



T.C.

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİGARA DUMANINA MARUZ BIRAKILMIŞ FARELERDE
EPİGALLOKATEŞİN GALLAT (EGCG) UYGULAMASININ
KARACİĞER TOKSİSİTESİ VE KOTİNİN DÜZEYİNE ETKİSİ**

Kağan AĞAN

DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Şerif DEMİR

Düzce, 2019



KABUL VE ONAY

KABUL VE ONAY

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji EABD Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan " **Sigara Dumanına Maruz Bırakılmış Farelerde Epigallokateşin Gallat (EGCG) Uygulamasının Karaciğer Toksisitesi ve Kotinin Düzeyine Etkisi** " konulu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 26 / 12 / 2019

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Şerif DEMİR (Danışman)
Başkan

Prof. Dr. Cahit BAĞCI
Üye

Prof. Dr. Şükrü ÖKSÜZ
Üye

Doç. Dr. Şule AYDIN TÜRKOĞLU
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Ersin BEYAZÇİÇEK
Üye

Bu tez Düzce Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddelerince, yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitümüz Yönetim Kurulu 10 / 01 / 2020 tarih ve 2020/43 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adnan ÖZÇETİN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin, çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

26.12.2019

Kağan AĞAN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin başlangıcından itibaren bilgileriyle ve tecrübeleriyle yol gösteren değerli danışmanım Prof. Dr. Şerif DEMİR'e ve değerli hocalarım Prof. Dr. Recep ÖZMERDİVENLİ ve Prof. Dr. Seyit ANKARALI'ya; bölümdeki katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Ersin BEYAZÇİÇEK'e, katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Merve ALPAY'a, istatistiksel analizlerde büyük yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Ali SUNGUR'a,

Doktora sürecinde yol arkadaşlığı yaptığımız Vet. Hek. Kayhan ÖZKAN'a, Arş. Gör. Özge BEYAZÇİÇEK'e

Benden desteklerini hiç esirgemeyen değerli arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Nurnehir BALTACI, Öğr. Gör. Çiğdem ÇİÇEK ve Öğr. Gör. Veysel BASKIN'a,

Çalışmalarında tüm özverileriyle yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen çok kıymetli Tuğçe ÇAPRAZLI ve Elif ARICA'ya,

Akademik hayatım boyunca akademik duruşunu, bilimsel bakış açısını örnek alacağım, lisansüstü eğitimim boyunca desteğini hep hissettiğim Sayın Hocam Prof. Dr. Nigar DEMİRCAN ÇAKAR'a,

Tez çalışmamı 2018.04.01.872 proje numarasıyla destekleyen Düzce Üniversitesi'ne,

Her türlü desteği sağlayarak bugünlere gelmemde büyük emekleri olan, her ne olursa olsun hep yanımda olan, hayatım boyunca sevgi ve hoşgörülerini esirgemeyen annem Leyla AĞAN, babam Mehmet AĞAN ve abim Çağan AĞAN'a

En zor zamanlarda devam etmemi sağlayan, hayallerimi gerçekleştirmemi sabırla bekleyen, tüm yoğunluğuna rağmen benim tez çalışmamla ilgilenen, benimle birlikte çalışan, yorulmak bilmeyen, maddi ve manevi olarak her zaman destek olan sevgili eşim ve meslektaşım Öğr. Gör. Aydan Fülden AĞAN'a

Sonsuz teşekkür ederim.

Kağan AĞAN

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
RESİMLER LİSTESİ	xi
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Karaciğer	5
2.1.1. Karaciğerin görevleri	5
2.1.2. Karaciğer toksisitesi ve değerlendirilmesi	6
2.1.3. Aspartat aminotransferaz (AST)	7
2.2. Sigara Dumanı	8
2.3. Kotinin	10
2.4. Oksidatif Stres	13
2.4.1. Malondialdehit (MDA)	16
2.5. Reaktif Oksijen Türleri	16
2.5.1. Singlet oksijeni (1O_2)	16
2.5.2. Süperoksit anyonu	16
2.5.3. Hidrojen peroksit	17
2.5.4. Hidroksil	17
2.5.5. Nitrikoksit radikali ($NO\cdot$)	17
2.5.6. Peroksinitrit	18
2.6. Antioksidan Sistem	18

2.6.1.	Enzimatik antioksidan sistem	19
2.6.1.1.	Süperoksit dismutaz (SOD).....	20
2.6.1.2.	Katalaz (CAT).....	20
2.6.1.3.	Glutasyon peroksidaz (GPx).....	20
2.6.1.4.	Glutasyon redüktaz (GPr).....	21
2.6.1.5.	Glutasyon S transferaz (GST).....	21
2.6.2.	Enzimatik olmayan antioksidanlar	21
2.6.2.1.	Glutasyon (GSH)	22
2.6.2.2.	Melatonin	22
2.6.2.3.	Miyogloblin ve Hemogloblin	23
2.6.2.4.	Askorbik Asit (C vitamini).....	23
2.6.2.5.	A- Tokoferol (E vitamini)	23
2.6.2.6.	Karotenoidler.....	23
2.6.2.7.	Polifenoller.....	23
2.6.2.8.	Sentetik antioksidanlar.....	24
2.7.	Epigallokateşin Gallat (EGCG).....	24
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1.	Araştırmanın Tipi	26
3.2.	Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	26
3.3.	Deney Hayvanlarının Bakım Koşulları	26
3.4.	Deney Hayvanlarının Gruplandırılması, Maddeler ve Dozları	26
3.4.1.	Akut kontrol ortam havasına maruz kalan grup (AH0).....	28
3.4.2.	Akut kontrol sigara dumanına maruz kalan grup (AS0)	28
3.4.3.	Akut 25 mg/kg EGCG uygulanan grup (AH25).....	29
3.4.4.	Akut 25 mg/kg EGCG + sigara dumanı uygulanan grup (AS25)	29
3.4.5.	Akut 50 mg/kg EGCG uygulanan grup (AH50).....	29
3.4.6.	Akut 50 mg/kg EGCG + sigara dumanı uygulanan grup (AS50)	29

3.4.7.	Kronik kontrol ortam havasına maruz kalan grup (KH0)	30
3.4.8.	Kronik kontrol sigara dumanına maruz kalan grup (KS0)	30
3.4.9.	Kronik 25 mg/kg EGCG uygulanan grup (KH25)	31
3.4.10.	Kronik 25 mg/kg EGCG + sigara dumanı uygulanan grup (KS25)	31
3.4.11.	Kronik 50 mg/kg EGCG uygulanan grup (KH50).....	31
3.4.12.	Kronik 50 mg/kg EGCG + sigara dumanı uygulanan grup (KS50)	31
3.5.	Cerrahi İşlemleri.....	32
3.6.	ELISA İşlemleri	33
3.7.	İstatistiksel Analiz.....	36
4.	BULGULAR	37
4.1.	Sigara Dumanı ve EGCG Uygulamasının Serum Kotinin Düzeyine Etkisi	37
4.2.	Sigara Dumanı ve EGCG Uygulamasının Karaciğer Toksisitesi Üzerine Etkisi 40	
4.2.1.	Sigara dumanı ve EGCG uygulamasının serum AST düzeyine etkisi	40
4.2.2.	Sigara dumanı ve EGCG uygulamasının serum ALT düzeyine etkisi	40
4.2.3.	Sigara dumanı ve EGCG uygulamasının serum ALT düzeyine etkisi	43
4.3.	Sigara Dumanı ve EGCG Uygulamasının Serum MDA Düzeyine Etkisi	46
4.4.	Sigara Dumanı ve EGCG Uygulamasının Antioksidan Düzeyleri Üzerine Etkisi 49	
4.4.1.	Sigara dumanı ve EGCG uygulamasının serum SOD düzeyine etkisi.....	49
4.4.2.	Sigara dumanı ve EGCG uygulamasının serum GPx düzeyine etkisi.....	52
4.4.3.	Sigara dumanı ve EGCG uygulamasının serum CAT düzeyine etkisi.....	55
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	59
6.	KAYNAKLAR	63
7.	EKLER	81
	Ek 1	81
8.	ÖZGEÇMİŞ	82

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ROS: Reaktif Oksijen Türleri	Dk: Dakika
ATP: Adenozin-5-trifosfat	kg: Kilogram
O₂⁻: Superoksit Anyon	mg: Miligram
ER: Endoplazmik Retikulum	AH0: Akut Kontrol (Ortam havasına Maruz Kalan) Grup
SOD: Süperoksit Dismutaz	AS0: Akut Kontrol (Sigara Dumanına Maruz Kalan) Grup
H₂O₂: Hidrojen Peroksit	AH25: Akut 25 mg/kg EGCG Uygulanan Grup
CAT: Katalaz	AS25: Akut 25 mg/kg EGCG + Sigara Uygulanan Grup
GPx: Glutasyon Peroksidaz	AH50: Akut 50 mg/kg EGCG Uygulanan Grup
OH⁻: Hidroksil İyonun	AS50: Akut 50 mg/kg EGCG + Sigara Uygulanan Grup
GPr: Glutasyon Redüktaz	
GST: Glutasyon S Transferaz	
Vitamin C – Vit C: Askorbik Asit	
Vitamin E – Vit E: α-tokoferol	
ETS: Elektron Taşıma Sistemi	
GSH: Glutasyonun	
GSSG: Glutasyon Oksit – Okside Glutasyon Disülfid	
FAD: Flavın Adenin Dinükleotid	
Q10 - CoQ: Koenzim Q10	
Trx: Tioredoksin	
Grx: Glutaredoksin	
NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat	
MDA: Malondialdehid	

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1 Akut Deney Grupları Tasarımı	30
Tablo 3.2 Kronik Deney Grupları Tasarımı	32
Tablo 4.1 Tüm Grupların Serum Kotinin değerleri	38
Tablo 4.2 Tüm Grupların Serum AST değerleri	41
Tablo 4.3 Tüm Grupların Serum ALT değerleri	44
Tablo 4.4 Tüm Grupların Serum MDA değerleri	47
Tablo 4.5 Tüm Grupların Serum SOD değerleri.....	50
Tablo 4.6 Tüm Grupların Serum GPx değerleri.....	53
Tablo 4.7 Tüm Grupların Serum CAT değerleri.....	56



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Karaciğer anatomik görüntüleri.....	6
Şekil 2.2 Nikotin ve kotinin kimyasal formülü	11
Şekil 2.3 Antioksidan sistem tepkimelerinin özet şeması	19
Şekil 2.4 EGCG molekülün kimyasal formülü.....	24
Şekil 4.1 Kotinin standart eğrisi	37
Şekil 4.2 Ortam havasına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum kotinin değerleri	39
Şekil 4.3 Sigara dumanına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum kotinin değerleri	39
Şekil 4.4 AST standart eğrisi.....	40
Şekil 4.5 Ortam havasına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum AST değerleri	42
Şekil 4.6 Sigara dumanına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum AST değerleri	42
Şekil 4.7 ALT standart eğrisi.....	43
Şekil 4.8 Ortam havasına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum ALT değerleri	45
Şekil 4.9 Sigara dumanına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum ALT değerleri	45
Şekil 4.10 ALT standart eğrisi.....	46
Şekil 4.11 Ortam havasına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum MDA değerleri	48
Şekil 4.12 Sigara dumanına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum MDA değerleri	48
Şekil 4.13 SOD Standart Eğrisi	49
Şekil 4.14 Ortam havasına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum SOD değerleri	51
Şekil 4.15 Sigara dumanına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum SOD değerleri	51
Şekil 4.16 GPX standart eğrisi	52
Şekil 4.17 Ortam havasına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum GPx değerleri	54

Şekil 4.18 Sigara dumanına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum GPx değerleri.	54
Şekil 4.19 CAT Standart Eğrisi	55
Şekil 4.20 Ortam havasına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum CAT değerleri.	57
Şekil 4.21 Sigara dumanına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum CAT değerleri.	57



RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1 Günlük kullanım için tartılan ve falkonlara ayrılan EGCG tüpleri.....	27
Resim 3.2 İ.P. EGCG Uygulaması	27
Resim 3.3 Sigara dumanına maruziyet için yaptırılmış olan kafes tasarımı	28
Resim 3.4 Anestezi altında eksanguinasyon	33
Resim 3.5 ELISA okumasında kullanılan cihaz.....	34
Resim 3.6 ELISA analizlerinde substrat (mavi renk) ve stop (sarı renk) solüsyonu eklenmiş plateler	35



ÖZET

SİGARA DUMANINA MARUZ BIRAKILMIŞ FARELERDE EPIGALLOKATEŞİN GALLAT (EGCG) UYGULAMASININ KARACİĞER TOKSİSİTESİ VE KOTİNİN DÜZEYİNE ETKİSİ

Kağan AĞAN

Doktora Tezi, Fizyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şerif DEMİR

Aralık 2019, 81 Sayfa

Tüm dünyada tütün ve türevlerinin kullanımı oldukça yaygındır. Sigara dumanının içinde bulunan oksidan maddeler vücuda girdiğinde oksidatif stresi arttırmaktadır. Yeşil çay (*Camellia sinensis*) içinde antioksidan özelliğe en yüksek olan ve bol bulunan epigallokateşin gallat'dır (EGCG). Çalışmamızın amacı sigara dumanına maruziyet sonucu artan oksidatif stresin ve karaciğerde oluşturdukları hasarın, antioksidan özelliğe sahip EGCG'nin, akut ve kronik olarak uygulandığı in vivo deney tasarımında etkilerinin incelenmesidir. Çalışmamızda 84 adet CD1 erkek fare kullanılmıştır. Fareler, uygulama süresi 1 gün olan akut ve 21 gün olan kronik olmak üzere 2 ana gruba, toplamda 12 alt gruba ayrılmıştır. Alt gruplar kontrol (ortam havasına maruz kalan), 2.kontrol (sigara dumanına maruz kalan), sadece 25 mg/kg ve 50 mg/kg EGCG ve aynı dozlarda EGCG ve sigara uygulanan gruplar olarak ayrılmıştır. Sigara dumanı, duman odası oluşturularak inhalasyon yoluyla, EGCG uygulamaları ise fareler duman odasına girmeden 30 dakika önce günde 1 kere intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Uygulamalar bittikten sonra ketamin/ksilazin anestezisi altında eksanguinasyon yoluyla fareler öldürülmüştür. Alınan kan örnekleri serumlarından karaciğer hasarı, sigara dumanı maruziyeti ve oksidatif stres düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçülmüştür. Yapılan değerlendirmeler sonucunda EGCG uygulamasının sigara dumanı uygulanan gruplarda GPx ve SOD antioksidan enzimleri düzeylerini anlamlı olarak yükselttiği bulunmuş ve karaciğer üzerinde olumsuz etkisinin olduğuna rastlanılmamıştır. Sonuç olarak, EGCG uygulamasının antioksidan sistem üzerinde olumlu etkilerinin ve sigara dumanına maruz kalan bireylerin oksidatif stresten etkilenmesinden korunmasında başarılı olabileceği ve bu konuda daha uzun süreli deneylerin ve daha yüksek dozların denenmesinin olumlu etkilerin pekiştirilmesinde önemli rol oynayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: EGCG, Fare, Karaciğer Toksikitesi, Oksidatif Stres, Sigara Dumanı

ABSTRACT

EFFECTS OF EPIGALLOCATECHIN GALLATE (EGCG) ADMINISTRATION ON LIVER TOXICITY AND COTININE LEVEL AT CIGARETTE SMOKE EXPOSED MICE

Kağan AĞAN

Doctoral Thesis, Department of Physiology

Supervisor: Prof. Şerif DEMİR

December 2019, 81 Pages

The use of tobacco and its derivatives is widespread all over the world. Oxidant substances in cigarette smoke increase oxidative stress when it enters the body. Epigallocatechin gallate (EGCG) is the most antioxidant and abundant molecule in green tea (*Camellia sinensis*). The aim of this study was to investigate the effects of increased oxidative stress and liver damage caused by exposure to cigarette smoke in an in vivo experimental design in which antioxidant EGCG was administered acutely and chronically. In our study 84 CD1 male mice were used. Mice were divided into two main groups: acute group (application period lasted 1 day) and chronic group (application period lasted 21 day) and total 12 subgroups. The subgroups were divided into control (exposed to room air) , 2nd control (exposed to cigarette smoke) , 25mg/kg and 50mg/kg only administered EGCG, and last subgroups are administered the same doses of EGCG and smoking. EGCG was administered one time in each day intraperitoneally 30 minutes before entering the smoke chamber. After administration, mice were sacrificed by exsanguination under ketamine/xylazine anesthesia. Liver damage, cigarette smoke exposure and oxidative stress levels were measured by ELISA from blood sample. As a result of the evaluations, it was found that EGCG application significantly increased the levels of GPx and SOD antioxidant enzymes in cigarette smoke groups and did not have a negative effect on liver. In conclusion, the positive effects of EGCG on the antioxidant system and the protection of individuals exposed to cigarette smoke from oxidative stress are thought to be successful, and longer trials and higher doses will play an important role in reinforcing the positive effects.

Key Words: Cigarette Smoke, EGCG, Hepatotoxicity, Mice, Oxidative Stress

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sigara kullanımı dünya üzerinde olumsuz sonuçları olan bir durumdur. Dünya üzerinde 15 yaş ve üzerinde 942 milyon erkek ve 175 milyon kadın sigara kullanıcısıdır. 2016 yılında yapılan çalışmalara göre erkeklerin 1/5'i ikinci el maruziyete uğramıştır. Kadınlarda ise oranlar daha yüksektir ve 1/3'ü sigara dumanına bir şekilde maruz kalmıştır.

Türkiye'de 2009 yılında yapılan yasal düzenlemelerle işyerlerinde %37 ve restoranlarda %56 sigara dumanına maruz kalma oranı, 2012 yılında sırasıyla %16 ve %13 seviyelerine kadar düşürülmüştür. Ülkemizde evlerdeki maruziyet oranı, kamusal alandaki maruziyetteki kadar olmasa da azalmaktadır¹.

Sigaranın 7000 toksik bileşen (70 tanesinin karsinojen olduğu bilinmektedir) içermesinden dolayı, kendisine veya dumanına maruz kalmak en az sigara içmek kadar ciddi sağlık sorunlarına, bebek düşüklüklerine veya ölü doğumlara sebep olmaktadır. Pasif içiciliği 2016 yılında 884.000 ölüme, 6,4 milyon alt solunum yolları iltihaplarına, 2,5 milyon kronik obstrüktif akciğer hastalığına sebep olduğu tahmin edilmektedir¹.

