



**MACLURA POMİFERA BİTKİSİNDEN İZOLE
EDİLEN POMİFERİN MADDESİNİN RATLARDA
OLEİK ASİT İLE İNDÜKLENEN AKUT AKCİĞER
HASARI MODELİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Kübra COŞAR

Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Serkan EROL**

Yüksek Lisans Tezi-2019

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MACLURA POMİFERA BİTKİSİNDEN İZOLE EDİLEN
POMİFERİN MADDESİNİN RATLARDA OLEİK ASİT
İLE İNDÜKLENEN AKUT AKCİĞER HASARI MODELİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Kübra COŞAR

**Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Serkan EROL**

**ERZURUM
2019**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MACLURA POMİFERA BİTKİSİNDEN İZOLE EDİLEN
POMİFERİN MADDESİNİN RATLARDA OLEİK ASİT İLE
İNDÜKLENEN AKUT AKCİĞER HASARI MODELİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Kübra COŞAR

Tez Savunma Tarihi : 26.12.2019

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Hüseyin Serkan EROL (Kastamonu Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Fatih Mehmet KANDEMİR (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Esra Dilek (Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki Jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

**Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM - 2019**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Akut Respiratuar Distres Sendromu (ARDS).....	3
2.1.1. Tanımı ve Tarihçesi	3
2.1.2. Patofizyoloji.....	4
2.1.3. Etiyoloji ve Epidemiyoloji.....	8
2.2. Tedavi Yöntemleri	9
2.2.1. Nonfarmakolojik Tedavi.....	10
2.2.2. Farmakolojik Tedavi.....	11
2.3. Deney Modeli	13
2.4. Maclura Pomifera	15
2.5. Pomiferin	17
2.6. Antioksidan Savunma Sistemi	18
2.6.1. Serbest Radikaller	18
2.6.3. Serbest Radikallerin Hücre Hasarındaki Etkileri.....	29
2.7. Antioksidanlar.....	36
2.7.1. Endojen (Doğal) Antioksidanlar.....	38

3. MATERYAL VE METOT	47
3.1. Deneyde Kullanılan Cihazlar.....	47
3.2. Deney Materyalinin Temini ve Etken Maddenin İzolasyonu.....	47
3.2.1. Meyvenin Toplanması ve Teşhisi.....	47
3.2.2. Pomiferin İzolasyonu ve Yapısal Doğrulanması.....	48
3.3. Deney Hayvanlarının Temini.....	49
3.3. Ratlarda Oleik Asit Uygulaması ile Deneysel ARDS Oluşturulması.....	49
3.3.1. ARDS Modeli.....	49
3.4. Akciğer Dokusunun Biyokimyasal İncelenmesi.....	50
3.4.1. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler, Hazırlanışları ve Ölçümleri.....	50
3.4.1.1. Lipid Peroksidasyon Seviyesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler ve Ölçümü.....	50
3.5. İstatistiksel Analizler.....	57
4. BULGULAR	58
4.1. Doku LPO Seviyesi.....	58
4.2. Doku SOD Aktivitesi.....	58
4.3. Doku GSH Seviyesi.....	59
4.4. Doku KAT Aktivitesi.....	60
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR	67
EKLER	82
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	82
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	83
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	84

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez araştırmamın her aşamasında bana destek veren, bilgisi ve yol göstericiliği ile hem benim hem de araştırmam üzerindeki emekleri için değerli danışman hocam Sayın Doktora Öğretim Üyesi Hüseyin Serkan EROL'a sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalar sırasında desteğini esirgemeyen hocam Sayın Prof.Dr. Mesut Bünyami HALICI'ya teşekkürlerimi sunuyorum. Tez çalışmasında madde saflaştırmada emeği geçen Prof.Dr. Ahmet ÇAKIR ile bitkinin teşhis ve temininde emeği olan Doç.Dr. Murat KOÇ'a, deney hayvanlarının temini ve deneyin gerçekleştirilmesinde destek veren Sayın ATADEM müdürlüğüne ve biyokimyasal analizlerin yapılmasında desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Fatih Mehmet KANDEMİR ve Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı tüm Öğretim Üyesi ve görevlilerine teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca benden desteğini esirgemeyen ve bana her zaman güvenen aileme ve değerli abim İslam COŞAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Kübra COŞAR

ÖZET

Maclura Pomifera Bitkisinden İzole Edilen Pomiferin Maddesinin Ratlarda Oleik Asit İle İndüklenen Akut Akciğer Hasarı Modeli Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Akut akciğer hasarı ve bunun daha ilerlemiş durumu olan akut solunum sıkıntısı sendromu halen daha tedavisi kesin olarak bulunamamış bir hastalıktır. Akut solunum sıkıntısı sendromu'nun şekillenmesinde reaktif oksijen türlerinin akciğer dokusunda hücresel hasara neden oldukları bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı ratlarda OA ile indüklenen akciğer hasarında antioksidan özelliği olduğu bilinen POM maddesinin etkilerini incelemektir.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada 24 adet Wistar ırkı erkek rat (200-250 gr) sağlıklı, kontrol, POM-150 ve POM-300 olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Uygulamadan 5 dakika önce kontrol grubundaki her rata 1 ml serum fizyolojik, POM gruplarında ise her rata distile suda 150 ve 300 mg/kg dozda hazırlanmış POM içeren 1 ml çözelti oral olarak uygulandı. Sağlıklı gruba sadece serum fizyolojik, kontrol ve POM gruplarına ise 50 ul OA+250 ul %1 BSA çözeltisi kuyruk veninden damar içi uygulandı. Uygulamadan 24 saat sonra yüksek doz anestezi altında ötenazi edilen ratlardan alınan akciğer dokusunda LPO ve GSH miktarı ile SOD ve KAT aktiviteleri ölçülmüştür.

Bulgular: Yapılan çalışmada OA ile oluşturulan deney modelinde sağlıklı grup ile kıyaslandığında kontrol grubu akciğer dokusunda LPO, SOD ve KAT'ın önemli derecede arttığı ($P<0.05$), GSH'ın ise belirgin şekilde düştüğü gözlemlenmiştir ($P<0.05$). Kontrol grubu ile kıyaslandığında POM uygulamasının doza bağlı olarak LPO, SOD ve KAT seviyelerini önemli oranda düşürdüğü ($P<0.05$), GSH seviyesini ise belirgin şekilde arttırdığı belirlenmiştir ($P<0.05$).

Sonuç: Akut sıkıntılı solunum sendromunda pomiferin maddesinin oleik asitin meydana getirdiği oksidatif stres üzerinde antioksidan etki gösterdiği ve LPO seviyesini düşürerek hücresel hasarı azalttığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak POM ratlarda OA ile indüklenen akut akciğer modelinde hasarın önlenmesinde ya da iyileşmesinde faydalı olabilir.

Anahtar Kelimeler: ALI, oleik asit, pomiferin, *Maclura pomifera*.

ABSTRACT

Investigation of Effects of Pomiferin Isolated from *Maclura Pomifera* Plant on Oleic Acid-Induced Acute Lung Injury Model in Rats

Aim: Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome, which is more progressed form of ALI, are the diseases for which no certain treatment has been found. It is known that reactive oxygen types cause cellular damages in lung tissue by occurring in the formation of ARDS. This study aims at investigating the effects of POM substance –known to have antioxidant properties- on the OA-induced acute lung injury in rats.

Materials and Methods: In the study, 24 Wistar male rats (200-250 gr) were equally arranged into healthy group, control group, POM-150 group and POM-300 group. Five-minutes before the administration, each rate in the control group orally received 1 ml saline solution while each rate in POM groups orally received 1 ml solution POM distilled in water prepared with 150 and 300 mg/kg doses. The healthy group received only saline solution while the control group and POM groups intravenously received 50 ul OA+250 ul %1 BSA solution in tail vein. After 24 hours following the administration, LPO and GSH amounts and SOD and KAT activities were measured in lung tissues taken from rats euthanized under high doses anesthesia.

Results: It was observed in the experimental model induced by OA that the LPO level, SOD and KAT activities significantly increased in the lung tissues of the control group ($P<0.05$) whereas GSH markedly decreased compared to the healthy group ($P<0.05$). It was determined that compared to the control group, POM administration significantly decreased LPO level, SOD and KAT activities considerably depending on doses ($P<0.05$) but markedly increased GSH levels ($P<0.05$).

Conclusion: It was found that in ARDS, the POM demonstrated antioxidant effect upon oxidative stress induced by oleic acid and reduced cellular damage by lowering LPO level. In conclusion; POM may be beneficial for preventing or curing cellular damage in the OA-induced acute lung injury model in rats.

Key Words: ALI, oleic acid, pomiferin, *Maclura pomifera*.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALI	: Akut Akciğer Hasarı
ARDS	: Akut Sıkıntılı Solunum Sendromu
ANOVA	: Varyans Analizi
ADP	: Adenozin Difosfat
BSA	: Bovine Serum Albumin
CuCl₂	: Bakır 2- Klorür
CCl₄	: Karbontetraklorür.
CCl₃	: Triklorometil
CO₂	: Karbondioksit
DTNB	: 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik
Fe⁺³	: Ferri Demir
Fe⁺²	: Ferro Demir
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotid
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon S-transferaz
GSSG	: Glutasyon Disülfit (okside glutasyon)
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GMCSF	: Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktördür
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HO₂⁻	: Peroksil
HOCl	: Hidrokloröz Asit
IL-	: İnterlökin
KCl	: Potasyum Klorür

LPO	: Lipid Peroksidasyonu
LOOH	: Hidraperoksit
LPS	: Lipopolisakkarid
LPB	: Lipopolisakkarit Bağlayıcı Proteinler
MDA	: Malondialdehit
MPO	: Myeloperoksidaz
NBT	: Nitro Blue Tetrazolium
Na₂CO₃	: Sodyum Karbonat
NO[•]	: Nitrik Oksit
NO₂	: Nitrojen Dioksit
NAC	: N-asetil Sistein
OA	: Oleik Asit
O₂⁻	: Süper Oksit Radikali
ONOO⁻	: Peroksinitrit
OSJ	: Osajin
OH	: Hidroksit
OH[•]	: Hidroksil Radikali
¹O₂	: Singlet Oksijen
O₂	: Oksijen
POM	: Pomiferin
PUFAs	: Poliansatüre Yağ Asitleri
PEEP	: Positive End Expiratory Pressure
PaO₂/FiO₂	: Partial Pressure of Oxygen / Fraction of Inspired Oxygen
ROS	: Reaktif Oksijen Radikalleri
ROO[•]	: Peroksil Radikali

RO·	: Alkoksil Radikali
RS·	: Tiyol Radikali
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
SOD	: Süper Oksit Dismutaz
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TBA	: Tiyobarbütrik Asit
XO	: Ksantin Oksidaz



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Maclura Pomifera (Osage Orange).....	16
Şekil 2.2. Osajin ve pomiferinin yapısı	18
Şekil 2.3. Antioksidanların sınıflandırılması	37
Şekil 2.4. Glutasyonun yapısı	44
Şekil 3.1. MDA miktarının hesaplanmasında kullanılan standart grafik	52
Şekil 3.2. GSH miktarının hesaplanmasında kullanılan standart grafik.....	53
Şekil 4.1. Doku LPO seviyesi.....	58
Şekil 4.2. Doku SOD aktivitesi	58
Şekil 4.3. Doku GSH seviyesi	59
Şekil 4.4. Doku KAT aktivitesi	60

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No

Sayfa No

Tablo 2.1. ARDS'ye yol açan primer ve sekonder sebepler 9



1. GİRİŞ

Akciğerlerde mikrobiyal ve mikrobiyal olmayan sebeplerle meydana gelen ani inflamatuvar yanıtın oluşturduğu hasar ile meydana gelen solunum güçlüğüne ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome-Akut Sıkıntılı Solunum Sendromu) denir. ARDS'de her iki akciğer üzerinde primer ve sekonder nedenlerin etkisiyle oluşan hasar yaygın inflamasyonla devam ederek ölümcül sonuçlara yol açabilir.¹ ARDS'de oluşan hasar genellikle alveollerde meydana gelir. Alveolar kapillerde membran yapısında oluşan hasar kan ile doku arasındaki gaz alışverişinde bozulma meydana getirir.² Bu nedenle ARDS mortalitesi yüksek seyreden ölümcül bir durumdur.

ARDS'nin oluşmasının altında yatan ciddi nedenler vardır. ARDS'nin oluşmasında önemli etkenler primer ve sekonder sebepler olarak sınıflandırılmıştır. Etiyolojik olarak sepsis ve travma en önemli nedenlerdir. ARDS'nin oluşumunda savunma hücresi olan nötrofiller aktive olarak akciğerlerdeki alveollerde endotelial ve epiteliyal hasar oluşumuna sebep olur. Bu durum alveollerde inflamasyona neden olur. Böylece nötrofil sayısı artar ve akciğere göç ederek birikime sebep olur. Nötrofillerin birikmesi adhezyon moleküllerini ve komplemen sistemi uyarır. Akciğerlerde inflamasyonu baskılamak ve nötrofillerin birikmesinin önlenmek hasarın azalmasını sağlayabilir.³

Primer sebepler akciğer epitelinin hasarında doğrudan rol oynarken sekonder sebepler sistemik şiddetli inflamatuvar durumunda akciğerlerde de ağır inflamasyonun başlamasına neden olurlar. Primer sebeplere örnek olarak; pnömoni, mide içeriği veya asitinin aspirasyonu, pulmoner tromboemboli, duman ve toksik gaz inhalasyonu verilebilir. Sekonder sebeplere sepsis, septik şok, akciğer dışı enfeksiyonlar, travma, akut pankreatit, ilaçlar ve zehirlenmeler verilebilir.^{4,5} Sekonder sebeplerden kaynaklı ARDS vakalarında mortalite %50 üzerindedir.⁶ Sekonder nedenlerden en sık sepsis kötü giden

prognaza neden olur. Ayrıca bu sebeplerden en çok travma ve sepsis ARDS'ye neden olurken akciğerlerde büyük hasar meydana getirir.⁷

Günümüzde ARDS'nin patofizyolojisi anlaşılmış ancak tedavisinin bulunamaması yeni araştırmaların yapılmasına sebep olmuştur. Bu hastalığın incelenmesinde küçük hayvan modelleri kullanılmıştır. Akciğer hasarı araştırmaları için LPS (lipopolisakkarid), intratrakeal asit aspirasyonu, hiperoksijenizasyon, sürfaktan sentez inhibisyonu, akciğer iskemi reperfüzyonu, indirekt oluşturan mezenter iskemi reperfüzyonu, intravenöz LPS, intravenöz ve intrapulmoner bakteri, çekal bağlama ve delme (CLP), oleik asit (intravenöz) gibi modeller uygulanmaktadır.⁸ Hastalığın patofizyolojisini en yakın şekilde taklit edebildiği için intravenöz uygulanan oleik asit modeli yaygın olarak kullanılır. Oleik asit damar içinde akciğer endoteli hücrelerinde hasar meydana getirerek ödeme ve ağır bir inflamatuvar sürecin başlamasına neden olur.⁹

Günümüzde hastalıkların tedavisinde antioksidanların etkisi güncel bir konu haline gelmiştir. Antioksidanlar serbest radikallere karşı savunma mekanizmasının bir parçasıdır.¹⁰ Özellikle bitkilerden elde edilen antioksidan özellikli organik maddelerin bu hastalıklar üzerine etkileri ve bu etkilerin mekanizmaları açıklanmaya çalışılmaktadır. Bu nedenle hastalıklar sonucu akciğer dokusunda meydana gelen hasarı azaltmak ya da tedavi etmek amacıyla denemeler yapılmaktadır.¹¹⁻¹⁵ Bu çalışmada *Maclura pomifera*'dan elde edilen pomiferin maddesinin oleik asitle indüklenen akut akciğer hasarı üzerine etkileri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akut Respiratuar Distres Sendromu (ARDS)

2.1.1. Tanımı ve Tarihçesi

Akut solunum sıkıntılı sendromu (ARDS), sağ ve sol akciğeri içine alan, direkt ve indirekt nedenlere bağlı olarak ortaya çıkan, oksijen tedavisine yanıt vermeyen, kalp-damar dolaşım sisteminden bağımsız ve yaygın bir birikim ile karakterize olan bir sendromdur. Diğer hastalıkların sonucunda (pnömoni veya ekstrapulmoner sepsis, septik şok) gelişebildiğinden sendrom olarak tanımlanır ve bu nedenle hastalık olarak nitelendirilmez.¹⁶

Amerikan askerlerinin 1955 yılında başlayan Vietnam savaşında yaraları hızlı ve uygun şekilde tedavi ediliyor ancak yaralanan askerlerin bazıları 5. günden itibaren hipoksiden ölüyorlardı. Bunun nedeni araştırılırken hastaların akciğer filmlerine bakıldığında akciğerlerde çift taraflı yoğun birikim görülüyordu. Bu nedenle ilk olarak filmlerindeki akciğer görüntüsü dikkate alınarak “beyaz akciğer” olarak adlandırılmıştır. Askerler ani gelişen taşikardi, solunum sayısında artış, ciddi solunum güçlüğü, oksijen tedavisine yanıt vermeyen siyanoz ve akciğerlerde kapasitenin ileri derecede kaybı sonucu ölüyorlardı. Bu nedenle sendroma ilk tanımlama 1967 yılında Ashbaugh ve arkadaşları, “Erişkin Solunum Yetmezliği Sendromu (Adult Respiratory Distress Syndrome)” terminolojik adını verdiler.¹

Tanımlama yapıldıktan sonra erişkinlerde gözlenen radyolojik tablo çocuk ve yeni doğan bebeklerde de görülmeye başlanınca, sendromun erişkinlere ait olmadığını anlaşılmıştır. Böylece “Akut Solunum Yetmezliği” olarak yeni bir terminolojik isimlendirme yapıldı.¹⁶ ARDS ile eş anlamlı ve günümüzde kullanılan bazı adlandırmalar vardır. Bu adlandırmalara örnek olarak; erişkin hiyalin membran hastalığı, erişkin

solunum yetersizlik sendromu, konjestif atelektazi, De Nang akciğeri, hemorajik akciğer sendromu, şok akciğer ve travmatik ıslak akciğer gibi tanımlamalar verilebilir.¹⁷

İlk tanımlamanın yapıldığı 1967 tarihinden itibaren ARDS'nin tanımlamasında sürekli yeni terminolojik tanımlamalar yapılmıştır. Terminolojik olarak en son yapılan tanımlama 1992 tarihinde gerçekleştirilen "The American-European Consensus Conference on ARDS (Amerika-Avrupa Konsensus Komitesi)" sonrası 1994'de Avrupa-Amerika Yoğun Bakım ve Toraks Derneğinde yapılmıştır.¹⁸

2.1.2. Patofizyoloji

ARDS'de solunum yetmezliği sık görülür ve klinik olarak birçok durumla birlikte gelişebilir. ARDS'de klinik tablonun sebebi yoğun inflamasyonun neden olduğu yaygın alveol hasarıdır. Ayrıca ARDS'de meydana gelen şiddetli inflamatuvar yanıtta görev alan nötrofiller ve fazla miktarda salınan mediyatörler endotelial ve epiteliyal hasar oluşumundan sorumludur. Proinflamatuvar (lökositler, doku makrofajları ve monositler, trombositler, prostaglandinler, kininler, sitokinler vb.) olan mediyatörlerin yapımı ve etkilerini engellemek için diğer taraftan antiinflamatuvar (soluble TNF- α reseptörleri, interlökin-4, interlökin-10, epinefrin, glukokortikoidler, lipopolisakkarit bağlayıcı proteinler (LPB) mediyatörler sentezlenir.³ ARDS'nin gelişmesi ve oluşan hasarın şiddetini proinflamatuvar ve antiinflamatuvar arasında ki denge belirler. Bu denge oluşan hasarın düzeltilmesinde önemli bir faktördür. Eğer bu denge bozulur veya olmazsa organda ağır hasarlar meydana gelir.¹⁹

İnflamasyonun başlaması ile akciğerde nötrofillerin salınımı artar ve akciğerlerde birikim meydana gelir. Akciğer hasarının primer sebeplerinin oluşturduğu hasar alveoler ve intertisyel makrofajlardan TNF- α , IL-1, IL-8 gibi sitokinlerin salınmasına neden olur. Bu sitokinler ise nötrofillerin kemotaksisini uyarır. Bu durum aynı zamanda nötrofil aktivasyonunu ve akciğerlerde sıvı toplanmasını sağlayan faktördür.²⁰ Sekonder

sebeplerden kaynaklanan ARDS'de nötrofil aktivasyonunu en çok endotoksin meydana getirir. Ayrıca akciğerlere yoğun nötrofil göçü ve aynı zamanda sitokinlerin salınmasında da etkilidir. Nötrofillerin sebep olduğu serbest radikaller, inflamatuvar medyatör ve proteazlar hücrenin epitelyal ve endotelial yapısında hasar oluşturur. Nötrofillerin aktive olmasıyla pulmoner alveollerde ki nötrofillerin geçiş ve temas süresinin uzaması hasarın ciddiyetini artırır.³ Son olarak akciğerlerde nötrofil birikiminin önlenmesi bazı durumlarda hasarın azalmasını sağlayabilir.²¹

Nötrofillerin aktivasyonunu takiben ARDS patofizyolojisinde rol alan bazı inflamatuvar hücreler olan makrofaj, monosit, trombositler ve lenfositlerde aktive olur. Böylece trombositler agregat oluşturarak pulmoner perfüzyonu bozar. Aynı zamanda salınan mediyatörler endotelial yapıdaki hasarı artırırlar.²² Akciğerlerdeki alveoler epitel hücreleri ve vasküler endotelial hücreler inflamatuvar yanıt ve koagülasyon sürecinin aktivasyonunda önemli role sahiptirler. Sistemik inflamatuvar yanıt meydana geldiğinde trombomodülün yapımı azalır.²³

Proinflamatuvar mediyatörler ve sitokinler akciğerdeki epitel hücrelerinden salınır. Buradan salınan sitokinler doku ve hücrel savunmayı kontrol ederler. Sitokinler nötrofillerden farklı olarak mikrovasküler permeabiliteyi artırır. Akciğerden ilk önce salınan sitokinler TNF- α ve IL-1 β 'dir. TNF- α sentezini monositler, makrofajlar ve lenfositler gerçekleştirir. Sitokinler bazı hücreleri hedef olarak seçerler. Bunlar endotel hücreleri, monositler, makrofajlar, nötrofiller ve fibroblastlardır. Hedef olarak seçtiği hücrelerde interlökin-1 β , interlökin-6, interlökin-8, trombosit aktive edici faktörler, lökotrienler, prostaglandinler, TNF- α gibi sitokinlerin sentezini ayrıca salınmasına etki ederler. Bu durum nötrofillerin, proteaz ve oksijen radikallerinin bulunduğu ortamda sayılarının artmasına neden olur.²⁴ TNF- α kemik iliğine etki eder ve burada nötrofil sentezini tetikler. Böylece fagositik aktivite artar. Bunun sonucunda kapiller endotel

hücreleri üzerindeki etkisi permeabiliteyi artırır. Vücut ısısının artması hipotalamusun etkilenmesinden kaynaklanmaktadır.²³ Monositler, makrofaj, endotel ve epitel hücrelerinden sentezlenen IL-1 β inflamasyonu iletir, koagulasyonu aktive eder ve endotel yapıdaki nötrofillerin artmasını tetikler. Böylece endotel yapıda adezyon molekülleri belirgin hale gelir ve aktivasyon artar.^{20, 23} IL-1 β 'den başka proinflamatuvar sitokinler, interlökin-2, interlökin-6, interlökin-8, interlökin-18 ve granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktördür (GMCSF). Bu olaylar sırasında serbest radikallerde rol oynar. Serbest radikallerin hasarda ki etkileri yapıda bulunan DNA, protein ve lipidleri hedef olarak oksidasyon ve bozulmalara neden olur. Ayrıca plazmada bulunan antioksidan düzeyleri azalır.²⁵

