, E.F., 2015. Tip60 geninin oksidatif stres üzerine etkisinin karaciğer spesifik tip60 nakavt fare karaciğerinde araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 153, 137-139.
- Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., and Vercesi, A.E., 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Research Support, Non-U.S. Gov't Review. Free Radic Biol Med*, 47(4), 333-343.
- Kroemer, G., Dallaporta, B., and Resche-Rigon, M., 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*, 60, 619–642.
- Krumschnabel, G., Schwarzbaum, P.J., Lisch, J., Biasi, C., and Wieser, W., 2000. Oxygen-dependent energetics of anoxia-tolerant and anoxia-intolerant hepatocytes. *Journal of Experimental Biology*, 203(5), 951-959.
- Kuge, S., and Jones, N., 1994. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J*, 13, 655–664.
- Lamarre, S.G., Le François N.R., Driedzic, W.R., and Blier, P.U., 2009. Protein synthesis is lowered while 20S proteasome activity is maintained following acclimation to low temperature in juvenile spotted wolffish (*Anarhichas minor* O lafsén). *J Exp Biol*, 212, 294–1301.
- Lee, P.J., and Choi, A.M.K., 2003. Pathways of cell signaling in hyperoxia. *Free Radical Biology and Medicine*, 35, 341– 350.
- Leveelahti, L., Rytönen, K.T., Renshaw, G.M., and Nikinmaa, M., 2014. Revisiting redox-active antioxidant defenses in response to hypoxic challenge in both hypoxia-tolerant and hypoxia-sensitive fish species. *Fish physiology and biochemistry*, 40(1), 183-191.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X., 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91, 479–489.
- Li, T., Danelisen, I., Belló-Klein, A., and Singal, P.K., 2000. Effects of probucol on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Cardiovascular research*, 46(3), 523-530.
- Li, Y., Wei, L., Cao, J., Qiu, L., Jiang, X., Li, P., Song, Q., Zhou, H., Han, Q., and Diao, X., 2016. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in

- the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation. *Chemosphere*, 144, 234-240.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X., 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86, 147-157.
- Love, M.R., 1980. *Chemical Biology of Fishes: Advances 1968-1977*. Academic Press, p:943, London.
- Lubiana, P., Prokkola, J.M., Nikinmaa, M., Burmester, T., Kanerva, M., and Götting, M., 2016. The effects of the painkiller diclofenac and hypoxia on gene transcription and antioxidant system in the gills of three-spined stickleback. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 185, 147-154.
- Lushchak, V.I., 2001. Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. *Biochemistry (Mosc)*, 66, 476-489.
- Lushchak, V.I., 2002. Oxidative stress in bacteria. Oxidative stress at molecular, cellular and organ levels, In Johnston, P., Boldyrev, A.A., (Ed.). *Research Signpost, Trivandrum, India*, pp: 45-65.
- Lushchak, V.I., 2007. Free radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of organisms. *Biochemistry (Mosc)*, 72, 809-827.
- Lushchak, V.I., 2010. Oxidative stress in yeast. *Biochemistry (Mosc)*, 75(3), 346-364.
- Lushchak, V.I., 2011a. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13-30.
- Lushchak, V.I., 2011b. Adaptive response to oxidative stress: bacteria, fungi, plants and animals. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol*, 153, 175-190.
- Lushchak, V.I., 2012. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids.*, doi:10.1155/2012/736837
- Lushchak, V.I., 2014a. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*, 224, 164-175.
- Lushchak, V.I., 2014b. Classification of oxidative stress based on its intensity. *EXCLI J*, 13, 922-937.
- Lushchak, V.I., 2016. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish physiology and biochemistry*, 42(2), 711-747.
- Lushchak, V.I., and Bagnyukova, T.V., 2006a. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 144(3), 283-289.
- Lushchak, V.I., and Bagnyukova, T.V., 2006b. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 143(1), 30-35.
- Lushchak, V.I., and Bagnyukova, T.V., 2006c. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 143(1), 36-41.

- Lushchak, V.I., and Bagnyukova, T.V., 2007. Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Perccottus glenii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 148(4), 390-397.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Husak, V.V., Luzhna, L.I., Lushchak, V., and Storey, K.B., 2005b. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 37(8), 1670-1680.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Lushchak, O.V., Storey, J.M., and Storey, K.B., 2005a. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 1319–1330.
- Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A., and Hermes-Lima, M., 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 280(1), R100-R107.