Sigara dumanı birçok reaktif oksijen türü içermektedir. Bu maddeler vücuda girdiğinde oksidatif stresi arttırmaktadır. Oksidatif stresin zararlı etkileri vücutta bulunan antioksidanlar tarafından engellenmeye çalışılmaktadır. Karaciğer antioksidan sistem elemanlarının üretilmesi ve antioksidan işlemlerin büyük çoğunluğuna ev sahipliği yapması dolayısıyla önemlidir. Ayrıca oksidatif stres karaciğer hastalıklarına sebep olan önemli etkenlerden biridir.

Epigallokateşin gallat molekülü (EGCG) yeşil çay'ın (*Camellia sinensis*) içerdiği bilinen 4 farklı polifenol bileşik içerisinde en bol miktarda bulunan polifenoldür. EGCG üzerinde yapılan birçok çalışmada önemli bir antioksidan madde olduğu ortaya konulmuştur

Chen ve ark. yaptığı karbontetraklorürle (CCl₄) oluşturulan karaciğer hasarında EGCG koruyucu etkisine baktıkları çalışmada, 3 ardaşık gün intraperitoneal uyguladıkları farelere son gün CCl₄ uyguladıklarında EGCG'nin karaciğer hasarının önlenmesinde olumlu etkileri olduğu görülmüştür². Zhou ve ark. yaptığı diğer bir deneyde EGCG'nin

hepatositlerde otofaji uyardığı ve lipid birikimini azalttığı bulunmuştur. Yaptıkları çalışmada EGCG ile otofajinin indüksiyonunun, obezite ve diyabet ile ilişkili alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığında bulunan hepatosteatozu azaltabileceği ve yüksek yağlı diyetle uyarılan hepatosteatozun azaltılmasında önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir³.

EGCG içeren bitkilerin kullanıldığı geleneksel tıpta, EGCG'nin antioksidan etkisi üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda EGCG uygulamasının sigara dumanına maruz bırakılan gruplarda GPx ve SOD antioksidan enzim düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Özellikle 50 mg/kg EGCG dozunun, 25 mg/kg EGCG dozuna göre daha etkili olduğu görülmektedir. Çalışmamızda aynı zamanda karaciğer toksisitesi gözlemek amacıyla AST ve ALT değerlerine bakılmıştır. EGCG kronik ve akut olarak sigara dumanına maruz kalan gruplarında hem 0-25 mg/kg hem de 0-50 mg/kg dozlarında anlamlı bir sonuç bulamamıştır.

Karaciğer enzimleri üzerinde EGCG'in etkisine bakıldığında, sitokrom p450 enzimleri üzerine etkileri varlığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir⁴. CYP2A6 enzimi ve CYP2B6 enzimlerinin nikotinin kotinine dönüştürülmesinde görev aldığı bilinmektedir⁵. Serum kotinin düzeyiyle ilgili yapılan çalışmalarda kotinin düzeyinin sigara uygulama süresiyle bağlantılı olarak arttığı gözlemlenmiştir⁶. Çalışmamızda 4 haftalık uygulama sonucunda ortam havası solutulan ve sigara dumanı uygulanan grupların kotinin düzeylerinin değerleri özellikle 50 mg/kg EGCG dozu uygulanan gruplarda anlamlı yükselmiştir.

Çalışmamızda sigara dumanına maruz bırakılan farelerde, EGCG'nin akut ve kronik şekilde intraperitoneal olarak 25 mg/kg ve 50 mg/kg dozlarda verilmesinin ardından antioksidan sistem, karaciğer hasarı, oksidatif stres ve kotinin düzeyi üzerine etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak, EGCG uygulamasının antioksidan sistem üzerinde olumlu etkilerinin olabileceği ve sigara dumanına maruz kalan bireylerin oksidatif stresten korunmasında etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmanın sonuçlarının, daha uzun süreli ve daha yüksek dozlarda denenecek yeni çalışmalarla olumlu sonuçların pekiştirilmesinde etkili olacağı öngörülmektedir.

Araştırmamız Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP) tarafından 2018.04.01.872 proje numarasıyla desteklenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Karaciğer

Toplam vücut ağırlığımızın yaklaşık %2'sini (1,5 kg) karaciğer oluşturmaktadır. Karın bölgesinde sağ tarafta diyaframında altında yerleşmiştir. Sağ, sol ve orta ana parçaların altında parçalara bölünmüş bir yapıya sahiptir. Glisson kapsülü denilen bağ dokusu örtüsüyle kaplanmıştır. Diğer organlarımızdan farklı olarak karaciğer 2 ana kan damarıyla beslenmektedir. Bunlardan ilki görevi karaciğere oksijence zengin ve organın beslenmesi sağlayan, toplam 300 mL/dk kan akımı sağlayan hepatik arterdir. İkincisi ise gastrointestinal sistemden emilen maddeleri, pankreastan ve dalaktan kalbe geri dönecek olan kanı içeren, 1050 mL/dk akışa sahip venöz kanın taşındığı portal vendir. Karaciğerde portal venin 7mm Hg, santral venin ise 0 mm Hg basınca ve düşük kan akım direncine sahip olması, sinüoitlerden akan kanda bulunan maddelerin karaciğer hücreleri tarafından düzenlenmesini mümkün kılmaktadır⁴. Aynı zamanda bu özellikler toplam kalp debisinin %27'sinin, karaciğere giden kan akımının oluşturmasını sağlamaktadır. Karaciğer, sindirim sisteminden, kana geçecek vücuda dağılacak maddelerin denetiminin yapıldığı merkezdir⁷.

Karaciğer köşelerde portallar venlerden, merkezde ise santral venden (terminal hepatik venül) oluşan lobüler yapıdan oluşmaktadır. Portal kısımda hepatik arter, interlobüler safra kanalı ve portal ven bulunmaktadır. Karaciğer parankiminde hepatositler merkezi vene doğru uzanırken aralarında bulunan boşluklara karaciğer sinüzoidleri oluşur⁷ (Şekil 2.1) .

2.1.1. Karaciğerin görevleri

Karaciğerin;

Protein metabolizması: γ -globulinler hariç kanda bulunan tüm proteinlerin, transferrin ve seruloplazmin taşıyan proteinlerin oluşumu, aminoasitlerin deaminasyonu, üre ve amonyağın vücut dışına atılması,

Karbonhidrat metabolizması: glikojenoliz ve glukoneojenez olayları ile kan şekerinin ayarlanması,

Yağ metabolizması: Endojen trigliserit, kolesterol ve yağ asitlerinin sentezi, enerji için yağ asitlerinin oksidasyonu,

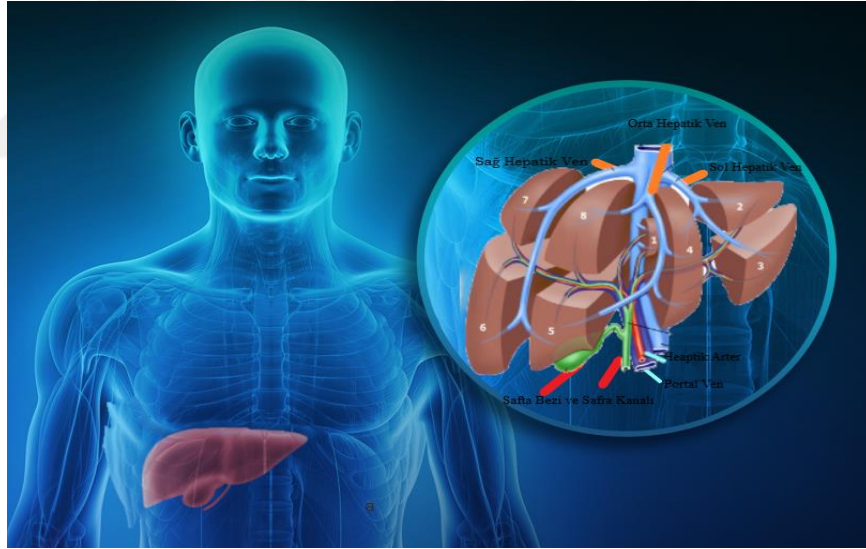
Safra oluşturulması: safra asitleri, kolesterol, su, elektrolit, fosfolipit ve konjuge bilirubin içeren safranın oluşturulması,

Vitamin ve demirin depolanması: en çok A olmak üzere, D ve B vitaminleri ve ferritin formunda demir depo edilmesi,

Pıhtılaşma faktörlerinin yapımı: fibrinojen, protrombin, akselerator globülin, faktör VII vb. pıhtılaşma faktörlerinin üretimi,

Katabolizma işlemleri: bazı hormonların (büyüme hormonu, östrojen, kortizol, aldestreron, glukokortikoidler, parathormon, insülin ve glukagon) , ilaç (sulfanamidler, penislin, ampisilin, eritromisin vb.) ve toksinlerin (Faz I-II) yıkım reaksiyonları

İmmünojik işlemleri: portal yola ulaşabilen bakteri ve organizmalar karaciğer hücreleri tarafından vücuttan temizlenmesi gibi görevleri mevcuttur⁷.



Şekil 2.1 Karaciğer anatomik görüntüleri

<https://slideplayer.com/slide/5775461/> ve https://www.saolucasopacabana.com.br/blog/wp-content/uploads/2019/04/HSL_190004_BLOG_ABR_DOENCAS_FIGADO_FINAL-810x608.png uyarlanmıştır.

2.1.2. Karaciğer toksisitesi ve değerlendirilmesi

Karaciğer vücudumuza giren toksinlerin ve ksenobiyotiklerin yıkımında (detoksifikasyon) birincil ve en önemli organdır. Ayrıca gastrointestinal sistemden emilen tüm maddeler vücut dolaşımına katılmadan önce portal venler sayesinde öncelikle karaciğere getirilir⁸. Bitkisel ürünlerden, ilaçlardan ve diğer kimyasallardan

karaciğer dokusuna zarar veren maddelere hepatotoksin adı verilir. Hepatotoksin etkisi, karaciğerin yüksek kendini yenileme (rejenerasyon) yeteneğinin sınırlarını aştıklarında dokuda hücrelerin apoptozla ya da nekrozla kaybına yol açar⁹.

Hepatotoksinlerin dokuyu haraplaması veya işlevselliğinin bozulması (disfonksiyon) durumuna ise karaciğer toksisitesi adı verilir. Aşağıda örneklenen bazı parametreler kullanılarak karaciğer hasarı hakkında bilgi edinilmektedir.

2.1.3. Aspartat aminotransferaz (AST)

Hücrede sitozolden daha çok mitokondrilerde bulunan bir enzimdir (%80 mitokondri, %20 sitozol) . Karaciğere özgün olmayan bir enzimdir. Kas, kalp, beyin ve böbrekte bulunmaktadır ve buralarda bulunan hücrelerin haraplanıp hücre zarlarının yırtılmasıyla kana geçmektedir. Karaciğer rahatsızlıklarında sıkça analizi istenen bir parametredir¹⁰.

2.1.4. Alanin aminotranferaz (ALT)

En çok karaciğerde bulunduğu için özgün parametre olarak değerlendirilmektedir. Hücrelerin sitozollerinde bulunan enzimdir. Hücrelerin hasarlanması sonucunda kanda değerleri yükselmektedir. Alanin transaminaz (ALT) üst sınırın 3 kat veya daha fazla üstünde bir değere çıkması; total bilirubin değerinin üst sınırın 2 kat üstüne çıkması durumlarının birinin veya her ikisinin birden görülmesi karaciğer toksisitesi olarak tanımlanmaktadır¹⁰.

ALT sitozolde bulunduğu için orta derecede karaciğer hasarında, AST ise mitokondride bulunduğu için ağır karaciğer hasarında serum değerleri yükselmeye başlar. Bu yüzden AST ve ALT değerlerinin beraber değerlendirilmesi önem arz etmektedir^{11,12}.

Karaciğer toksisitesine sebep olan en önemli etmenlerden biri oksidatif stres sonucu oluşmaktadır¹³. Hepatosit adı verilen karaciğer hücreleri metabolizma işlemleri sonucunda ROS üretimine katılırlar. Bunlar dışında karaciğeri desteklemede ve korumada görev alan yardımcı Kupffer hücreleri, makrofajlar, polimorfonükleer lökositler ve endotelial hücrelerde ROS üretimine katılmaktadırlar. Karaciğer antioksidan sistem için önemli bir organdır. Oksidanlara karşı vücudun savunulmasında yüksek miktarda antioksidan elemanı içerdiğinden önemli bir organdır. Ayrıca hücre içi savunmada en önemli antioksidan olan glutatyon karaciğerde üretilmektedir. Bunun dışında glutatyon peroksidaz, C ve E vitaminleri gibi önemli antioksidanları bulundurmaktadır^{11,12}.

2.2.Sigara Dumanı

Tütüne dair ilk bilgilere MÖ 6000 yıllarında Amerika Kıtası'nda rastlanılmaktadır. Bu zamanlarda tarımının yapıldığı ve Mayalar'ın kullandığına ilişkin bilgiler tarih kitaplarında yer almaktadır. O zamanki kullanımı daha çok tedavi amaçlı olup, yaralara sürerek veya çiğneyerek kullanılmaktaydı. İlk defa ticari amaçlı üretimi Amerika Kıtası'nda, ilk ihracatı ise İngiltere'ye yapılmıştır^{14,15}.

Anadolu oldukça geç zamanda 17. yüzyılda tütünle tanışırken, Osmanlı Devleti çok daha önce 1500'lü yıllarda Mısır'da tütünle tanışmıştır. Daha sonraları Anadolu'da "Şark tütünü" adıyla bilinen, kendini piyasada kabul ettiren ve tercih edilen tütün türü yetiştirilmeye başlanmıştır.

Sigara yapımında kullanılan tütün, sistematik olarak *Solanaceae* ailesinin içerisinde *Nicotiana* cinsidir. 65 üzerinde türü bulunmasına rağmen "*Nicotiana tabacum*" ve "*Nicotiana rustica*" tütün ürünlerinin üretiminde kullanılmaktadır. Genellikle tek yıllık bitki olan tütünün yapraklarında güçlü bir alkaloid olan organik azot taşıyan nikotin bulunmaktadır. Bu madde bağımlılık yapan keyif verici bir maddedir¹⁶.

Tütün yandığı zaman, sigara ateşinde sıcaklık 980-1050°C'ye ulaşmaktadır. Bu durumda ortaya aerosol şeklinde, gaz içinde çapları 0,1-1µ olan katı ve sıvı dağılmış maddelerden oluşan karışım ortaya çıkmaktadır. Duman içeriği tütünün türüne, sigaranın sarınım yapısına, nemine, kalınlığına, kağıdının yapısına ve filtre bulundurulup bulundurmamasına göre değişmektedir¹⁷. Ayrıca sigara dumanının içerdiği bileşiklerle, tütünün içerdikleri farklılık göstermektedir. Çünkü sigara yakıldıktan sonra oluşan bileşikler farklıdır. Sigara dumanının içerisindeki karbon monoksit, nikotin, katran fazdaki karsinojen maddeler ve iritanlar toksisitede rol oynayan en önemli bileşiklerdir¹⁸. Katran olarak ifade edilen kısmında nikotin, nem ve karbonmonoksit bulunmaz. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler ve nitrozaminler katranda en fazla bulunan, yüksek karsinojen maddelerdir. Bu bileşikler sigaranın yakılması veya tütünün işlem görmesi sırasında nikotinden ve diğer tütün alkaloidlerinden oluşmaktadır. Ayrıca katran içinde fenol bileşikleri, furfural, akrolleoin, amonyak, nitrojendioksit, hidrosiyamik asit ve nitrik oksit vb. tahriş edici ve zehirli organik bileşikler bulunmaktadır.

Sigara dumanının içinde bilinen 4000'den fazla kimyasal madde bulunmaktadır. Bunlar yüksek miktarda reaktif oksijen türleri ve/veya karsinojenik maddelerdir. Sigaradan

alınan bir nefesle 1014 bileşik ya da daha fazla ROS ortama ve solunum sistemine katılmaktadır. Bu radikaller, doğrudan oksidatif stresi artırır¹⁹. Sigara dumanında her üflemede 10^{15} radikal içerdiği elektron spin rezonans yöntemiyle ölçülmüştür²⁰.

Dumanda suni gübre kaynaklı radyoaktif polonyum-210 (Po210) vb. metaller, nikel, akrolein, fenol bileşikler ve siyanür vb. kanser yapıcı özelliği olduğu iyi bilinen maddelerde bulunur. Siyanür molekülü nedeniyle sigara kullananların kanında, metaboliti olan tiyosiyanat adlı madde tespit edilmektedir. Bu maddeler de karsinojeniktir. Environmental Protection Agency (EPA) , pasif sigara içilmesini, grup A karsinojen olarak tanımlamıştır. Grup A karsinojen maddeler, kanser yaptığına dair yeterli kanıt olan maddelerdir^{21,22}.

Yanan bir tütün ürünün ucundan çıkan duman, yan akım dumanı (side stream) , akciğerlere çekilip atılan duman ise ana akım dumanı (main stream) olarak adlandırılmaktadır. Odadaki dumanın %85'ni yan akım dumanı, %15'ini ise ana akım dumanı oluşturmaktadır. Yan akım dumanının yanma ısısı daha düşük olduğundan ana akım dumanına göre zararlı etkileri bilenen bileşikler daha fazla bulunmaktadır¹⁷. Karsinojen madde olan nitrosodimetilamin (NMDA) yan akım dumanında çok daha fazla bulunmaktadır²³.