Alveollerdeki epitel yapısında iki tip hücre vardır. Tip 1 ve Tip 2 pnömosit hücreleridir. Tip 1 pnömositler hasara karşı hassas, aktivitesi az ve epitel yapının %90 kapsar. Tip 2 pnömositler sürfaktan yapımı ve iyon pompalanmasında görev alan, epitel yapının %10 kapsar. Tip 2 pnömositler hasara karşı dayanıklıdır. Eğer hasar oluşursa farklılaşarak bölünerek diğer epitel hücresi olan Tip 1 pnömositleri oluşturur. Normal koşullarda damar endotel tabakasının permeabilitesi alveollerdeki epitellerden fazladır.¹ Akciğerde ilk oluşan epitel hasarı ARDS'nin akut döneminde gerçekleşir. Bu dönemde proteince zengin alveoler ödem oluşum hızı ve ödem miktarı sekonder sebeplerle meydana gelen ARDS'ye oranla çok fazladır. Alveoler epitel Tip2 pnömosit hücresinin hasar görmesiyle ödem sıvısının atılımı, sürfaktan yapımı ve dönüşümünün bozulmasına neden olur.^{23, 26, 27} Bunlarla beraber proteinden zengin olan alveoler ödem sıvısı ve inflamasyon mevcut sürfaktanın fonksiyonunda bozulmasına sebep olur. Epitel yapısındaki bozulma bakteriyel pnömoni ya da septik şoka neden olabilir ve bu durumda en çok direk ARDS görülür. Yaygın olarak patogenez akciğerlerdeki alveoler kapillerde

görülür. Buda nötrofillerin ARDS hastalığının patogenezindeki rolü önemlidir.²⁸ Bu hasarın aşamalı olarak görüldüğü faz dönemleri vardır.

a. Eksudatif Faz

Bu faz ilk olarak 24- 72 saat içinde ortaya çıkar. Alveollerdeki kapiller membranı oluşturan yapılar sırasıyla mikrovasküler endotel, intersitisyum ve alveoler epitelyumdur.^{18, 29} Endotelyel hücre yapısı birbirine bağlanmıştır ve ilk görevi vasküler alandan sıvı sızmasını önlemektir. Bu fazdaki endotelyal hücrelerin yapısı bozulmaya uğrar. Böylece hücreler şişerek aralarındaki bağlantı genişler. Alveoler epitel yapının ikinci görevi intraalveoler alana sıvı kaçağını önlemektir.²¹ Membran yapısının bütünlüğünün bozulması epitelyuma çok miktarda nötrofil göçü ile proinflamatuvar, antiinflamatuvar (IL-10) ve diğer sitokinlerin (TNF- α) salınmasına neden olur. Bu durum akciğerler dokusunda hasar meydana getirir.^{22, 30}

Sonuç olarak alveoller, hiyalin membran, inflamatuvar hücreler ve proteince zengin ödem ile dolar. Hiyalin membranlar fibrin, fibronektin ve hücrel artıkların karışımından oluşur. Bazı durumlarda epitelyal nekroz ve surfaktan kaybı ile kollaps gelişebilir.³¹ Aynı zamanda histolojik olarak ARDS epitelyal ve endotelyal hücre hasar, nötrofil istilası hiyalin membran oluşumu, alveoler ödem ve hemoraji ile karakterizedir.³²

b. Proliferatif Faz

Genel olarak ikinci haftada gelişir. Yaygın olarak tip-1 pnömositlerde nekroz görülür. Tip-1 pnömosit alveollerin lümeninde lökosit ve fibrin birikmesine yol açar. Alveoller de bulunan ikinci tip hücre olan tip-2 pnömosit hücreleri tip-1 pnömosit hücrelerine dönüşerek epitelyum yüzeyini onarmaya çalışırlar.^{3, 32, 33} Tip-2 hücrelerin çekirdekleri büyük ve mitotik özelliktedirler.³⁴ Fibroblastlar ve nötrofiller akciğerdeki intertisyuma göç ederler ve nötrofiller mediyatörlerini salıverir.³¹ Bu fazda rol oynayan en önemli mediyatörler fibronektin, fibroblast büyüme faktörü ve transforme edici

büyüme faktörü beta'dır. Epidermal büyüme faktörü ve TGF- α gibi mediyatörler epitelin yenilenmesinde rol oynarlar.³⁵ Bu gelişen olayların sonucunda akciğerin yapısında çok hücreli bir organizasyon oluşur. Bu durum gelişen fibrozis sonucu alveoler boşlukta tıkanıklık meydana gelir. Oluşan hiyalin membran ya ortamda bulunan makrofajlar tarafından fagosit edilir ya da fibroblastlarla kaplanıp intertisyuma ilerletilebilir. Böylece epitelyal hücreler intraalveoler fibrotik dokuya göç eder ve hava yollarında reepitelizasyon gelişir.^{36,37}

Sonuç olarak hiyalin membran ve alveoler septum yüzeyinde meydana gelen değişimler fibrozis başlangıcı şeklinde değerlendirilir. Epitelyal bazal membran ve alveoler boşluklara miyofibroblastlar ve fibroblastlar göç eder. Miyofibroblastların infiltrasyonu, matriks metalloproteinazları ve doku inhibitörlerinin salınımını düzenleyerek akciğer ekstraselüler matriksin yenilenmesini sağlar.^{38,39}

c. Fibrotik Faz

Fibrozis; fibroblast, makrofajlar ve diğer parankim hücreleri arasındaki ilişki sonucu oluşur.³⁶ Akciğerler kaya taşı gibi görünümüne sahip olup mikrosistik değişiklikler sonucu alveoler kanallar dilatedir. Alveoler duvarın kalınlaşması sağlamak için fibroblastlar kollojen depolarlar. Fibrozis geri dönüşümsüz şekilde hızlıca ilerleyerek değişikliklere neden olur. Pulmoner vasküler değişiklikler gözlenir ve kapiller trombüsler gelişir.^{31,38} Sonuç olarak gerçekleşen fibrozis kompliansı azaltır, solunum işini artırır ve alveoler tıkanıklığa, zayıf gaz değişimine yol açan interstisyel kalınlaşma eklenir.^{3,33}

2.1.3. Etiyoloji ve Epidemiyoloji

Hastalıkların altında yatan ciddi sebepler ARDS nedeni olabilir. ARDS primer (pulmoner) ve sekonder (ekstra-pulmoner) olmak üzere iki gruba ayrılır (Tablo 1). Primer nedenler akciğer epiteline direkt olarak etki eder. Primer nedenlere genellikle akciğer enfeksiyonları neden olur.^{6,40} Primer nedenli ARDS'nin oluşmasında pnömoni, mide

içeriğinin aspirasyonu ve toksik gaz gibi sık olarak görülen faktörlerdir. Hasarı direkt olarak yapan sebepler, indirekt olarak yapan sebeplere göre daha kısa sürede sessiz olarak sendroma yol açar.⁴⁰

Sekonder nedenler akciğerde meydana gelen hasar ile sistemik inflamatuvar cevabı aktive eden durumlardır. Genellikle bu durumdaki ARDS'nin ortaya çıkmasına neden olarak en fazla sepsis ve pankreatit gösterilmiştir. Ayrıca pnömoni, aspirasyon, travma ve tekrarlayan kan transfüzyonlarına bağlı da gelişebilir. Sepsis bu hastalıklardan en çok ARDS gelişimine sebep olarak gösterilmiştir.²⁸ Bu durumdan dolayı yapılan birçok çalışmada sepsisli hastaların yaklaşık %40'nda, ARDS geliştiği gösterilmiştir. Sepsis kaynaklı ARDS en fazla Kuzey Amerika ve Avrupa kıtaları arasında görülmektedir.^{28, 41}

Tablo 2.1. ARDS'ye yol açan primer ve sekonder sebepler ⁴²

Primer (Direkt) ALI/ARDS	Sekonder (İndirekt) ALI/ARDS
<ul style="list-style-type: none">▪ Pnömoni (bakteriyel veya viral)▪ Mide içeriği veya asit aspirasyonu▪ Hava veya yağ embolisi▪ İnhalasyon hasarı▪ Akciğer kontüzyonu▪ Suda boğulma▪ Reperfüzyon hasarı sonucu gelişen akciğer ödem▪ Ciddi akut solunumsal sendrom (SARS)▪ Duman inhalasyonu▪ Millier tüberküloz	<ul style="list-style-type: none">▪ Sepsis ve septik şok▪ Ciddi travma▪ Akut pankreatit▪ Kardiyopulmoner baypass▪ Transfüzyon ilişkili akciğer hasarı (TRALI)▪ İlaçlar, zehirlenmeler▪ Nörojenik pulmoner ödem▪ Eklampsi▪ Miyokard infarktüsü▪ Lenfoma, Üremi, Diyabetik ketoasidoz▪ Allerjik Reaksiyonlar▪ Dolaşım şoku▪ Karbonmonoksit Zehirlenmesi▪ Yanıklar▪ Yaygın damar içi koagülasyon

2.2. Tedavi Yöntemleri

ARDS'nin tedavisinde birçok yöntem geliştirilmesine rağmen etkisini göstermiş kesin bir yöntem bulunmamaktadır. Destekleyici tedavi, mekanik ventilasyon, hemodinami tedavi, sıvı balansının düzenlenmesi ve beslenme tedavisi ön plandadır.³⁷

ARDS tedavisini nonfarmakolojik ve farmakolojik olmak üzere iki sınıfta ayırılır.

2.2.1. Nonfarmakolojik Tedavi

ARDS'li hastalarda hipoksiyi önlemek amacıyla başlangıç destek tedavisi ve oksijen verilmesidir.

Mekanik Ventilasyon Tedavisi: ARDS'li hastalarda dokudaki oksijen miktarının artırılması için hastaya optimum düzeyde oksijen tedavisi uygulanmasıdır.^{17, 43} Akut solunum sıkıntılı sendrom hastalığında hipoksiyi önlemek, hiperkarbiyi ortadan kaldırmak ve pH'yı normal düzeye getirebilmek için destek tedavisinin esasını oluşturur. ARDS'li hastalarda bu tedavinin hedefi; yeterli konsantrasyonda oksijen verilmesi, karbondioksit atılımının kolaylaştırılması, havayolu inspirasyon sonu basıncının (PEEP - Positive End Expiratory Pressure) yükselmesinin ve atelektazi oluşumunun engellenmesi, doku oksijenizasyonuna etki etmeden akciğer ödeminin azaltılması yeterli PEEP düzeyinin ve kapalı alveollerin açılmasının sağlanmasıdır.⁴³

Pron pozisyon: ARDS'li hastaları yüzüstü yatırılarak yapılan solutma yöntemidir.⁴⁴ Bu yöntem oksijenizasyonu artırmak için uygulanır. Göğüs duvarının üst bölgesinde hacim ve basınç (komplians) önceki duruma göre biraz düzelir, tidal volüm bu bölgeye yönelir ve alt kısmında ise komplians azalır. Böylece oksijenizasyon düzelir ve ortamdaki karbondioksit (CO₂) miktarı azaltılır. Pron pozisyona verilen tepki ARDS'nin erken dönemlerinde ve sekonder ARDS'de daha iyidir.

Hemodinami ve Sıvı Balansının Düzenlenmesi: Yapılan bazı deney çalışmalarında ARDS'li hastalarda damar dolgunluğunun ve oksijen dağılımının artırılabilindiği bu tedavi yöntemi ile hastaların genellikle olumlu cevap verdiği bildirilmektedir. Pulmoner kapiller basıncı azaltarak, yapısında bozulma meydana gelmiş alveoler kapiller membrandan dışarıya sıvı kaçmasını önlemeye yöneliktir. Ortamdaki

inflamatuvar mediyatörleri uzaklaştırmak ve fazla bulunan sıvıyı atmak için hemofiltrasyon uygulanabilir.⁴⁵

Beslenme: ARDS'li hastalarda enteral ya da parental beslenme uygulanmalıdır. Ancak öncelikli olarak enteral beslenme uygulanmalıdır, eğer uygulanamıyorsa parentel beslenme önerilebilir. ARDS 'li hastalarda erken enteral beslenme hastaya verilecek kalorinin az olması önemlidir. Enteral beslenme, barsaklarda villus atrofisini önlemede, bakteri ve toksik maddelerin translokasyonunu azaltmada önemlidir. Beslenme içeriğinin yapısı hakkında yapılan çalışmalarda organik bileşikler olan karbonhidrat, protein ve yağlar enerji üretmek için metabolize olurken CO₂ üretirler. Metabolize olan bu bileşiklerin CO₂ üretme sırasıyla en yüksek karbonhidratlarda, proteinlerde orta, en az yağlardır. Bu nedenle lipidden zengin, karbonhidrattan fakir diyet solunum yetmezliğinde önerilmektedir.⁴⁶

2.2.2. Farmakolojik Tedavi

Steroid Tedavisi: 1980'li yıllarda yaygın olarak steroid tedavisi uygulanmış, fakat 1980 yılından sonra ARDS'nin erken döneminde pek etkili olmadığı belirlenmiştir. 2007 yılında Meduri ve ark.'ın yaptıkları çalışmalarda ciddi ARDS'li hastalarda erken dönemde düşük dozlarda uygulanan metilprednizolon tedavisinin sistemik inflamasyonu baskıladığı, pulmoner ve ekstrapulmoner doku bozukluklarında düzelme olduğu belirtilmiştir.⁴⁷ Yapılan araştırmalarda ARDS 'li hastalarda erken dönemde uygulanan steroid tedavisi hastalarda mortalite miktarında düşüş meydana getirdiği gözlemlenmiştir.⁴⁸ Akut akciğer solunum sıkıntısı hastalarında kortikosteroid tedavisi uygulaması sağkalıma pek etkisi olmasada, gaz değişimi ve hemodinamik stabilite açısından yararlı olabilmektedir.⁴⁹ ARDS'li hastalarının tedavisinde glukokortikoid kullanımı hastaların iyileşmesine etki etmediği ancak akut akciğer hastalarında kortikosteroid kullanılması yinede büyük ilgi çekmektedir. Akut akciğer solunum

sıkıntısı olan hastalarda kortikosteroid kullanımdan önce hastada enfeksiyon olmadığına dikkat edilmelidir.⁴⁸

Sürfaktan Replasman Tedavisi: Endojen sürfaktan temel görevi yüzey gerilimi azaltan ve atelektazi oluşumunu önleyen, salgın yeri tip 2 alveoler hücreleri olan lipoprotein kompleksidir. Sürfaktan antiinflamatuvar ve antibakteril özelliktedir. Antiinflamatuvar olarak ROS'ların tutulması ve ayrıca sitokin salgınını inhibe etmesidir.⁵⁰ ARDS hastalarında Tip 2 pnömosit hücrelerinden sürfaktan yapımı azalır, azalan sürfaktan üretimi disfonksiyonel olduğu hem de mevcut sürfaktan inaktivedir. Sonuç olarak yüzey gerilimin artışı ve atelektazi akciğer ödemi artırır. Yapılan çalışmalarda eksojen sürfaktan kullanılması oksijenasyonun düzelmesinde etki ettiği gösterilmiştir. Böylece ARDS hastalarında sürfaktanın yararlı olduğu düşünülerek tedavide uygulanmıştır. Ancak ARDS hastalarında sürfaktan kullanımının olumlu sonuçlanmadığı gibi tedavisinde de etkili değildir.⁵¹

Nitrik Oksit (NO) İnhalasyonu: Endotel kaynaklı düz kaslarda gevşemeye, iyi hava alan akciğer bölgesindeki sıvı birikimlerinde azalmaya, böylece oksijenizasyonu artmasına ve pulmoner arter basıncı azalmasına sebep olur. Yapılan bazı çalışmalarda inhale NO tedavi uygulamasının iyileşme üzerine etkili olmadığı ortaya konulmuştur. Bu nedenle ARDS'nin rutin tedavisinde NO inhalasyon tedavi yöntemi önerilmez.⁵²

Antioksidan Tedavi: Akut solunum sıkıntılı hastalarda antioksidan mekanizma zayıflar. Akciğer hasarının oluşmasında ROS'lerin endotoksin, bakteriyel sepsis ve hiperoksik akciğer yaralanmasında etkili olduğunun bulunmasıyla antioksidan tedavinin etkilerini gösterme ve yeni tedaviler geliştirme gibi çalışmalara başlanılmıştır.⁵³ Antioksidan savunma sistemi ROS miktarının yükselmesi ile organizmanın hücre içinde üretilen savunma sistemidir. ARDS'li hastalarda ve hayvan modellerinde antioksidan özellikleri bilinen N-asetil sistein (NAC), lipoik asit, vitamin C ve vitamin E hakkında

çalışmalar yapılmıştır. Yapılan deneysel çalışmalarda bu maddelerin antioksidan sistemi düzelterek hastalığın patofizyolojinde olumlu etkileri gözlenmiştir.⁵⁴ Faz II çalışmalarında antioksidan tedavi umut verici olsa da bu yöntemler rutin de tek başlarına tedavi edici olarak uygulanamazlar.

Diğer Tedavi Yöntemleri: ARDS hastalarında diğer farmakolojik tedavi yöntemleri prostaglandin inhibitörleri, vasodilatatörler, fosfodiesteraz inhibitörleri ve tronboksan sentez inhibitörleridir.⁵³ Bu tedavi yöntemlerinin standart tedavide yararı yoktur, rutin için araştırma yapılmalıdır.

2.3. Deneysel Modeli

Deneysel ARDS hastalığı oluşturmak için hayvanlar üzerinde kullanılabilir birçok model bulunsa da en yaygın olarak oleik asit (OA) ile indüklenme modeli kullanılmaktadır. Oleik asit albümin çözeltisi içinde çözündürülerek deney hayvanlarına intravenöz yöntemle uygulanmasıyla akciğerde ARDS'de benzer semptomlar meydana gelir.⁵⁵

Oleik asit 18 karbonlu bir çift bağı bulunan doymamış bir yağ asitidir. Oda sıcaklığında saf oleik asit katı formda bulunur. Hayvansal ve bitkisel yağlarda sıklıkla bulunan yağ asitidir. Oleik asit 25 kg'lık hayvana indirekt yolla intravenöz yöntemle 1-2 ml uygulanırsa belirgin şekilde akciğerlerde hasar oluşturulur.⁵⁵ Yapılan bazı çalışmalarda 30 µl dozda kullanılan oleik asit 24. ve 72. saatlerde akciğerlerde belirgin hasar meydana getirdiği gözlemlenmiştir.⁵⁶ Oleik asit tuz çözeltisinde veya etanolde çözülerek verilir. Çözelti fraksiyonlar halinde ya da birkaç dakikada bir sürekli infüzyon halinde verilebilir. Ayrıca veriş yöntemleri hasarın şiddetini ve yoğunluğunu etkiler ve böylece değişik patolojik sonuçlarda ortaya çıkar. İntravenöz yolla verilen OA akciğerlerde oluşturduğu patolojik değişiklikler ARDS'de gözlenen benzer etkiler göstermiştir.⁵⁷ İntravenöz yolla uygulanan OA akciğerlerin hem endotel hem de epitelin de hasar meydana getirir. Böylece akciğerlerde şiddetli bir inflamasyon şekillenir.

Alveoler kapiller membranının yapısını bozarak permeabilite artışı, nötrofil birikmesi, sitokin salınımı, intraalveoler ve intertisyel sıvı artışı, intrapulmoner kan akımında değişiklik, alveoler ödem, hemoraji, perfüzyon bozukluğu, lökosit birikmesi, oksidan enzimlerin aktivasyonu, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminde artış ve hipoksik respiratuar yezmezlik gibi oksido-inflamatuar olaylar hasarın meydana gelmesinde önemli rol oynarlar.⁵¹

Akciğerlerde OA'nın etkisiyle süperoksit ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) salınımı başlatır, aktive olan nötrofillerin üretimi artarak endotel hücrelerine bağlanmasını ve nötrofil aktivasyonunu içeren süreci tetikler. Bu olaylar sonucunda oluşan inflamasyon akciğerlerde nitrik oksit (NO) salınımını uyarır ve NO üretimini hızlandırarak etkisinin artmasına neden olur.⁵⁸ Miktarı artan NO vasküler kaslarda süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ile tepkimeye verir ve sitotoksik oksidan olan peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$) oluşmasında artışa neden olur. Sitotoksik oksidan olan peroksinitritler lipitler, karbonhidratlar, proteinler ve nükleik asitler organik bileşikler üzerinde oksidan etki yapar. Bunun sonucunda ARDS'li hastalarda akciğerde meydana gelen doku hasarı ve inflamasyonda artışa neden olur. OA deney modelinin uygulandığı bir çalışma sonucunda oluşan akut akciğer hasarında serum total antioksidan kapasitesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir.⁵⁹

ROS'lar kısa ömürlü ve reaktif oldukları için; ARDS ile ilgili çalışmalarda ROS'lar hakkında araştırma yapılmış, fakat ayrıntılı ve yeterli bilgi bulunamamıştır. Bunun sonucunda sekonder veya son ürünlerden olan oksidize proteinler, H_2O_2 , peroksidize lipidler, malondialdehit (MDA) gibi enzimlerin ölçümüyle ayrıca süper oksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimlerdeki değişiklikler baz alınarak ARDS'deki oksidan-antioksidan denge ortaya konulmaya çalışılmıştır.⁶⁰

ARDS üzerine oleik asit ile indüklemek gibi hayvanlarda oluşturulan modellerin ortaya çıkan bazı avantaj ve dezavantajları vardır. Oleik asit (OA) ile indüklenen ARDS modelinde her ne kadar hastalığın patolojisinde görülen şiddetli nötrofil infiltrasyonu, hyalin membran oluşumu ve mikrotrombüs olguları gözlenirse de hastalığın insanlarda meydana gelen şeklini tam olarak karşılamamaktadır.⁸ Buna rağmen oleik asit ile oluşturulan modelde gözlenen inflamasyon bulguları, hyalin membran oluşumu ve şiddetli ödem hastalığın patogenezinde görülen şekline en yakındır ve üzerine araştırma yapılarak çözülmesi gereken en önemli faktörlerdir.

Yapılan çalışmalarda farelere verilen OA uygulaması sonucunda pulmoner hipertansiyon gelişir, sistolik ortalama arter basıncı düşer, hipoksemi (PaO_2/FiO_2 oranında azalma) ve kardiyovasküler düzensizlik geliştiği gözlemlenmiştir. Ancak diğer sistemlere etkisi minimal olduğu bildirilmektedir.⁶¹ Bundan dolayı sistemik etkisi az, pulmoner hasar etkisi fazla olup, doğrudan (pulmoner kaynaklı) bir ARDS modeli olarak kullanılabilir.