- Lygren, B., Hamre, K., and Waagbø, R. 2000. Effect of induced hyperoxia on the antioxidant status of Atlantic salmon *Salmo salar L.* fed three different levels of dietary vitamin E. *Aquaculture Research*, 31(4), 401-407.
- Margaritelis, N.V., Veskoukis, A.S., Paschalis, V., Vrabas, I.S., Dipla, K., Zafeiridis, A., Kyparos, A., and Nikolaidis, M.G. 2015. Blood reflects tissue oxidative stress: a systematic review. *Biomarkers*, 20(2), 97-108.
- Marí, M., Morales, A., Colell, A., García-Ruiz, C., and Fernández-Checa, J.C., 2009. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal*, 11(11), 2685–2700.
- Marnett, L.J. 1999. Lipid peroxidation–DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, 424, 83- 95.
- Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., and Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and fisheries*, 15(1-2), 75-88.
- Mates, J.M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153(1), 83-104.
- Mavis, R.D., and Stellwagen, E. 1968. Purification and subunit structure of glutathione reductase from bakers' yeast", *Journal of Biological Chemistry*, 243(4), 809-814.
- Maxwell, P.H., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J., 2001. The pVHL-HIF-1 system. Hypoxia, Roach, R.C., Wagner, P.D. Hackett, P.H., (Ed). Springer US, pp: 365-376.
- McCord, J.M., and Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.
- Mercan, L., Sirkecioğlu, N., Aksakal, E., Bayır, M., Bayır, A., Aras, M., ve Ekinci, D. 2013. Goose fat, a promising nutrient for fish feeding, activates antioxidant enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(3), 964-971.
- Michaelis, L., 1939. Free radicals as intermediate steps of oxidation-reduction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 7, 33–49.

- Michail, K., Baghdasarian, A., Narwaley, M., Aljuhani, N., and Siraki, A.G., 2013. Scavenging of free-radical metabolites of aniline xenobiotics and drugs by amino acid derivatives: toxicological implications of radical-transfer reactions. *Chem Res Toxicol*, 26, 1872–1883.
- Miller, J.W., Selhub, J., and Joseph, J.A., 1996. Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: protective effects of O-methylation and melatonin. *Free Radic Biol Med*, 21, 241–249.
- Monaghan, B.R., and Schmitt, F.O., 1932. The effects of carotene and of vitamin A on the oxidation of linoleic acid. *J Biol Chem*, 96, 387–395.
- Moraes, G., 2004. Metabolical responses in adaptation to stress in fish, International Congress on the Biology of Fish, Manaus, Brazil.
- Morgan, R.W., Christman, M.F., Jacobson, F.S., Storz, G., and Ames, B.N. 1986. Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 8059–8063.
- Muenzer, J., Weinbach, E.C., and Wolfe, S.M., 1975. Oxygen consumption of human blood platelets. II. Effect of inhibitors on thrombin-induced oxygen burst. *Biochim Biophys Acta*, 376, 243–248.
- Mukhopadhyay, D., Srivastava, R., and Chattopadhyay, A., 2015. Sodium fluoride generates ROS and alters transcription of genes for xenobiotic metabolizing enzymes in adult zebrafish (*Danio rerio*) liver: expression pattern of Nrf2/Keap1 (INrf2). *Toxicol Mech Methods*, 23, 1–10.
- Mürer, E.H., 1968. Release reaction and energy metabolism in blood platelets with special reference to the burst in oxygen uptake. *Biochim Biophys Acta*, 162(3), 320–326.
- Nanduri, J., Vaddi, D.R., Khan, S.A., Wang, N., Makerenko, V., and Prabhakar, N.R., 2013. Xanthine oxidase mediates hypoxia-inducible factor-2 α degradation by intermittent hypoxia. *PLoS ONE*, 8(10), e75838.
- Niki, E., 2000. Free radicals in the 1900's: from in vitro to in vivo. *Free Radic Res*, 33(6), 693–704.
- Nikinmaa, M., and Rees, B.B., 2005. Oxygen-dependent gene expression in fishes. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(5), R1079-R1090.
- Nikinmaa, M., and Rytönen, K.T., 2011. Functional genomics in aquatic toxicology—do not forget the function. *Aquatic toxicology*, 105(3), 16-24.
- Nikinmaa, M., and Rytönen, K.T., 2012. From genomes to functions in aquatic biology. *Marine genomics*, 5, 1-6.
- Nilsson, G.E., and Renshaw, G.M., 2004. Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark. *Journal of Experimental Biology*, 207(18), 3131-3139.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annals of Biochemistry*, 95, 351- 358.