Günümüzde yaygın sigara kullanımı; ülkelerin sağlık giderlerine getirdiği ilave yük, kaybettirdiği iş gücüyle ve bireylerde sebep olduğu düşük yaşam kalitesiyle tüm ülkelerin karşılaştığı önemli sağlık sorunudur. Sigara, kapalı ortamlarda sosyal zehirleyicilerin başında gelmektedir. Sigara kullanımının dışında sigara dumanıyla karşılaşma da önemli bir sağlık sorunu teşkil etmektedir. Sigara kullanmayan bireyin evde, işyerinde veya toplum içinde sigara içen bireylerin dumanına maruz kalması, solunması ve etkilenmesine "edilgin (pasif) içicilik, ikinci el sigara içimi (sekonder içicilik) ," denilmektedir¹. Diğer bir tanımlamayla kişilerin sigara içilen ortamda havaya karışan ve ortamda bulunan tüm bireylere istemsiz olarak zarar veren sigara dumanını solunması ve etkilenmesidir. Ancak bu durum önlenemez olması bakımından da üzerine gidilmesi gereken bir durumdur. Pek çok Ülke bu konunun üzerine eğilmeye başlamış ve bu durumu düzeltmek için yasal düzenlemeler yapmıştır. Ülkemizde 4207 Sayılı kapalı alanlarda sigara dumanı kullanımı kısıtlayan kanun, 5326 sayılı Kabahatler Kanunu cezai işlemlerin uygulanacağı yasal zeminler olarak düzenlenmiştir. Zamanla sigara içimine yönelik kısıtlamalar yasal düzenlemeler yapılarak genişletilmektedir²⁴.

Dünya üzerinde yaklaşık 1 milyar insan sigara kullanmaktadır. Tütün ürünlerinin kullanımı dünyada her gün 11.000 kişinin ölümüne sebep vermektedir. Bu ölümlerin yaklaşık 5/6'sı sigara kullananlar geri kalanı ise sigaraya maruz kalanlardan oluşturmaktadır²⁵. Bu oranlar değişmediği sürece 2020'li, 2030'lu yıllarda tütün ürünlerinden ölümlerin yılda 10 milyon kişiye varacağı düşünülmektedir. Bu korkunç rakamın %70'nin gelişmekte olan ülkelerde ortaya çıkacağı sanılmaktadır. Gelişmiş ülkelerde sigara kullanımı azalma, gelişmemiş ülkelerde artma eğilimindedir. Eğitim durumu ve refah durumu ile sigara içimi arasında doğru orantı mevcuttur^{25,26}.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporundaki verilere göre dünyadaki tüm çocuklarının yarısı bir şekilde sigara dumanına maruz kalmaktadır. Avrupa'da her iki evden birinde en az sigara kullanan bir birey vardır^{14,27}.

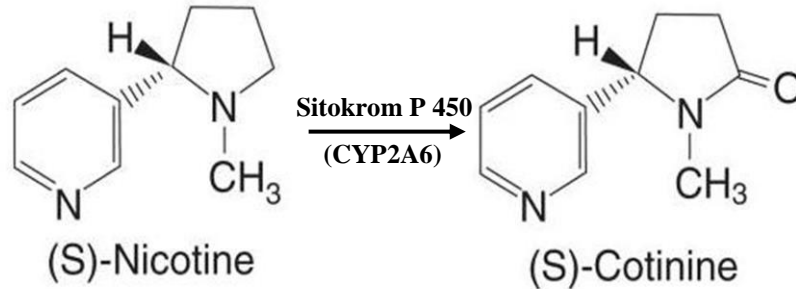
Ülkemizde son yıllarda sigara kullanımının önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. Küresel Yetişkin Tütün Araştırması (GATS) raporuna göre, sigara kullanımı yetişkinler arasında 2008'de % 31,2 (16 milyon) iken; 2012 yılında %27,1'e (14,8 milyon) gerilemiştir. Bu oran sevindirici olsa da Türkiye'de, her dört yetişkinden biri halen sigara kullanmaktadır²⁵. Pasif içicilik ise Ülkemizde daha dikkat edilmesi gereken bir sorun olarak görülmektedir. 13-15 yaş grubunda ise toplum içinde yaklaşık 4/5'i, evde ise daha fazlası sigara dumanına temas etmektedir²⁸.

2.3.Kotinin

Günümüzde duman maruziyetinin değerlendirilmesi için vücut sıvısı (kan, idrar, tükürük) ya da dokusundan (saç) alınan örneklerde, sigara dumanında bulunan maddeler veya onların metabolitleri test edilerek belirlenebilmektedir²⁹. Bu ölçümler için kullanılan biyobelirleyiciler arasında DNA, karboksihemoglobin, nikotin, kotinin, protein metabolitleri, karbonmonoksit (CO) , tiyosiyanat gösterilmektedir³⁰. Tiyosiyanatın yarılanma ömrü iki hafta olduğu için iyi bir maruziyet biyobelirleyicisi olarak düşünülmüştür. Ancak karbonmonoksit ve tiyosiyanat duman dışında çevresel başka kaynakların maruziyetinde de ortaya çıktığı için tütüne özgü değildir. Nikotin tütün dumanının en çok bulunan ve potansiyel toksin bileşenlerindedir. Tek bir sigarayla vücuda 1 mg nikotin girdiğini düşünülmektedir. Solunum şekli ve metabolize etmede bulunan bireysel farklılıklar, vücut nikotin değerlerini çok değiştirmektedir. Yarılanma ömrü sadece 1-3 saat arasındadır. Nikotin ve kotinin tütün kullanımını veya maruziyeti değerlendirmek için oldukça özgün moleküllerdir. Ancak nikotin kitlerinin maliyetli

olması ve yarılanma ömrünün kısalığı gibi sebeplerden ötürü maruziyet için iyi bir biyobelirleyici olarak değerlendirilmemektedir³¹⁻³⁵.

Karaciğerde metabolize edilen (p450 enzimleriyle CYP2A6 – en önemli enzim^{36,37} - ve CYP2B6 ve aldehyd oksidaz enzimleriyle) nikotinin kotinine dönüştürülür³¹⁻³⁵ (Şekil 2.2) . Kotinin, nikotinin major oksidatif ve kan-beyin bariyerini geçebilen metabolitidir^{38,39}. Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmaya göre kotinin, nikotin gibi beyinde yer alan striatumdaki sinir hücrelerinden dopamin salgılanmasını uyarmaktadır. Ancak yapılan araştırmada kronik sigara kullanan bireylerde bu uyarı için yeterli kotinin miktarı birikmemektedir⁴⁰. Bu kotininin, nikotinden ayıran 1000 kat daha düşük bir reseptör affinitesine sahip olmasından kaynaklanmaktadır⁴¹. Diğer bir farklı yarılanma ömrünün 17 saat gibi uzun süreye sahip olması ve beyinde biyotransformasyon geçirilmeden kalmasıdır⁴². Toplam nikotinin %80'ini vücutta yıkılırken %20'si doğrudan idrarla atılır. Kotinin kimyasal formülü $C_{10}H_{12}N_2O$ ³¹⁻³⁵.



Şekil 2.2 Nikotin ve kotinin kimyasal formülü

<https://2e9be637a5b4415c18c5-ddb36df15af65ab8482e83373c53fe5.ssl.cf1.rackcdn.com/images/110.jpg> uyarlanmıştır.

Nikotinin ana metaboliti kotinin, diğer yıkım ürünlerine göre tamamen sigaraya özgün olması, vücut sıvılarında daha uzun kalması (yarı ömrü uzun olması) , sadece in vivo metabolizmalar tarafından üretilebilmesi, bulaşma (kontaminasyon) şansının sıfır olması dış ortam şartlarından etkilenerek vücut seviyelerindeki değişme olasılığının düşük olması gibi sebeplerden ötürü sigara dumanına maruziyetin ölçülmesi, sigara kullanım sıklığının belirlenmesi gibi çalışmalarda tercih edilmektedir. Vücuttaki kotinin değerleri yarılanma ömrünün uzun olmasından dolayı benzerlik göstermektedir. Böylece sigara dumanına uzun süreli maruziyetin biyobelirleyicisi olarak kotinin, son dönemdeki kısa dönemde maruziyetin göstergesi nikotindir^{35,43}. Yanan sigara dumanına

maruz kalınması durumunda vücuttaki nikotin değerleri artar. Nikotini kanda ölçmek zor olduğu için en güvenilir yol metaboliti olan kotinin ölçülmesidir⁴⁴. Sigara içenlerde veya dumanından etkilenenlerde kan kotinin düzeyi, nikotine göre 15 kat fazladır. Kişinin diyeti, ruh hali sigara kullanımını kotinin seviyelerini etkileyebilir. Siyah ırkda nikotin yıkımı daha yavaştır⁴³. İdrar, tükürük ve plazmadan kotinin düzeylerine bakılabilmektedir⁴⁵⁻⁴⁷. Tükürük ve plazma kotinin değerleri analiz edildiğinde birbirine yakın çıkarken, idrardaki düzey 1/6 daha az bulunmaktadır.³⁵

Sigara dumanına maruziyeti ölçmek için 3 farklı yöntem kullanılabilir;

1. Solunan havadaki duman bileşenlerinin ölçümüyle (çevresel ölçüm) .
2. Sigara dumanını soluyan bireyin anket uygulanması sonucunda verdiği bilgilerle
3. Dumanı soluyan kişinin kanında bulunan duman maruziyetinin belirleyicisi (biyobelirleyici) olan maddelerin ölçümüyle.

Tütün dumanına maruziyette bireyler, en geçerli yol olan sigara dumanına maruz kalan bireylerin tükürük, kan ve idrar gibi biyobelirleyiciler kullanılarak elde edilen değerlere göre aktif sigara kullananlar, edilgin içiciler ve hiç maruz kalmayanlar olarak 3 farklı grupta değerlendirilebilmektedir. ABD Çevre Koruma Ajansı ile Bramer ve Kallungal'e göre kotinin referans değerleri aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır.

- Hiç maruz kalmayanlarda
 - Tükürükte 0-5 ng/ml,
 - Kanda 0,09-0,7 ng/ml,
 - İdrarda <10 ng/ml olarak
- Edilgin içicilerde ise
 - Tükürükte 5-10 ng/ml
 - Kanda 2-10 ng/ml,
 - İdrarda 10-500 ng/ml;
- Aktif içicilerde ise
 - Tükürükte >10 ng/ml
 - Kanda >10 ng/ml,
 - İdrarda 500 ng/ml üstündedir ⁴⁶.

Vücut sıvılarından kotinin ölçümü için kolorimetri, kromotografi, radyoimmünoassay ve enzime bağlı immünosorbent belirlenmesi (ELISA) yöntemleri geliştirilmiştir. Kolorimetri özgünlüğün olmaması nedeniyle en az tercih edilen yöntemdir. Aktif sigara

kullanıcıları için gaz kromatografi-mass spektrometrisi, edilgin içiciler için gaz likit kromatografisi tercih edilen yöntemlerdir. Radyoimmünoassay ve ELISA yöntemleri de yüksek özgünlüğe ve duyarlılığa sahiptir^{48,49}.

İdrardan yapılacak çalışmalarda 24 saat idrar toplanmadığı durumlarda kotinin ve kreatinin değerleri arasında orantı yapılarak sonuca gidilmiştir. Bu çalışmalarda Henderson ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan yararlanılmaktadır⁵⁰.

2.4.Oksidatif Stres

Oksidatif stres, reaktif nitrojen (RNS) ve reaktif oksijen (ROS) türlerinin üretiminin veya biyomoleküllerimize zarar vermesinin antioksidan sistemimiz tarafından engellenemediği, koruma sistemdeki eksikliği tanımlamak için kullanılan en genel ifadedir⁵¹.

Yapısında bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran, yüksek enerjiye sahip atom veya moleküllere serbest radikal adı verilmektedir^{52,53}. Birçok molekül serbest radikal oluşturabilir. Vücut içindeki en önemli serbest radikal kaynakları oksijen ve nitrojendir. Serbest radikaller nitrojen ve oksijen bulundurmalarına göre reaktif nitrojen (RNS) ve reaktif oksijen (ROS) türleri olarak sınıflandırılırlar⁵⁴. Bu moleküller kısa yarılanma ömürlerine rağmen, kararsızlık oluşturan ortaklanmamış elektronlarından dolayı yüksek tepkimeye girme eğilimi (reaktiflik) göstermektedirler⁵⁵⁻⁵⁷. Eşlenmemiş elektron bulunduran moleküller diğer moleküllere göre daha hızlı tepkimeye girmektedirler. ROS, hem serbest radikal hem de onların radikal olmayan ara ürünleri için kullanılmaktadır⁵⁵. İki veya daha fazla serbest radikalın eşlenmemiş elektronlarını ortak kullanmasıyla oluşan, dolayısıyla eşlenmemiş elektronu bulunmayan moleküller ise serbest radikal olmayan reaktif oksijen türleri olarak adlandırılmaktadır (none-radikal)^{58,59}. Bu türler hızla reaktif oksijen türlerine dönüşebilirler⁶⁰. Oksijen üzerinden örneğinden açıklamak gerekirse O_2^- ve OH^- hem serbest radikal hem ROS olarak adlandırılırken, H_2O_2 ve O_2 türleri ise sadece ROS olarak adlandırılmaktadır^{58,61-63}.

Hem çevresel etmenler hem vücut içindeki etmenler sebebiyle RNS ve ROS üretimi biyolojik süreç içinde engellenemeyen bir olgudur. Hücrelerde enerji üretimi (mitokondri ETS), enfeksiyonlara karşı savunma sistemleri, proteinlerin oluşturulması süreçleri (ER), enzim ve protein aktiviteleri (hemglobin, ksantin oksidaz vb.), lipid proksidasyonu, iskemi, travma, hava kirliliği, sigara dumanı, ultraviyole ışınlar, alkol, toksik etkenlere maruz kalma, yaşlılık ve yaşanan stresler gibi oksidan üretimine

katılan bir çok mekanizma sayılabilir^{19,64-67}. Fizyolojik süreçlerde nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz (NADPH) , CYT P450 gibi enzimler, büyüme hormonu, ilaçlar ve toksinlerde ROS miktarını arttırdığı için serbest radikal oluşturulmasına katılırlar⁵. Patofizyolojik süreçte ise ksantin oksidaz ROS oluşumuna önemli katkıda bulunur. Çünkü bu enzim ksantin, pürin ve hipoksantini; ürik aside kadar yıkmaktadır⁹.

Oksijen vücut için hem yararı olan hem de zararı olan bir moleküldür. Oksijen molekülü fosforilasyon tepkilerinde yüksek enerjili elektron transfer sisteminde yer alarak temel enerji kaynağımız olan adenosin trifosfat (ATP) üretimine katılırken, bir yandan da bu oksijen türleri vücudumuzda yer alan biyolojik yapılara da zarar vermektedir⁶⁸. Bu yüzden oksijen yaşamın sürdürülmesi için olmazsa olmazımızdır. Ancak denetim altında tutulması da gerekmektedir.

O_2^- oluşum oranı solunum zincirindeki elektron sayılarıyla artmaktadır. Hiperoksiya ve diyabet hastalarındaki gibi artmış glukoz seviyelerinde elektron seviyeleri arttığı için O_2^- oranı daha fazla artar. Diğer bir yandan Kompleks IV için son elektron alıcı olarak davranan oksijenin mevcudiyetin azalması durumu da, elektronların birikmesine sebep olur. Bu durum hipoksi durumlarında da artar. Normal koşullar altında mitokondrielerde tüketilen oksijenin %2'si, su oluşturmak yerine O_2^- oluşumuna sebep olmaktadır. O_2^- hücre membranının geçirgenliği düşürdüğü ve artması durumunda mitokondri matriksinde birikmesinden dolayı çevre dokulara çok zarar verebilen bir radikal değildir⁶⁹.

Benzer şekilde ER üzerinde yer alan kısa elektron zincirinde gerçekleşen tepkimelerden sızan elektronlar yüzünden de O_2^- oluşmaktadır⁶⁴. Protein katmalarında disülfid bağlarının yapılması oksidatif stres oluşturan bir olaydır. Hücre içinde oluşan O_2^- 'nin %25'i ER sebebiyle oluşmaktadır. Hücrede protein sentezi arttığında veya hatalı proteinler tekrar düzeltilip katlandığında bu stres daha fazla artmaktadır⁷⁰.

Kısaca özetlemek gerekirse oksijen varlığın fazla olduğu durumlarda fazla oksijenin elektronlarla birleşmesiyle, oksijen yokluğunda ise elektronların birikmesiyle oksijen serbest radikalleri artar.

ROS türleri önceleri oksijenli solunumun (aerob solunum) zararlı bileşeni olarak dikkat çekmekteydi, ancak son yapılan çalışmalarda hücreler arası haberci sistem, immun reaksiyonlar ve detoksifikasyon tepkimeleri içerisinde önemli rol oynadığı bulunmuştur⁷¹. Örnek olarak O_2^- ve H_2O_2 gibi reaktif türler bakteriyel kökenli enfeksiyonlarda mücadelede kullanılmaktadırlar^{66,72-74}. Kendisi için tehlikeli olmasına

rağmen, ihtiyaç duyduğu ve kullanmak zorunda olduğu ROS'un durumu vücut için karmaşık bir hal yaratmaktadır. Bu yüzden vücut ROS üretime basamak basamak cevap vermektedir. Küçük miktarlarda oluşan ROS türleri hemostatik denge için gerekliken, büyük miktarlardakiler zararlı olmakta ve antioksidan sistem tarafından dengelenmeye çalışılmaktadır. Prooksidan – antioksidan sistem arasındaki denge, ilkinin ağır basacağı şekilde değiştiğinde vücudumuzun tüm bileşenlerin yapılarını bozmakta ve biyomoleküllere biyolojik yapılarımıza onarılamaz hasar verebilmekte hatta hücre ölümlerine sebep olmaktadır⁶⁴.

Proteinlerle etkileşimleri doğrudan fenil alanin, sistein, histedin, metionin, tirozin ve triptofan gibi aminoasitler üzerinden gerçekleşmektedir. Bu aminoasitlerin yapılarında doymamış bağ ve sülfür içerdiğinden radikallerle hızlı şekilde tepkimeye girerek, bunları içeren protein yapıları bozulmaya daha yatkındır^{64,75}. Bu tepkimeler sonucunda proteinlerin içerdiği disülfid bağ sayısı arttığından etki gösterecekleri subsratlarla uyumları bozulmaktadır. Böylece proteinlerin işlevsellikleri zarar görmektedir^{64,75}. Örneğin “Hem” molekülü içeren oksihemoglobinler serbest radikallerle girdikleri tepkime sonrasında methemoglobinlere dönüşürler^{57,76}.

Deoksiribonükleik asit (DNA) serbest radikallere karşı hassas olan biyomoleküllerimizdendir. DNA'da yarattığı mutasyonlarla ROS'lar polimerazın inaktivasyonuna sebep olmaktadır. Bazı durumlarda ise radikaller DNA hasarını önleyici, onarıcı enzimlere saldırarak işlevsizleştirir. Sonuç olarak radikallerle gerçekleşen tepkimeler sonucunda DNA yapımız hasarlanmaktadır^{57,64,77,78}.