2.4. Maclura Pomifera

Genellikle odunsu bitkiler olup çiçekleri genel olarak rüzgârla tozlaşan (anemogam) küçük ve apetaldir. Yapısında sepal ve petal bulunuyorsa küçük, pulsu ya da belirsizdir. Kuzey yarım kürenin kurak iklimine toleranslı, açık güneşli alanlarda ortaya çıkan geniş yapraklı toprak tipleri ve toprak nem koşulları geniş alan kapsayan bölgelerde yetişen ağaçtır.⁶²

Moraceae cinsine ait 1179 tür içeren tohumlu bitkilerin en geniş ailesidir. Bu ailenin en geniş kapsamlı olanı maclura cinsi ve 36 türü vardır. *Maclura pomifera* (yalancı portakal) bu türlerden biridir.⁶³

Sistematığı şöyledir;

Alem : Plante (Bitkiler)

Divisio (Bölüm) : Spermatophyta (Tohumlu Bitkiler)
Subdivisio (Altbölüm) : Gymnospermae (Açık Tohumlular)
Klassis (Sınıf) : Magnoliopsida (Dicotyledoneae = Çift Çenekli Bitkiler)
Subklassis (Altsınıf) : Hamamelidae
Familiya(Aile) : Moraceae (Dutgiller)
Genus : *Maclura*
Tür : *Maclura pomifera* (Raf.) C.K. Schneid

Yalancı portakal (osage orange) olarakta bilinen *Maclura pomifera*, kapalı tohumlulardan, familyası dutgiller cinsinden olan ağaçtır. Toprağın pH sınırı 4.5'dur ve iyi direne toprak ile düzensiz ormanlarda bulunabilir. Bu ağaç, Nisan ve Haziran aylarında ilk sürgünleri yeşilimtrak veya açık kahverevgi olup, çıplaktır ve üzerinde lentiseller vardır. Ekim ve Kasım aylarında sarı–yeşil dokulu, sürgünler üzerinde dikenler bulunan, asitli ve kesildiğinde süt görünümünde sıvısı bulunan yenmeyen meyvesi vardır.⁶⁴ (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *Maclura Pomifera* (Osage Orange).

Özellikle Türkiye’de çit ve süs bitkisi yetiştirilmektedir. Konya, Bursa, Sivas, İstanbul ve Lüleburgaz gibi şehirlerde daha sık rastlanılır. Halk arasında ayı elması, yalancı portakal ve avlu ağacı olarak bilinir. *Maclura pomifera* bitkisinden bazı bileşikler izole edilip, aydınlatılan izoflavin türevi maddeler osajin ve pomiferindir. Bu maddeler *Maclura pomifera* bitkisinin taze meyve özütü olan etil asetatın % 25.7’si osajin ve % 36.2’si pomiferinden oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda maclura pomifera bitkisinden izole edilen özütlerin önemli farmakolojik etkileri ortaya konulmuştur. Bunların; antitümoral, antienflamatuar, antimikrobiyal ve antidepresan gibi özellikleri olduğu belirlenmiştir.⁶⁵

Yağın fiziko-kimyasal özellikleri:

Ham yağın içeriğinde % 13.87 oleik, % 76.19 stearik, % 6.76 ve % 2.40 palmitik asit gibi yağ asidi türevleri bulunmaktadır. *Maclura pomifera* tohumunun yağı 100 gr tohumda mg olarak; 18.92 α tokoferol, 10.80 γ -tokoferol, 6.02 β -tokoferol ve 6.29 δ -tokoferol içerdiği ayrıca zengin tokoferol içeriğine de sahip olduğu belirlenmiştir.⁶³

Maclura Pomifera zengin besin maddelerine sahip, insan sağlığına olumlu etki yapacak esansiyel yağları ve yağda çözünen biyoaktif molekülleri bulundurmaktadır. Bu nedenle çoğu antioksidan özellikli mantar türleri ile *Maclura pomifera*’dan elde edilen deniz tuzu ve metanol ekstresiyle mukayese edildiğinde bu bitkinin daha etkili antioksidan özellikte olduğu belirlenmiştir.⁶²

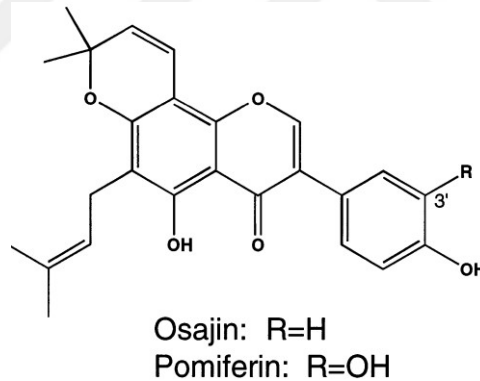
2.5. Pomiferin

Maclura pomifera bitkisinin etil asetat özütü % 36.2 oranında pomiferin (POM) % 25.7 civarında osajin (OSJ) içermektedir. *Maclura pomifera* bitkisinden saflaştırılan POM, sistematik olarak “3-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-8,8-di-methyl-6-(3-methylbut-2-enyl)-4H,8H-pyrano[2,3-h]chromen-4-one” şeklinde tanımlanır. Kısaca moleküler $C_{25}H_{24}O_6$ şeklinde formülendir.⁶⁵

Açık formülleri birbirine benzer olan ve bu bitkide yüksek miktarda bulunan POM ve OSJ molekülleri arasındaki tek fark, 3 nolu karbona bağlı grubun pomiferinde -OH yerine osajinde H grubunun bağlı olmasıdır. Pomiferin üzerinde yapılan *in vitro* ortamda antioksidan potansiyelini belirleme araştırmaları pomiferinin güçlü bir antioksidan olduğunu ortaya koymuş, yapılan benzer çalışmalarda aynı şekilde izoflavon grubu maddelerin de antioksidan kapasitesinin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yapılan bazı *in vivo* modellerde antioksidan özellikte olmalarına rağmen soya kaynaklı izoflavon türevi genistein ve daidzein gibi maddeler çalışmalarda beklenen başarıyı yakalayamamıştır.⁶⁵

66

Pomiferin maddesinde belirlenen bu antioksidan kapasitesinin mutlak kanıt olmasada, OSJ'den farkı yapısındaki fazladan -OH grubundan kaynaklandığı düşünülmektedir (Şekil 2.2).⁶⁵



Şekil 2.2. Osajin ve pomiferinin yapısı

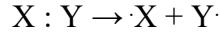
2.6. Antioksidan Savunma Sistemi

2.6.1. Serbest Radikaller

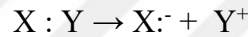
Serbets radikaller orbitalinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya moleküllerdir. Atom içerisinde bulunan orbitalde en fazla iki adet olacak şekilde ve birbirine zıt konumda elektronlar ihtiva eder. Geçiş metalleri olan demir, bakır, mangan orbitallerinde bir elektron bulunmasına rağmen radikal karakter göstermezler. Ancak nitrit oksit, nitrik dioksit gibi bazı atomlar tek orbitalinde bir

elektron bulundurmalarına rağmen radikal özellik gösterirler. Serbest radikaller üç yolla oluşur.⁶⁷

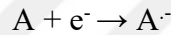
1. Homolitik bağın kopması ve bir elektronun bir molekülden diğerine transferi sonucunda oluşan serbest radikallerdir. Serbest radikal oluşumunda en sık durum homolitik bağın ayrılmasıdır.



2. Bir molekülün heterolitik bölünmesi veya molekülden tek bir elektronun kaybı ile meydana gelen radikallerdir. Kovalent bağı oluşturan her iki elektron heterolitik bölünmede, atom veya atom gruplarının birinde kalır.



3. Serbest radikaller bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi sonucu da oluşur.



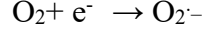
Canlılarda radikal kaynağı oluşmasında ki en büyük etken oksijendir. Nedeni ise oksijen atomunun orbitalinde iki eşleşmemiş elektron bulunmasıdır. Diğer atomlardan bu ayırıcı özelliği bulunan oksijenin, serbest radikallerle kolay reaksiyona girebilirken, radikal olmayan maddelerle reaksiyonu daha yavaştır. Oksijenin orbitalindeki elektronların dizilimindeki farklılık nedeniyle süperoksit, peroksit ve singlet oksijen gibi radikaller oluşmasına katkı sağlar.

Bunlara ek olarak serbest oksijen radikalinin oluşmasında hidrojen peroksit, oksijen, süperoksit, hidroksil radikalleri ve geçiş metal iyonları etkilidir. Oksijenli (Aerobik) solunum yapan canlılar besinleri oksitleme özelliğinden dolayı ATP üretir. Bundan dolayı serbest radikallerin en çok olduğu canlılar oksijenli solunum yapan canlılar olup, yine serbest radikallerin etkisine en fazla maruz kalanlardır.⁶⁸

Serbest Radikal Çeşitleri:

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Süperoksit radikali, oksijen molekülünün orbitalinde bulunan iki serbest elektrondan birini bir elektron olarak indirgenmesi sonucu oluşur.



Genel olarak bütün aerobik hücrelerde bulunan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) nötrofil, makrofaj ve eozinofil gibi savunma hücrelerince üretilmesi ile radikal oluşumunda artma meydana gelmektedir.⁶⁸ Süperoksit radikalleri oksidatif hasara az oranda etki ederler. Nedeni ise SOD enzimi sayesinde direkt olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) çevrilir. Ayrıca asidik durumda H_2O_2 ve peroksil (HO_2^{\cdot}) radikallerini üreten spontan reaksiyona uğrar. Süperoksit radikalleri hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri iyonları indirgeyicisi olmasıyla çok zararlıdır.⁶⁹

İki tane süperoksitin reaksiyonu sonucu hidrojen peroksit oluşur.



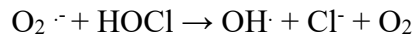
Süperoksit radikali ve peroksil reaksiyona girmesi ile biri indirgenirken diğeri okside olur. Bunun sonucunda hidrojen peroksit ve oksijen oluşur.



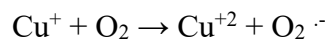
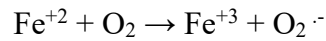
Nitrik oksit radikali ile süperoksit radikali reaksiyona girerek birer eşleşmemiş elektronlarını kovalent bağ ile bağlanması sonucunda peroksinitrit oluşur.



Hidroklorik asitin ($HOCl$) oksijen metabolitleriyle reaksiyona girme özelliği vardır. Ayrıca süperoksit radikali ile reaksiyona girerek hidroksil radikali (OH^{\cdot}) gibi çok güçlü bir oksidan oluşmasına neden olabilmektedir.⁷⁰



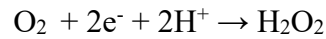
Süperoksit anyonu hem yükseltgeyici hem de indirgeyici özellikte olup, dopamin, askorbat, adrenal ve hidroksilamini oksitler, sitokrom c'yi ve Nitrobluetetrazolium indirger, ferrisitokrom c'nin redüksiyonunda redüktan olduğunda bir elektron kaybederek yükseltgenir ve okside olur. Oksidan olduğunda epinefrinin oksidasyonunda bir elektron alır, indirgenerek hidrojen perokside dönüşür. Ayrıyaten geçiş metalleri ile otooksidasyon sonucunda süperoksit radikali meydana gelebilmektedir.



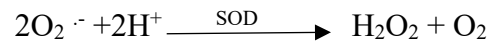
Yukarıdaki reaksiyonlar geri dönüşümlüdür ve serbest radikal oluşum hızında büyük öneme sahiptir.^{69, 71, 72}

Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Asidik bir ortamda süperoksit radikalinin bir elektron alması veya moleküler oksijenin iki elektron almasıyla hidrojen peroksit ortaya çıkar.



Rastgele bir sistem tarafından oluşturulan süperoksit radikalinin dismutasyon reaksiyonu, canlılardaki hidrojen peroksitin asıl kaynağıdır. Diğer taraftan glukoz oksidaz, urat oksidaz ve D-aminoasit oksidaz gibi enzimler oksijene iki elektron verirler ve H₂O₂ meydana getirirler.



Tek başına bulunduğu hidrojen peroksit çok zayıf oksidan özelliktedir. Nedeni ise orbitalinde ortaklanmamış bir elektron içermemektir. Hidrojen peroksitler hücreler tarafından kofaktör olarak selenyum kullanan glutatyon peroksidaz, katalaz ve belirli peroksidazlar tarafından bulunduğu ortamdan yok edilebilir. Hidrojen peroksit (H₂O₂), Serbest radikal ve reaktif oksijen türleri (ROS) içinde önemli role sahiptir ancak serbest

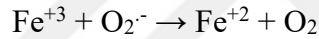
radikal değildir. Nedeni ise ortamdaki geçiş metallere Fe ve Cu ile süperoksit reaksiyona girer, yıkılarak en aktif ve zarar verici oksidan olan hidroksil radikaline dönüşür.



Varlığında

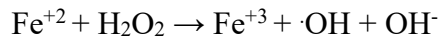
Yukarıdaki reaksiyon Haber-Weiss reaksiyonu olarak adlandırılır. Bu reaksiyon ortamda katalizör olması ya da katalizör olmaması gibi iki durumdada gerçekleşebilir. Diğer taraftan katalizör olmadığı durumda reaksiyon yavaş ilerler. Bu reaksiyonun oluşumu sırasıyla önce ferri demir (Fe^{+3}) süperoksit tarafından ferro demir'e (Fe^{+2}) indirgenmesi ve oluşan ferro demir kullanılarak fenton reaksiyonuyla hidrojen peroksitten $\cdot\text{OH}$ ve OH^- üretilmesi şeklindedir.⁷³⁻⁷⁵

Reaksiyon oluşum mekanizması aşağıdaki şekildedir.

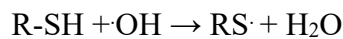


Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$)

Hidroksil radikali, ortamdaki geçiş metalleri etkisiyle oluşan fenton reaksiyonu sonucu ve suyun yüksek enerji ile iyonlarına ayrılmasıyla oluşan güçlü oksidan radikaldir. Hidroksil radikali özellikle organik molekülleri etkileyen ve bulunduğu yerde büyük hasarlar meydana getiren aktif hareketli bir oksidandır.



Hidroksil radikali birçok biyolojik molekülden hidrojen atomu koparabilir, bunlara tiyoller de dahil edilir.



Hidroksil radikalinin en iyi bilinen hasarı lipid peroksidasyonunu (LPO) oluşturmaktadır. Lipid peroksidasyonu membrana yakın kısımda hidroksil radikalinin üretilmesi ve membran fosfolipit zincilerinin yağ tabakasına saldırmasıyla gerçekleşen olaydır. Ayrıca hidroksil radikalinin doymamış çift zincir içeren (araşidonik asit) yağ asitlerine ilgisi çok olduğu bildirilmiştir.^{67, 76}

Singlet Oksijen (1O_2)

Singlet oksijen, orbitalinde elektron veya eşleşmemiş elektron bulundurmadığı için serbest radikal değildir. Oksijenin orbitalinde bulunan verilen enerji sonucu, eşleşmemiş elektronlardan herhangi birinin başka bir orbitale yer değiştirmesiyle meydana gelir. Diğer ROS ile okside olmasını artıran neden singlet oksijenin orbitalindeki elektronların aynı yönlü olmasındandır. Singlet oksijen fotokimyasal reaksiyonlar için olabildiğince öneme sahiptir.⁶⁷

Nitrik oksit ($NO\cdot$) ve nitrojen dioksit (NO_2)

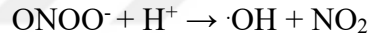
NO , orbitalinde tek sayıda elektron bulunduran, renksiz ve gaz halinde bulunan serbest radikaldir. Nitrojen dioksit orbitalinde eşleşmemiş elektron bulunan serbest radikaldir. Nitrik oksidin oksijen ile reaksiyonu sonucu nitrojen dioksit oluşur. NO_2 zehirli ve çok güçlü oksidandır. Nitrik oksit yoğunluğunun az olduğu durumlarda da önemli fizyolojik işlevlere sahiptir, fakat fazla ve kontrolsüz nitrik oksit üretimi hücreler için zararlı olduğu gösterilmiştir. Araşidonik asit metabolizması oksijen redüksiyonu sırasında nitrojen dioksite maruz kalması konsantrasyonda değişiklik meydana getirdiği gözlemlenmiştir. Araşidonik metabolizmasında düşük miktarda nitrojen dioksit bu metabolizmanın artmasında büyük oranda etki gösterir.^{77, 78}

Nitrik oksit sentaz olarak bilinen enzimlerce L-argininin L-sitrüline dönüşümü sırasında üretilmektedir. NO az yoğunlukta önemli fizyolojik işlevlere sahiptir, ancak aşırı ve kontrolsüz NO sentezi hücreler için zararlı olmaktadır. NO , yarılanma ömrü kısa

olan, 2-30 saniye içinde nitrata oksitlenerek daha kararlı bir yapı meydana getirir. Biyolojik olarak kardiyovasküler sistemde, sinir sisteminde ve immun sistemde etki gösterip, nörotransmitter ve nöromodulatör bir etkiye sahiptir.⁷⁹

NO oksijene bağlı sisitemlerde oksijeni uzaklaştırır ve lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Böylece hücreleri korumuş olur, serbest radikal ve metal aracılı süreçlerde antioksidan olarak güçlü etki gösterir.⁷⁸

Son yıllardaki yapılan çalışmalarda nitrik oksit üzerinde fazlaca durulmaya başlanılmıştır. Nitrik oksit orbitalindeki eşleşmemiş elektrondan dolayı, tiol grupları, süperoksit, ve nitrojen dioksit ile reaksiyonu çok hızlı meydana gelir. Diğer radikallerle birlikte Alzheimer hastalığı, diabetes mellitus, kalp bozuklukları, septik şok ve gastrik hasar meydana gelmesinde etkili olduğu düşünülmektedir.⁸⁰



Diğer Serbest Radikaller

Meydana gelmek için kaynak olarak ROS'ları kullanan karbon merkezli radikaller (R·), peroksil radikalleri (ROO·), tiyol radikalleri (RS·), alkoksil radikalleri (RO·), gibi önemli serbest radikaller de oluşabilmektedir. Peroksil radikali yarı ömrü uzun olup, polidoymamış yağ asitlerinden oluşmaktadır. Oksijenle reaksiyona giren tiyol radikalleri tiyol (RSO₂·) veya sülfenil (RSO·) vb. gibi radikaller oluşturabilirler.⁸¹

2.6.2. Serbest Radikal Kaynakları

Canlıda serbest radikaller normal koşullarda metabolizma işlevi sırasında ya da çevresel faktörlerin etkisi ile de oluşabilmektedir. Örnek olarak en önemlileri stres ve hastalıklardır. Bundan dolayı serbest radikaller endojen ve eksojen olmak üzere ikiye ayrılır.⁸²

Eksojen radikal kaynakları

- İlaç oksidasyonu (Aminotriazol, asetaminofen, bleomisin)
- İyonize radyasyon
- Gamma radyasyon, Ultraviyole ışık, x-ray
- Metal iyonları (Demir, nikel, bakır, krom, kadmiyum, civa)
- Kirleticiler (Karbon monoksit, Asbest lifleri, ozon, mineral tozlar, ozon, karbon monoksit, nitrojen dioksit, nitrik oksit, silika, bazı solventler, toksinler, kükürt dioksit, hipoklorit)
- Sigara dumanı, egzoz dumanı
- Çevresel ajanlar, pestisitler, hava kirliliğine neden olan fotokimyasal maddeler, hiperoksit, solventler, aromatik hidrokarbonlar, anestezi maddeleri gibi xenobiyotikler.
- Stres, katekolamin miktarında artmasını ve artıran bu miktarın oksidasyon reaksiyonları ile serbest radikal oluşturur.

Endojen radikal kaynakları

a. Küçük Moleküllerin Oksidasyonu

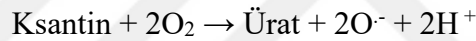
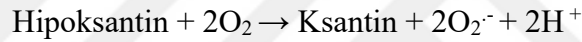
Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarına nötral sıvı ortamda girebilen ve çözünme özelliğine sahip çoğu intrasellüler olarak serbest radikalleri oluştururlar. Bu duruma örnek olarak tiyoller, hidrokarbonlar, katekolaminler, flavinler ve tetrahidroproteinler verilebilir. Bu maddeler oksijenin redüksiyonunu sağlarken primer olarak süperoksit radikallerinin oluşmasına neden olurlar. Süperoksit radikallerinin enzimatik dismutasyonu ise hidrojen peroksidin oluşmasına neden olur. Bundan dolayı süperoksit radikalini oluşturan enzimatik dismutasyonu hidrojen peroksidin oluşmasına neden olur.

Bundan dolayı süperoksit radikalini oluşturan reaksiyonlar dismutasyon nedeni ile hidrojen peroksit oluşmasında neden olmuştur.⁸⁰

b. Enzimler ve Protein

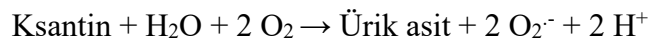
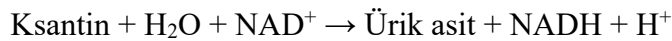
Çoğu enzim katalitik döngüler sırasında serbest radikal oluşmasını sağlar. Bu olayı meydana getiren aldehit oksidaz, ksantin oksidaz (XO), triptofan dioksijenaz ve flavoprotein dehidrogenaz gibi enzimlerdir. Genel olarak üzerlerinde en çok çalışılan ksantin oksidaz olup, oksijenin hidrojen peroksit indirgenmesi sırasında süperoksit radikalini oluşturur. *In vivo* koşullarda oluşturulan iskemi, ksantin oksidaz, dehidrogenaz halinden oksidaz haline dönüştürülürken süperoksit radikali meydana gelir.⁸³

Oksijen bulunduğu XO enzimi hipoksantini ksantine veya ksantini ürate okside eder. Meydana gelen bu reaksiyonda oksijen atomu elektron alıcısıdır.



Yukarıdaki reaksiyonda meydana gelen süperoksit radikallerinin yaptığı en büyük hasar vasküler sistemdedir. Yapılan bazı çalışmalarda XO enziminin akciğer, barsak, böbrek ve karaciğer gibi dokularda hasara neden olduğu gözlemlenmiştir.