- Olcott, H.S., and Mattill, H.A., 1931a. The unsaponifiable lipids of lettuce. II Fractionation. *J Biol Chem*, 93, 59–64.

- Olcott, H.S., and Mattill, H.A., 1931b. The unsaponifiable lipids of lettuce. III Antioxidant. *J Biol Chem*, 93, 65–70.
- Olsvik, P.A., Kristensen, T., Waagbø, R., Rosseland, B.O., Tollefsen, K.E., Baeverfjord, G., and Berntssen, M.H.G., 2005. mRNA expression of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) and lipid peroxidative stress in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to hyperoxic water during smoltification. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology*, 141(3), 314-323.
- Olsvik, P.A., Kristensen, T., Waagbø, R., Tollefsen, K.E., Rosseland, B.O., and Toften, H., 2006. Effects of hypo- and hyperoxia on transcription levels of five stress genes and the glutathione system in liver of Atlantic cod *Gadus morhua*. *J Exp Biol*, 209, 2893–2901.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B., 2007. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12, 913–922.
- Otto, D.M., and Moon, T.W., 1996. Endogenous antioxidant systems of two teleost fish, the rainbow trout and the black bullhead, and the effect of age. *Fish physiology and Biochemistry*, 15(4), 349-358.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., and Moncada, S., 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524–526.
- Palmer, R.M., Rees, D.D., Ashton, D.S., and Moncada, S., 1988. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*, 153, 1251–1256.
- Parrilla-Taylor, D.P., and Zenteno-Savín, T., 2011. Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. *Aquaculture*, 318(3), 379-383.
- Pérez-Jiménez, A., Peres, H., Rubio, V.C., and Oliva-Teles, A., 2012. The effect of hypoxia on intermediary metabolism and oxidative status in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed on diets supplemented with methionine and white tea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 155(3), 506-516.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Gonzalez, P., Bourdineaud, J.P., Elie, P., and Massabuau, J.C., 2007. Common pattern of gene expression in response to hypoxia or cadmium in the gills of the European glass eel (*Anguilla anguilla*). *Environ Sci Technol*, 41, 3005–3011.
- Pillet, M., Dupont-Prinet, A., Chabot, D., Tremblay, R., and Audet, C., 2016. Effects of exposure to hypoxia on metabolic pathways in northern shrimp (*Pandalus borealis*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 483, 88-96.
- Ploch, S.A., Lee, Y.P., McLean, E., and Di Giulio, R.T., 1999. Oxidative stress in liver of brown bullhead and channel catfish following exposure to tert-butyl hydroperoxide. *Aquat. Toxicol.* 46, 231– 240.

- Prunet, P., Cairns, T.M., Winberg S. and Pottinger G.T., 2008. Functional genomics of stress responses, *Fisheries Science*, 16(S1), 157-166.
- Rees, B.B., Sudrajat, F.A., and Love, J.W., 2001. Acclimation to hypoxia increases survival time of zebrafish, *Danio rerio*, during lethal hypoxia. *Journal of Experimental Zoology*, 289(4), 266-272.
- Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T., and Symons, M.C., 1991. Techniques in free radical research. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, In Burton, R.H., Knippenberg, P.H. (Eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 147-149.
- Richards, J.G. 2009. Metabolic and molecular responses of fish to hypoxia. *Fish physiology*, 27, 443-485.
- Ritola, O., Livingstone, D.R., Peters, L.D., and Lindström-Seppä, P., 2002a. Antioxidant processes are affected in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to ozone and oxygen-supersaturated water. *Aquaculture*, 210(1), 1-19.
- Ritola, O., Peters, L.D., Livingstone, D.R., and Lindstrom-Seppä, P., 2002b. Antioxidant enzymes and glutathione defense system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells exposed to ozone and oxygen in vitro. *Aquacult. Res*, 33, 165-175.
- Ritola, O., Tossavainen, K., Kiuru, T., Lindström-Seppä, P., and Mölsä, H. (2002c). Effects of continuous and episodic hyperoxia on stress and hepatic glutathione levels in one-summer-old rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology*, 18(3), 159-164.
- Ritola, O., Peters, L.D., Livingstone, D.R., and Seppä, P.L., 2002d. Effects of in vitro exposure to ozone and and hyperoxia on superoxide dismutase, catalase, glutathione and lipid peroxidation in red blood cells and plasma, *Aquaculture Research*, 33: 165-175,.
- Roberts, M.H., Sved, D.W., and Felton, S.P., 1987. Temporal changes in AHH and SOD activities in feral spot from the Elizabeth River, a polluted sub-estuary. *Marine Environmental Research*, 23(2), 89-101.