Karbonhidratlar yapılarında bulunan hidrojenlerin, radikallerin saldırıları sonucunda kopmasıyla veya ilave edilmesiyle yeni radikallerin üretilmesine sebep olabilmektedir. Bu türlerde diğer biyomoleküllere saldırarak zarar verebilmektedir^{64,75}. Monosakkaritlerin oksidasyonu ile H_2O_2 , O_2^- ve okzaldehyitler oluşmaktadır. Bunlar DNA, RNA ve protein moleküllerine bağlanıp aralarında bağlar oluşturduklarında mitotik aktiviteyi durdurucu (antimitotik) etki yaparlar. Yapılan in vitro çalışmada H_2O_2 ve O_2^- ise hyalüronik asidi parçalayıcı etkileri mevcuttur⁷⁹.

Lipidler içerdikleri doymamış bağlar sebebiyle radikallere karşı oldukça hassastır. Bu bağların oksidasyonuna lipid peroksidasyonu denilmektedir. Hücre zarındaki fosfolipidlerdeki doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen atomu koparıncaya lipid peroksidasyonu başlar. Bu reaksiyonu başlatan en önemli radikal OH^{\cdot} 'dir⁸⁰. Bunun

sonucunda doymamış yağ asitlerini parçalayarak, toksik yan ürün (MDA vb.) oluşturmaktadır ve bu ürünler zarlardan kolay geçebildikleri için, gittikleri yerlerdeki hücrelerin ve onların organellerinin (mitokondri ve lizozom) zarlarının geçirgenliklerini arttırıp parçalanmalarına da sebep olmaktadır^{66,72-74,81}. Lipid oksidasyonu sonucunda oluşan radikaller en son 4-hidroksi nonenal ve malondialdehid (MDA) gibi yıkım ürünlerine kadar parçalanırlar⁸².

2.4.1. Malondialdehit (MDA)

Dokularda oksidatif stres sonucu oluşan hasarın önemli belirteçlerinden biride hücre zarı içeriğinde bulunan lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan MDA'dır⁸³. En az 3 çift bağ bulunduran doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda oluşmaktadır. Hücre membranı lipitlerinin yıkımı sonrasında da ortaya çıkmaktadır. MDA'nın lipid peroksidasyonu sonucunda, reaksiyona özgün ürün olmamasına rağmen, ortaya çıkan son ürünlerden en stabili olması nedeniyle, ölçümleriyle vücut lipid peroksidasyonu derecesi orantısal olarak değerlendirilmektedir^{57,82,84}. Plazma MDA düzeyinin analizi lipid peroksidasyonu derecesinin önemli göstergesidir^{66,85,86}. MDA hücre membranında alış-verişten sorumlu biyomoleküllere etki ederek onların çapraz bağlar yapmasına ve iyon geçirgenliğine, enzim aktivitesine olumsuz etkiler oluşturmaktadır⁸⁷. Ayrıca DNA'nın nitrojen bazıyla tepkimeye girmektedir. Bu yüzden mutojenik ve genotoksik etki göstermektedir⁶⁶.

2.5.Reaktif Oksijen Türleri

2.5.1. Singlet oksijeni (1O_2)

Yapısında ortaklanmamış elektron bulunmadığı için serbest radikallerden değildir. Ancak oksijenin içerdiği elektronların dışarıdan fazla enerji alarak spin değiştirip yüksek enerjiye sahip olduğu halidir⁸⁸. Membran lipid gibi bazı molekülleri oksitleyebilecek olması ve serbest radikal oluşumunu başlatmasından dolayı önemli bir ROS türüdür⁶².

2.5.2. Süperoksit anyonu

Vücutta en çok bulunan oksijen kaynaklı serbest radikal türü mitokondride oluşan süperoksit anyon'dur (O_2^-). Serbest radikallerdendir^{55,89-92}. Oksijenin bir elektron almasıyla oluşur.⁹³ Solunum zincirinin enzimleri boyunca elektron transferi tamamen verimli değildir⁶⁴. Mitokondrilerin iç zarında bolca bulunan elektronlar, adenosin trifostat (ATP) üretimi sırasında elektron taşıma sisteminden taşınırken reaksiyonda görev alan

oksijende suya dönüştürülür. Ancak ksantin oksidaz, nikotamid adenin dinükleotif fostat (NADPH) oksidaz enzimleri sayesinde, sızan elektronların Singlet oksijenine (O_2 - moleküler oksijen) bağlanmasıyla dönüşmektedir⁹⁴.

2.5.3. Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksit, O_2 'nin 2 elektron almasıyla veya $O_2^{\cdot-}$ 'nin tek elektron almasıyla oluşmaktadır⁶¹⁻⁶³. H_2O_2 , ozon (O_3) ve oksijen (O_2) gibi kendisi de serbest radikal değildir. Bunlar endojen kaynaklı olarak üretilmekte ve serbest radikallerin tepkimelere girmelerine sebep olmaktadır^{58,59,95,96}. Yapısında eşleşmemiş elektron bulunmayan bu reaktif oksijen türleri Fenton ve Haber-Weiss tepkimeleri sonucunda kuvvetli serbest radikal olan hidroksil (OH^{\cdot}) oluşmasına sebep olur. Sitozele difüze olabilir ve hücre zarından kolayca geçebildiği ve yarılanma ömrü uzun olduğu için ikincil habercil olarak sinyal iletiminde yer almaktadır^{92,97,98}. H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ ulaşamadığı yerlere kolayca ulaşır, buralarda Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla OH^{\cdot} oluşmasına sebep olmaktadır^{99,100}. Proteinlerde bulunan Hem molekülüyle de etkileşime girerek, lipid peroksidasyonunun başlamasına sebep olabilen reaktif Fe oluşturabilirler^{69,101}.

2.5.4. Hidroksil

$O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 aynı ortamda yüksek yoğunlukta demir (Fe) , bakır (Cu) vb. geçiş elementleriyle H_2O_2 'nin tepkimeye girmesi sonucunda oluşabilmektedir. Bu tür geçiş elementlerinin katıldığı tepkimelere Fenton ve Haber-Weiss tepkimeleri adı verilir^{58,102-104}. Fenton tepkimesiyle hepsinden daha zararlı etkiye sahip ve bilinen bir radikal temizleyicisi olmayan hidroksil iyonun (OH^{\cdot}) oluşmasına sebep olmaktadır. OH^{\cdot} yakın çevresinde difüze olabildiği sınırlar içinde bulunan biyolojik maddelerle tepkimeye girebilmektedir¹⁰⁵. Kısa ömürlü ama oldukça aktif bir radikaldir. Tüm biyomoleküllerimizle çok hızlı tepkimeye girebildikleri için en zararlı ROS'lardandır¹⁰⁶.

Hidroksil radikalide lipid peroksidasyonunu başlatabilir. Bu olay hücre zarının yapısında hasara yol açarak geçirgenliğini artırır. DNA yapısına saldırıp gen yapısının değişmesine ve protein yapılarına hasar vererek yıkımlarına sebep olabilir. Bu hasarlar tamir edilemediği zaman hücre ölümü gerçekleşebilir^{107,108}.

2.5.5. Nitrikoksit radikali (NO^{\cdot})

Ortaklanmamış tek elektron bulunan, inorganik serbest radikallerdendir. Vücutta yaygın olarak vazodilatör (damar genişletici) etkiye sahiptir. Damar hücreleri olan endotelde nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla L-arjinden sentezlenir. Yarılanma ömrü kısa

olan, reaktivite özelliği düşük gaz halindeki bir RNS'dir. Metabolize olması sırasında O_2 bağlanarak NO_2 oluşumuna katılır. Ayrıca ROS'lar ile tepkimeye girerek güçlü bir serbest radikal olan ONOOH oluşmasını sağlar¹⁰⁹.

2.5.6. Peroksinitrit

Bir diğer güçlü prooksidan olan peroksinitrit ($ONOO^-$) aşırı artmış O_2^- üretimi sonrasında, nitrik oksit (NO) tepkimeye girmesiyle oluşmaktadır. $ONOO^-$ 5µm difüzyon yeteneğine sahip olması nedeniyle olduğu yerin yakınlarındaki birçok hücreyi etkileyebilmektedir¹¹⁰.

2.6. Antioksidan Sistem

Vücudumuzda ROS'un oluşumunu ve lipid, protein ve/veya DNA gibi biyolojik yapılarımıza zarar vermesini engellemeye çalışan ve sürekli dengelemeyi sağlayan antioksidan sistem mevcuttur. ROS'un oluşturduğu oksidatif strese karşı savaşan sistem olarak da tanımlanabilmektedir⁵¹.

Antioksidan sistem;

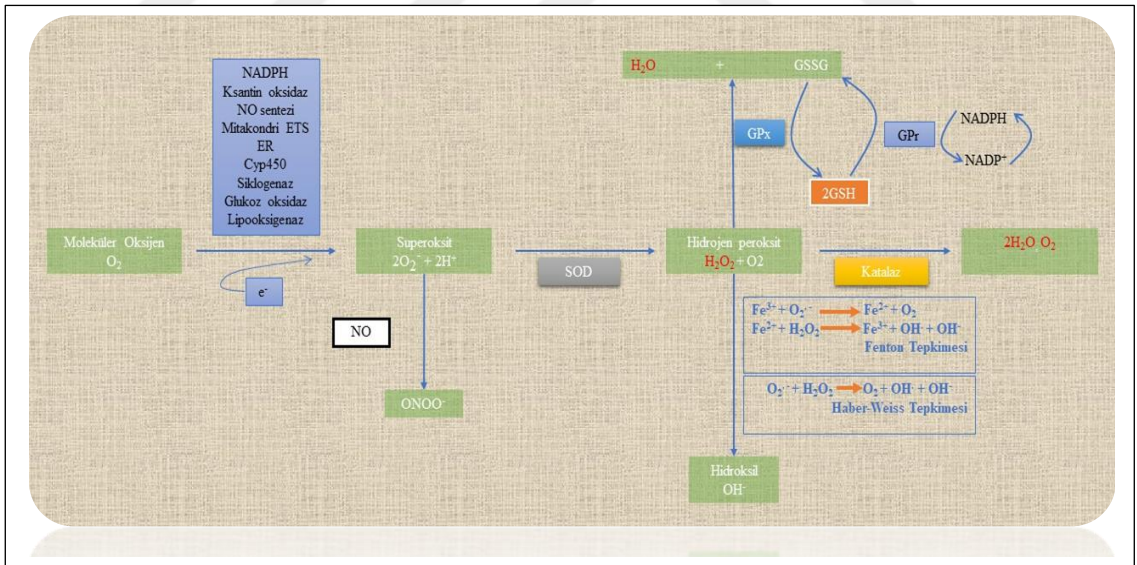
1. Radikal oluşumu başlatan türleri ve katalitik metal iyonlarını uzaklaştırarak veya yoğunluklarını azaltarak hücre içi kinaz kaybını önleyerek,
2. Oksidanları daha küçük ve zararsız moleküllere çevrilerek süpürme yada toplayıcı (scvenging) etkiyle,
3. Oksidanlara H^+ atomu aktarılmasıyla eşlenmemiş elektron kalmaması sağlanarak kararlı hale getirildiği baskılayıcı (qenching) etkiyle,
4. Oksidanların zarar verdiği moleküllerin onarıldığı (repair) etkiyle,
5. Zincirle etkiyle tepkimeye girerek oksidan oluşturan moleküllerin, başka moleküller (A, C ve E Vit, Hemoglobün, mineraller, seruloplazmin vs) tarafından kendilerine bağlanarak zincir kırıcı (chain breaking) etkiyle,
6. Endojen kaynaklı antioksidan sentezinin arttırıldığı enzimatik etkiyle

bilinen 6 yolla serbest radikallerle savaşmaktadır^{57,111}. Ayrıca DNA mutasyonlarını, proteinlerin disülfid çapraz bağlarıyla bağlanmalarını ve lipid peroksidasyonları engelleyerek de oksidatif strese karşı savunmada yardımcı olurlar.

Oksidasyonun zararlı etkilerine karşı, otofaji fizyolojik bir süreç olarak ortaya çıkmaktadır¹¹². Yapılan çalışmalarda ROS ve H_2O_2 otofajinin ilk uyarıcılardan olduğunu öne sürmektedir¹¹³. Antioksidan uygulamalarının otofajiyi engellendiği bulunmuştur.

Bu yüzden redoks tepkimelerinin otofaji mekanizmalarının denetiminde önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Oksidatif strese maruz kalan ve onarılamayan biyomoleküllerin otofajiyle yıkılması, yeni biyomoleküllerin oluşumu sırasında bu moleküllerin tekrar kullanılmasını sağlamaktadır^{114,115}. Vücutta açlık durumlarında enerji azaldığı için ATP'ye olan ihtiyaç artmaktadır. ATP üretiminin artmasıyla birlikte ROS üretimide artmaktadır. Heksokinaz 2 mTOR kompleks 1(mTORC1) 'e bağlandığında glukoz-6-fosfat sayısında azalmaya neden olmaktadır. Ayrıca bu birleşme mTORC1 ile mitokondri geçirgenlik transfer porları arasındaki ilişkiyi bozar. Porlarda geçirgenlik arttığında elektron sızmaları artacağı için mitokondriyal ROS üretiminin artacağına inanılmaktadır¹¹².

Antioksidan sistem doğal ve sentetik ana başlıklara ayrılır. Doğal antioksidan sistem enzimatik (SOD, CAT, GPx vb.) ve enzimatik olmayan olmayan (glutasyon, bilirubin, askorbik asit (vitamin C) ve α -tokoferol (vitamin E) olarak 2 gruba ayrılır¹¹⁶. Bunlar çoğunlukla hücre koruyucu olan proteinlerdir¹¹⁷⁻¹¹⁹. Enzimatik savunmaların tümü, detoksifikasyon işlemi sırasında elektronları aktarırken farklı değerler alabilen, çekirdeğinde bir geçiş metaline sahiptir (Şekil 2.3) .



Şekil 2.3 Antioksidan sistem tepkimelerinin özet şeması

2.6.1. Enzimatik antioksidan sistem

Enzimatik antioksidan sistem elemanları primer ve birincil olarak adlandırılan enzimlerden oluşmaktadır. Bunlar doğrudan ROS'ları yok etmeseler bile, tüm

enzimlerin varlığı ve beraber uyum içinde hareket etmesi zehirsizleştirme basamakları için elzemdir^{105,120,121}.

2.6.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

İlk defa 1968 yılında McCord ve Fridovich tarafından elde edilen tetramerik yapıda metalloenzimdir¹²².

SOD hücrelerde ROS'lara karşı en etkili ve ilk savunmada görevlidirler. İçerisinde metal bulduran bir enzimdir. Süperoksitle tepkimeye girip hidrojen peroksit (H_2O_2) çevrilmesini hızlandırmaktadır^{64,123}. Reaksiyonun devamında görev alacak olan CAT ve GPx enzimlerini aktifleşmesini sağlamaktadır. Memelilerde kofaktörlerin ve aminoasit dizimlerinin farklılıklarından dolayı pek çok izoformda SOD bulunmaktadır. Bunların manganez içeren formu (Mn-SOD) mitokondride, bakır ve çinko içeren formu (CuZn-SOD) ise sitozolde bulunmaktadır^{4,117-119}. Bunların haricinde birde hücrelerarası sıvıda bulunan anti-tümör etkisine sahip ekstrasellüler SOD bulunmaktadır^{121,124,125}.

2.6.1.2. Katalaz (CAT)

İlk defa 1937 yılında Summer ve Dounce tarafından sığır karaciğerinden elde edilen hemprotein grubundan bir enzimdir¹²⁶. Özellikle hücre peroksidazlarda bolca bulunmaktadır¹²⁷.

Çoğunlukla karaciğerde, böbreklerde, kemik iliğinde ve eritrositlerde aktivite gösteren enzimdir^{128,129}. Aktif kısmı 4 bölümden oluşur. Her bölümde ferrihem (Fe^{3+} protoforfilin) elementi ve alt kısımda substratı H_2O_2 'ye karşı koruyan ve etkinliğini yükselten NADPH bulunur^{69,58}. H_2O_2 tepkimeye girerek su ve oksijen oluşumu sağlar. Böylece OH öncülü olan H_2O_2 'nin miktarının seyreltilmesinde görev alır^{57,128}.

2.6.1.3. Glutasyon peroksidaz (GPx)

İlk defa 1957 yılında Mills tarafından memeli eritrositlerinden elde edilen enzimdir¹²⁶.

Glutasyonun (GSH), H_2O_2 tepkimeye girmesini katalizleyerek ROS olan OH^- yerine glutasyon oksit (GSSG) oluşturarak, H_2O_2 'nin miktarının seyreltilmesinde görev alır¹²³. GPx enzimin çalışması indirgenmiş glutasyon (GSH) varlığına bağlıdır. Çünkü sitozolde L-glutamat, L-sistein ve glisinden üretilen, hidrojen vericisi olan, GSH, en önemli hücrel redoks tamponudur. GSH, GSSG oluşturan çok sayıda detoksifiye edici reaksiyona katılır¹³⁰. GPx bu tepkimeler için pentoz fosfat yoluyla elde edilen NADPH ihtiyacı duymaktadır. NADPH azalması GPx aktivitesinde de azalmaya sebep olur.

Selenyum içerip içermemelerine göre 2 çeşit GPx vardır. Bunlar Se-GPx (4 Selenyum atomu içerir) ve GST (selenyum içermez) olarak adlandırılırlar^{121,124}. Eritrositlerde, hücre membranında, sitozolde, mitokondrilerde¹³¹; organ olarak ise akciğer ve karaciğerde bulunur. Plazmada bulunan GPx ise böbrekler tarafından sentezlenmektedir. Sitozolde mitokondri içerisinde olduğundan daha aktiftir.^{121,124}.