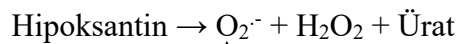
XO, normal durumda NAD⁺ bağımlı dehidrogenaz görevini üstlenir, fakat serbest radikal oluşturmaz. Ancak iskeminin akut fazını geçirdikten sonra hücre membranı sahte sodyum-kalsiyum pompası meydana getirme eğilimi oluşur. Böyle bir durumda proteaz enzimlerinin miktarında artma olmasına rağmen hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artış devam etmektedir.^{84, 85}



XD

Ca⁺⁺↓

XO





Yukarıdaki reaksiyon sürecinde hücre, ksantin dehidrogenaz (XD) XO 'a dönüşmesine imkân sağlamış olur. Hücre içinde gerçekleşen bu süreçte süperoksit (O_2^-) radikaller meydana gelmiş olur. Meydana gelen bu süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit'e dönüşümü çok hızlı bir şekilde gerçekleşir. Güçlü radikal olmayan hidrojen peroksit Fe^{+2} varlığında fenton reaksiyonu ile çok güçlü hidroksil radikaline dönüşmesini sağlar. XO'a yapı benzerliği olan aldehit oksidaz, substratlarını çoğunlukla aynı şekilde kullanarak süperoksit radikali üretirler.⁸⁰

c. Mitokondrial Elektron Transportu

Hücresinin iç mitokondrisinde sınırlandırılmış oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük miktarda redükte olduğu zaman mitokondriyal süperoksit radikalinin açığa çıkışı artar. Bu olay sonucunda mitokondrial radikal yapımına etki eden endojen faktörlerin, solunumu regüle eden maddeler olduğu düşünülmektedir. Solunumda regülasyona neden olan maddeler, hazır olarak bekleyen NAD'ye bağlı substratlar, süksinat, oksijen ve adenozin difosfat (ADP)'dir. Ama oksijenin sitokrom oksidaz aracılığıyla H_2O 'ya indirgenmesi, sınırlı miktarda bulunması, artan solunum zinciri indirgenmesi ve hücre içinde indirgeme kofaktörlerinin yığılması, iskemik hücrelerde süperoksit radikal yapımında kolaylık sağlayacaktır. Yapılan bazı araştırmalar sonucunda yalıtılmış mitokondri ve submitokondrial parçacıklar konu edilerek, mitokondrial serbest radikallerin kaynağının, iç mitokondrial membranda yer alan elektron transport zinciri olduğu gösterilmiştir.⁸⁶ Mitokondri içinde en başta süperoksit radikali daha sonra hidrojen peroksit ve hidroksil radikali meydana gelmektedir. Mitokondrial oksijen tüketiminin yaklaşık %1-2'sini süperoksit ve hidrojen peroksit yapımı oluşturmaktadır. Bozulmamış mitokondri, hidrojen peroksidi sitoplazmaya verebilmekte, fakat süperoksit radikali için farklı bir durum vardır. Mitokondrial süperoksit dismutaz, mitokondrial süperoksit radikalini çok düşük denge derişiminde tutar ve bu duruma bakarsak

mitokondrial süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi hidroksil radikali de mitokondride yapılabilir, bu konu ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.^{87,88}

d. Endoplazmik Retikulum ve Nükleer Membran Transport Sistemleri

Membrandaki sitokromların oksidasyonu sonucu endoplazmik retikulum ve nükleer membranda serbest radikallerin oluşumu gerçekleşir. Meydana gelen bu serbest radikaller hem sitozolik ve hem de intraorganel reaksiyonların başlamasına sebep olabilirler. Nükleer membranda meydana gelen radikallerin varlığında en başta DNA yapısı serbest radikal harabiyetine maruz kalabilecektir.⁸⁹

Endoplazmik retikulum ve nükleer membranlar özdeş elementleri, örneğin sitokrom P450 ve bs'i içerdikleri için ksenobiotikleri, ansature yağ asitlerini okside edebilir ve oksijeni redükte edebilirler. Ayrıca otooksidasyonla hidrojen peroksit ve süperoksit radikali oluşturmalarının nedeni sitokrom redüktazların flavoprotein içermeleridir. Mikrozomal ve nükleer membran sitokromları bir elektron aktarımının direkt olarak peroksisitokrom komplekslerinde ya da süperoksit radikalinde ayrışma yapabilmesi ile hidrojen peroksit oluşturabilirler. Yapılan çalışmalarda rat karaciğer mikrozomlarında da hidroksil radikalinin oluşumu gözlemlenmiştir.^{86,90}

e. Peroksizomlar

Hücre yapısındaki peroksizomlar güçlü hidrojen peroksit kaynağıdır. Peroksizomlar, urat oksidaz, L- α -hidroksi asit, D-amino asit oksidazdan oldukça zengin olan, bu enzimler hidrojen peroksit oluşturma özelliğe sahiptirler.⁸⁰

f. Plazma Membranları

Plazma membranı, serbest radikaller için ciddi önemli bir yapıdır. Hücre içinde, ekstraselüler olarak oluşan serbest radikaller, hücrenin başka bölgeleriyle reaksiyon yapabilmek için ya plazma membranında hasar yapıp geçmeli ya da toksik reaksiyonları membranda başlamasını gerçekleştirmelidir. Membranda bulunan gliseridler,

fosfolipidler, steroller gibi ansature yağ asitleri ve basitçe okside olabilen amino asitleri içeren zar proteinleri serbest radikal hasarına açıktır. Ayrıca, transmembran eğiminin bozulmasının, salgı yapan fonksiyonların kaybının, selüler metabolik olayların inhibisyonunun nedeni serbest radikallerin başlattığı yapısal önemi olan proteinlerin oksidasyonu ya da lipid peroksidasyonu olabilir.⁸¹ Bu konu hakkında son zamanlarda dikkat çekici olan lipoksijenaz ve siklooksijenaz gibi mikrozomal ve plazma membrama bağlı enzimlerin serbest radikal açığa çıkarmalarıdır. Bu lipoksijenaz ve siklooksijenaz enzimlerinin baskın substratı olan araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu ile bir karbonlu serbest radikal açığa çıkarılır. Diğer yandan siklooksijenazın katalize ettiği araşidonik asit metabolizması sırasında bir oksijen merkezli radikal meydana geldiği, bu radikalin hidroksil radikali olduğu ve PGG₂ üzerindeki hiperoksidin parçalanması sonucu olduğu ileri sürülmektedir. Prostaglandin sentezi sırasında oluşan hidroksil radikali ya da diğer radikal türlerinin siklooksijenazın feedback (geri bildirim) cevabına neden olabilir, prostaglandin sentezinin hem hızını hem de miktarını ayarlanmasını sağlayabilir.⁹¹

2.6.3. Serbest Radikallerin Hücre Hasarındaki Etkileri

Oksijen atomunun indirgenmesi ve enzimatik reaksiyonu sonucu süperoksit oluşur. Bu süperoksit radikali hücrede en çok lipid molekülü ile reaksiyon verir. Oksijen molekülü normal durumda metabolik reaksiyonlarda %5-10 yüksek toksisite ürünü oluşturabilir. Oksijenli solunum yapan canlılar intrasellüler ve ekstrasellüler antioksidan savunma sistemi ile oluşan toksik ürünleri zarar seviyesini azaltarak duruma getirerek kendilerini korurlar. Fakat antioksidan savunma sistemi zayıflar ve radikal üretimi artar ise hücrelerde hasar meydana gelir.^{81, 92}

Oksijen radikalleri kısa süre içerisinde yıkım meydana geldikten sonra enzimler tarafından detoksifiye edilmezlerse nükleik asitler, proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve

glikoproteinler gibi biyolojik yapılarda reaksiyon meydana getirerek geçici veya geri dönüşümsüz değişikliklere yol açar.

Reaktif oksijen radikalleri (reactive oxygen species - ROS) vücutta nötrofil, monosit, makrofaj, eozinofil gibi savunma hücrelerinden, hücre yüzeylerindeki redükte NADPH oksidaz sistemi sayesinde üretilmektedir. Serbest oksijen radikalının üretilmesinin nedeni yabancı mikroorganizmaları yok etmektir. Kronik inflamasyonda koruyucu olan bu mekanizma hasar oluşmasına neden olur.⁹³

ROS'ların hücre ve dokulardaki başlıca zararlı etkileri;

- DNA'nın zarar görmesi
- Nükleotid yapılı koenzimlerin yadımlanması
- Kollajen ve elastin gibi uzun ömürlü bileşiklerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapillerde aterofibrotik değişikliklerin oluşması
- Tiyollere bağımlı enzimlerin fonksiyonları ve yapısının bozulması, hücre ortamının tiyol/disülfid oranının değişmesi
- Protein ve lipidlerle kovalent bağlanması
- Mukopolisakkaritlerin yadımlanması
- Zar proteinlerinin zarar görmesi, taşıma sistemlerinin bozulması
- Enzim aktivitelerinde ve lipid metabolizmasındaki değişiklikler
- Proteinlerin zarar görmesi
- Lipid peroksidasyonu, zar fonksiyonu ve yapısının değişmesi
- Yaş pigmenti ve seroid denilen bazı maddelerin yığılması

Membran lipidleri üzerine etkileri:

Canlı organizmasında serbest radikallere karşı hassas ve onlardan etkilenen lipidlerdir. Canlının hücrelerindeki membran yapısında poliansatüre yağ asitleri (PUFAs) çok miktarda bulunur ve okside edici radikallerle çok kolay reaksiyona girebilirler.⁹⁴

Poliansatüre yağ asitleri bağları ile serbest radikallerin bağlarının reaksiyon meydana getirmesi sonucunda oluşan ürün peroksidasyon (LOO·) yapılarıdır. Ayrıca ROS kendilerine özgü karakterleri ile lipitlerden elektron koparmasıyla lipit radikali meydana getirirler. Böylece PUFAs'ın oksidatif yıkımına lipid peroksidasyonu denilmektedir. Bu durumun meydana gelmesinden sonra yeni radikaller oluşur ve böylece zincir reaksiyonu şeklinde devam eder. Bu reaksiyonun devamlı tekrarlanması çok zararlı ve geri dönüşümü olmayan bir hasar meydana gelir.⁹⁵ Bu zincir reaksiyonları sonucunda oluşan ürün hidroperoksitler (LOOH) ve bunlar şiddeti daha çok olan aldehitlere (L-CHO) dönüşür.

Lipid peroksidasyonunun oluşması hidroksil radikali tarafından metilen karbon atomundan bir hidrojen atomu koparılması ile başlar. Ayrıca süperoksit radikali lipit molekülünden tek hidrojen koparamaz fakat ortamda bulunan Fe⁺² varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucunda hidroksil radikalini meydana getirir. Bununla beraber süperoksit anyonunun protonlanmış formu daha reaktif olup linoleik asit gibi bazı yağ asitlerinden hidrojen atomu koparabilir. Böylece süperoksit anyonu protonlaştığı için yüksüz olur ve hücre membranından kolayca geçebilir, lipitlerin alt hücrel organellerinde peroksidasyona sebep olur. Metilen karbonundan bir hidrojen atomu koparan lipit molekülü karbon merkezli bir radikal oluşturur. Meydana gelen bu radikal moleküler düzenleme ile konjuge dien oluşturarak kararlı duruma gelir. Böylece konjuge dien moleküler oksijen ile reaksiyon vererek lipit peroksil radikalini meydana getirir.⁷⁰

Tiobarbitürik asitle ölçülebilen MDA (malondialdehit) oluşumu yağ asitlerinden üç ya da daha fazla çift bağ bulunduranların peroksidasyonu ile gerçekleşir. MDA lipid peroksidasyon seviyesini gösteren genellikle biyomarker olarak kullanılmaktadır, ancak spesifik bir kriter değildir.⁷⁰ Ayrıca çift bağ sayısındaki artma serbest radikaller ile tepkimeye girme olasılığı artar, böylece MDA oluşmasındaki artış ile paraleldir. Bununla beraber peroksidasyon esnasında oluşan konjugat dien ölçümünde, *in vivo* koşullarda lipit

hidroperoksitlerin düzeyini belirlemekte giderek önem kazanmaktadır. Meydana gelen lipit peroksil radikali başka lipit moleküllerinden bir hidrojen atomu koparır ve zincirleme reaksiyonunun başlamasında etken olur.⁸¹

Lipit peroksidasyonu hasar oluşturması iki yolla yapar. Birincisi direkt yolla olan membran yapısına ve ikincisi ise indirekt olarak ürettiği reaktif aldehitlerle diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Bundan dolayı birçok hastalığa ve doku hasarının oluşmasına neden olurlar. Lipid peroksidasyonu ateroskleroz ve karsinogenez gibi ciddi problemlerle ilgisi bulunmaktadır. Hidrofobik yapıda olan lipid radikalleri genel olarak reaksiyonlarını membrana bağlı olan moleküllerde gerçekleştirir, bundan dolayı membran permeabilitesi ve mikroviskozitesini ciddi şekilde etkiler. Lipit peroksidasyonu sonucunda oluşan moleküllerden biri olan MDA membran komponentlerinin çapraz bağlanması ve polimerizasyonuna neden olur. Bu olay; iyon transportu, deformasyon, membrana bağlı enzim ve reseptörlerin inaktivasyonu ayrıca hücre yüzey bileşenlerinde yığılma gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Meydana gelen bu etkiler MDA'nın karsinogenik, mutajenik ve genotoksik özellikte olduğunu göstermektedir.⁹⁶ MDA özellikle karaciğer hücrelerinde, DNA ve proteinlere çapraz bağlanarak büyük hasar meydana getirir. Fakat yıkım ürünlerinin DNA'ya bağlanması, lipit peroksidasyonlarının neden olduğu en önemli patolojik sorundur. Lipit hidroperoksitlerin faydalı olduğu durumlara örnek olarak programlanmış hücre ölümünü başlattığı, hücrelerin çoğalma ve farklılaşması ile eritrositlerin olgunlaşmasında yardımcı olduğu bildirilmektedir.⁹⁷

Sonuç olarak lipit peroksidasyonu; ya toplayıcı reaksiyonlarla (antioksidan enzimler) bastırılır ya da otokatalitik yayılma reaksiyonlarıyla devam eder. Buna göre;

- Antioksidan kapasite yeterli olduğunda hasar meydana gelmez. Bunun nedeni ise, peroksidatif hasarlar önlenir veya tamir edilir,

- Orta dereceli oksidatif hasar (subletal), hücre koruyucu aktivitesini uyarır (Katalaz, GSH-Px gibi),
- Daha geniş hasar apoptozisi yani genetik olarak programlanmış ölümü tetikler. Büyük hasar ise programlanmamış ani ölüm olan nekrozisle sonuçlanır,
- Lipid peroksidasyonu ile başlayan hücre sinyalleri, oksidatif stres durumunda apoptotik hücre ölümüyle en yüksek düzeye ulaşır.

Bundan daha ileri seviyesinde ise oksidatif stres ve hücre sinyalleri, nekrotik hücre ölümüyle beraber yaygınlaşan enflamasyon ile birlikte artar. Subselüler membranların stres sinyali naklinde plazma membranından çok daha öneme sahip olduğu bildirilmektedir.⁹⁸⁻¹⁰¹

Proteinler üzerine etkileri:

Serbest radikallerin diğer bir hedefi ise proteinlerdir. Proteinlerin aminoasit kompozisyonu serbest radikallerden etkilenmeleri için önemli bir unsurdur. Proteinlerin doymamış ve sülfür (-SH) grubu içerenleri (triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin, sistein) okside olmaları daha kolaydır. Oksijensiz (aerobik) koşullarda hidroksi radikali proteinlerde intersellular olarak S-S bağları arasında çapraz bağlanma yapar. Hidroksi radikali bazı amino asit kalıntılarının peptit bağını oksijensiz (aerobik) koşullarda kırarak peptit zincirinin parçalanmasına neden olur. İn vitro koşullar altında mitokondride ve eritrositlerde endojen proteinler parçalanır ve hücrelerde oluşan oksijen radikallerinden etkilenir.⁸⁰

Proteinlerin primer, sekonder ve tersiyer yapıları üzerine oksijen radikalleri etki gösterebilir. Primer yapısında meydana gelen oksidatif modifikasyon olayı sekonder ve tersiyer yapı değişmelerine sebep olmaktadır. Bu olaylar sonucunda membran proteinlerinin yapı ve fonksiyonlarında ki değişmeler proteolitik hasasiyette artışa meydana gelir.^{98, 100, 101}

Okside proteinleri okside olmayan proteinlerden çok hızlı bir şekilde proteinazlar parçalar. Örnek olarak birçok hayvansal dokularda proteinlerin okside formunu parçalayabilen nötral alkalın proteazlar bulundurulur. Fakat bu nötral alkalın proteazlar okside olmayan proteinleri parçalayamazlar.⁹⁹ Protein parçalanması; birinci basamakta bazı amino asitler okside olur ve karbonil türevleri oluşturur ve ikinci basamakta, modifiye proteinler intraselular proteazlar tarafından çok hızlı şekilde parçalanır. Okside olan proteinlerin parçalanması yararlı da olabilir ve nedeni ise sonradan oluşabilecek oksidatif hasarı önleyerek proteinlerde çapraz bağlanma oluşumunu engeller. Yeni protein sentezi için amino asit oluşmasını proteolitik aktivite sağlar.⁶⁴

Sitoplazma ve membran proteinleri serbest radikallerle etkileştiklerinde, çapraz bağlanarak dimerleşir ve çok büyük agregatlara dönüşürler. Hem proteinlerinde yüksek oranda hasar meydana gelir. İndirgenmiş oksijen türevleri protein yapısını oluşturan peptid bağları ve prolin, lizin gibi amino asitler gibi yapılar üzerinde etki gösterirler. Buna örnek olarak superoksit radikali, hidroksil radikali, hidrojen peroksit açığa çıkarıcı reaksiyon ortamında prolin ve lizin hidroksilasyonu nonenzimatik olarak oluşabilir.⁸⁰

Hidrojen peroksit ve süperoksit radikalleri, oksihemoglobinin methemoglobine dönüşmesine neden olur. *In vivo* şartlarda meydana getirilen proteinlerdeki oksidatif hasar, transport proteinlerini, enzimleri, reseptör fonksiyonunu ve belki de immün sistem üzerinde etki gösterebilir. Meydana gelen proteinlerdeki oksidatif hasar ürünleri diğer biyomoleküller üzerinde sekonder hasarlar oluşmasına yol açar (DNA enzimlerinin inaktivasyonu vs.).¹⁰²

DNA üzerine etkileri:

Hücre içinde radyasyonun etkisi sonucunda enerji depolanması sonucunda iyonlar, serbest radikaller ve aktif moleküller meydana gelir. Bu iyonize edici radyasyonlar sonucunda oluşan serbest radikaller, DNA'da mutasyona veya ölüme neden

olurlar. Sitotoksosite, yüksek oranda ya DNA'daki diğerk bozukluklara bağılı ya da nükleik asit-baz çevre şartlarından doğan kromozom değışikliklerine bağılıdır.¹⁰³ Nükleik asitlerin yapısını oluşturan bazlar ve deoksiriboz şekere serbest radikaller etki ederek reaksiyona girer ve hasar meydana getirir. DNA 'yı oluşturan çift sarmal, heliks yapısının dış kısmında bulunan deoksiriboz şekeri oksidasyona karşı aşırı duyarlıdır.¹⁰⁴

Oksidatif tepkime sonucunda DNA 'nın zincirinde çapraz bağlanma olur ve böylece genetik bilginin transkripsiyonu değışir. ROS'ların konsantrasyonlarının yüksek olması DNA zincirinde kırılmaya meydana getirir. DNA yapısına giren serbest radikaller nükleik asitlerle tepkimeye girerek DNA'da ki nükleotid dizilişinde çatlamaya sebep olurlar ve bu hücrelerin kanser hücresi olma ihtimalini artırırılar. Hücrelerde oluşan oksidatif stres sonucunda hücre içi kalsiyum seviyesinde aşırı yükselmesi, endonükleazi aktive ederek DNA fragmentasyonuna neden olabilirler.^{10, 102}

Hücre membranından hidrojen peroksit kolay bir şekilde geçerek hücrenin nükleusuna ulaşır. Böylece DNA 'da hücre disfonksiyonuna ve hücre ölümüne sebep olacak hasar meydana getirir. Hidroksil radikali, DNA'nın bütün komponentlerine hücum eder ve böylece hücre dışına radikal salarak komşu hücrelerde hasara neden olur.^{29, 81}

Enzimler üzerine etkileri:

Proteolitik ve katabolik enzimlerin seviyesini serbest radikaller artırırılar. Elastaz, fosfolipaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz, lipoksijenaz, triptofan dioksijenaz, proteaz, ve galaktoz oksidaz gibi enzimleri aktifleştirir. α -1- antitripsini inaktive ederler.⁹⁰

Karbonhidratlar üzerine etkileri:

Basit şekerk olan monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucunda peroksitler, glioksal hidrojen peroksit ve okzoaldehitler oluşturur. DNA, RNA ve proteinlere bağlanan okzoaldehitler antimitotik etki yaparlar. Okzoaldehitlerin göstermiş oldukları bu etkiden dolayı yaşlanma ve kanser olaylarında role sahiptir. Bağ dokunun önemli

mukopolisakkaritlerinden biri hidrojen peroksit, hiyalüronik asit ve süperoksit radikalının etkileriyle parçalanmaktadır. Böylece hiyalüronik asitin fazlaca bulunduğu bölgelerde patolojik bozukluklar meydana gelmektedir.⁸⁰

2.7. Antioksidanlar

Canlı organizmada meydana gelen reaktif oksijen türlerini engellemek ve bu türlerin oluşturduğu hasarları önlemek, ayrıca detoksifikasyonu sağlamak için vücutta görev yapan savunma sistemlerine “antioksidanlar” veya “antioksidan savunma sistemleri” denilmektedir.⁸¹

Radikallerle çok hızlı reaksiyona giren antioksidanlar, otooksidasyon/ peroksidasyonun dengesinin devamını önleyen maddelerdir. Antioksidanların diğer görevleri ise fazla bulunan serbest radikalleri pasifleştirmek, serbest radikallerin toksik etkilerine karşı hücreleri korumak ve hastalıkların önlenmesinde yardımcı olduğu denilebilir.¹⁰⁵

Antioksidanların etki mekanizmaları

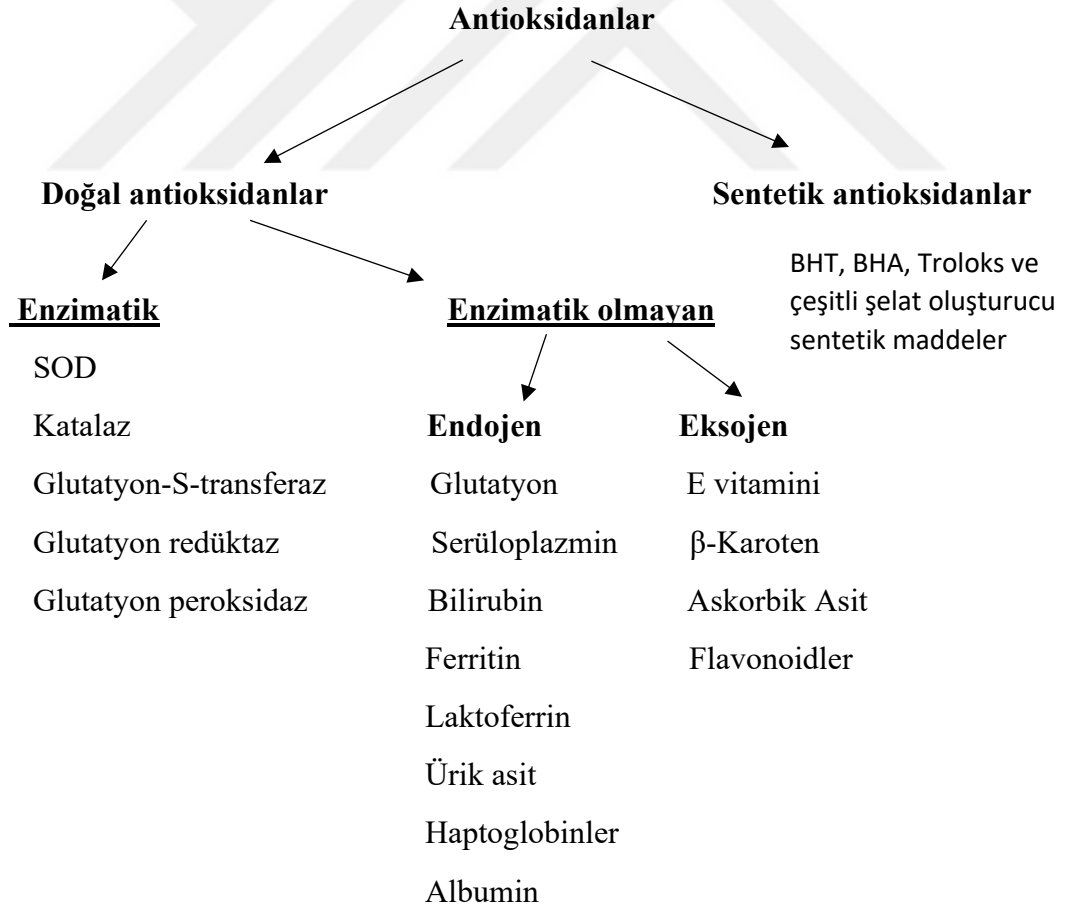
1. Toplayıcı etki; SOR'ları tutabilir ya da bunları daha zayıf moleküllere dönüştürerek etki yaparlar. Antioksidan enzimlerin işlev şeklidir.
2. Bastırıcı etki; SOR'ların aktivitelerini azaltmak için bir H₂ ekleyebilir ya da inaktif duruma dönüştürerek etki yaparlar. Bunlara vitaminler ve flavanoidler örnek verilebilir.
3. Zincir kırıcı etki; SOR'ların zincirlerinde kırıcı etki yaparlar. Bunlara hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller örnek verilebilir.
4. Onarıcı etki; Serbest radikallerin etkisiyle oluşan hasarda onarıcı etkiye gösterirler.
5. Hücresel kinaz kayıplarını önleme; yükseltgenme reaksiyonlarını durdurucu etkiye sahiptirler.