- Ross, S.W., Dalton, D.A., Kramer, S., and Christensen, B.L., 2001. Physiological (antioxidant) responses of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology*, 130(3), 289-303.
- Rossi, F., Della Bianca, V., and de Togni, P., 1985. Mechanisms and functions of the oxygen radicals producing respiration of phagocytes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 8, 187–204.
- Röhrdanz, E., and Kahl, R., 1998. Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(1), 27-38.
- Rudneva, I.I., Skuratovskaya, E.N., Kuzminova, N.S., and Kovyrshina, T.B., 2010. Age composition and antioxidant enzyme activities in blood of Black Sea teleosts. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol*, 151(2), 229–239
- Ruppert, E.E., Fox, R.S., and Barnes, R.D., 2004. *Invertebrate zoology: a functional evolutionary approach*. Thomson-Brooks/Cole, p: 963, Belmont, CA.

- Salas-Leiton, E., Cánovas-Conesa, B., Zerolo, R., López-Barea, J., Cañavate, J.P., and Alhama, J., 2009. Proteomics of juvenile Senegal sole (*Solea senegalensis*) affected by gas bubble disease in hyperoxygenated ponds. *Marine biotechnology*, 11(4), 473-487.
- Saller, S., Merz-Lange, J., Raffael, S., Hecht, S., Pavlik, R., Thaler, C., Berg, D., Berg, U., Kunz, L., and Mayerhofer, A., 2012. Norepinephrine, active norepinephrine transporter, and norepinephrine- metabolism are involved in the generation of reactive oxygen species in human ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, 153(3), 1472-1483.
- Scandalios, J.G., 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(7), 995-1014.
- Semchyshyn, H., Bagnyukova, T., Storey, K., and Lushchak, V., 2005. Hydrogen peroxide increases the activities of soxRS regulon enzymes and the levels of oxidized proteins and lipids in *Escherichia coli*. *Cell Biol Int*, 29, 898-902.
- Sies, H., 1985. Oxidative stress: introductory remarks. *Oxidative Stress*, In: Sies H (ed). Academic Press, London, pp 1-8.
- Sies, H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, 91(3C), 31-38.
- Sies, H., 2013. *Oxidative stress*. Academic Press, p:506, London.
- Simons, P.C., and Vander Jagt, D.L., 1977. Purification of glutathione S-transferases from human liver by glutathione-affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*, 82, 334-341.
- Skulachev, V.P., 2012. Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. *J Alzheimers Dis*, 28, 283-289.
- Spagnoli, A., Spadoni, G.L., Sesti, G., Del Principe, D., Germani, D., and Boscherini, B., 1995. Effect of insulin on hydrogen peroxide production by human polymorphonuclear leukocytes. Studies with monoclonal anti-insulin receptor antibodies, and an agonist and an inhibitor of protein kinase C. *Horm Res*, 43, 286-293.
- Speare, D.J., Carvajal, V., Horney, B.S., 1999. Growth suppression and branchitis in trout exposed to hydrogen peroxide. *J. Comp. Pathol.*, 120, 391- 402.
- Stadtman, E.R., 1993. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annual review of biochemistry*, 62(1), 797-821.
- Stern, K.G., 1937. On The Absorption Spectrum of Catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 121, 561-572.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29, 1715-1733.
- Storz, G., and Imlay, J.A., 1999. Oxidative stress. *Curr Opin Microb*, 2, 188-194.
- Sun, Y., Oberley, L.W., Li Y., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 34(3), 497-500.
- Szweda, L.I., and Stadtman, E.R., 1992. Iron-catalyzed oxidative modification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. Structural and functional changes. *Journal of Biological Chemistry*, 267(5), 3096-3100.

- Tarin, J.J., Brings, J. and Cano, A., 1998. Serbest radikalleri antioksidanlar ve infertilite ile klinik ilişkiler. *Hum. Reprod.*, 13(9), 2371-2376.
- Tartaglia, L.A., Storz, G., and Ames, B.N., 1989. Identification and molecular analysis of oxyR-regulated promoters important for the bacterial adaptation to oxidative stress. *J Mol Biol*, 210, 709–719.
- Thomas, P.M., Pankhurst, N.W., and Bremner, H.A., 1999. The effect of stress and exercise on post-mortem biochemistry of Atlantic salmon and rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 54(6), 1177-1196.
- Tiedke, J., Thiel, R., and Burmester, T., 2014. Molecular response of estuarine fish to hypoxia: a comparative study with ruffe and flounder from field and laboratory. *PLoS one*, 9(3), e90778.