2.6.1.4. Glutasyon redüktaz (GPr)

İlk defa 1951 yılında tanımlanan, Flavin adenin dinükleotid (FAD) içeren, GPx ve GST tarafından, redükte GSH'ın kullanımı sonucunda oluşan Glutasyon oksit (GSSG – Okside glutasyon disülfid) tepkimelerde tekrar kullanılmak üzere glutasyona dönüşmesini sağlayan enzimdir. Bunun için kofaktör olarak pentoz fosfat yoluyla elde edilen, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz(G6PD) enzimi sayesinde üretilen, NADPH'ı kullanır ve buna bağımlıdır^{57,132,133}. Glutasyon, disülfid glutasyon redüktaz (GPr) varlığında NADPH kullanılarak (bir elektron kopartılarak) tekrar GSH'ye dönüştürülür¹³⁴.

2.6.1.5. Glutasyon S transferaz (GST)

İlk defa Boyland ve ark. tarafından sıçan karaciğerinden elde edilen dimerik yapıda bir enzimdir¹²⁶. Serbest radikallerin glutasyonla birleşme tepkimesinde görev alarak, hücre sel biyomoleküllerimizi koruyan Faz II detoksifikasyon enzimlerindendir¹³⁵. Bir çok memeli türünün akciğer, karaciğer, barsak mukozası, plasenta ve eritrositlerinde bulunmaktadır¹³⁶.

Oksidatif stresin oluşturan moleküllerin, dışarıdan alınan ilaçların (antikanser, ksenobiyotikler vs.) ve toksik kimyasalların (pestisid, herisid, kanserojenler vs.) vücudumuzda bulunan diğer biyomoleküllere bağlanmasını engelleyip, atılmasını kolaylaştırarak hücrelerin korunmasında önemli görev üstlenen intrasellüler proteindir^{137,138}.

2.6.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

Enzimatik olmayan oksidatif savunma sistemi endojen kaynaklı (metabolik) tiyol antioksidanları (GSH, Trx, Grx, Q10(CoQ) lipoik asit, melatonin) , ürik asit, bilirubin vb.; ekzojen kaynaklı askorbik asit (vitamin C) , α -tokoferol (vitamin E) , karatenoidleri ve polifenollerini içermektedir^{120,121}. Yeşil çay ve resveratrol gibi antioksidanlar sitozolik antioksidanlardır. Hücre içinde yayılış gösterir. Mitokondri içine etkileri kısıtlıdır³⁵. Bunlara ek olarak tiyol bileşiklerinden olan tiyoredoksin H₂O₂ zehirsizleştirilmesinde

görev almaktadır. Bu aşamada enzim kullanılmazken, tekrar indirgenmiş tiyoredoksin oluşturulması işleminde tiyoredoksin redüktaz enzimi gereklidir. Seruloplazmin (bakırca zengin plazma proteini) serbest demir iyonlarını ayrıştırarak Fenton tepkimeleri baskılar. Fenton tepkilerini baskılamasıyla OH⁻ oluşumunu engelleyerek antioksidan etki gösterir. Reaktif oksijen türleri, redox-duyarlı transkripsiyon faktörlerini (NF-kB vb.) , protein kinazlar (p38 vb.) , iyon kanalları (riyonadin vb.) uyararak; lipid peroksidasyonu, protein modifikasyonu, DNA oksidasyonu arttırarak hasarlara sebep olabilir⁶⁴.

Ekzojen kaynaklı antioksidan savunma sistemi çoğunlukla diyetle veya sentetik olarak doğrudan vücudumuza alınan tironları, karetonoidleri, flavanoidleri , bazı vitaminleri (A ve C) içerir¹³⁹⁻¹⁴¹.

2.6.2.1. Glutasyon (GSH)

Glutamik asit, glutasyon, glisin ve sistein amino asitlerden oluşmaktadır. Hücre sitozolünde en bol bulunan tiyol antioksidanlarından. İndirgenmiş (redükte) glutasyon (GSH) ve yükseltgenmiş (oksidasyon) glutasyon (GSSG) olarak 2 formu bulunmaktadır^{57,142}. Böylece hücrenin redüksiyon-oksidasyon dengesinde önemli bir maddedir. Glutasyon-S-transferazlar için kofaktör olarak görev almaktadırlar¹⁴³. Ana kaynağı ve en çok bulunduğu organ, ksenobiyotiklerin zehirsizleştirildiği (detoksifikasyon) karaciğerdir. Sonrasında GSH'nin en çok bulunan organlar ise akciğerler (3 kat az) böbrek ve testislerdir (2 kat az) . Karaciğer hücrelerinin sitozolünde 2-4 saatlik yarılanma ömrüne sahipken, mitokondrilerde 30 saatlik uzun bir yarılanma ömrüne sahiptir¹⁴⁴.

2.6.2.2. Melatonin

Melatonin vücutta beyinde bulunan pineal bezden karanlıkta ve sirkadiyen ritimde salgılanan bir hormondur. Bir çok görevi vardır. Ergenliğe kadar gonadal işlevlerin baskılanması, endokrin sistemin düzenlenmesi gibi fonksiyonları bulunmaktadır⁷. Bir diğer özelliği hem suda hem yağda çözünebilen bir antioksidan olmasıdır. Bu özelliği sayesinde vücudun her bölgesinde antioksidan sistemde görev alabilen önemli bir moleküldür^{145,146}.

Serbest radikallerle tepkimeye girip onları kendine bağlar. Bu özelliği güçlü bir antioksidan olmasına sebep olmaktadır. Bu tepkime sırasında indolil katyon radikaline

dönüşür. Melatonin lipofilik özellik göstermesinden dolayı hücre çekirdeğine kadar ulaşır, DNA'nın korunmasında özellikle önemli bir antioksidandır⁵⁷.

2.6.2.3. Miyoglobin ve Hemoglobin

Miyoglobinler, özellikle iskelet ve kalp kas hücreleri olan miyositlere oksijenin taşınmasında ve depolanmasında görev alırlar. Hemoglobinler ise kanda bulunan eritrositlerde en fazla bulunan ve sistemik olarak dokulara oksijenin taşınmasında görev alırlar. Hem molekülünün hemopeksine ya da hemoglobin haptoglobin bağlanması lipid peroksidasyonun gerçekleşmesini azaltır¹⁴⁷.

2.6.2.4. Askorbik Asit (C vitamini)

Bu C ve E vitaminleri birlikte çalışmaktadırlar ve Vit C, indirgenmiş Vit E üretimi için gereklidir. Suda çözünen enzimlerden biridir. Bu yüzden depo edilemez ve sürekli olarak vücuda dışarıdan alınması gerekir. Lipit peroksidasyon önce H₂O₂, süperoksit, oksijen ve peroksil su fazında baskılar. Nötrofillerin sebep olduğu peroksidasyonlarda, plazma lipitlerini koruyup hipoklorat radikalinin uzaklaştırılmasını sağlar⁶¹.

2.6.2.5. A- Tokoferol (E vitamini)

Dört farklı yapıdaki (alfa, beta, gamma ve delta) E vitaminlerinden en güçlü antioksidan olanı α – tokoferol'dür. Daha çok bitkisel kaynaklarda yaygın olarak bulunur. Yağda çözünen bir vitamindir. İçerdiği OH grubu sayesinde moleküller arası zincirlerin kırılmasına yardımcı olmaktadır^{61,148}.

2.6.2.6. Karotenoidler

Yağda çözücülerde çözünebilmektedir. Birkaç çeşidi bulunmaktadır. En önemli antioksidan etkiye sahip olan β - karoten, likopen, luteindir. β - karoten singlet oksijeni üzerinde ciddi antioksidan etkiye sahiptir. Aynı zamanda vücudun UV ışınların oluşturduğu oksidatif stresten korunmasında önemli role sahiptir¹⁴⁹.

2.6.2.7. Polifenoller

Polifenoller flavonoid olmayanlar, flavonoidler ve fenolik asitler olmak üzere 3 ana başlığa ayrılır¹⁵⁰. Yeşil çay flavonoid yapıdaki polifenoller içermektedir. Flavonoidlerin serbest radikallerle tepkimeye girerek, üretilen fenoksil radikalinin kararlı hale gelmesini sağlar¹⁵¹.

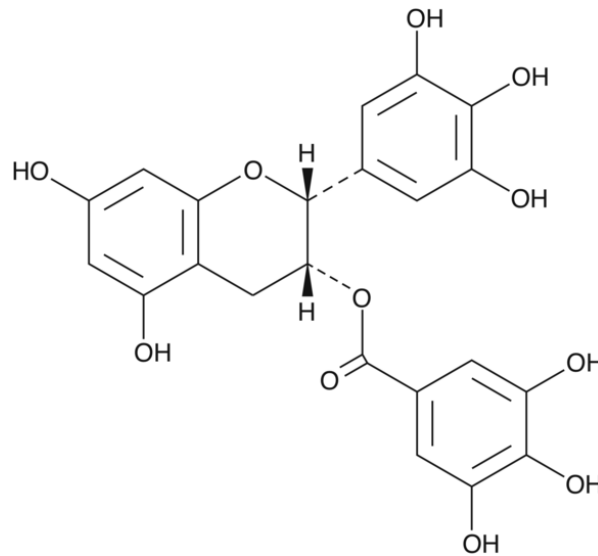
2.6.2.8. Sentetik antioksidanlar

Doğal antioksidanların özellikleri örnek alınarak üretilen yapay antioksidanlardır. Doğal antioksidanlara göre daha az etkili olmaları, akciğer ve karaciğerde hasara sebep olmaları kullanımları sınırlandırılmıştır¹⁵².

2.7.Epigallokateşin Gallat (EGCG)

Günümüz dünyasında sudan sonra en çok tüketilen içecek çaydır. Dünya geneli tahminlere göre günlük 120mL/gün kişi başı çay tüketimi mevcuttur. Çin ve Hindistan'dan köken olan *Camellia sinensis* adlı bitkiden çay elde edilmektedir¹⁵³.

Siyah, yeşil ve oolong olmak üzere, elde edilmiş yöntemlerine göre 3 çeşit çay bulunmaktadır. Taze toplanan yeşil çay yaprakları hemen buhardan geçirilerek işlenir. Böylece fermentasyondan kaçınılmış olunur. Yeşil renk veren pigmentlerin yıkımından sorumlu enzimler, buhar işleminden sonra etkisiz hale getirildiği için çay doğal yeşil haliyle kalır¹⁵⁴. Fermante işlemi geçirmediği için yeşil çayda kateşin grubu yüksek oranda bulunur^{155,156}. Yeşil çay içeriğinde en çok bulunan madde EGCG'dir (Şekil 2.4). Yeşil çayın antioksidan özelliğini içerdiği epigallokateşin gallat (EGCG), epigallokateşin (EGC), epikateşin (EC) ve epikateşin gallat (ECG) olmak üzere 4 tür kateşinden kaynaklanmaktadır. Bunlar içinde %60 oranına sahip EGCG tarafından sağlanır¹⁵⁷. Sonra miktarları sırasıyla EGC, EC, ECG olarak bulunmaktadır.



Şekil 2.4 EGCG molekülün kimyasal formülü

[https://www.caymanchem.com/product/70935/\(-\)-epigallocatechin-gallate](https://www.caymanchem.com/product/70935/(-)-epigallocatechin-gallate)

Kateşinler içerdikleri aromatik halkalar ve hidroksil grupları sayesinde serbest radikalleri yakalayarak etkisiz hale getirirler¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Biyomoleküllerimizin bu ROS'lar tarafından zarar görmesini engellerler. Ayrıca prooksidan özelliğe sahip siklooksijenaz, lipooksijenaz, nitrik oksit sentez (NOS) ve ksantin oksidaz gibi enzimleri baskılamak aynı zamanda SOD, GPr, GSR, CAT gibi antioksidan enzimlerin DNA üzerinden sentezini arttırarak indirek olarak da etki ederler¹⁶¹⁻¹⁶³. Kateşinler bir diğer antioksidan özellikleri ise metalleri bağlayarak reaktif oksijen türlerinin oluşmasını engellemesidir. Ayrıca 12-*o*-tetradekanoil porbol-13-asetat (TPA) 'ın ve 8-hidroksideoksi guanozin'in baskılayarak H₂O₂ oluşumunda engeller¹⁶⁴.

Yapılan pek çok *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda EGCG molekülünün antienflamatuar (sitokin üretimi, endotelyal aktivasyonu, nötrofil göçünü engelleyerek) , antioksidatif, antikarsinojenik ve iskemi-reperfüzyon sırasında oluşan hasara karşı koruduğu ortaya çıkarılmıştır¹⁶⁵. Bunun dışında akciğer, göğüs, kolon gibi kanser türlerinin gelişmesini engelleyici, yara iyileşmesine olumlu katkı yaptığı etkileri mevcuttur¹⁶⁶. Bir diğer çalışmada TNF- α indüklediği iltihabı (hücre-içi adezyon molekülü 1 (ICAM1) üzerinden) ve NADPH oksidazı engellediği gözler önüne serilmiştir¹⁶⁷.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırmamız rastgele (randomize) dağılımlı ve kontrollü deneysel çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmamızın hayvanların yetiştirilmesi, bakılması ve uygulamaların yapılması, deneyin sonlandırılması aşamasına kadar tüm basamakları 2019 Mayıs-Haziran tarihlerinde Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DÜDAM) gerçekleştirilmiştir. Bu süreç içinde deney hayvanları hiçbir şekilde Merkezimiz sınırları dışına çıkarılmamış ve farklı ortamlarda bulunmamıştır.

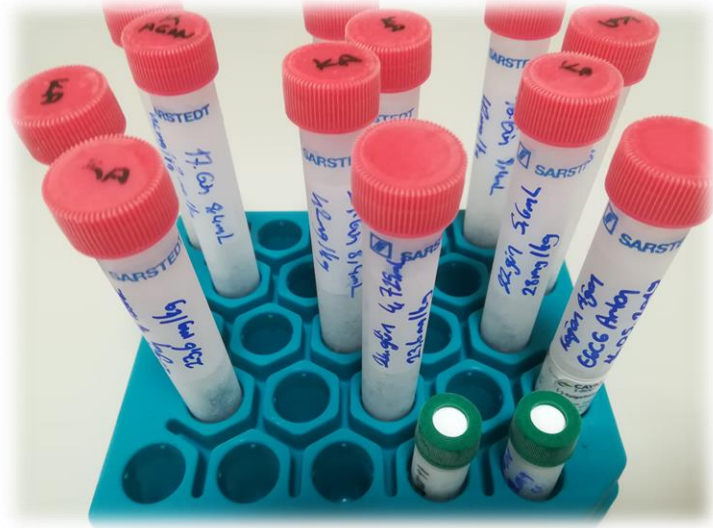
Çalışmamız için gerekli etik izni Düzce Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 16.04.2019 tarihli toplantısında 2019/3/1 karar no'lu belgeyle alınmıştır (Ek 1) .

3.3. Deney Hayvanlarının Bakım Koşulları

Bu çalışmada 2-3 aylık, 30 ± 5 g ağırlığında 84 adet CD1 türü erkek fare kullanılmıştır. Deney hayvanları laboratuvarında 12:12 otomatik foto periyodunda, 23 °C oda ısısında, $60\pm 5\%$ nem standart pellet yemle ve çeşme suyu ad libitum ortamlarda yetiştirilmiş ve bakılmıştır.

3.4. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması, Maddeler ve Dozları

Çalışmamızda rastgele seçilen hayvanlardan oluşan akut (42) ve kronik (42) olmak üzere iki ana grup ayrılmıştır. Her ana grup kendi içinde 6 alt gruba ayrılmıştır. Her bir grupta 7 deney hayvanı olacak şekilde toplamda 12 deney grubu oluşturulmuştur. Deney gruplarına sigara dumanı ve epigallokateşin gallat (EGCG) (Item No: 70935 - Cayman Chemical Company USA) uygulaması aşağıda **Tablo 3.1** ve **Tablo 3.2**'de belirtildiği şekilde uygulanmıştır. Firmanın görüşü alınarak, deneyler başlamadan önce EGCG her gün için ihtiyaç duyulacak miktarlar tartılıp falkon tüplere porsiyonlanarak etiketlenmiş ve -20°C 'de saklanmıştır (**Resim 3.1**) . Her günün falkona bölünmüş halde bulunan EGCG saf su ile tamamen çözdürüldükten sonra homojenize edilip uygulama gruplarına i.p. olarak uygulanmıştır (**Resim 3.2**) .

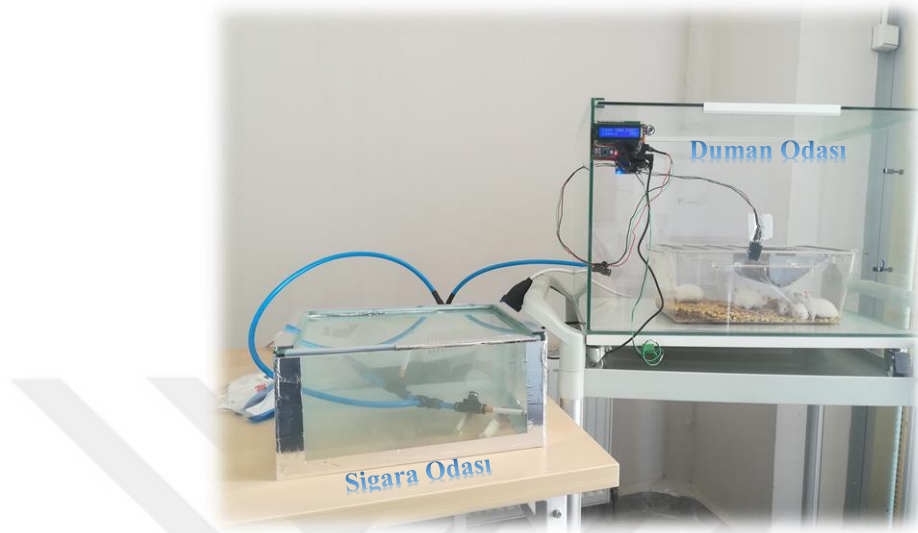


Resim 3.1 Günlük kullanım için tartılan ve falkonlara ayrılan EGCG tüpleri



Resim 3.2 İ.P. EGCG Uygulaması

Sigara dumanı uygulanmayan gruplarda yer alan sreler (180dk, 90dk) , pompanın emiş gücüne göre sigara veya sigaraların takıldığı (6 adete kadar) her seride 15 dk içinde yanmasından dolayı ortaya çıkan toplam srelerdir. Bu sreler ortam havasına maruz kalacak hayvanlar için hesaplanmıştır. Böylece tüm grupların eşit srelerde duman odasında (**Resim 3.3**) kalması sağlanmıştır. Çalışmamız uygulanacak sigara adedi üzerinden tasarlanmıştır.