6. Enzimatik etki; antioksidan enzimler (SOD vs.) ile enzimatik olmayan antioksidanların sentez reaksiyonlarının çoğalmasında etkili olurlar.

Lipid peroksidasyonunu inhibe eden antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu önleyerek ya da ROS'ları ortadan kaldırarak inhibasyonu gerçekleştirirler. Serbest radikallerin etkileriyle biyolojik sistemlerde indüklenen hasarın diyet antioksidanlarla inhibe olduğu bildirilen bilgilerdendir.¹⁰⁶

Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar iki gruba ayrılır ve endojen ve eksojen olmak üzere isimlendirilir. Endojen ve eksojen antioksidanlar, vücudu serbest radikallerden korur ve oluşan serbest radikalleri etkisiz duruma getirir. Böylece bu durumda oksidan/antioksidan oranını korumak için kullanılırlar.⁸¹



Şekil 2.3. Antioksidanların sınıflandırılması

2.7.1. Endojen (Doğal) Antioksidanlar

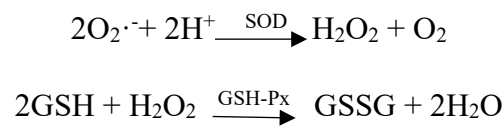
a) Enzimatik antioksidanlar: Birçok mekanizma türünün ile hücre içinde meydana getirdiği radikaller bazı enzimlerin etkisiyle giderilebilir. Bununla birlikte çoğu enzim doğrudan ya da dolaylı yollarla serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesinde etki gösterirler. Bu mekanizmalardan en önemlilerinin çalışma prensibi aşağıdaki anlatılmıştır.

Süperoksit Dismutaz (SOD):

SOD enzimi ilk önce 1969 yılında Mc Cord ve Fridovich adlı araştırmacılar tanımlamıştır. Oksijenin bulunduğu metabolizma reaksiyonları sırasında meydana gelen süperoksit anyonunun (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijen (O_2) katalizini gerçekleştiren enzimatik bir antioksidandır. SOD enzimi hücrel bölmelerde süperoksit düzeylerini kontrol eder ve ayrıca hücreleri direkt oksidatif hasara karşı korumada önemli rol sahiptir. H_2O_2 'nin ortamdan uzaklaştırılması KAT ya da GSH-Px gibi antioksidan enzimler tarafından gerçekleştirilir.¹⁰⁵ Süperoksit dismutaz enzimi hepsi metalloprotein yapısında olan 4 izoenzim bulunduran özelliğe sahiptir. SOD enziminin 3 çeşiti bulunur. İntrasellüler izomerlerinden birincisi sitozolik SOD bakır ve çinkoya bağlı iken (Cu/Zn-SOD), mitokondriyal SOD manganzeze (Mn-SOD) ve sonuncusu ise içeriğinde bakır (Cu) bulunduran ve vasküler endotele bağlı plazmada bulunan süperoksit radikallerini metabolizesini gerçekleştiren bakır SOD (Cu-SOD)'dur.¹⁰⁷ Hücrelere genellikle sitozolik SOD çok bulunur ve eritrositler için önemli, çünkü hemoglobinin otooksidasyonunda oluşan süperoksitleri temizler ve iki alt ünitesi vardır. Bu ünitelerin her birinde birer tane bakır (Cu) ve çinko (Zn) atomu bulundurmaktadır. Oksijen radikallerinin en büyük kaynağı mitokondrideki solunum zinciri ve bu özelliğe bakılırsa Mn-SOD'nin çok önemli antioksidandır. Mitokondriyal enzimdir ve dört eşit alt ünite bulundurmaktadır. Aktif bölgesinde Mn^{+3} bulundurmaktadır. Ancak Cu/Zn SOD ile

yapısında farklılıklar olmasına rağmen aynı reaksiyonu katalize etmektedir. Mn-SOD tümör nekrozis faktörü ve interlökin-1 tarafından uyarılmaktadır.¹⁰⁷ Ekstrasellüler sıvılardan olan snoviyal sıvı ve plazma sıvısında çok az miktarlarda SOD enzimi bulunur. Ekstrasellüler süperoksit dismutaz (EC- SOD), hücrede genel olarak homotetramer formda bulunur ancak diğer formlar olan multimer, tetramer ve dimer formlarda da bulunma ihtimali vardır. Genellikle matriks ve hücre yüzeylerinde bulunur. SOD enziminin ekstrasellüler olanı glia hücreleri, endotel hücreleri ve fibroblast hücreleri tarafından salgılanır ve sentezlenir. EC-SOD seviyesi genellikle akciğer tip 2 epitel hücreleri, solunum yolları ve kan damarlarını çevresini sarmalayan düz kas hücrelerinin yoğunluk miktarına bağlı olarak yüksek bulunur. Süperoksit anyonunu ekstrasellüler düzeylerde enzimatik olarak etkisizleştirebilen tek antioksidan enzimdir. Bu özelliğinden dolayı yangı, fibrosiz ve oksidan hasarı gibi benzer çoğu akciğer hastalıklarından korumada etkili bir role sahiptir.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Ekstrasellüler SOD (EC-SOD) bakır ve çinkoya bağlıdır. Bunlara ek olarak bazı bakteri ve kloroplastlarda demire bağlı SOD (Fe-SOD) ve nikel ile bağlı SOD (Ni-SOD) bulunduğu bildirilmiştir.⁸⁰

ROS'lara karşı antioksidan savunma enzimatik bir yol oluşturmuştur. Böylece ilk savunma sistemi enzimi SOD olmuştur. Bu yolun ikinci savunma enzimleri olarak SOD'dun aktivitesi ile meydana gelen ürün hidrojen peroksiti suya indirgeyen glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimidir.



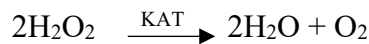
SOD, reaktif oksijen türlerinden olan süperoksit anyonuna bir elektron vermesi sonucu hidrojen perokside indirgenirken, glutatyon peroksidaz enzimi selenyum ve katalaza bağımlı olmakla birlikte H_2O_2 'yi suya redükte etmektedir. Diğer taraftan

antioksidan etkisi olan SOD enzimi ise süperoksit ile Fe⁺³'ün, Fe⁺²'ye indirgenmesi ile hidroksil radikalinin oluşmasını önlemektedir.¹¹⁰

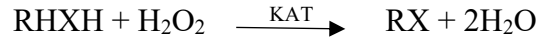
Bu reaksiyon zincirleme şeklinde devam eder, yani SOD aktivitesindeki artış, ikinci kademe enzimlerinin aktivitesinde artış meydana gelmektedir. Hücrede oluşan yüksek süperoksit üretimine adaptasyon gösteren SOD artışı ile GSH-Px arasındaki dengesizlik olursa hücrede oksidatif stresin meydana gelmesi kaçınılmaz olur. Yani SOD/GSH-Px dengesinin oronındaki yükselme oksidatif hasarın oluşacağı ve bu olayın patolojik olayları başlatabileceğini gösterebilir. SOD enziminin fizyolojik önemi; ortamdaki süperoksit radikallerinin aerobik hücrelere zarar vermesini engellemek ve böylece lipid peroksidasyonunun başlamasını engellemektir.^{110, 111}

Katalaz (KAT):

Hayvansal organizmanın canlı hücrelerinde KAT enzimi her bir alt biriminin bir hem grubu bulundurmakta, dört alt üniteden oluşmakta, tetramerik yapıya sahip ve 240,000 dalton ağırlığında proteindir. Bütün oksijenli solunum yapan hücrelerde bu enzim bulunur. Miyokard, karaciğer, böbrek, eritrositler ve çizgili kaslar katalaz aktivitesinin yüksek olduğu organlardır. Katalazın %80'ni peroksizomlarda ve %20'si ise sitozolde bulunmaktadır. Beyin, kalp ve iskelet kasında düşük oranda katalaz (KAT) bulunur. Hücrelerde oluşan hidrojen peroksidi katalaz enzimi su ve oksijene çevirerek etkisiz duruma getirir. Süperoksit dismutaz aktivitesi sonucunda meydana gelen hidrojen peroksid radikal değildir fakat reaktif aktivitesi yüksek olan hidroksil radikalinin (OH[·]) oluşmasında öncül olduğundan hücre içi oksidatif hasarın oluşmasında sebep olmaktadır. Bundan dolayı katalaz enzimi H₂O₂ 'in iki elektronunu su ve oksije parçalayarak hidrojen peroksidin derişiminin azalmasını sağlamaya çalışır.^{111, 112}



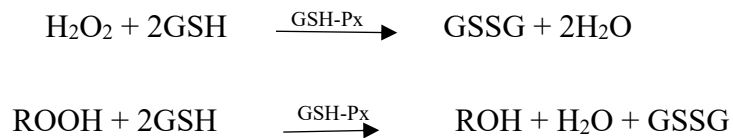
Diğer bir özelliğide H₂O₂ konsantrasyonunda askorbat ve fenol gibi redükte edici kosubstratları kullanması ile peroksidaz gibi davranır.



Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px):

GSH-Px, hücre sitoplazmasında bulunmaktadır ve H₂O₂'den dolayı oluşan oksidatif hasara karşı korur ve H₂O₂ etkisiyle oluşan hidroksil radikalinin meydana gelmesini engeller.¹¹¹ İlk olarak 1957 yılında Mills tarafından sığır eritrositlerinde glutasyon peroksidaz enzimi izole edildi. Yapılan çalışmalarda selenoprotein yapısında olduğu belirlenmiştir. Glutasyon peroksidaz enzimi dört protein alt birimi bulunmakta ve alt birimlerinde selenyum atomu bulunmaktadır. Glutasyon peroksidaz enziminin iki temel şekli vardır. Bunlardan birincisi aktif bölgesinde Se bulunduran selenyuma bağlı olan ve ikincisi bağlı olmayan glutasyon peroksidazlardır. Selenyuma bağımlı glutasyon hidrojen peroksid ve organik hiperoksitlere karşı etkili, diğeri ise genellikle organik hidroperoksidlerin metabolize edilmesinden sorumludur. Bu GSH-Px enziminin dört tipi olduğu, bunların enziminin gastro-intestinal glutasyon peroksidaz (GI-GSH-Px = GSH-Px -3), plazma glutasyon peroksidaz (P GSH-Px = GSH-Px-2), sitozolik glutasyon peroksidaz (C GSH-Px = GSH-Px-1), fosfolipid glutasyon peroksidazdır (PL-GSH-Px = GSH-Px -4).⁸⁰

Bu enzim hidrojen peroksid varlığında H₂O₂ 'in hidroperoksitlere ve suya indirgenir, glutasyon (GSH) ise okside glutatyona (GSSG) yükseltgenir.¹¹³



Okside glutasyonun diğer bir ifadesi glutasyon disülfid (GSSG) şeklindedir. Bu glutasyon ortamda bulunan glutasyon redüktaz (GR) enziminin ortamda bulunması

durumunda okside glutatyon redükte glutatyona dönüşümü için indirgenme gerçekleşir ve bu reaksiyon olayında NADPH elektron verici olarak görev yapar.¹¹¹ Glutatyon redoks döngüsünün meydana geldiği hücrelerde hidrojen peroksit ve hidroperoksitlerin indirgenmesinde öneme sahiptir. Bu döngünün anahtar enzimi glutatyon peroksidaz, glutatyon ise substratıdır. Oksidatif stresin diğer göstergesi ise GSSG/GSH oranıdır. Örnek olarak eritrositlerdeki bu oran 1/500 seviyesinde tutulur. Eritrositlerdeki bu dengenin bozulması hasar oluşmasına neden olur.¹¹¹ GSH-Px enzimi selenyum ve E vitamini arasındaki ilişki önemli oranda yüksektir. Bu enzimin kofaktörü olan selenyumun önemi ortamda bulunan bu radikallerin ortadan kaldırılmasında yardımcı olmaktır. Bundan dolayı E vitamini ve selenyum eksikliğinde GSH-Px enziminin aktivitesinde azalma olur. SOD ve katalaz enzimlerinin aksine glutatyon peroksidaz enziminin yaşla birlikte kandaki seviyesinde yükselme olduğu belirlenmiştir.^{110, 111, 113}

Glutatyon Redüktaz (GR):

GR, yapısında FAD bulduran flavoprotein türevi bir enzimdir. İki alt üniteden oluşan yükseltgenmiş glutatyonu (GSSG) indirgenmiş glutatyona (GSH) çeviren dimerdir. Bu alt üniteler yapısında üç alan bulundurmakta ve bunlar ara yüz alan, NADPH bağlayan alan ve FAD bağlayan alandır. GSSG (Okside glutatyon) birinin alt biriminin FAD bölgesi ile diğerinin alt biriminin arayüz bölgesinden meydana gelen bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Okside glutatyonun redükte reaksiyonuyla glutatyona indirgenmesi esnasında genellikle elektronlar NADPH'dan FAD'ye aktarımı gerçekleşir. Böylece son olarak FAD'ye transfer edilen elektronlar alt birimlerdeki iki sistein arasındaki disülfid köprüsüne aktarılmak üzere okside glutatyona aktarma gerçekleşir. Bundan dolayı serbest radikallerin oluşturduğu hasarı önleyebilmesi için NADPH' a ihtiyaç vardır ve bunun en önemli kaynağı ise pentoz fosfat yoludur.^{111, 112}



Glutasyon S-transferaz (GST):

Glutasyon S-Transferaz enzimi toksik metabolitlerle glutasyonun konjugasyonunu katalizler ve toksik metabolitlerin detoksifikasyonuna neden olan antioksidandır. Başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitler GST'dir. Bunlar lipid peroksitlere karşı selenyuma bağımlı olmayan glutasyon peroksidaz aktivitesi gösterirler ve antioksidan sistem meydana getirir. Böylece katalitik ve katalitik olmayan birçok fonksiyona sahiptirler. Ayrıca bu enzimler hem hücre içi taşıyıcı ve bağlayıcıdır hem de detoksifiye edici rollere sahiptirler.^{111, 112}



Glutasyon S-transferazlar üç sitozolik ve bir mikrozomal gruba ayrılır. Bu enzim yabancı maddeleri glutatyonda bulunan –SH grubu ile bağlayarak nötralize işlemini gerçekleştirirler. Böylece meydana gelen ürünün suda kolay çözünmesini sağlayarak, organizmadan kolayca atılmasını sağlamaktadır. Lipit hidroperoksitlerin detoksifikasyonunda rol oynayan GSH-Px ve PL GSH –Px enzimlerinden sonra önemli olan üçüncü enzimdir.⁸⁰

Miyeloperoksidaz (MPO):

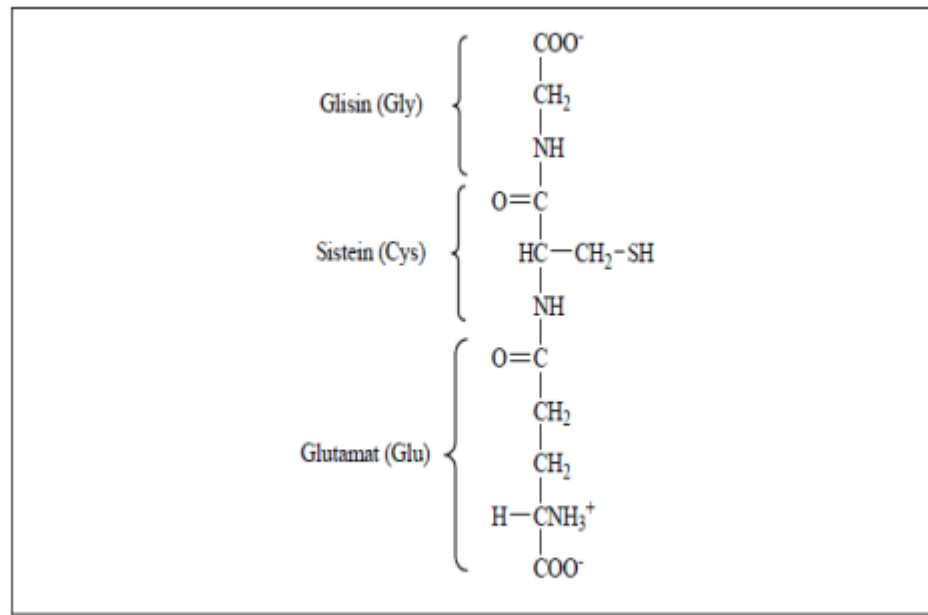
Myeloperoksidaz (MPO), memeli nötrofillerinde bulunan ve fagosite edilmiş bakterilerin öldürülmesinde önemli role sahiptir. 1940'lı yıllarda verdoperoksidaz olarak anılırken daha sonraları myeloperoksidaz olarak adlandırılmıştır. Bu enzimin %3-4'ü karbonhidrattır ve MPO aktivitelerini bloke etmektedir. Bu enzim hidrojen peroksit (H₂O₂) ile birlikte halojen iyonlardan etki sırası iyodit, bromit ve klorit olan ve bunların bulunduğu ortamda oksijene bağlı (antibakteriyel) etki göstermektedir. MPO'nun etkili reaksiyonu MPO+H₂O₂+Cl şeklinde. H₂O₂ ve diğer halojenlerin miktarında ki artış antibakteriyel etkiyi artırmakta, ayrıca H₂O₂ 'in antibakteriyel mekanizmadaki rolü mikrobiyal metabolizma üzerine olan etkisidir. Böylece H₂O₂'in tek başına antibakteriyel etkiye sahiptir. Ortamda bulunan H₂O₂ üretimi fagositoz yapan hücrelerde yapılarak

salınmaktadır. H₂O₂ 'in konsantrasyonu antibakteriyel mekanizma da çok olan önemli bir yer tutar.^{114, 115}

b) Sekonder Antioksidanlar:

Glutatyon (GSH):

Glutatyon; glutamik ait, sistein ve glisenden oluşan moleküler ağırlığı düşük ve bir tripeptiddir. Ayrıca bol miktarda bulunan intrasellüler tiyolden olan GSH, bitkiler ve hayvanlar ve mikroorganizmalarda hücre sitozolünde bulunmaktadır.¹¹⁶



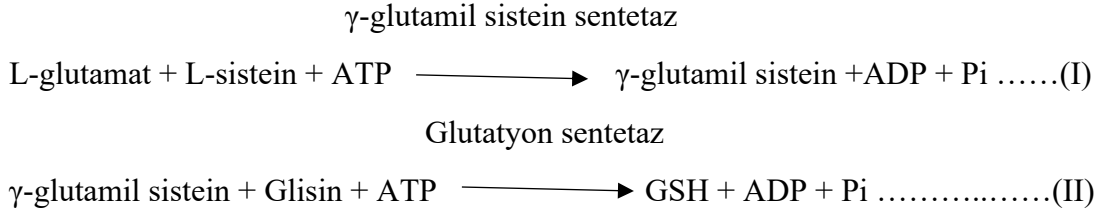
Şekil 2.4. Glutatyonun yapısı⁸⁰

Glutatyonun hücre içinde kullanıldığı üç önemli uygulama aşağıdadır:

1. Serbest radikallerin direk temizleyicisinde antioksidan etki yaparak,
2. Glutatyon -S transferazların detoksifikasyonu olayında kofaktör etki yaparak,
3. Glutatyondan diğer aminoasitlere glutamin transferinde aracı olan gamaglutamil transpeptidazlar için substrat olarak görev yapar.

Glutatyon enzimi hücrenin okside-redükte oranında önemli role sahiptir. Böylece hücrelerdeki toksik metabolitlerin uzaklaştırılmasında rol oynar ve indirgenmiş şeklinden dolayı sülfhidril grubunun hücredeki sürekliliğini sağlamaktadır. Glutatyonun

biyosentezi iki adımda gerçekleşir. Sentezin oluşumu γ -glutamilsisteinil sentetaz ve glutasyon sentetaz adındaki bu enzimlerin katalizlediği tepkime ile ATP'ye bağımlı olarak meydana gelir.¹¹⁶



Birinci adım L-glutamat ile L-sisteinin γ -Glutamil sisteinil sentetaz aracılığıyla bir araya gelmesidir. Glutasyon sentezini sınırlandıran enzim olan γ -glutamil sistein sentetaz bu reaksiyonu katalize eder. İkinci adım glisin ve γ -glutamil sistein birleşmesidir. Glutasyonda homeostazisinin sağlanması, enzim aktivitesi ve sentezinde kritik role sahiptir. Glutasyon dokularda indirgenmiş glutasyon (GSH) ve okside glutasyon (GSSG) şeklinde bulunup denge halindedirler. İndirgenmiş glutasyon serbest sülfhidril grubu bulundurması ile hücre içindeki proteinlerin tiol gruplarını ve hemoglobinin sistein gruplarını redükte şekilde bulundurur.¹¹⁷

Redükte protein ve enzimlerin –SH grubu ile yeteri kadar kontrolü sağlanan indirgenme formları ve böylece glutasyonun sistein rezidüsünde bulunan tiyol yan grubu onun fizyolojik özelliklerinin belirli bir bölümünü yerine getirmektedir. Enzimler –SH grubunu bulunduranların hızları yüksek olmayıp O₂ ile temas etmesi ya da okside olmasıyla hızlı şekilde aktivitelerini kaybetmektedir. Böylece bu reaksiyon sonunda tiyol gruplarını tekrardan redükte eder, glutasyon ise okside olup bunların aktivitesini sağlamaktadır.^{81, 117} Glutasyonun metabolik fonksiyon ve hücrel düzenleyicilerin tümündeki önemli mekanizma –SH –disülfid oranındaki denge değişimidir. Hücre içerisinde tiyol grupları sürekli redükte durumda bulunurlar. Çünkü sistein amino asidi, bir takım enzimatik reaksiyonlar ve CoA'nın protein sentezi için ortamda redükte

şeklinde bulunmalıdırlar. Hücrelerde glutatyonun %95'i GSH ve geriye kalan %5'i ise okside glutatyondur. Bazen hücrenin indirgenme kapasitesi yetersiz olduğundan GSH/GSSG dengesinde değişim azalma yönündedir. Oksidatif stres indikatörü olan intrasellüler GSSG miktarı, hücrel redoks indikatörü olduğunu GSH/GSSG miktarı hücrelerin antioksidatif kapasitesini belirlemede Oksidatif stres ve oluşan patolojik halde ROS'ların glutatyonla bağımlı detoksifikasyonu, reaktif oksijen türleri ile kendiliğinden ya da direkt oluşan reaksiyonlar ve yapısında selenyum bulunduran glutatyon peroksidaz etkisiyle katalizlenen reaksiyonlar şeklinde temel mekanizmalarla gerçekleşmektedir ve bu enzim H₂O₂ ile oluşan diğer peroksitleri indirger ve peroksitleri korur. Bu iki reaksiyon sonunda GSSG meydana gelmektedir.¹¹²

ARDS ve Oksidatif Stres İlişkisi

Akciğer yapısında meydana gelen hasarın oluşmasında reaktif oksijen ve nitrojen türleri rol (ROS/RNS) almaktadır. Bu nedenle süperoksit ve peroksinitrit radikalleri akciğerdeki antioksidan savunma sisteminde azalmaya sebep olması veya oksidan oranının artışı antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalmasında etken rol oynamaktadır. Böylece akciğerde oluşan oksidan artışı antioksidan savunma sistemi enzimleriyle baskılanmakta veya etkisi azaltılmaktadır.⁹

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deneyde Kullanılan Cihazlar

Soğutmalı santrifüj	: Hettich Universal R 320
UV-visible spektrofotometre	: BIO-TEK EPOCH, GEN 5 Yazılımı ile birlikte
pH metre	: OHAUS Starter 3100 pH Metre
Hassas terazi	: Denver Instrument TP-303
Derin dondurucu	: Sanyo MDF - 235
Manyetik karıştırıcılar	: Heidolph Hei-Standard
Otomatik pipetler	: Eppendorf Research Pipette set 1 ve set 2
Buzdolabı	: Vestel tek kapılı buzdolabı
Distile su cihazı	: GFL 2012/4
Çalkalayıcı su banyosu	: GFL 1083
Homojenizatör	: Qiagen Tissuelyser LT
Vorteks	: Heidolph Standard ve IKA MS-3 Digital

3.2. Deney Materyalinin Temini ve Etken Maddenin İzolasyonu

3.2.1. Meyvenin Toplanması ve Teşhisi

Maclura pomifera (Yalancı Portakal) Prof.Dr. Ergin HAMZAOĞLU ve Dr. Murat KOÇ tarafından Ankara Üniversitesi kampüs alanından 15.10.2010 tarihinde toplanmıştır.