- Toledano, M.B., Kumar, C., Le Moan, N., Spector, D., and Tacnet, F., 2007. The system biology of thiol redox system in *Escherichia coli* and yeast: differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis. *FEBS Lett*, 581, 3598–3607.
- Toone, W.M., and Jones, N., 1999. AP-1 transcription factors in yeast. *Curr Opin Genet Dev*, 9, 55–61.
- Trasviña-Arenas, C.H., Garcia-Triana, A., Peregrino-Uriarte, A.B., and Yepiz-Plascencia, G., 2013. White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: Gene structure, expression and activity under hypoxia and reoxygenation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 164(1), 44-52.
- Trenzado, C., Hidalgo, M.C., García-Gallego, M., Morales, A.E., Furné, M., Domezain, A., Domezain, J., and Sanz, A., 2006. Anti-oxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*: A comparative study. *Aquaculture*, 254, 758-767.
- Tsan, M.F., White, J.E., Treanor, C., and Shaffer, J.B., 1990. Molecular basis for tumor necrosis factor-induced increase in pulmonary superoxide dismutase activities. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 259(6), L506-L512.
- Vaca, C.E., Wilhelm, J., and Harms-Ringdahl, M. 1988. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A Review. *Mutation Research*, 195, 137-149.
- van den Thillart, G., and van Waarde, A., 1985. Teleosts in hypoxia-aspects of anaerobic metabolism. *Molecular Physiology*, 8(3), 393-409.
- Via, J. D., van den Thillart, G., Cattani, O., and Cortesi, P., 1998. Behavioural responses and biochemical correlates in *Solea solea* to gradual hypoxic exposure. *Canadian Journal of Zoology*, 76(11), 2108-2113.
- Wdzieczak, J., Zaleśna, G., Wujec, E., and Peres, G., 1982. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 73(2), 361-365.
- Welker, A.F., Campos, É.G., Cardoso, L.A., and Hermes-Lima, M., 2012. Role of catalase on the hypoxia/reoxygenation stress in the hypoxia-tolerant *Nile tilapia*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 302(9), R1111-R1118.

- Wendel, A., 1980. Enzymatic basis of detoxication. Academic Press, NY, p:333.
- Wenger, R.H., 2000. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *Journal of Experimental Biology*, 203(8), 1253-1263.
- Wilhelm, F.D., 1996. Fish antioxidant defenses--a comparative approach. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, 29(12), 1735-1742.
- Winston, G.W., and Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic toxicology*, 19(2), 137-161.
- Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton, J.R., and Turner, N.D., 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of nutrition*, 134(3), 489-492.
- Yamaguchi, T., Kakinuma, K., Kaneda, M., and Shimada, K., 1980. Comparative studies on alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes. I. H₂O₂ and O₂-generation by rabbit alveolar macrophages. *J Biochem*, 87, 1449-1455.
- Yan, H, Harding, J.J., 1997. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem. J.* 328, 599-605.
- Yeldandi, A.V., Rao, M.S., and Reddy, J.K., 2000. Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. *Mutat Res*, 448(2), 159-177.
- Yoshioka, T., Homma, T., Meyrick, B., Takeda, M., Moore-Jarrett, T., Kon, V., and Ichikawa, I., 1994. Oxidants induce transcriptional activation of manganese superoxide dismutase in glomerular cells. *Kidney international*, 46(2), 405-413.
- Zernov, S.A, 1934. General hydrobiology. State Publishing House for Biological and Medicinal Literature, p. 504, Moscow-Leningrad, Rusia.
- Zhang, G., Mao, J., Liang, F., Chen, J., Zhao, C., Yin, S., Wang, L., Tang, Z., and Chen, S., 2016. Modulated expression and enzymatic activities of Darkbarbel catfish, *Pelteobagrus vachelli* for oxidative stress induced by acute hypoxia and reoxygenation. *Chemosphere*, 151, 271-279.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılının Aralık ayında Malatya'da doğan tezin yazarı, ilk, orta ve lise öğrenimlerini Malatya'da tamamlamıştır. Lisans öğrenimini Erzurum ilinde bulunan Atatürk Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde tamamlamış olan yazar yüksek lisans öğrenimini aynı üniversitedeki Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde tamamlamıştır. Evli ve bir çocuk babası olan yazar ayrıca amatör neyzen olarak Klasik Türk Müziği ile de ilgilenmektedir. Yazar Atatürk Üniversitesi'nde doktora öğrenimine devam etmektedir.