Resim 3.3 Sigara dumanına maruziyet için yaptırılmış olan kafes tasarımı

3.4.1. Akut kontrol ortam havasına maruz kalan grup (AH0)

Bu grupta yer alan hayvanlar aynı şartlar altında duman odasına konulmuş pompayla duman odasının içine ortam havası pompalanmıştır. Bu uygulama yapılmadan önce kafes sigara dumanı etkisi olmaması için havalandırılmış ve temizlenmiştir. Sonrasında pompanın sigara dumanı için kullanılan hortumları değiştirilerek sigaranın yandığı odaya konulmadan doğrudan açığa bırakılarak ortam havasının kafese verilmesi sağlanmıştır. Bu işlem sadece 1 gün 180 dakika (dk) boyunca uygulanmıştır. Sonrasında hayvanlar anestezi altında eksanguinasyon yöntemiyle öldürülmüştür.

3.4.2. Akut kontrol sigara dumanına maruz kalan grup (AS0)

Bu grupta yer alan hayvanlar aynı şartlar altında duman odasına konulmuştur Her hayvan için 10 tane sigara peşpeşe yakılarak pompaya bağlanmıştır. Hem sigaralardan gelen ana akım, hem de sigara odasına dolan yan akım dumanı pompayla çekilerek duman odasındaki hayvanlara verilmiştir. Bu işlem sadece 1 gün 1 kez uygulanmıştır. Sonrasında hayvanlar anestezi altında eksanguinasyon yöntemiyle öldürülmüştür.

3.4.3. Akut 25 mg/kg EGCG uygulanan grup (AH25)

Bu grupta yer alan hayvanlar aynı şartlar altında önce 25 mg/kg oranında EGCG intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Sonrasında 180 dk duman odasında konulup ortam havası verilmiştir. Ardından hayvanlar anestezi altında eksanguinasyon yöntemiyle öldürülmüştür.

3.4.4. Akut 25 mg/kg EGCG + sigara dumanı uygulanan grup (AS25)

Bu grupta yer alan hayvanlar aynı şartlar altında önce 25 mg/kg oranında EGCG intraperitoneal olarak uygulanmış sonrasında 30 dk beklenilmiş ardından duman odasına konulmuştur. Her hayvan için 10 tane sigara peşpeşe yakılarak pompaya bağlanmıştır. Bu işlem sadece 1 gün 1 kez uygulanmıştır. Sigara odasına dolan hem ana akım dumanı, hem de yan akım dumanı pompayla çekilerek duman odasındaki hayvanlara verilmiştir. Sonrasında hayvanlar anestezi altında eksanguinasyon yöntemiyle öldürülmüştür.

3.4.5. Akut 50 mg/kg EGCG uygulanan grup (AH50)

Bu grupta yer alan hayvanlar aynı şartlar altında önce 50 mg/kg oranında EGCG intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Sonrasında 180 dk duman odasında konulup ortam havası verilmiştir. Ardından hayvanlar anestezi altında eksanguinasyon yöntemiyle öldürülmüştür.

3.4.6. Akut 50 mg/kg EGCG + sigara dumanı uygulanan grup (AS50)

Bu grupta yer alan hayvanlar aynı şartlar altında önce 50 mg/kg oranında EGCG intraperitoneal olarak uygulanmış sonrasında 30 dk beklenilmiş ardından duman odasına konulmuştur. Her hayvan için 10 tane sigara peşpeşe yakılarak pompaya bağlanmıştır. Bu işlem sadece 1 gün 1 kez uygulanmıştır. Sigara odasına dolan hem ana akım dumanı, hem de yan akım dumanı pompayla çekilerek duman odasındaki hayvanlara verilmiştir. Sonrasında hayvanlar anestezi altında eksanguinasyon yöntemiyle öldürülmüştür.

Tablo 3.1 Akut Deneş Grupları Tasarımı

Grup No	Grup Adı	Verilen Maddeler	Veriliş Yöntemi	Uygulanacak Maddelerin Hayvan Başına Verilen Miktar	Uygulanacak Hayvan Başına Dakika/Gün veya Kez/Gün Süresi	Hayvan Sayısı
1	AH0	Ortam Havası	İnhalasyon	-	180dk/gün	7
2	AS0	Sigara Dumanı	İnhalasyon	10 tane yanan sigaranın dumanı	180dk/gün	7
3	AH25	EGCG + Ortam Havası	İP	25 mg/kg	1kez/gün + 180dk/gün	7
4	AS25	EGCG + Sigara Dumanı	İP + İnhalasyon	25 mg/kg + 10 tane yanan sigaranın dumanı	1kez/gün + 180dk/gün	7
5	AH50	EGCG + Ortam Havası	İP	50 mg/kg	1kez/gün + 180dk/gün	7
6	AS50	EGCG + Sigara Dumanı	İP + İnhalasyon	50 mg/kg + 10 tane yanan sigaranın dumanı	1kez/gün + 180dk/gün	7

3.4.7. Kronik kontrol ortam havasına maruz kalan grup (KH0)

Bu grupta yer alan hayvanlar aynı şartlar altında kafese konulmuş pompayla duman odasının içine ortam havası pompalanmıştır. Bu uygulama yapılmadan önce kafes sigara dumanı etkisi olmaması için havalandırılmış ve temizlenmiştir. Sonrasında pompanın sigara dumanı için kullanılan hortumları değiştirilerek sigaranın yandığı odaya konulmadan doğrudan açığa bırakılarak ortam havasının duman odasına verilmesi sağlanmıştır. Bu işlem 21 gün boyunca 3kez/gün 60 dakika (dk) boyunca uygulanmıştır. Sonrasında hayvanlar anestezi altında eksanguinasyon yöntemiyle öldürülmüştür.

3.4.8. Kronik kontrol sigara dumanına maruz kalan grup (KS0)

Bu grupta yer alan hayvanlar aynı şartlar altında duman odasına konulmuştur. Her hayvan için 3 tane sigara peşpeşe yakılarak pompaya bağlanmıştır. Bu uygulama 21 gün boyunca 3kez/gün oranında tekrarlanmıştır. Sigara odasına dolan hem ana akım dumanı

hem de yan akım dumanı pompayla çekilerek duman odasındaki hayvanlara verilmiştir. 22.günde hayvanlar anestezi altında eksanguinasyon yöntemiyle öldürülmüştür.

3.4.9. Kronik 25 mg/kg EGCG uygulanan grup (KH25)

Bu grupta yer alan hayvanlar aynı şartlar altında önce 25 mg/kg oranında EGCG intraperitoneal olarak 21 gün boyunca 1kez/gün olarak uygulanmıştır. Sonrasında 21 gün boyunca 3kez/gün 60 dakika (dk) duman odasında koyulup ortam havası verilmiştir. Ardından 22.günde hayvanların anestezi altında eksanguinasyon yöntemiyle öldürülmüştür. Hayvanlar anestezi altında eksanguinasyon yöntemiyle öldürülmüştür.

3.4.10. Kronik 25 mg/kg EGCG + sigara dumanı uygulanan grup (KS25)

Bu grupta yer alan hayvanlar aynı şartlar altında önce 25 mg/kg oranında EGCG intraperitoneal olarak uygulanmış sonrasında 30 dk beklenilmiş ardından duman odasına konulmuştur. Her hayvan için 3 tane sigara peşpeşe yakılarak pompaya bağlanmıştır. Bu uygulama 21 gün boyunca 3kez/gün oranında tekrarlanmıştır. Sigara odasına dolan hem ana akım dumanı hem de yan akım dumanı pompayla çekilerek duman odasındaki hayvanlara verilmiştir. 22.günde hayvanlar anestezi altında eksanguinasyon yöntemiyle öldürülmüştür.

3.4.11. Kronik 50 mg/kg EGCG uygulanan grup (KH50)

Bu grupta yer alan hayvanlar aynı şartlar altında önce 50 mg/kg oranında EGCG intraperitoneal olarak 21 gün boyunca 1kez/gün olarak uygulanmıştır. Sonrasında 21 gün boyunca 3kez/gün 60 dakika (dk) duman odasında koyulup ortam havası verilmiştir. Ardından 22.günde hayvanların anestezi altında eksanguinasyon yöntemiyle öldürülmüştür.hayvanlar anestezi altında eksanguinasyon yöntemiyle öldürülmüştür.

3.4.12. Kronik 50 mg/kg EGCG + sigara dumanı uygulanan grup (KS50)

Bu grupta yer alan hayvanlar aynı şartlar altında önce 50 mg/kg oranında EGCG intraperitoneal olarak uygulanmış sonrasında 30 dk beklenilmiş ardından duman odasına konulmuştur. Her hayvan için 3 tane sigara peşpeşe yakılarak pompaya bağlanmıştır. Bu uygulama 21 gün boyunca 3kez/gün oranında tekrarlanmıştır. Sigara odasına dolan hem ana akım dumanı hem de yan akım dumanı pompayla çekilerek duman odasındaki hayvanlara verilmiştir. 22.günde hayvanlar anestezi altında eksanguinasyon yöntemiyle öldürülmüştür.

Tablo 3.2 Kronik Deney Grupları Tasarımı

Grup No	Grup Adı	Verilen Maddeler	Veriliş Yöntemi	Uygulanacak Maddelerin Hayvan Başına Verilen Miktar	Uygulanacak Hayvan Başına Dakika/Gün veya Kez/Gün Süresi	Hayvan Sayısı
7	KH0	Ortam Havası	İnhalasyon	-	60dk/3kez/21gün	7
8	KS0	Sigara Dumanı	İnhalasyon	3 tane yanan sigaranın dumanı	60dk/3kez/21gün	7
9	KH25	EGCG + Ortam Havası	İP	25 mg/kg	1kez/21gün + 60dk/3kez/21gün	7
10	KS25	EGCG + Sigara Dumanı	İP + İnhalasyon	25 mg/kg + 3 tane yanan sigaranın dumanı	1kez/21gün + 60dk/3kez/21gün	7
11	KH50	EGCG + Ortam Havası	İP	50 mg/kg	1kez/21Gün + 60dk/3kez/21gün	7
12	KS50	EGCG + Sigara Dumanı	İP + İnhalasyon	50 mg/kg + 3 tane yanan sigaranın dumanı	1kez/21Gün + 60dk/3kez/21gün	7

3.5.Cerrahi İşlemleri

Tüm farelere cerrahi işlemi öncesinde ketamin/ksilazin anestezikleri sırasıyla 200/10 mg/kg dozlarında hesaplanarak intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Bütün hayvanların tam anesteziye girdiklerinden, pençe ve göz reflektleri kontrol edilerek, emin olunduktan sonra abdomende median hatta çeneye doğru kesi yapıldıkmış ve sternum kaldırılmıştır. Doğrudan olarak eksanguinasyon (Şekil 3.4) yöntemiyle kan alınmıştır. Hayvanların öldüğünden emin olunmuştur. Alınan kanlar +4°C'de 4000 rpm 10dk santrifüj edildikten (Nüve NF1200R, Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Tic. A.Ş., Ankara, Türkiye) sonra serumları alınıp -80°C buzdolabında (Nüve DF590, Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Tic. A.Ş., Ankara, Türkiye) saklanmıştır.



Resim 3.4 Anestezi altında eksanguinasyon

3.6.ELISA İşlemleri

Çalışmamızda karaciğer toksisitesini değerlendirmek için AST ve ALT, sigara dumanına maruziyeti ölçmek için kotinin, antioksidan sistem ve oksidatif stres için ise CAT, GPx, GST ve SOD kitleri (Sunredbio, Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd, Şanghai, Çin) kullanıldı. Değerlendirmeler için aşağıda listelenen işlem basamakları uygulandıktan sonra plateler Biotek 800 TS Absorbance Reader makinası (Şekil 3.5) kullanılmıştır. Her bir ayrı kitle beraber verilen standart değerlerin soğurma (absorbans) değeri ve yoğunlukları (konsantrasyo) değerleri kullanılarak, $R^2 = 1$ Denklemde en yakın şartını sağlayan eğrinin formül elde edilmiş, her örnek için ELISA okuyucunun verdiği değerler bu formüllere yazılarak gerçek miktarları elde edilmiştir.

Kit içeriği:

1. Standart
2. Standart diluent
3. Mikroelisa
4. 96 kuyucuklu (12kuyucuk X 8şerit) ELISA mikrolate
5. Str-HRP Konjugasyon Reaktif
6. 30X yıkama solüsyonu
7. Biotin Ab (her kit ayrı)
8. Kromojen A ve B
9. Durdurma solüsyonu



Resim 3.5 ELISA okumasında kullanılan cihaz

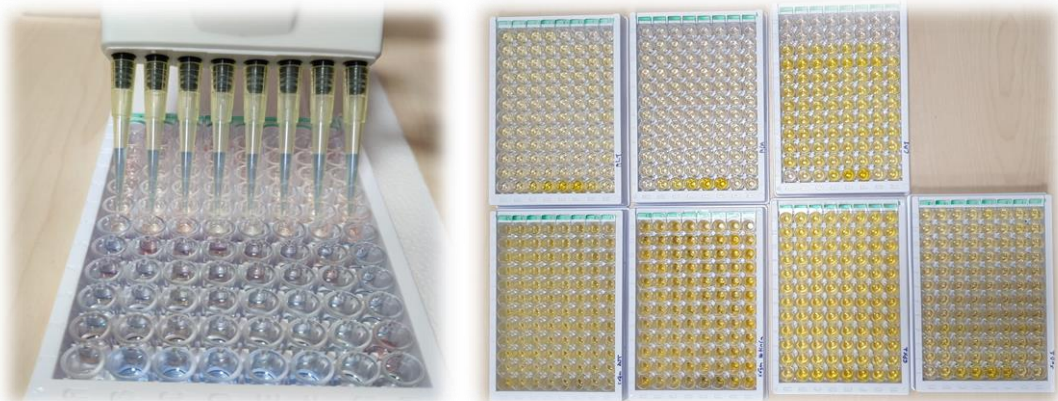
ELISA testi hazırlık aşaması

- Standartlar oluşturulurken 5 ependorf tüpü numaralandırılmış ve hazırlanmıştır. Her tüpe 120µL standart dilüent eklenmiştir. 800U/L olan standarttan 120µL ½ dilüsyon yapılarak 400U/L 1. standart oluşturulmuştur. 1. standarttan 120µL alınıp ½ dilüsyon yapılarak 200U/L 2. Standart oluşturulmuştur. Her defasında hazırlanan standartlardan 120µL alınıp ½ dilüsyon yapılarak 3. standart 100U/L, 4. standart 50U/L ve 5. standart 25U/L oluşturulmuştur. Her aşamada önce pipetaj sonrasında vorteksenerek homojen dağılım sağlanmıştır. Standartlar oluşturulurken kullanılan değerler kit içeriğinde bulunan standart yoğunluklarına göre değişiklik göstermesine rağmen, aynı işlemler sırasıyla uygulanmıştır. Sonuç olarak 5 standart her kit için ayrı ayrı hazırlanmıştır.
- -80°C saklanan kanlar çalışmadan 12 saat önce -20°C'ye, 4 saat önce +4°C'ye, çalışmadan 1 saat önce oda sıcaklığında tutularak çalışma için hazır hale getirilmiştir. Vorteklenip homojenize edildikten sonra analizlerde kullanılmıştır.
- 30X olarak gelen yıkama solüsyonu 30 kez seyreltilerek hazırlanmıştır.

ELISA testi basamaklarının uygulanması aşaması

- 96'lık plate ilk kuyucuk blank kuyucuğudur. Bu kuyucuk Chromogen solüsyon A ve B koyuluncaya kadarki işlemlerde kuyucuk boş bırakılmıştır.

- Blankın hemen altından başlayarak 5 farklı stardattan 50 μL alınıp 5 farklı kuyucuğa koyulmuştur. Standartların üstüne 50 μL Streptavidin-HRP eklenmiştir.
- Standartların yer aldığı kuyucukların hemen altından ise örneklerden 40 μL , biotin – Ab antBADİDEN 10 μL , Streptavidin-HRP 50 μL her numune için her bir ayrı kuyucuğa koyulmuştur.
- Sonrasında plate üstü kitle gönderilen şeffaf jelatinle kapatılıp, buharlaşmaya karşı önlem alındıktan sonra 60dk, 37⁰C’de inkübasyona bırakılmıştır.
- İlk inkübasyondan sonra plate ters çevrilerek içeriği boşaltılmış peşine 5 tekrarlı olmak üzere her kuyucuğa en az 350 μL önceden hazırlanan yıkama solüsyonuyla yıkanmıştır.
- Yıkama işlemi bittikten sonra tüm kuyucuklara 50 μL Chromogen solüsyon A ve 50 μL Chromogen solüsyon B eklenip hafifçe çalkalanmış ve 10dk, 37⁰C’de inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşamada Chromogen A ve B solüsyonlarının ışığa maruz kalmasından mümkün olduğunca kaçınılmıştır.
- 2.inkübasyon işleminden sonra 50 μL durdurucu (stop) solüsyonu kuyucuklara eklenmiştir. Renk değişimi görülmüştür (Şekil 3. 6) .
- Durdurucu solüsyon eklendikten sonra 15dk içinde 450nm dalgaboyunda plate optik yoğunluk (optical density - OD) ölçülmüştür.
- Daha sonra standartların yoğunluklarından ve OD değerlerinden yararlanılarak, standart eğrisi bulunmuş ve formülü hesaplanmıştır. Formülde örneklerin OD değerleri kullanılarak örneklerin yoğunlukları hesaplanmıştır.