Toplanan meyvelerin türünün teşhisi için örneklerde uluslararası teşhis yöntemi kullanılmış olup yine aynı araştırmacılar tarafından örnekler doğrulanmıştır. Toplanan meyvelerden ve bitki örneklerinden alınan materyaller M.Koç 1292 kodu verilerek Bozok Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumunda (Yozgat) saklanmıştır.

3.2.2. Pomiferin İzolasyonu ve Yapısal Doğrulaması

Bu araştırmada pomiferin, Prof.Dr. Ahmet ÇAKIR tarafından kromatografik yöntemler kullanılarak *Maclura pomifera* meyvelerinden izole edilmiştir ve izoflavonoid yapıda olan bu maddenin yapısal doğrulaması için UV-Görünür Bölge, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 1D ve 2D NMR spektroskopik yöntemler kullanılmıştır.

Meyveler önce büyük parçalara bölünerek kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan meyveler daha küçük parçalara ayrıldıktan sonra oda koşullarında 5 defa etil asetat ile mesara edilmiş ve bu ekstraksiyon işlemi ile 114 gram elde edilmiştir. Kromatografik çalışmalarda kolon kromatografisi için silika jel (Kiesel gel 60, 70-230 mesh, Merck) sabit faz materyali, ince tabaka kromatografisi (İTK) için ise silika jel (Hazır plak, Kieselgel 60 F254, 0.2 mm, Merck, 5554) kullanılmıştır. Bu işlemden 25 gr ekstre alınarak silika jel kolon kromatografisinde fraksiyonlanmıştır. Bu işlemden toplam her biri 5'er gr olan MP-1 ve MP-2 olarak kodlanan iki izole majör madde elde edilmiştir. İTK'da izole edilen moleküllere ait lekeler UV254 ve UV366 nm ışık dalga boyuna sahip UV lambasında belirlenmiştir. Kolon kromatografisi yönteminde kullanılmak üzere süspansiyon silika jel (70-230 mesh)'den daha önce hazırlanan 250 gr ekstreten 25 gr alınarak yeteri kadar sıcak kloroform-etil asetat (8:2) 'da zldkten sonra hareketli faz sistemi ile 2,5 x 70 cm boyutundaki bir kolona doldurulmuştur. Elsyonun devamlılığı kloroform-etil asetat (8:2) hareketli faz ile sağlanarak 50 ml hacimler şeklinde fraksiyonlar toplanmıştır. Devamında İTK ile kloroform-etil asetat (8:2) sistemi kullanılarak kontrol edilmiştir ve fraksiyonların saflığı belirlenmiştir. Yapılan analizle saflıkları belirlenen madde fraksiyonları ayrı ayrı toplandıktan sonra çözücüleri uzaklaştırılarak 5'er gr miktarda saf 2 madde MP-1 ve MP-2 şeklinde kodlanmıştır.

Bu maddelerin kimyasal yapıları IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT ¹³C-NMR, ¹H,¹H-COSY, HMQC ve HMBC spektroskopik yöntemleri ile sırasıyla osajin (MP-1) ve pomiferin (MP-2) olarak aydınlatılmıştır.

3.3. Deney Hayvanlarının Temini

Bu çalışma, Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından 02.09.2015 tarihli, 159 sayılı yazıda belirtilen 133 karar nolu izni ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 200-250 gram ağırlıkta Wistar ırkı erkek ratlar kullanılmıştır. Deney hayvanları, Atatürk Üniversitesi, Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarlarından temin edilmiş ve deneyler aynı merkezde gerçekleştirilmiştir. Hayvanlar deneye alınmadan önce gruplara ayrılmış, standart şartlar altında muhafaza edilmiş ve beslenmiştir.

3.3. Ratlarda Oleik Asit Uygulaması ile Deneysel ARDS Oluşturulması

3.3.1. ARDS Modeli

Bu çalışmada oleik asit ile uyarılan akciğer akut hasarı üzerine *Maclura pomifera* bitkisinden elde edilen pomiferin maddesinin etkilerini araştırmıştır. Deneyde uygulanan model Erol ve ark.⁹ tarafından tarif edilen şekilde gerçekleştirildi. Uygulamalar süresince ratlar oda sıcaklığında (22°C±1) ve % 40-50 sabit nem oranında, havalandırma sistemine sahip bir odada bekletildi. Işık periyodu ise 12 saat gündüz ve 12 saat gece olacak şekilde ayarlandı. Standart rat kafeslerinde optimal şartlarda taze çeşme suyu ve ad libitum standart pellet yem verildi. Deney günü tüm uygulamalar aynı gün ve eşit zamanlama ile yapıldı. Deneyde uygulanan POM dozunun belirlenmesinde daha önce yapılan çalışmalar incelenerek tahmini etkin doz aralığı belirlendi.^{118, 119} Uygulama aşağıda özetlenen şekile gerçekleştirildi.

- a. Sağlıklı grubu: Oleik asitin meydana getirdiği değişiklikleri sağlıklı dokularla mukayese edebilmek için sadece intravenöz yolla 300 µl izotonik uygulanan grup,

- b. Kontrol grubu: Bu gruba akciğer hasarı oluşturulması amacıyla 250 µl %1'lik BSA içinde çözülen 50 µl OA (OA+BSA) kuyruk veninden intravenöz yolla uygulanan grup,
- c. POM-150: 1 ml distile su içinde hazırlanmış oral yolla 150 mg/kg dozda pomiferin + intravenöz yolla 250 µl %1'lik BSA içinde çözülen 50 µl OA (OA+BSA) verilen grup,
- d. POM-300: 1 ml distile su içinde hazırlanmış oral yolla 300 mg/kg dozda pomiferin + intravenöz yolla 250 µl %1'lik BSA içinde çözülen 50 µl OA (OA+BSA) verilen grup.

Akciğer hasarı oluşturmak için kullanılan OA (cis-9-octadecenoic acid Sigma-Aldrich Germany) ratlara kuyruk veninden (v.caudalis) 25G iğne ucuna sahip insülin enjektörü kullanılarak, 50 µl OA 250 µl %1'lik BSA (Bovine Serum Albumin – Sigma Aldrich Germany) solüsyonu içinde çözümlenerek verildi. 24 saat sonra ratlara sevofluran anestezisi uygulandıktan sonra servikal dislokasyon yöntemi uygulanarak ötanazi edildi.

3.4. Akciğer Dokusunun Biyokimyasal İncelenmesi

Akciğer dokuları çıkarılıp biyokimyasal incelemeler içinse petri kaplarına kodlanarak koyuldu. Biyokimya incelemesinde kullanılacak dokular -20°C'de derin dondurucuda (BEKO) dondurulduktan sonra sıvı azot kullanılarak homojenize edildi ve dokular -80 °C derin dondurucu (SANYO MDF-235) içerisinde deneylerin yapılmasına kadar saklandı.

3.4.1. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler, Hazırlanışları ve Ölçümleri

3.4.1.1. Lipid Peroksidasyon Seviyesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler ve Ölçümü

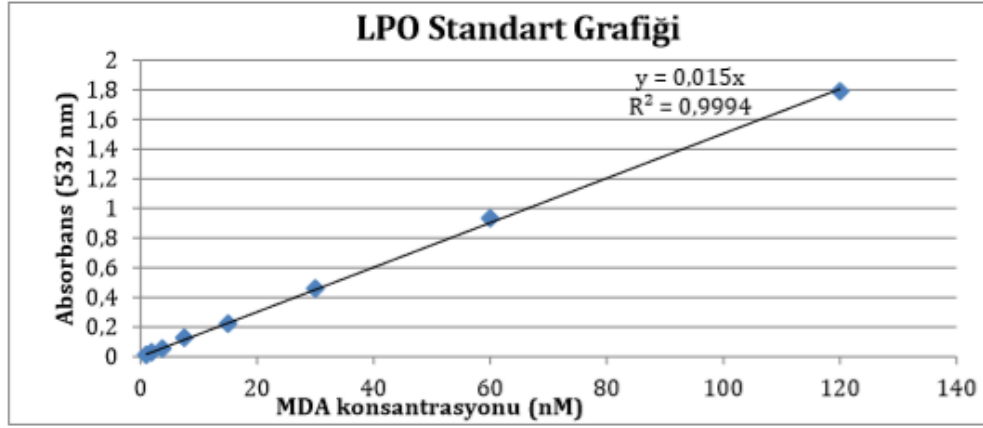
1. LPO Homojenat Tamponu (% 10 KCl): 10 g KCl alınarak bir miktar saf suda çözülmüş ve hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

2. LPO Ölçüm Karışımı:

- a) % 8 Sodyum dodesil sülfat (SDS): 0.8 g SDS alınıp bir miktar saf suda çözülmüş ve hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.
- b) % 0.08 Tiyobarbitürik (TBA): 0.48 g TBA alınarak 1-2 damla 1 M NaOH çözeltisi ilavesi ile bir miktar saf suda çözülmüştür. Daha sonra distile su ile hacmi 60 ml'ye tamamlanmıştır.
- c) % 20 Asetik asit: 13 ml %100'lük glasiyel asetik asit alınmış, üzerine 65 ml saf su eklenmiştir.

Ölçüm prensibi ve ölçüm: Hücre zarında serbest radikallerin meydana getirdiği LPO'nun son ürünlerinden olan MDA seviyesini belirlemek için kullanılan yöntemlerin çoğu MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile verdiği reaksiyon temel olarak kullanılmaktadır. Bir molekül MDA iki molekül TBA ile stabil kırmızı renk oluşturmak üzere reaksiyona girmektedir. LPO ölçümü, Ohkawa ve ark.¹²⁰ metoduna göre MDA'in asidik ortamda TBA ile oluşturduğu rengin 532 nm'de ölçülmesi prensibine dayanarak yapılmıştır.

Ölçümü ise 0.025 gr dokunun üzerine homojenize etmek için 1.5 ml %10 KCl eklenir. Bu homojenatlar, 5000 gr 4°C'de 20 dk. santrifüj edilmiş ve oluşan bu süpernatant kısımlar LPO değerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Kapaklı deney tüpleri içerisine 250 µl homojenat, 100 µl % 8 sodyum dodesil sülfat (SDS), 750 µl % 20 asetik asit, 750 µl % 0.08 TBA ve 150 µl distile su pipetlenerek vortekslenmiştir. Karışım 100°C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra üzerine 2.5 ml n-bütanol ilave edilmiş ve ölçüm alınmıştır.



Şekil 3.1. MDA miktarının hesaplanmasında kullanılan standart grafik

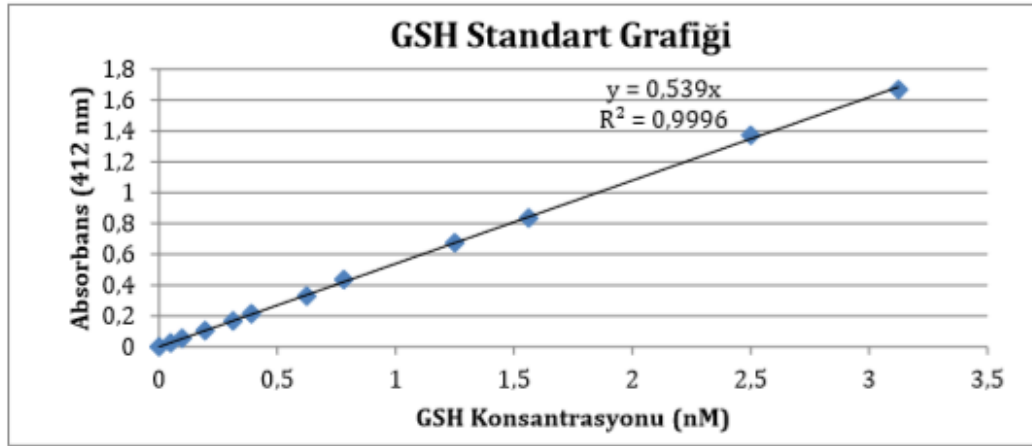
Miktarın hesaplanması: Meydana gelen kırmızı rengin absorbansları 96 kuyulu kuartz plate kullanılarak 532 nm’de okunmuştur ve önceden hazırlanmış seyretme katsayısı dikkate alınarak MDA stok çözeltisi kullanılarak oluşturulan grafikten yararlanarak hesaplamalar yapılmıştır (Şekil 3.1). Numunelerin LPO miktarları, nmol MDA/g doku olarak tarif edilmiştir. Her bir faktörün etkisi 3 tekrar yapılarak verilmiştir.

Glutasyon Seviyesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler ve Ölçümü

1. GSH Homojenat Tamponu (50 mM, pH 7.4, Tris-HCl Tamponu): 1.514 g Tris-HCl 200 ml saf suda çözülmüş, pH’sı bir pH metre kullanılarak 7.4’e ayarlanmış ve sonra hacmi saf su ile 250 ml ye tamamlanmıştır.
2. GSH Ölçüm Tamponu (0.2 mM EDTA, 200 mM pH 8.2 içeren Tris-HCl Tamponu): 6.05 g Tris-HCl ve 0.0146 g EDTA alınarak 200 ml saf suda çözülmüş, pH’sı bir pH metre kullanılarak 8.2’ye ayarlanmış ve sonra hacmi saf su ile 250 ml ye tamamlanmıştır.
3. GSH Miktarını Ölçmek İçin Gereken Çözelti (10 mM DTNB (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid))): 0.03963 g DTNB alınmış ve bir miktar metil alkolde çözülerek hacmi yine metil alkol ile 10 ml ye tamamlanmıştır.

Ölçüm prensibi: Oluşan sarımsı renk spektrofotometre aracılığıyla 412 nm de ölçülmektedir. Ortamda bulunan disülfid kromojen olan DTNB [5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)], çok kolay şekilde sülfhidril gruplu bileşikler aracılığıyla indirgenmektedir.

Ölçümü ise Sedlak ve Lindsay'in¹²¹ geliştirdiği yöntem esas alınarak gerçekleştirilmiştir. 0.025 gr dokuyu homojenize etmek için üzerine 1.5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) eklenmektedir. Oluşturulan bu homojenatlar, 12.000 gr 4°C'de 10 dk santrifüj edilmiş bu süpernatant kısımlar GSH değerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Kapaklı deney tüpleri içerisine ölçüm tamponundan (pH = 8.2, 200 mM Tris-HCl içeriğinde 0.2 mM EDTA) 1500 µl, 500 µl süpernatant, 100 µl DTNB ve 7900 µl metanol pipetleme yapılarak vortekslenmiştir. Karışım 30 dk 37°C'de inkübasyona bırakılmış ve sonuç olarak ölçümleri yapılmıştır.



Şekil 3.2. GSH miktarının hesaplanmasında kullanılan standart grafik

Miktarın hesaplanması: Meydana gelen sarı rengin 96 kuyulu kuartz plate kullanılarak 412 nm'de absorbansları okunmuştur. Önceden hazırlanan seyreltme katsayıları dikkate alınmış stok GSH çözeltisiyle oluşturulan standart grafiğine (Şekil 3.2) bakılarak hesaplamalar yapılmıştır. Numuneler nmol/mg doku şeklinde GSH miktarları gösterilmektedir. Faktörlerin her birinin tesiri 3 kez tekrar yapılarak belirlenmiştir.

Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler ve

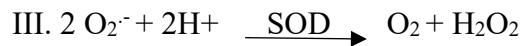
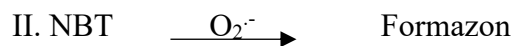
Ölçümü

1. SOD Homojenat Tamponu (10 mM EDTA içeren Fosfat Tamponu, 50 mM pH 7.8): 1.7 g KH_2PO_4 ve 0.73 g EDTA alınarak 200 ml saf suda çözülmüş, pH'sı bir pH metre kullanılarak 7.8'e ayarlanmış ve sonra hacmi saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
2. SOD Ölçüm Karışımı:
 - a) 0.3 mM Ksantin: 0.0018 g Ksantin alınarak bir miktar saf suda çözülmüş ve hacmi saf su ile 40 ml'ye tamamlanmıştır.
 - b) 0.6 mM EDTA: 0.0035 g EDTA alınmış, bir miktar saf suda çözülmüş ve hacmi saf su ile 20 ml'ye tamamlanmıştır (2 damla 5 M NaOH ile çözünmektedir).
 - c) 150 μM NBT (Nitro blue tetrazolium): 0.0024 g NBT (Nitroblue tetrazolium) alınarak bir miktar saf suda çözülmüş ve hacmi saf su ile 20 ml'ye tamamlanmıştır.
 - d) 0.4 M Na_2CO_3 : 0.5088 g alınarak bir miktar saf suda çözülmüş ve hacmi saf su ile 12 ml'ye tamamlanmıştır.
 - e) 1.2 g / L BSA (Bovine Serum Albumine): 0.0061 g tartılmış, bir miktar saf suda çözülmüş ve hacmi saf su ile 6 ml'ye tamamlanmıştır.
3. SOD Enziminin Aktivitesini Ölçmek İçin Gereken Çözelti (167 U/L Ksantin oksidaz):
 - a) Orijinal ambalajından (1 ml sinde 32 mg protein ve 0.3 U enzim ihtiva eden enzim) 34.79 μl alınmış ve üzerine 2 ml soğuk 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çözeltisi eklenmiştir.

- b) 2 M (NH₄)₂SO₄: 0.7928 g (NH₄)₂SO₄ alınmış, bir miktar saf suda çözülmüş ve hacmi saf su ile 3 ml ye tamamlanmıştır. Bu çözelti her seferinde taze olarak hazırlanmış ve +4°C’de saklanarak soğuk olarak kullanılmıştır.
- c) 0.8 mM CuCl₂: 0.0108 g CuCl₂ alınmış, bir miktar saf suda çözülmüş ve hacmi saf su ile 100 ml ye tamamlanmıştır.

Ölçüm prensibi: Ksantin oksidaz (XO) enzimi ksantini ürik asite dönüştürürken ortamda oluşan süperoksin radikalleri, eğer ortamda NBT (nitro blue tetrazolium) bulunuyorsa, NBT ile reaksiyona girerek formazon boyası meydana getirmektedir. Oluşan bu bileşik 560 nm’de ölçülmekte ve maksimum absorbans vermektedir. Ortamda eger SOD enzimi bulunuyorsa süperoksit radikalleri bu enzim tarafından hidrojen peroksida (H₂O₂) dönüştürüldüğü için formazon oluşumunda azalma meydana gelecektir ve 560 nm’de ölçülen absorbans azalacaktır.

Absorbanstaki azalmanın miktarı SOD aktivitesini vermektedir. Özetle; SOD aktivitesi aşağıda verilen II nolu reaksiyonun inhibe edilme derecesiyle ölçülebilmektedir.



Ölçüm ise SOD aktivitesi Sun ve ark.¹⁰⁹ tarafından tarif edilen yöntemle ölçülmüştür. Akciğer dokuları homojenize edildikten sonra 18.000 g’de 1 saat santrifüj edilmiştir. Deney tüpüne 980 µl ölçüm karışımı (0.3 mM ksantin, 0.6 mM EDTA, 150 µM NBT, 0.4 M Na₂CO₃, 1.2 g/L BSA), 200 µl supernatant, 20 µl XO eklendikten sonra karıştırılarak yaklaşık 20 dakika inkübasyon bırakılmış ve 400 µl 0.8 mM CuCl₂ ilave edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır.

Aktivitenin hesaplanması: Meydana gelen formazon değeri 96 kuartz plate kullanılarak 560 nm’de okunmuştur. Dikkate alınan seyreltme katsayıları aşağıdaki geliştirilen formülden aktivite değerleri (EÜ) elde edilmiş ve SOD aktivitesi mmol/dakika/mg doku olarak tarif edilmiştir. Her bir faktörün etkisi 3 tekrar yapılarak verilmiştir.

$$\text{EU/mg doku} = \frac{\Delta\text{Akör} - \Delta\text{Anumune}}{\Delta\text{Akör}}$$

Katalaz Aktivitesini Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler ve Ölçümü

1. KAT Homojenat Tamponu (50 mM pH 7.8, %1 Triton X-100 içeren Fosfat Tamponu): 1.7 g KH_2PO_4 ve 2.5 ml Triton X-100 alınarak 200 ml saf suda çözülmüş, pH’sı bir pH metre kullanılarak 7.8’e ayarlanmış ve sonra hacmi saf su ile 250 ml’ye tamamlanmıştır.

2. KAT Ölçüm Karışımı (40 mM, pH 7’de H_2O_2 içeren 50 mM Fosfat Tamponu): 1020 μl H_2O_2 ve 1.7 g KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, pH’sı bir pH metre kullanılarak 7.0’a ayarlanmış ve sonra hacmi 250 ml’ye tamamlanmıştır.

Ölçüm Prensipleri: Meydana gelen aktivite, ortamındaki hidrojen peroksitin (H_2O_2) KAT vasıtasıyla suya dönüşümü sağlanırken oluşan absorbans azalmasının 240 nm’de ölçüm yapılmaktadır. Ölçüm ise KAT’ın aktivitesi Aebi’nin¹²² belirttiği metoda göre gerçekleştirilmiştir. 0.025 gr dokuyu homojenize etmek için üzerine 1.5 ml 50 mM K-fosfat tamponu (pH 7) eklenmektedir. Oluşan homojenat 10.000 g’de 4°C’de 60 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar katalaz aktivitesi ölçümünde enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Kuartz plate içerisine H_2O_2 çözeltisinden 100 μl konularak numune çözeltisinden 200 μl ilave edildiği anda kronometre çalıştırılmıştır. Kuartz plate, okuyucuda 240 nm dalga boyunda 15 saniye aralıkla 3 dakika süreyle ölçülerek absorbans azalması köre karşı kaydedilmiştir.