Resim 3.6 ELISA analizlerinde substrat (mavi renk) ve stop (sarı renk) solüsyonu eklenmiş plateler

3.7. İstatistiksel Analiz

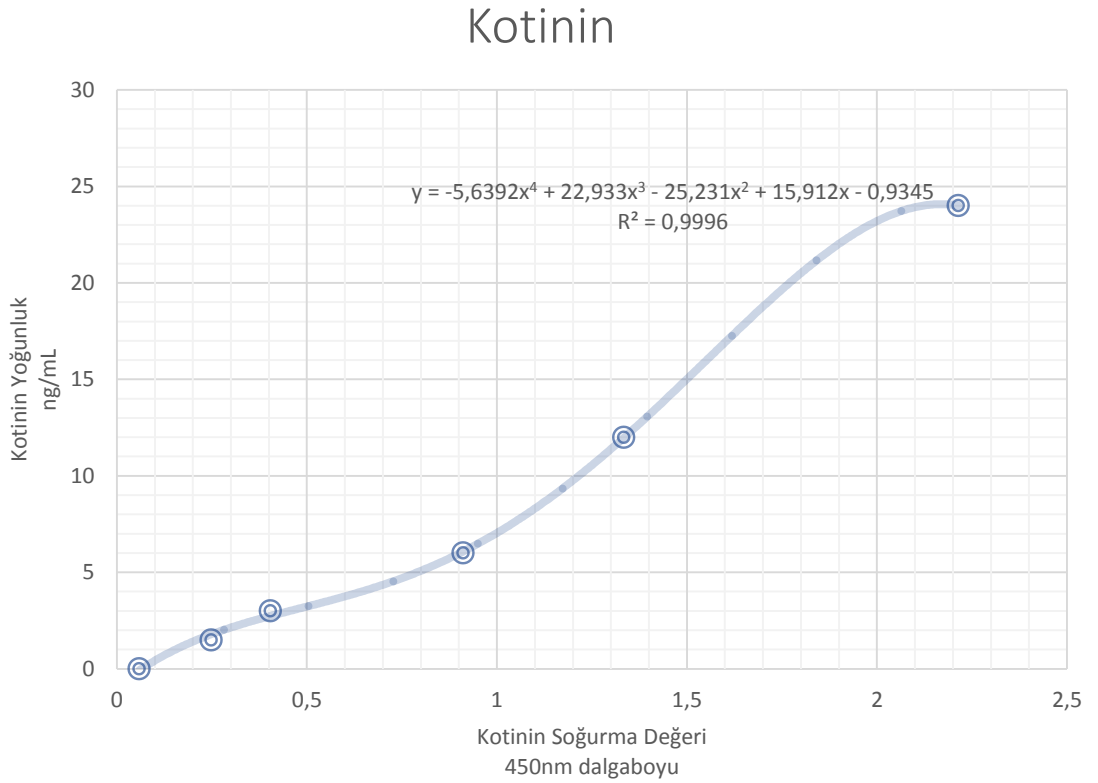
Verilerin istatistiksel analizleri SPSS v.22 ve Statistica paket programları ile yapılmıştır. Uygulama şekli, uygulama ve doz etkisinin birlikte etkisini (etkileşimini) değerlendirmek amacıyla Üç Yönlü Faktöriyel Varyans Analizi kullanılmıştır. Etkileşimin anlamlı bulunması durumunda çoklu karşılaştırmalar için LSD testi kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma cinsinden tablo şeklinde özetlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi 0,05 olarak dikkate alınmıştır.



4. BULGULAR

4.1. Sigara Dumanı ve EGCG Uygulamasının Serum Kotinin Düzeyine Etkisi

Serum kotinin düzeyleri hesaplanmasında yoğunlukları bilinen standartların ELISA okuyucuda elde edilen soğurma değerleri kullanılarak “ $y = -5,6392x^4 + 22,933x^3 - 25,231x^2 + 15,912x - 0,9345$ ” formülü hesaplanmıştır. “y” yoğunluk (konsantrasyon) değerini vermektedir. “x” değeri ise örneklerin ELISA okuyucuda elde edilen soğurma (absorbans) değerini temsil etmektedir. Formülde “x” değeri yerine konulduğunda her bir hayvanın serum kotinin yoğunluğu hesaplanmıştır. Denklemden $R^2 = 0,9996$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.1) .



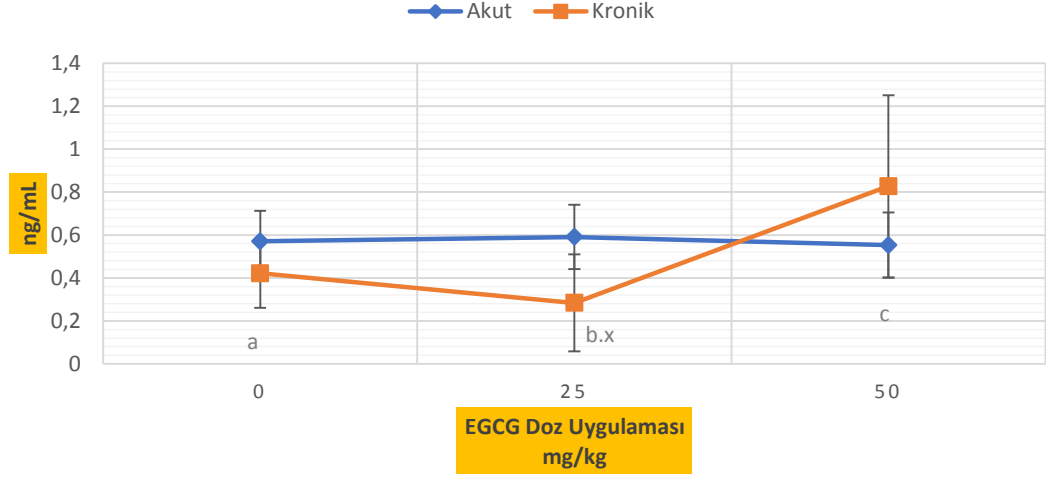
Şekil 4.1 Kotinin standart eğrisi

Tablo 4.1 Tüm Grupların Serum Kotinin değerleri

<i>Gruplar</i>	<i>Ortalama Değeri</i>	<i>Standart Sapma Değeri</i>	<i>Ortalama En Yüksek Değeri</i>	<i>Ortalama En Düşük Değeri</i>
AH0	0,571	0,142	0,713	0,429
AS0	0,537	0,156	0,693	0,381
AH25	0,591	0,15	0,741	0,441
AS25	0,353	0,147	0,5	0,206
AH50	0,553	0,152	0,705	0,401
AS50	0,68	0,208	0,888	0,472
KH0	0,422	0,161	0,583	0,261
KS0	0,63	0,181	0,811	0,449
KH25	0,284	0,226	0,51	0,058
KS25	0,313	0,136	0,449	0,177
KH50	0,827	0,424	1,251	0,403
KS50	0,803	0,466	1,269	0,337

Tablo 4.1'de verilen kotinin değerleri için grup (akut veya konik uygulama) , maruziyet (sigara dumanı veya ortam havası) ve doz (0, 25 veya 50 mg/kg uygulamayı) parametrelerinin üçünün birlikte etkisi (üçlü etkileşim) dikkate alındığında anlamlı fark göstermemektedir ($p=0,167$) . Doz-maruziyet ($p=0,227$) ve grup-maruziyet ($p=0,226$) ikili etkileşimleri anlamlı farklılık göstermemesine rağmen grup-doz arasında anlamlı fark görülmüştür ($p=0,011$) .

ORTAM HAVASINA MARUZİYET

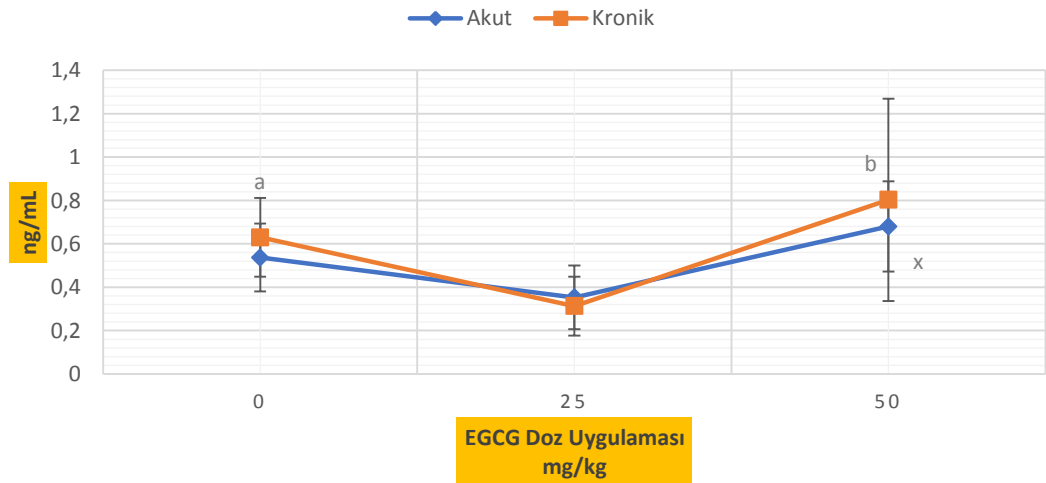


Şekil 4.2 Ortam havasına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum kotinin değerleri

a: KH50*KH0, b: KH50*KH25, c: KH50*AH50; x:AH25*KH25 gruplarının karşılaştırmasını göstermektedir.

Şekil 4.2’de Ortam havasına maruz kalan gruplar arasında yapılan değerlendirmelerde KH50 grubuyla sırasıyla, KH0 ($p = 0,002$), KH25 ($p < 0,001$) ve AH50 ($p=0,035$) grupları ve AH25 ile KH25 ($p = 0,009$) grupları arasındaki karşılaştırmalarda kotinin düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmuştur.

SIGARA DUMANINA MARUZİYET



Şekil 4.3 Sigara dumanına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum kotinin değerleri

a: KS25 X KS0, b: KS25 X KS50; x: AS25*AS50 gruplarının karşılaştırmasını göstermektedir.

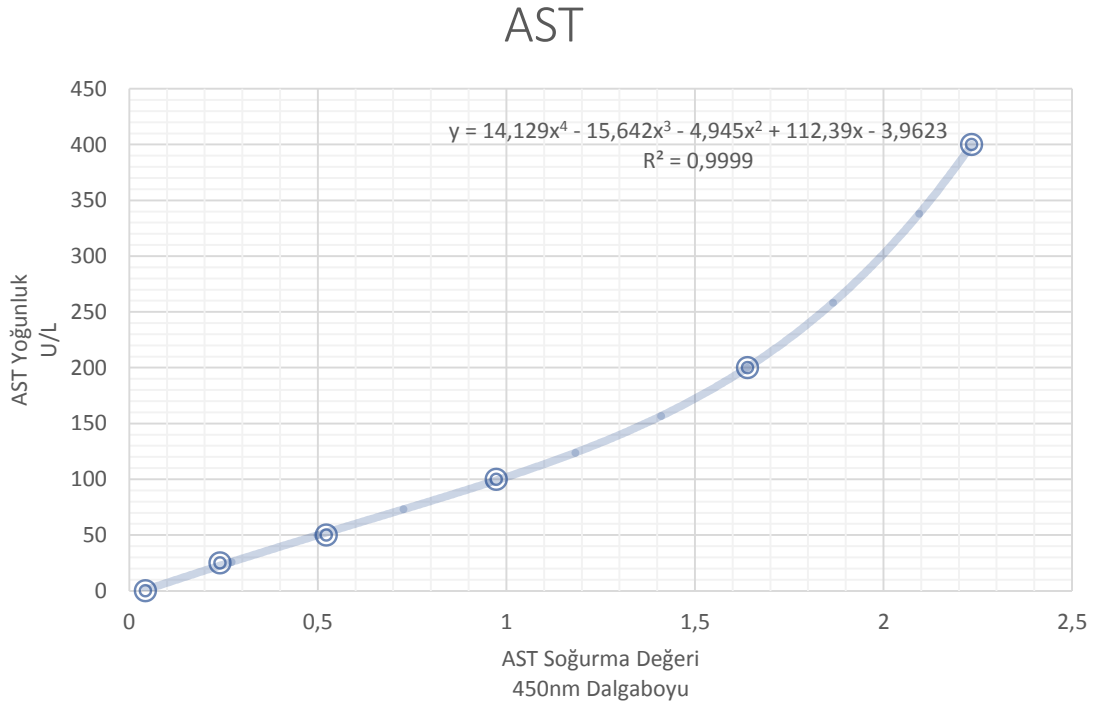
Şekil 4.3'te Sigara dumanına maruz kalan gruplar arasında yapılan değerlendirmelerde KS25 grubunun kotinin düzeyi sırasıyla KS0 ($p = 0,007$) ve KS50 ($p < 0,001$) gruplarından istatistiksel olarak düşük bulunmuştur. AS50 grubunun kotinin düzeyi ise AS25 ($p = 0,007$) grubundan istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur.

4.2. Sigara Dumanı ve EGCG Uygulamasının Karaciğer Toksisitesi Üzerine Etkisi

Karaciğer toksisitesinin değerlendirilmesi, karaciğer hücrelerinde bulunan AST ve ALT değerlerinin serum seviyeleri ölçülerek yapılmıştır.

4.2.1. Sigara dumanı ve EGCG uygulamasının serum AST düzeyine etkisi

Serum AST düzeyleri hesaplanmasında yoğunlukları bilinen standartların ELISA okuyucuda elde edilen soğurma değerleri kullanılarak “ $y = 14,129x^4 - 15,642x^3 - 4,945x^2 + 112,39x - 3,9623$ ” formülü hesaplanmıştır. “y” yoğunluk (konsantrasyon) değerini vermektedir. “x” değeri ise örneklerin ELISA okuyucuda elde edilen soğurma (absorbans) değerini temsil etmektedir. Formülde “x” değeri yerine konulduğunda her bir hayvanın serum AST yoğunluğu hesaplanmıştır. Denklemden $R^2 = 0,9999$ olarak hesaplanmıştır (**Şekil 4.4**).



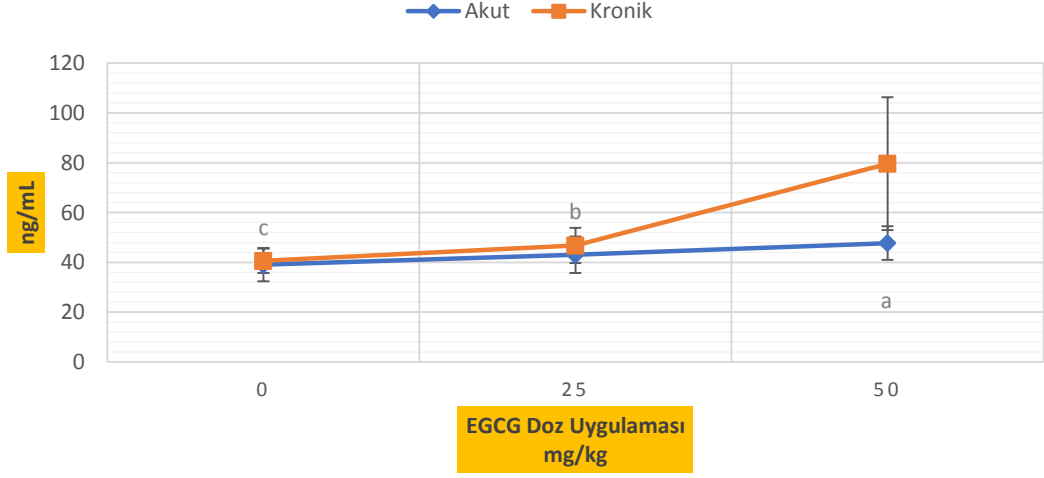
Şekil 4.4 AST standart eğrisi

Tablo 4.2 Tüm Grupların Serum AST değerleri

<i>Gruplar</i>	<i>Ortalama Değeri</i>	<i>Standart Sapma Değeri</i>	<i>Ortalama En Yüksek Değeri</i>	<i>Ortalama En Düşük Değeri</i>
AH0	39,037	6,669	45,706	32,368
AS0	38,152	9,105	47,257	29,047
AH25	43,055	7,303	50,358	35,752
AS25	29,792	3,228	33,02	26,564
AH50	47,735	6,721	54,456	41,014
AS50	37,312	5,41	42,722	31,902
KH0	40,604	4,892	45,496	35,712
KS0	54,219	13,878	68,097	40,341
KH25	46,789	7,053	53,842	39,736
KS25	58,906	11,034	69,94	47,872
KH50	79,617	26,7	106,317	52,917
KS50	59,563	22,121	81,684	37,442

Tablo 4.2'de verilen AST değerleri dikkate alındığında, grup (akut veya konik uygulama) , maruziyet (sigara dumanı veya ortam havası) ve doz (0, 25 veya 50 mg/kg uygulanması) parametrelerinin üçünün birlikte etkisi (üçlü etkileşim) dikkate alındığında anlamlı fark göstermemektedir (p=0,018) .

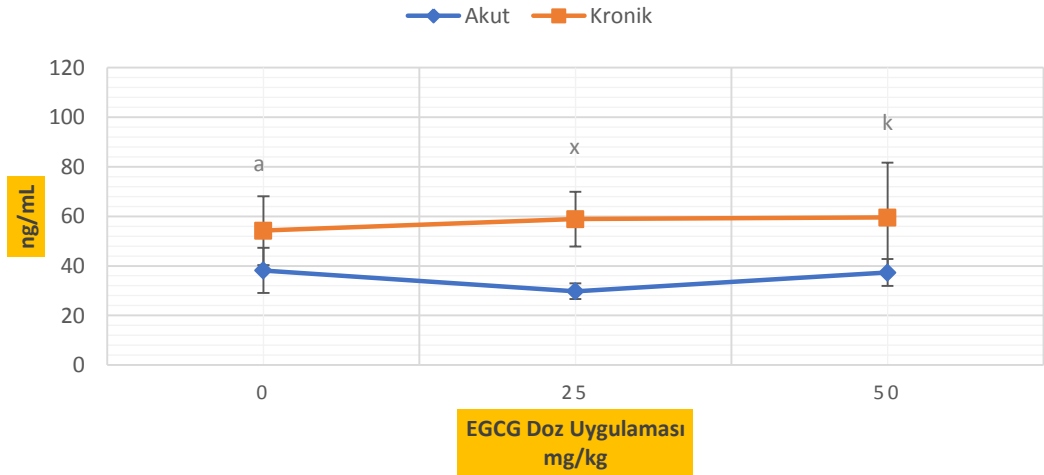
ORTAM HAVASINA MARUZİYET



Şekil 4.5 Ortam havasına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum AST değerleri
a: KH50 X AH50, b: KH50 X KH25, c: KH50 X KH0 gruplarının karşılaştırmasını göstermektedir.

Şekil 4.5'te Ortam havasına maruz kalan gruplar arasında yapılan değerlendirmelerde KH50 grubunun serum AST değerleri bakımından AH0, KH25 ve KH50 gruplarından istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0,001$) olarak yüksek olduğu bulunmuştur.