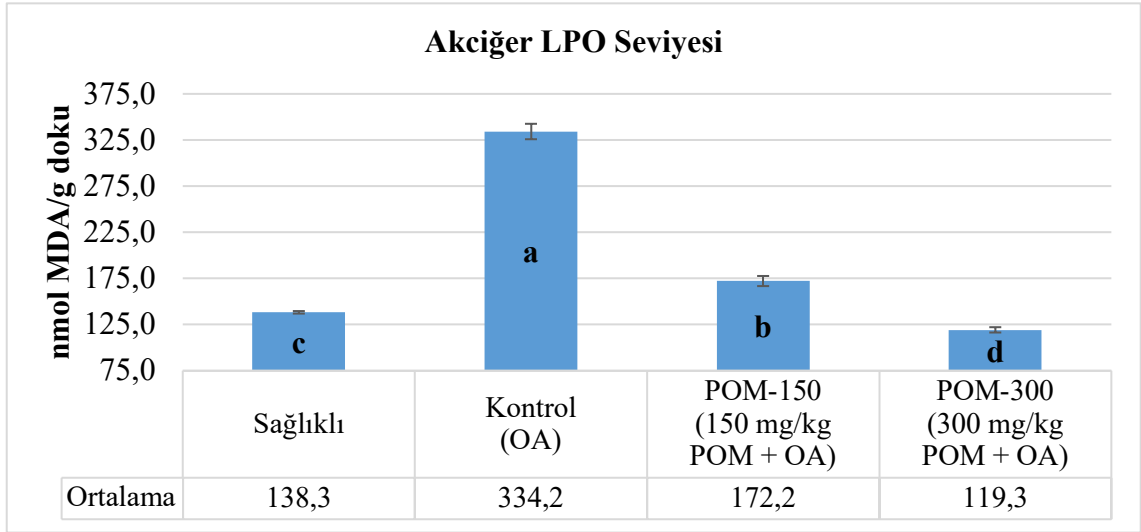
Aktivitenin hesaplanması: Ölçümler, lineer olarak absorbans azalması olan aralıkta dakika başına absorbans azalması olarak hesaplanmıştır. Işık yolu (b)= 10mm, azalma katsayısı ($\epsilon_{H_2O_2}$), 0.00394 ($mmol^{-1} \times mm^{-1}$) alınarak $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ formülünden 240 nm’de, dakikada 1 mmol H_2O_2 ’in harcanmasını sağlayan enzim miktarı (=EÜ) hesaplanmıştır. Formülde seyreltme faktörleri dikkate alınmış, 25 mg doku için $mmol/min = 60/25 \times A/0.00394$ şeklinde oluşturulan formülde bütün aktiviteler yerine konularak absorbans değerlerinden hesaplanmıştır. KAT aktivitesi, $\mu mol/dakika/mg$ doku olarak tarif edilmiştir. Deneyle 3 paralel tekrar halinde yapılmıştır.

3.5. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler IBM SPSS 20.0 yazılım programı kullanılarak yapılmıştır. Bütün ölçümlerde istatistiksel farklılıklar ve önem seviyeleri “One-way Analysis of Variance (ANOVA)” testi ile belirlenmiş ve $p < 0.05$ seviyesindeki sonuçlar önemli kabul edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalarda Duncan testi uygulanmıştır.

4. BULGULAR

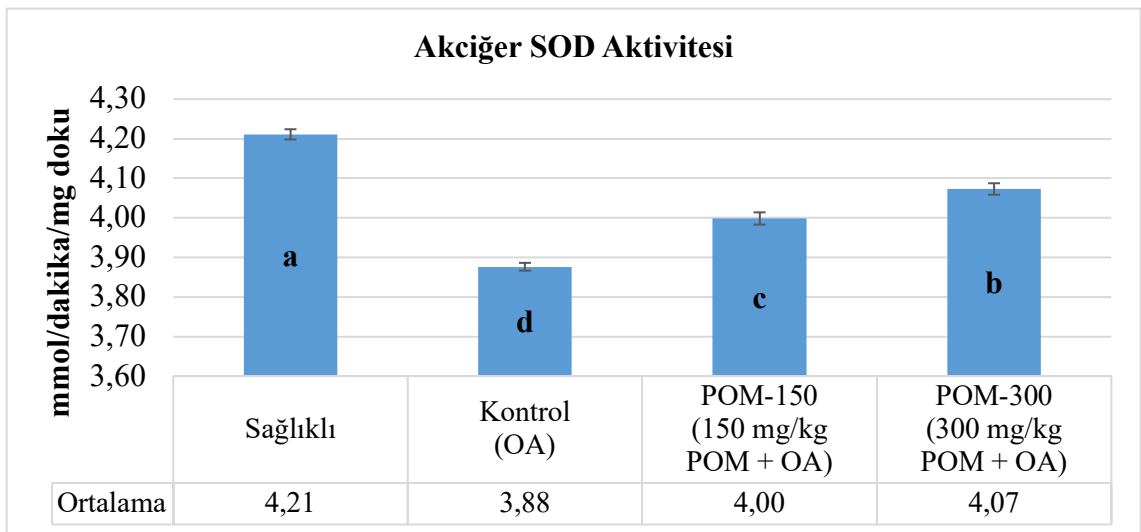
4.1. Doku LPO Seviyesi



Şekil 4.1. Doku LPO seviyesi

Akciğer dokusuna ait LPO seviyeleri Şekil 4.1’de verilmiştir. Sağlıklı grup ile kıyaslandığında OA uygulamasının LPO seviyesini önemli seviyede arttırdığı gözlenmiştir ($P<0.05$). Tedavi olarak uygulanan POM’un doza bağlı olarak akciğer dokusunda artan bu LPO seviyesini azalttığı belirlenmiştir ($P<0.05$).

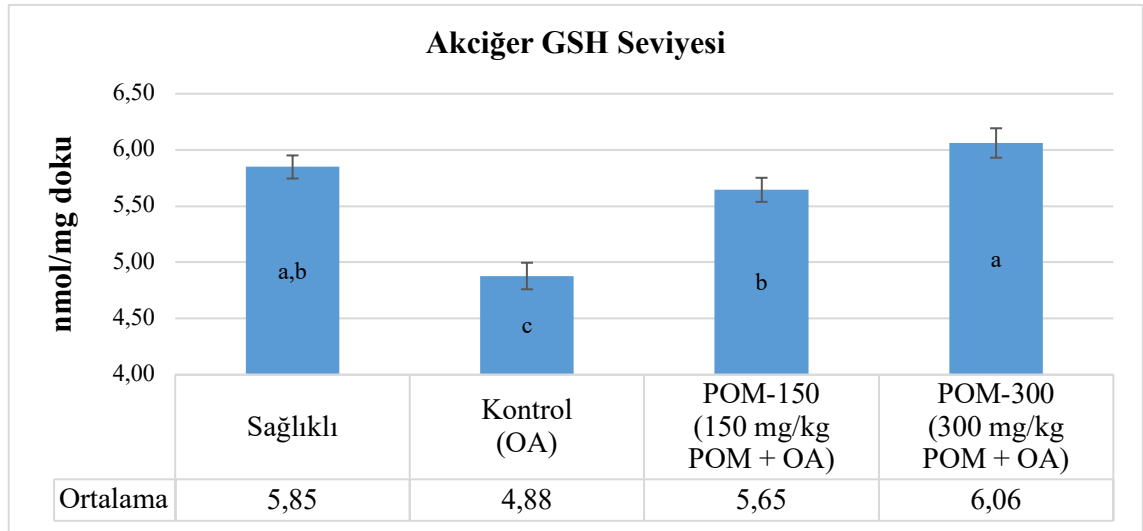
4.2. Doku SOD Aktivitesi



Şekil 4.2. Doku SOD aktivitesi

Akciğer dokusuna ait SOD aktiviteleri Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Sağlıklı grup ile kıyaslandığında OA uygulaması kontrol grubunda SOD aktivitesini önemli seviyede inhibe etmiştir ($P<0.05$). Tedavi için uygulanan POM ise doza bağlı olarak akciğer dokusu SOD aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırmıştır ($P<0.05$).

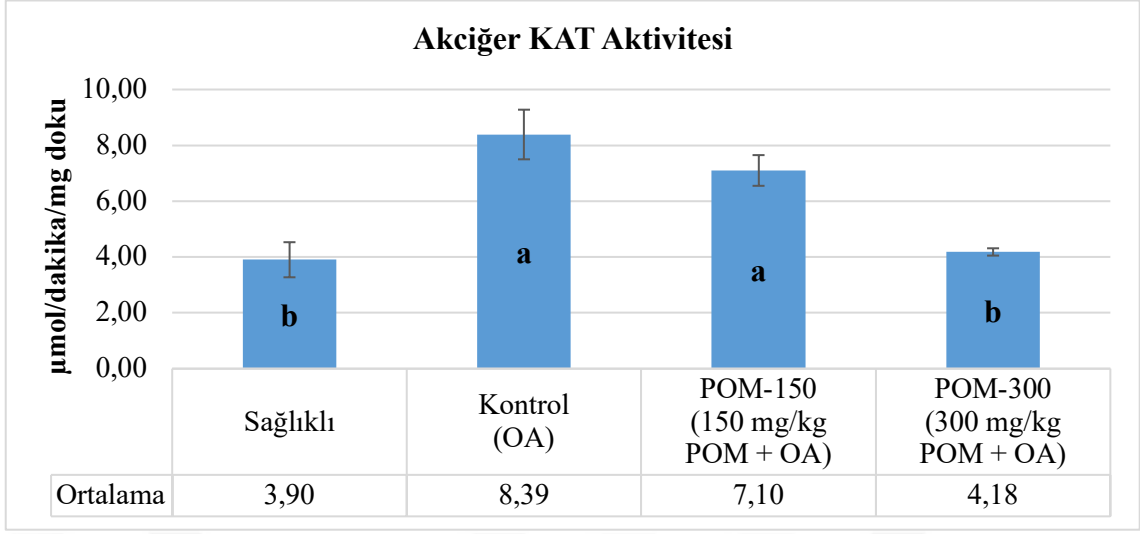
4.3. Doku GSH Seviyesi



Şekil 4.3. Doku GSH seviyesi

Akciğer dokusu GSH seviyeleri Şekil 4.3’de verilmiştir. Sağlıklı grup ile kıyaslandığında OA uygulanan kontrol grubu GSH seviyesi önemli seviyede azalmıştır ($P<0.05$). Tedavi olarak uygulanan POM ise akciğer dokusu GSH seviyesini doza bağlı şekilde önemli oranda arttırmıştır ($P<0.05$).

4.4. Doku KAT Aktivitesi



Şekil 4.4. Doku KAT seviyesi

Akciğer dokusu KAT aktivitesi Şekil 4.4’de gösterilmiştir. Sağlıklı grup ile kıyaslandığında OA uygulanan kontrol grubunda KAT aktivitesinin önemli seviyede yükseldiği belirlenmiştir ($P<0.05$). Tedavi olarak uygulanan POM ise 150 mg/kg dozda artan bu aktiviteye önemli etkisi tespit edilemese de ($P>0.05$) 300 mg/kg dozda artan bu aktiviteyi belirgin bir şekilde azalttığı gözlenmiştir ($P<0.05$).

5. TARTIŞMA

Akut Respiratuar Distres Sendromu (ARDS) akut gelişen hipoksemi, akciğer ödemi, yaygın damar endotel hasarı, doku arası kanamalar ve ölüm ile sonuçlanabilecek ciddi inflamasyon ile seyreden bir akciğer sendromudur.^{9, 16} Patolojisinde ödem, immün hücre infiltrasyonu, sıvı kaçıışı ve nekroz temelini oluşturan durumlardır. Daha önce yapılan çalışmalarda ARDS patofizyolojisinde ROS oluşumunun doku hasarını önemli oranda arttırdığı, bu nedenle antioksidan sistemin güçlendirilmesinin ARDS tedavisinde doku hasarını azaltabileceği belirtilmektedir.⁹ Bu sebeple çalışmada daha önceki çalışmalarda antioksidan etkinliği belirlenen POM'un ratlarda oleik asit ile indüklenen ARDS modeli üzerine etkileri incelenmiştir.

Maclura pomifera bitkisinin halk dilinde yalancı portakal, at elması, çit elması ve yol elması gibi isim kullanılmaktadır.¹²³ *Maclura pomifera* bitkisinin etil asetat ekstresinin % 36.2 pomiferin ve osajinden oluşmaktadır. Diğer yandan fazladan sahip olduğu –OH grubu ile osajinden farklıdır.¹¹⁸ Pomiferinin kimyasal yapısı açık olarak 3-(3,4-dihidroksifenil) – 5 – hidroksil – 8, 8 – dimetil – 6 - (3-metilbut-2-enil) - 4H, 8H – pirano - [2,3-h] chromen – 4 - one, kapalı formülü ise C₂₅H₂₄O₆ olarak tespit edilmiştir. Moraceae familyasından maclura cinsine ait olan tür ismi *Maclura pomifera* bitkisinin iki izoflavin türevinden biri olan pomiferin maddesinin yapılan çalışmalarda antienflamatuar, antitümoral ve antidepresan ve antimikrobiyal özellikleri belirlenmiştir.^{63, 66}

Flavonoid yapısında olan pomiferinin güçlü antioksidan etkisinin yanı sıra bu grup moleküllerin daha önceki çalışmalarda tespit edilen fosfolipaz A₂ inhibisyonunununa neden oldukları da bildirilmektedir.^{124, 125} Kalp ve böbrek iskemileri üzerine antioksidan sistemi güçlendirerek iyi etkilerinin olduğu belirlenmiştir.^{124, 126}

ARDS sendromunda şekillenen inflamasyon süreci sırasında immün hücreler tarafından salgılanan mediyatörler redoks sisteminde bir dengesizliğe sebep olarak oksidatif stresi meydana getirir. Akciğer dokusu bu oksidatif stresi oluşturan ROS'lere karşı GSH, tokoferoller, askorbik asit, retinol gibi antioksidan moleküller yanı sıra SOD, KAT, GSH-Px ve GR gibi çeşitli antioksidan enzimleri barındırır. Her ne kadar dokunun sahip olduğu antioksidan sistem bu ajanlara karşı dokuyu savunsa da son çalışmalar artan ROS ve RNS miktarının hastalığın mekanizmasında ve patolojinin gelişmesinde çok önemli bir faktör olduğu bildirmektedir.^{70, 127}

Deneysel olarak OA ile indüklenen akciğer hasarı modeli deney hayvanlarında sıklıkla ARDS üzerine yapılan çalışmalarda bu hastalığın patofizyolojisine en yakın model olarak kullanılmaktadır.¹¹ OA'nın damar içi verilmesi akciğerde ARDS'de gözlenen ağır bir inflamasyonla karakterize bir patoloji gösterir. Özellikle akciğer damar endotellerinde hasara sebep olarak burada oksijen geçişinin sağlandığı akciğer alveoelleri ve kapillar damarlar arasındaki membranda bozulmalar, alveoellerde sıvı birikimi, immün hücre infiltrasyonları, sitokin salınımı ve ROS miktarında aşırı artışa sebep olurlar.⁹

Ayrıca ROS miktarının artması nötrofillerin aktivasyonu ile ilişkilidir ve bu aktivasyon hücrelerin hasar sürecinde süperoksit ve hidroksil radikallerinin üretimine neden olarak gösterilmektedir. Örneğin doku hasar sürecinde zarar gören hücreler tarafından salınan nitrik oksitler peroksinitrit üretimi ile sonuçlanan ROS üretimini aktif hale getirir.¹²⁸ Daha önceki çalışmalar OA'nın intravenöz olarak uygulanması ile akciğer epitel ve endotel yapısının tamamında meydana getirdiği etki sonucunda gaz değişimini durduran plazma proteini ve sıvının birikiminin ortaya çıktığını bildirmiştir.⁶¹

ROS'ler hücre membranlarını oluşturan doymamış yağ asitlerine saldırarak LPO yapısını meydana getirirler ve bu durum membran yapı, geçirgenlik ve dayanıklılığında bozulmaya neden olur.⁹ Bu bozulmalar aynı zamanda hücrenin ölümüne sebebiyet verir

ve hücre ölümü ile LPO seviyeleri arasında paralellik gözlenir. Bu nedenle doku LPO seviyesinin belirlenmesi doku hasar seviyesini gösteren önemli bir parametredir. Daha önceki deneysel çalışmalarda OA uygulamasının ROS ve LPO seviyelerinin önemli oranda arttırdığı bildirilmektedir. Bu konuda Liu ve ark.⁶⁰ tarafından OA uygulanan hayvanlarda akciğer doku ROS seviyesinin, Chen ve ark.¹²⁹ ise serum LPO seviyesinin 30 dakika içerisinde pik seviye ulaştığını bildirirlerken, Yang ve ark.¹³⁰ tarafından gine domuzlarına damar içi uygulanan OA'nın bronkoalvolar sıvıda LPO seviyesinin arttığı tespit edilmiştir. Bulgularda belirlenen doku LPO seviyesinin yükselmesi ROS miktarının arttığını göstermektedir. *Maclura pomifera* bitkisinden elde edilen POM 150 ve 300 mg dozda oral olarak uygulandığında OA uygulamasıyla artan LPO seviyesini doza bağlı olarak önemli oranda azalttığı tespit edilmiştir. Bu molekülün ROS nötralizasyonunda kullanılmak üzere ortama sağladığı antioksidan özelliğini sağlayan sahip olduğu iki adet serbest hidroksil gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir.^{65, 118} Daha önce yapılan çalışmalarda da OA uygulamasının akciğer dokusu ve serumda LPO seviyesini önemli şekilde arttırdığı, antioksidan özellikli lipoik asit, vitamin E ve C uygulamalarının artan bu doku ve serum LPO seviyelerini azalttıkları tespit edilmiştir.^{9, 11} Ayrıca bu çalışmalarda yapılmış olan histopatolojik incelemelerde azalan LPO seviyesiyle paralel doku hasarının da azaldığı gözlenmiştir.

Superoksit dismutaz enzimi süperoksit radikallerini bir substrat olarak kullanarak bu radikalleri dismutaz reaksiyonu gerçekleştirerek hidrojen peroksite dönüştürür. Bu enzimin aktivitesi direkt olarak antioksidan sistem ile ilişkilidir ve süperoksit radikal üretimi ile ilgili bilgi verir. SOD'nin inhibisyonu süperoksit radikalının aniden yükselmesine ve LPO seviyesinin artmasına neden olur.⁶⁰ Deneysel olarak OA'nın intravenöz yolla uygulanması SOD aktivitesinin akciğer dokusu ve plazmada önemli oranda aktivitenin inhibe olmasına neden olur.^{129, 130} Mevcut çalışmada OA

uygulamasının SOD aktivitesini önemli derecede inhibe ettiği tespit edilmişken, tedavi olarak uygulanan POM doza bağlı olarak düşen bu aktiviteyi belirgin şekilde arttırdığı belirlenmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar OA uygulamasının akciğer SOD aktivitesini önemli oranda inhibe ettiğini bildirmiştir.^{9, 12, 99, 131} Diğer yandan Yang ve ark.¹³⁰ OA uygulamasının bronkoalvolar sıvıda SOD aktivitesini arttırdığını bildirmiştir. Bulmuş ve ark.¹¹ ve Korkmaz ve ark.¹³² OA uygulamasıyla serum ve doku SOD aktivitesinin değişmediğini rapor ederken, Türkoğlu ve ark.¹⁵ aynı modelde doku SOD aktivitesinin arttığını ve serum aktivitesinin değişmediğini rapor etmişlerdir. Pandey ve ark.¹⁴ ciddi ölümlere sebep olan ARDS'nin araştırılması için oleik asit modelinin kullanılma nedenini sendromun patofizyolojisinde de gözlenen akciğerde erken eksüdatif fazı meydana getirmesi olarak göstermişlerdir. Bundan dolayı feniramin maleat maddesinin sıçanlarda OA ile oluşturulan ARDS üzerine etkilerini araştırmak için yaptıkları çalışmada antihistaminik etkili olan bu maddenin erken fazda faydalı olduğunu bildirmişlerdir. Zhao ve ark.¹³¹ karaciğer X reseptörünün oleik asit ile oluşturulan ARDS modeli üzerine yaptıkları çalışmada karaciğer X reseptörünün (LXR) ekspresyonu ve aktivitesinin artırılmasının antioksidan savunmayı güçlendirdiği ve inflamatuvar süreci azalttığı rapor edilmiştir.

Hidrojen peroksit ROS'ler ile kıyaslandığında metabolizma ve hücre sağlığı açısından daha az zararlıdır. Fakat konsantrasyonu arttığında hücre yaşamını tehdit eden bir durum meydana gelir. Bu durumun oluşmasını engellemek ve oluşan hidrojen peroksitin bertaraf edilmesini sağlamak amaçlı KAT enzimi ile GSH antioksidan metabolizmada görev yapar. KAT enzimi H₂O₂'i bir substrat olarak suya dönüşümü için direk kullanırken, GSH bunu GR ve GSH-Px enzimleri aracılığıyla suya dönüştürür.¹¹² Çalışmada OA uygulaması ile GSH seviyesi önemli seviyede azalmıştır. Bu durum GSH rejenerasyonunu sağlayan enzimlerin inhibisyonu, GSH'ın bir antioksidan savunma aracı

olarak aşırı kullanımı veya hasar alan dokuda nekroze dokunun artması ile doku genelinde GSH miktarının azalması olarak yorumlanabilir. Daha önce Erol ve ark.⁹ tarafından yapılan bir çalışmada deneysel olarak damariçi OA uygulaması akciğer dokusunda GSH miktarı önemli seviyede düşerken, GSH yenilenme metabolizmasında önemli yeri olan E vitamini verilen grupta diğer tedavi grupları ile kıyaslandığında azalan bu seviyeyi büyük miktarda arttırdığı tespit edilmiştir. Bu durum GSH miktarının azalmasının GSH'ın rejenerasyonunu sağlayan sistemle alakalı olma ihtimalini kuvvetlendirmiştir. Mevcut çalışmaya paralel olarak daha önceki çalışmalarda da akciğer KAT aktivitesinin OA uygulamasıyla hem serum hem akciğer dokusunda belirgin şekilde inhibe olduğu tespit edilmiştir.^{9, 11}

Daha önceki çalışmalarda ARDS'de meydana gelen hasardan sorumlu olan inflamasyon sürecinin hastalık sırasında artan ROS ve oksidatif stresin daha da şiddetlendiği ve dokuda kalıcı hasarı arttırdığı bildirilmiştir.^{9, 133}

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, tüm elde edilen veriler değerlendirildiğinde;

1- Oleik asit uygulaması akciğer dokusunda önemli seviyede oksidatif stres oluşturarak antioksidan metabolizmada belirgin bozulmalara neden olmaktadır. LPO sonuçları göz önüne alındığında, ARDS'de meydana gelen hücresel hasarda sendromun sürecinde ROS ve oksidatif stresin önemli bir etkisi olduğu düşünülmektedir.

2- *Maclura pomifera* bitkisinden elde edilen POM antioksidan sistemde meydana gelen bozulmalarda belirgin düzelmeler meydana getirmiştir. POM uygulaması ile düşen LPO seviyeleri azalan hücresel ve doku hasarının olduğunu düşündürmektedir.

Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde;

1- ARDS'de hücresel hasarın oluşmasında ROS'ler önemli rol oynadığından mevcut tedavilere ek olarak antioksidan tedavilerin de uygulanması faydalı olabilir.

2- POM, oksidatif stres ve ROS'lerin rol oynadığı patolojik durumlarda antioksidan sistemi güçlendirmek için kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Ünal N. Akut akciğer hasarı/akut respiratuar distres sendromunda (ALI/ARDS) patogenezi/patofizyoloji ve mekanik ventilasyon ile ilişkili akciğer hasarı (VALI). *Yoğun Bakım Dergisi*, 2002, 1: 6-21.
2. Kox W. The physiological basis of ventilatory and respiratory support. In: Kox, w., Bilhari, D., *Shock and the Adult Respiratory Distress Syndrome*, London, Springer, 1989: 139-152.
3. Bellingan G. The pulmonary physician in critical care* 6: The pathogenesis of ALI/ARDS. *Thorax*, 2002, 57: 540-546.
4. Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G, Brazzi L, Pimentel J, Lewandowski K, Bion J, Romand J-A, Villar J, Thorsteinsson A. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. *Intensive Care Medicine*, 2004, 30: 51-61.
5. Gattinoni L, Pelosi P, Suter PM, Pedoto A, Vercesi P, Lissoni A. Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary disease: different syndromes? *American journal of respiratory and critical care medicine*, 1998, 158: 3-11.
6. Hamman RF, Good JT, Benson KN, Baird M, Eberle DJ, Petty TL, Hyers TM. Adult respiratory distress syndrome: risk with common predispositions. *Annals of Internal Medicine*, 1983, 98: 593-597.
7. Raijmakers P, Groeneveld A, Rauwerda JA, Teule G, Hack CE. Acute lung injury after aortic surgery: the relation between lung and leg microvascular permeability to ¹¹¹indium-labelled transferrin and circulating mediators. *Thorax*, 1997, 52: 866.
8. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2008, 295: L379-L399.

9. Erol N, Saglam L, Saglam YS, Erol HS, Altun S, Aktas MS, Halici MB. The Protection Potential of Antioxidant Vitamins Against Acute Respiratory Distress Syndrome: a Rat Trial. *Inflammation*, 2019, 42: 1585-1594.
10. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The lancet*, 1994, 344: 721-724.
11. Bulmuş FG, Gürsu MF, Muz MH, Yaman İ, Bulmuş Ö, Sakin F. Protective effects of alpha-lipoic acid on oleic acid-induced acute lung injury in rats. *Balkan medical journal*, 2013, 2013: 309-314.
12. Chen S, Zheng S, Liu Z, Tang C, Zhao B, Du J, Jin H. Endogenous sulfur dioxide protects against oleic acid-induced acute lung injury in association with inhibition of oxidative stress in rats. *Laboratory Investigation*, 2015, 95: 142-156.
13. Erdem A, Gedikli E, Yersal N, Karaismailoglu S, Muftuoglu S, Fadillioglu E, Tuncer M. Protective role of erdosteine pretreatment on oleic acid-induced acute lung injury. *Journal of Surgical Research*, 2017, 213: 234-242.
14. Pandey R, Singh D, Singh R, Deshpande SB. Pheniramine maleate attenuates oleic acid-induced acute respiratory distress syndrome in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2017, 55: 351-356.
15. Türkoğlu S, Muz MH, Özercan R, Gürsu MF, Kırkıl G. Effects of lycopene on the model of oleic acid-induced acute lung injury. *Tüberküloz ve Toraks*, 2012, 60: 101-107.
16. Force TA. Acute respiratory distress syndrome. *JAMA*, 2012, 307: 2526-2533.
17. Yurdakul AS, Atilla Ş, Yikilmazoğlu EÜ, Yılmaz L. Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu. *Solunum Hastalıkları*, 2002, 13: 142-152.
18. Johnson ER, Matthay MA. Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 2010, 23: 243-252.

19. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*, 1997, 112: 235-244.
20. Fulkerson WJ, MacIntyre N, Stamler J, Crapo JD. Pathogenesis and treatment of the adult respiratory distress syndrome. *Archives of Internal Medicine*, 1996, 156: 29-38.
21. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *New England Journal of Medicine*, 2000, 342: 1334-1349.
22. Matthay MA, Zimmerman GA. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2005, 33: 319-327.
23. Günther A, Walmrath D, Grimminger F, Seeger W. Pathophysiology of acute lung injury. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 2001, 22: 247-258.
24. Abraham E. Neutrophils and acute lung injury. *Critical Care Medicine*, 2003, 31: S195-S199.
25. Martin TR. Cytokines and lung injury: Searching for useful biomarkers. *Critical Care Medicine*, 2005, 33: 230.
26. Matthay MA, Robriquet L, Fang X. Alveolar epithelium: role in lung fluid balance and acute lung injury. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2005, 2: 206-213.
27. Modelska K, Pittet J-F, Folkesson HG, Courtney Broaddus V, Matthay MA. Acid-induced lung injury: protective effect of anti-interleukin-8 pretreatment on alveolar epithelial barrier function in rabbits. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1999, 160: 1450-1456.
28. Piantadosi CA, Schwartz DA. The acute respiratory distress syndrome. *Annals of Internal Medicine*, 2004, 141: 460-470.
29. Phua J, Badia JR, Adhikari NK, Friedrich JO, Fowler RA, Singh JM, Scales DC, Stather DR, Li A, Jones A. Has mortality from acute respiratory distress syndrome

decreased over time? A systematic review. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2009, 179: 220-227.

30. Tomashefski Jr JF. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clinics in Chest Medicine*, 2000, 21: 435-466.

31. Weinacker AB, Vaszar LT. Acute respiratory distress syndrome: physiology and new management strategies. *Annual Review of Medicine*, 2001, 52: 221-237.

32. Ichikado K, Suga M, Gushima Y, Johkoh T, Iyonaga K, Yokoyama T, Honda O, Shigeto Y, Tomiguchi S, Takahashi M. Hyperoxia-induced diffuse alveolar damage in pigs: correlation between thin-section CT and histopathologic findings. *Radiology*, 2000, 216: 531-538.

33. Stanley MW, Henry-Stanley MJ, Gajl-Peczalska KJ, Bitterman PB. Hyperplasia of type II pneumocytes in acute lung injury: cytologic findings of sequential bronchoalveolar lavage. *American journal of clinical pathology*, 1992, 97: 669-677.

34. Henke C, Marineili W, Jessurun J, Fox J, Harms D, Peterson M, Chiang L, Doran P. Macrophage production of basic fibroblast growth factor in the fibroproliferative disorder of alveolar fibrosis after lung injury. *The American journal of pathology*, 1993, 143: 1189.

35. Madtes DK, Rubenfeld G, Klima LD, Milberg JA, Steinberg KP, Martin TR, Raghu G, Hudson LD, Clark JG. Elevated transforming growth factor- α levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1998, 158: 424-430.

36. Fukuda Y, Ishizaki M, Masuda Y, Kimura G, Kawanami O, Masugi Y. The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. *The American journal of pathology*, 1987, 126: 171.

37. Takahashi T, Takahashi Y, Nio M. Remodeling of the alveolar structure in the paraquat lung of humans: a morphometric study. *Human Pathology*, 1994, 25: 702-708.
38. Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV, Fishback N, Koss MN, Liotta LA, Ferrans VJ, Travis WD. Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *The American journal of pathology*, 1996, 149: 1241.
39. Rozin G, Gomes M, Parra E, Kairalla RA, De Carvalho C, Capelozzi VL. Collagen and elastic system in the remodelling process of major types of idiopathic interstitial pneumonias (IIP). *Histopathology*, 2005, 46: 413-421.
40. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 1994, 149: 818-824.
41. Gullo A. *Anaesthesia, Pain, Intensive Care and Emergency (APICE)*. Baski. Springer, 2008.
42. Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 1995, 151: 293-301.
43. Turner JS, Smith G, Theunissen D. Prone position for ventilation in patients with severe adult respiratory distress syndrome. *South African medical journal= Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde*, 1994, 84: 803-806.
44. Guerin C, Badet M, Rosselli S, Heyer L, Sab J-M, Langevin B, Philit F, Fournier G, Robert D. Effects of prone position on alveolar recruitment and oxygenation in acute lung injury. *Intensive Care Medicine*, 1999, 25: 1222-1230.

45. Schuster D. The case for and against fluid restriction and occlusion pressure reduction in adult respiratory distress syndrome. *New horizons (Baltimore, Md.)*, 1993, 1: 478-488.
46. Cerro F, Benitez M, Blackburn G. Applied nutrition in ICU patients. A consensus statement of the American College of Chest Physicians (ACCP). *Chest III*, 1997, 769.
47. Meduri GU, Headley AS, Golden E, Carson SJ, Umberger RA, Kelso T, Tolley EA. Effect of prolonged methylprednisolone therapy in unresolving acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA*, 1998, 280: 159-165.
48. Meduri GU, Chinn AJ, Leeper KV, Wunderink RG, Tolley E, Winer-Muram HT, Khare V, Eltorok M. Corticosteroid rescue treatment of progressive fibroproliferation in late ARDS: patterns of response and predictors of outcome. *Chest*, 1994, 105: 1516-1527.
49. Luce JM, Montgomery AB, Marks JD, Turner J, Metz CA, Murray JF. Ineffectiveness of high-dose methylprednisolone in preventing parenchymal lung injury and improving mortality in patients with septic shock. *American Review of Respiratory Disease*, 1988, 138: 62-68.
50. Lewis JF, Veldhuizen RA In *The future of surfactant therapy during ALI/ARDS*, Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine, (editör).^(editörler). Copyright© 2006 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New ...: 2006; 377-388.
51. Gilliard N, Richman PM, Merritt TA, Spragg RG. Effect of volume and dose on the pulmonary distribution of exogenous surfactant administered to normal rabbits or to rabbits with oleic acid lung injury. *American Review of Respiratory Disease*, 1990, 141: 743-747.
52. Sokol J, Jacobs SE, Bohn D. Inhaled nitric oxide for acute hypoxic respiratory failure in children and adults: a meta-analysis. *Anesthesia & Analgesia*, 2003, 97: 989-998.

53. Brower RG, Ware LB, Berthiaume Y, Matthay MA. Treatment of ARDS. *Chest*, 2001, 120: 1347-1367.
54. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 1997, 2: 152-159.
55. Schuster DP. ARDS: clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1994, 149: 245-260.
56. Weiner RE, Sasso DE, Gionfriddo MA, Thrall RS, Syrbu S, Smilowitz HM, Vento J. Early detection of oleic acid-induced lung injury in rats using ¹¹¹In-labeled anti-rat intercellular adhesion molecule-1. *Journal of Nuclear Medicine*, 2001, 42: 1109-1115.
57. McGuigan CRM, Mullenix CP, Norlund MLL, Ward MD, Walts MM, Azarow LK. Acute lung injury using oleic acid in the laboratory rat: establishment of a working model and evidence against free radicals in the acute phase. *Current Surgery*, 2003, 60: 412-417.
58. Lang JD, McArdle PJ, O'Reilly PJ, Matalon S. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. *Chest*, 2002, 122: 314S-320S.
59. Koksel O, Cinel I, Tamer L, Cinel L, Ozdulger A, Oral U. N-acetylcysteine inhibits peroxynitrite-mediated damage in oleic acid-induced lung injury. *Critical Care*, 2004, 8: P204.
60. Liu H, Zhang D, Zhao B, Zhao J. Superoxide anion, the main species of ROS in the development of ARDS induced by oleic acid. *Free radical research*, 2004, 38: 1281-1287.
61. Davidson KG, Bersten AD, Barr HA, Dowling KD, Nicholas TE, Doyle IR. Lung function, permeability, and surfactant composition in oleic acid-induced acute lung injury

in rats. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2000, 279: L1091-L1102.

62. Kupeli E, Orhan I, Toker G, Yesilada E. Anti-inflammatory and antinociceptive potential of *Maclura pomifera* (Rafin.) Schneider fruit extracts and its major isoflavonoids, scandenone and auriculasin. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 107: 169-174.

63. Saloua F, Eddine NI, Hedi Z. Chemical composition and profile characteristics of Osage orange *Maclura pomifera* (Rafin.) Schneider seed and seed oil. *Industrial crops and products*, 2009, 29: 1-8.

64. Erol HS. *Maclura pomifera* bitkisinden izole edilen osajin maddesinin ratlarda indometazin ile oluşturulan gastrik hasar üzerine etkilerinin araştırılması. Veterinerlik Biyokimyası. Doktora, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2015.

65. Tsao R, Yang R, Young JC. Antioxidant isoflavones in osage orange, *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2003, 51: 6445-6451.

66. Teixeira DM, da Costa CT. Novel methods to extract flavanones and xanthenes from the root bark of *Maclura pomifera*. *Journal of chromatography A*, 2005, 1062: 175-181.

67. Halliwell B, Gutteridge J. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical journal*, 1984, 219: 1.

68. Buonocore G, Groenendaal F In *Anti-oxidant strategies*, Seminars in Fetal and Neonatal Medicine, (editör).^(editörler). Elsevier: 2007; 287-295.

69. Slater T, Cheeseman K, Davies M, Proudfoot K, Xin W. Free radical mechanisms in relation to tissue injury. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1987, 46: 1-12.

70. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American journal of medicine*, 1991, 91: S14-S22.
71. Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reactions. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 1985, 1: 3-25.
72. Gutteridge J. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, 1995, 41: 1819-1828.
73. Afanas'ev IB. Signaling functions of free radicals superoxide & nitric oxide under physiological & pathological conditions. *Molecular Biotechnology*, 2007, 37: 2-4.
74. Aruoma OI. Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 1999, 8: 53-63.
75. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*, 1993, 57: 715S-725S.
76. Ku H-H, Brunk UT, Sohal RS. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radical Biology and Medicine*, 1993, 15: 621-627.
77. Bredt D, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annual review of biochemistry*, 1994, 63: 175-195.
78. Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 1989, 82: 747-752.
79. Radi R, Peluffo G, Alvarez MaN, Naviliat M, Cayota A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, 30: 463-488.
80. Halıcı M. Bazı Likenlerden İzole Edilen Maddelerin Sıçanlarda Indometazin ile Oluşturulan Ülser Modelinde Antiülserojen Mekanizmalarının Araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü. Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2007.

81. Akkuş I. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*. Baskı. Konya, Mimoza Yayın Evi, 1996.
82. Georgieva N. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems—a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 2005, 8: 1-11.
83. Jarasch E, Bruder G, Heid H. Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, 1986, 548: 39-46.
84. Nordström G, Säljö A, Hasselgren P. Studies on the possible role of oxygen-derived free radicals for impairment of protein and energy metabolism in liver ischemia. *Circulatory Shock*, 1988, 26: 115-126.
85. Tanaka A, Chance B, Quistorff B. A possible role of inorganic phosphate as a regulator of oxidative phosphorylation in combined urea synthesis and gluconeogenesis in perfused rat liver. A phosphorus magnetic resonance spectroscopy study. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264: 10034-10040.
86. Schönfeld P, Schild L, Kunz W. Long-chain fatty acids act as protonophoric uncouplers of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1989, 977: 266-272.
87. Brown GC, Lakin-Thomas PL, Brand MD. Control of respiration and oxidative phosphorylation in isolated rat liver cells. *European journal of biochemistry*, 1990, 192: 355-362.
88. Brustovetsky N, Mayevsky E, Grishina E, Gogvadze V, Amerkhanov Z. Regulation of the rate of respiration and oxidative phosphorylation in liver mitochondria from hibernating ground squirrels, *Citellus undulatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1989, 94: 537-541.

89. Vaca CE, Wilhelm J, Harms-Ringdahl M. Studies on lipid peroxidation in rat liver nuclei and isolated nuclear membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1988, 958: 375-387.
90. Kalra J, Chaudhary AK, Massey KL, Prasad K. Effect of oxygen free radicals, hypoxia and pH on the release of liver lysosomal enzymes. *Molecular and cellular biochemistry*, 1990, 94: 1-8.
91. Colletti L, Burtch G, Campbell JD In *Prostaglandin E2 protects the isolated perfused rabbit liver from an oxygen free radical-induced injury*, Transplantation proceedings, (editör).^(editörler). 1990; 2381-2383.
92. Uysal M. Serbest radikaller, lipit peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen kosullar. *Klinik gelisim*, 1998, 11: 336-341.
93. Chesseman K. Mechanism and effects of lipid peroxidation. *Molec Aspects Med*, 1993, 14: 191-197.
94. Odeleye OE, Watson RR, Eskelson CD, Mufti SI. Dietary polyunsaturated fatty acid promote peroxidation and its possible role in the promotion of cancer. İçinde:*Biological Reactive Intermediates IV*, Springer, 1991: 789-791.
95. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry*, 1997, 43: 1209-1214.
96. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1998, 75: 199-212.
97. Tan S, Sagara Y, Liu Y, Maher P, Schubert D. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *The Journal of cell biology*, 1998, 141: 1423-1432.

98. Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262: 9895-9901.
99. Demple B. Oxidative DNA damage: repair and inducible cellular responses. *Progress in clinical and biological research*, 1990, 340: 155.
100. Marcillat O, Zhang Y, Lin S, Davies K. Mitochondria contain a proteolytic system which can recognize and degrade oxidatively-denatured proteins. *Biochemical Journal*, 1988, 254: 677-683.
101. Schuessler H, Schilling K. Oxygen effect in the radiolysis of proteins: Part 2 bovine serum albumin. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 1984, 45: 267-281.
102. Wei H, Frenkel K. In vivo formation of oxidized DNA bases in tumor promoter-treated mouse skin. *Cancer Research*, 1991, 51: 4443-4449.
103. Nalbant S. Yaşlanmanın Biyolojisi. *Türk Fiz Tıp Rehab Derg*, 2006, 52: A12-A17.
104. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *The American journal of medicine*, 1991, 91: S23-S30.
105. Sen S, Chakraborty R. The role of antioxidants in human health. İçinde: *Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy*, ACS Publications, 2011: 1-37.
106. Young I, Woodside J. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 2001, 54: 176-186.
107. Marikovsky M, Ziv V, Nevo N, Harris-Cerruti C, Mahler O. Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response. *The Journal of Immunology*, 2003, 170: 2993-3001.
108. Constantino L, Gonçalves RC, Giombelli VR, Tomasi CD, Vuolo F, Kist LW, de Oliveira GMT, de Bittencourt Pasquali MA, Bogo MR, Mauad T. Regulation of lung

oxidative damage by endogenous superoxide dismutase in sepsis. *Intensive Care Medicine Experimental*, 2014, 2: 17.

109. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 1988, 34: 497-500.

110. Mills GC. Hemoglobin catabolism I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *Journal of Biological Chemistry*, 1957, 229: 189-197.

111. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clinical Chemistry*, 1991, 37: 1932-1937.

112. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free radical research*, 1999, 31: 261-272.

113. Klaus A, Fuhrmann H, Sallmann H. Peroxidative and antioxidative metabolism of the broiler chicken as influenced by dietary linoleic acid and vitamin E. *Archiv fuer Gefluegelkunde (Germany)*, 1995.

114. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *Journal of bacteriology*, 1968, 95: 2131-2138.

115. Miyasaki KT, Wilson ME, Genco RJ. Killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by the human neutrophil myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system. *Infection and immunity*, 1986, 53: 161-165.

116. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annual review of biochemistry*, 1983, 52: 711-760.

117. Murray RK, Granner D, Mayes P, Rodwell V. *Harper's illustrated biochemistry*. 28 Baskı. London, Lange/McGraw-Hill, 2003.

118. Bozkurt İ, Dilek E, Erol HS, Çakir A, Hamzaoğlu E, Koç M, Keleş ON, Halici MB. Investigation on the effects of pomiferin from *Maclura pomifera* on indomethacin-induced gastric ulcer: An experimental study in rats. *Medicinal Chemistry Research*, 2017, 26: 2048-2056.
119. Florian T, Necas J, Bartosikova L, Klusakova J, Suchy V, El Naggar BE, Janostikova E, Bartosik T. Effects of Prenylated Isoflavones Osajin and Pomiferin in Premedication on Heart Ischemia-Reperfusion. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 2006, 150: 93-100.
120. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 1979, 95: 351-358.
121. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 1968, 25: 192-205.
122. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 1984, 105: 121-126.
123. Smith JL, Perino JV. Osage orange (*Maclura pomifera*): history and economic uses. *Economic Botany*, 1981, 35: 24-41.
124. Bartošíková L, Nečas J, Bartošík T, Pavlík M, Fráňa P. Effect of pomiferin administration on kidney ischaemia-reperfusion injury in rats. *Interdisciplinary Toxicology*, 2010, 3: 76-81.
125. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. In: *Methods in Enzymology*, Elsevier, 1990: 343-355.
126. Nečas J, Bartošíková L, Florian T, Klusáková J, Suchý V, Janoščíková E, Bartošík T, Naggar EBE. Protective effects of flavonoid pomiferin on heart ischemia-reperfusion. *Acta Veterinaria Brno*, 2007, 76: 363-370.

127. Chapple I. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 1997, 24: 287-296.
128. Kohen R, Nyska A. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 2002, 30: 620-650.
129. Chen HI, Hsieh N-K, Kao SJ, Su C-F. Protective effects of propofol on acute lung injury induced by oleic acid in conscious rats. *Critical Care Medicine*, 2008, 36: 1214-1221.
130. Yang C, Moriuchi H, Takase J, Ishitsuka Y, Irikura M, Irie T. Oxidative stress in early stage of acute lung injury induced with oleic acid in guinea pigs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2003, 26: 424-428.
131. Zhao Z, Xu D, Li S, He B, Huang Y, Xu M, Ren S, Li S, Wang H, Xie W. Activation of Liver X Receptor Attenuates Oleic Acid-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome. *The American journal of pathology*, 2016, 186: 2614-2622.
132. Korkmaz M, Erden İA, Uzun Ş, Akıncı SB, Erden G, Karabulut İ, Zeybek ND, Fadilloğlu E, Müftüoğlu S, Sarıcaoğlu F. Sıçanlarda Koenzim Q10'un Oleik Asitle Oluşturulan Akut Akciğer Hasarına Etkisi. *Turkiye Klinikleri Journal of Anesthesiology Reanimation*, 2013, 11: 1-10.
133. Arpag H, Gül M, Aydemir Y, Atilla N, Yiğitcan B, Cakir T, Polat C, Behirli Ö, Sayan M. Protective effects of alpha-lipoic acid on methotrexate-induced oxidative lung injury in rats. *Journal of Investigative Surgery*, 2018, 31: 107-113.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Kübra COŞAR
Doğum tarihi:	06.04.1993
Doğum Yeri:	Ilıca
Medeni Hali:	Bekâr
Uyruğu:	T.C
Adres:	Fidanlık Mah. Osmanlı Sok. NO:26
Tel:	0552 409 41 21
Faks:	
E-mail:	kubra.cosar@hotmail.com
Eğitim	
Lise:	NENEHATUN KIZ LİSESİ
Lisans:	FEN FAKÜLTESİ/ BİYOLOJİ
Yüksek lisans:	
Doktora:	
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	
Almanca:	
Rusça:	
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
İlgi Alanları ve Hobiler	

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak *Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Serkan EROL* danışmanlığında sunulan “Maclura pomifera Bitkisinden İzole Edilen Pomiferin Maddesinin Ratlarda Oleik Asit ile İndüklenen Akut Akciğer Hasarı Modeli Üzerine Etkilerinin Araştırılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	2	15
Genel Bilgiler	8	30
Materyal ve Metod	22	35
Bulgular	4	10
Tartışma	1	15

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 04 / 12/ 2019

Öğrenci
Kübra COŞAR


Danışman
Dr.Öğr.Üyesi Hüseyin Serkan EROL

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 36643897-161
Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

02.09.2015
ERZURUM

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

25240 – Kampus / ERZURUM

İlgi : 20.08.2015 tarih ve 36643897-604.01.01-E.1500046829 sayılı yazınız.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Hüseyin Serkan EROL'un yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan "**Maclura Pomifera Bitkisinden İzole Edilen Pomiferin Maddesinin Ratlarda Oleik Asit ile İndüklenen Akut Akciğer Hasarı Modeli Üzerine Etkilerinin Araştırılması**" başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 01.09.2015 tarih ve 7 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 135 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcut oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.


Prof. Dr. Derviş ÖZDEMİR
Başkan

Toplantı Tarihi : 01.09.2015

Toplantı Sayısı : 7

KARAR NO : 135- Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Hüseyin Serkan EROL'un yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan "**Maclura Pomifera Bitkisinden İzole Edilen Pomiferin Maddesinin Ratlarda Oleik Asit ile İndüklenen Akut Akciğer Hasarı Modeli Üzerine Etkilerinin Araştırılması**" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Veteriner Fakültesi Dekanlığının 20.08.2015 tarih ve 36643897-604.01.01-E.1500046829 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı. 25240 – Yakutiye / ERZURUM
Telefon : 0-442-231 47 30 Fax : 0-442-231 55 63 e-mail: hadyek@atauni.edu.tr