SIGARA DUMANINA MARUZİYET

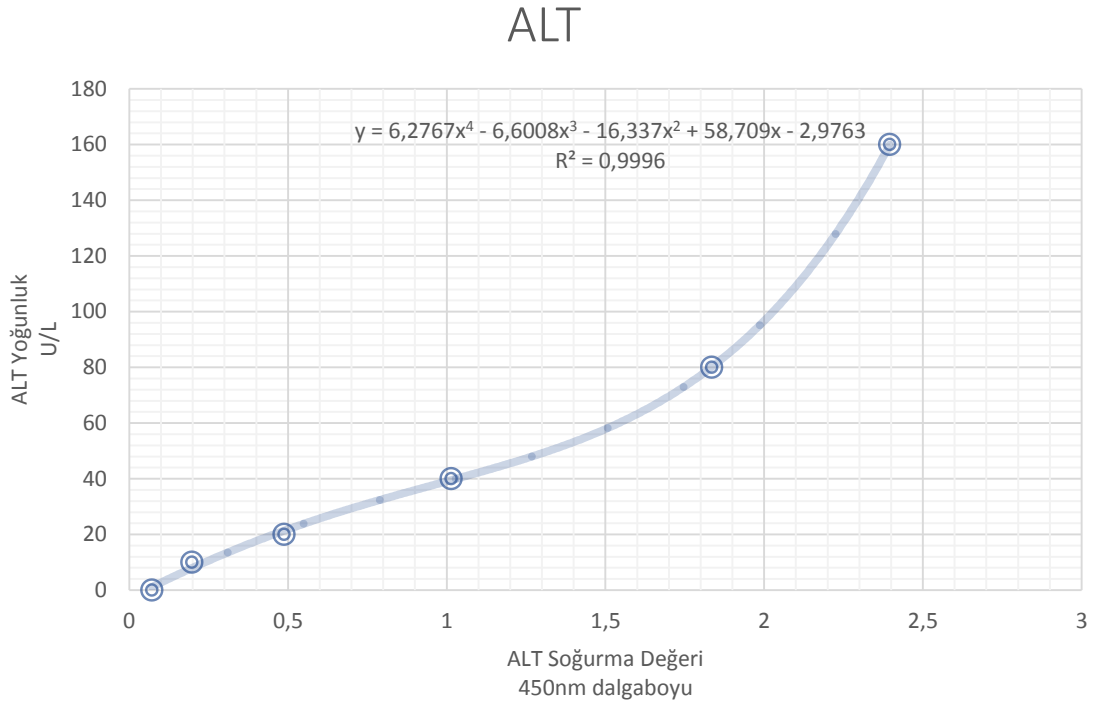


Şekil 4.6 Sigara dumanına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum AST değerleri.
a: AS0 X KS0; x: AS25 X KS25; k: AS50 X KS50 gruplarının karşılaştırmasını göstermektedir.

Şekil 4.6'da Sigara dumanına maruz kalan gruplar arasında yapılan değerlendirmelerde akut gruplardaki grubunun serum AST değerlerinin kronik gruplardakilerden istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük bulunduğu bulunmuştur. AS0 grubu KS0 grubundan ($p = 0,008$) ; AS25 grubu KS25 grubundan ($p < 0,001$) ; AS50 grubu KS50 grubundan ($p < 0,001$) istatistiksel olarak düşük olduğu görülmektedir.

4.2.3. Sigara dumanı ve EGCG uygulamasının serum ALT düzeyine etkisi

Serum ALT düzeyleri hesaplanmasında yoğunlukları bilinen standartların ELISA okuyucuda elde edilen soğurma değerleri kullanılarak “ $y = 6,2767x^4 - 6,6008x^3 - 16,337x^2 + 58,709x - 2,9763$ ” formülü hesaplanmıştır. “y” yoğunluk (konsantrasyon) değerini vermektedir. “x” değeri ise örneklerin ELISA okuyucuda elde edilen soğurma (absorbans) değerini temsil etmektedir. Formülde “x” değeri yerine konulduğunda her bir hayvanın serum ALT yoğunluğu hesaplanmıştır. Denklemden $R^2 = 0,9996$ olarak hesaplanmıştır (**Şekil 4.7**) .



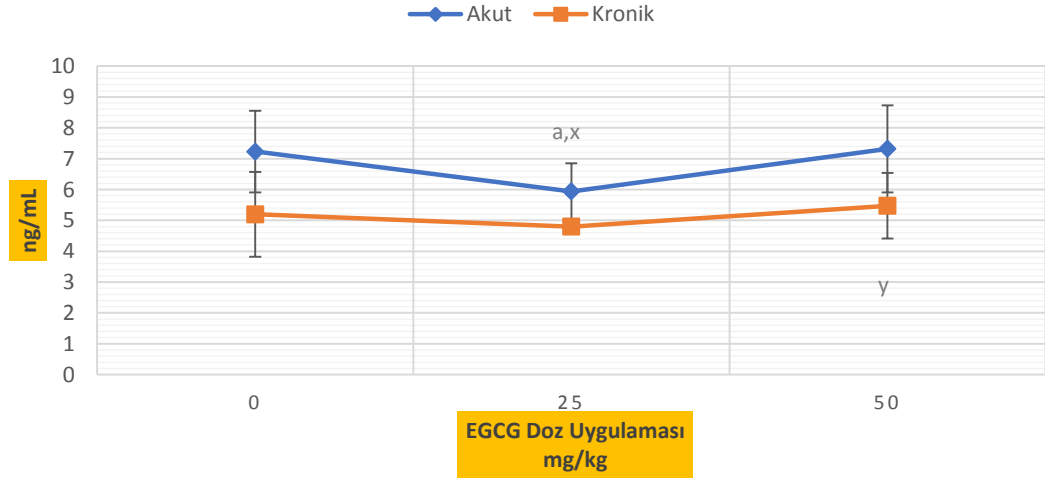
Şekil 4.7 ALT standart eğrisi

Tablo 4.3 Tüm Grupların Serum ALT değerleri

<i>Gruplar</i>	<i>Ortalama Değeri</i>	<i>Standart Sapma Değeri</i>	<i>Ortalama En Yüksek Değeri</i>	<i>Ortalama En Düşük Değeri</i>
AH0	7,229	1,322	8,551	5,907
AS0	6,538	0,939	7,477	5,599
AH25	5,938	0,912	6,85	5,026
AS25	5,485	1,79	7,275	3,695
AH50	7,318	1,415	8,733	5,903
AS50	7,741	0,889	8,63	6,852
KH0	5,196	1,378	6,574	3,818
KS0	5,521	1,291	6,812	4,23
KH25	4,799	0,243	5,042	4,556
KS25	5,708	0,683	6,391	5,025
KH50	5,473	1,066	6,539	4,407
KS50	5,277	1,784	7,061	3,493

Tablo 4.3'te verilen ALT değerleri için grup (akut veya konik uygulama) , maruziyet (sigara dumanı veya ortam havası) ve doz (0, 25 veya 50 mg/kg uygulamayı) parametrelerinin üçünün birlikte etkisi (üçlü etkileşim) dikkate alındığında anlamlı fark göstermemektedir ($p=0,286$) . Doz-maruziyet ($p=0,804$) ve grup-maruziyet ($p=0,275$) ikili etkileşimleri anlamlı farklılık göstermezken sadece grup-doz arasında anlamlı fark görülmüştür ($p=0,038$) .

ORTAM HAVASINA MARUZİYET

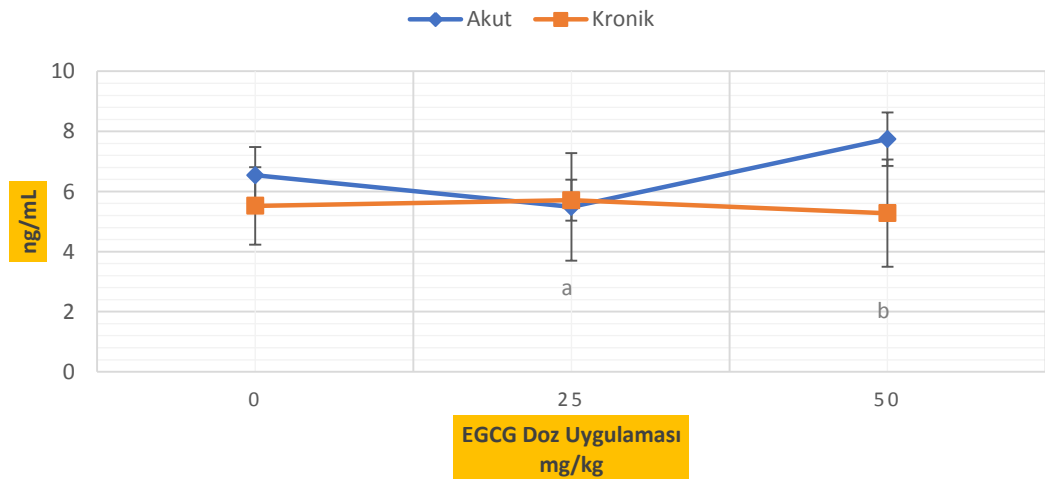


Şekil 4.8 Ortam havasına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum ALT değerleri

a: AH0 X AH25; x: AH50 X AH25, y: AH50 X KH50 gruplarının karşılaştırmasını göstermektedir.

Şekil 4.8’de Ortam havasına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum ALT değerleri gruplar arasında yapılan değerlendirmelerde AH0 grubu AH25 grubundan istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek, AH50 grubu ise hem AH25 ($p = 0,026$) hemde KH50 gruplarından ($p = 0,006$) anlamlı olarak yüksek olduğu görülmüştür.

SIGARA DUMANINA MARUZİYET



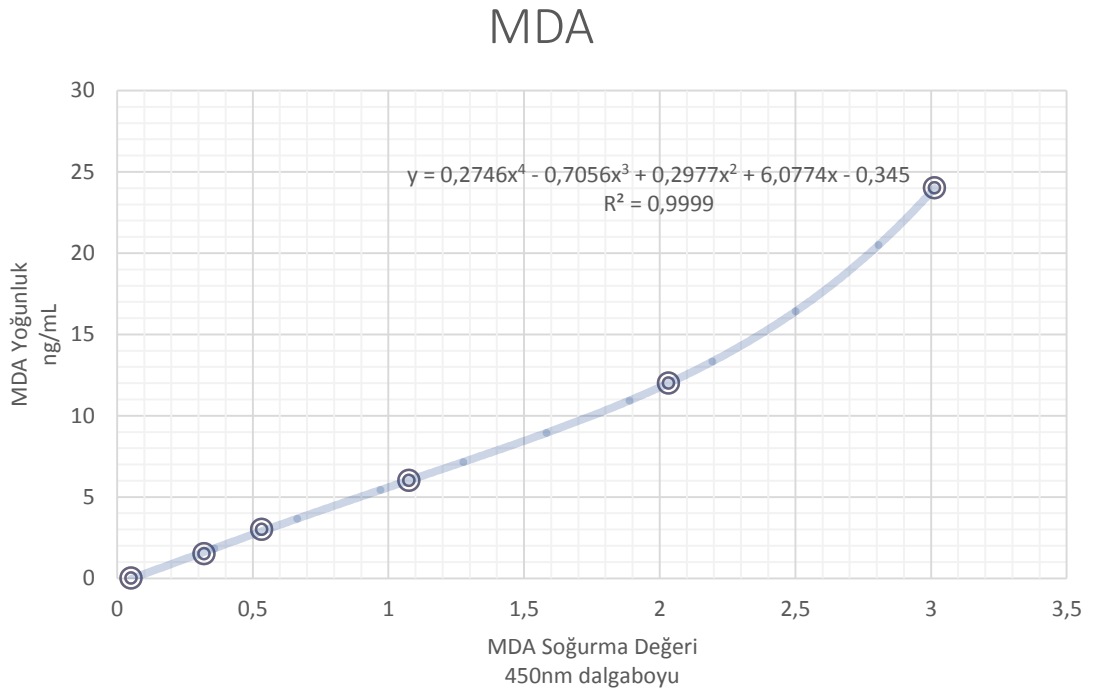
Şekil 4.9 Sigara dumanına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum ALT değerleri.

a: AS50 X AS25; b: AS50 X KS50 gruplarının karşılaştırmasını göstermektedir.

Şekil 4.9’da Sigara dumanına maruz kalan gruplar arasında yapılan değerlendirmelerde AS50 grubunun serum ALT değerinin sırasıyla AS25 (p < 0,001) ve KS50 (p < 0,001) gruplarından istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur.

4.3.Sigara Dumanı ve EGCG Uygulamasının Serum MDA Düzeyine Etkisi

Serum MDA düzeyleri hesaplanmasında yoğunlukları bilinen standartların ELISA okuyucuda elde edilen soğurma değerleri kullanılarak “ $y = 0,2746x^4 - 0,7056x^3 + 0,2977x^2 + 6,0774x - 0,345$ ” formülü hesaplanmıştır. “y” yoğunluk (konsantrasyon) değerini vermektedir. “x” değeri ise örneklerin ELISA okuyucuda elde edilen soğurma (absorbans) değerini temsil etmektedir. Formülde “x” değeri yerine konulduğunda her bir hayvanın serum MDA yoğunluğu hesaplanmıştır. Denklemden $R^2 = 0,9999$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.10) .



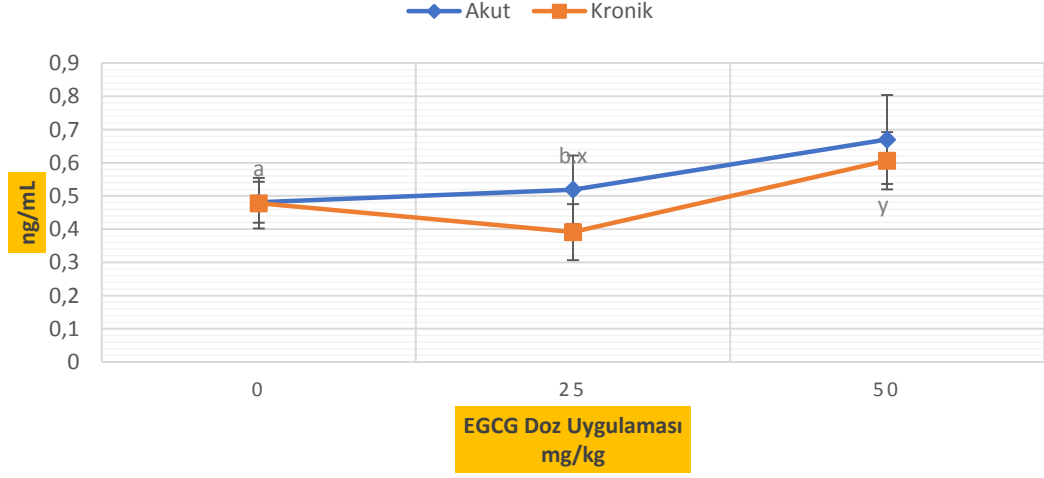
Şekil 4.10 ALT standart eğrisi

Tablo 4.4 Tüm Grupların Serum MDA değerleri

<i>Gruplar</i>	<i>Ortalama Değeri</i>	<i>Standart Sapma Değeri</i>	<i>Ortalama En Yüksek Değeri</i>	<i>Ortalama En Düşük Değeri</i>
AH0	0,481	0,062	0,543	0,419
AS0	0,481	0,085	0,566	0,396
AH25	0,519	0,103	0,622	0,416
AS25	0,45	0,051	0,501	0,399
AH50	0,67	0,134	0,804	0,536
AS50	0,464	0,099	0,563	0,365
KH0	0,478	0,076	0,554	0,402
KS0	0,545	0,087	0,632	0,458
KH25	0,391	0,084	0,475	0,307
KS25	0,549	0,077	0,626	0,472
KH50	0,606	0,086	0,692	0,52
KS50	0,404	0,064	0,468	0,34

Tablo 4.4'te verilen MDA değerleri için grup (akut veya konik uygulama) , maruziyet (sigara dumanı veya ortam havası) ve doz (0, 25 veya 50 mg/kg uygulamayı) parametrelerinin üçünün birlikte etkisi (üçlü etkileşim) dikkate alındığında anlamlı fark göstermemektedir ($p=0,079$) . Doz-maruziyet ($p<0,001$) ve grup-maruziyet ($p=0,018$) ikili etkileşimleri anlamlı farklılık gösterirken, grup-doz arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p=0,209$) .

ORTAM HAVASINA MARUZİYET

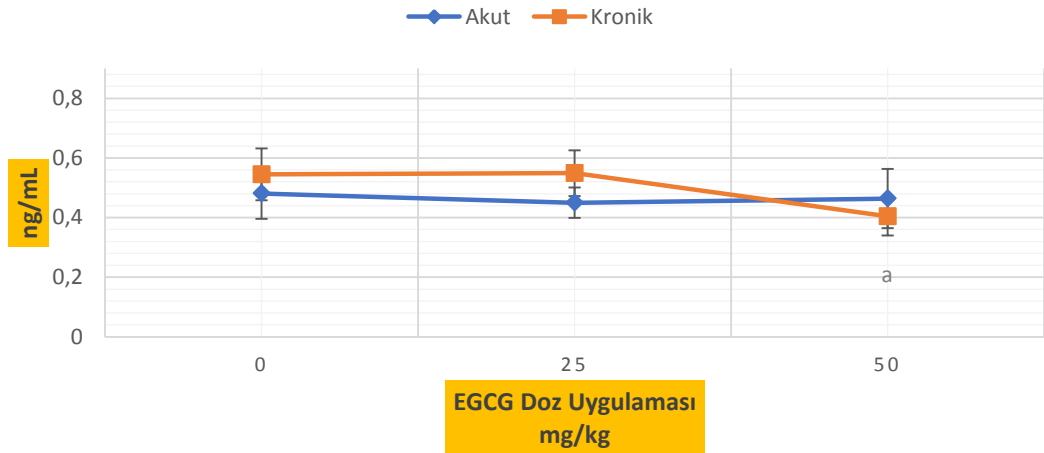


Şekil 4.11 Ortam havasına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum MDA değerleri

a: AH50 X AH0, b: AH50 X AH25; x: KH25 X AH25, y: KH25 X KH50 gruplarının karşılaştırmasını göstermektedir.

Şekil 4.11’de Ortam havasına maruz kalan gruplar arasında yapılan değerlendirmelerde AH50 grubu serum MDA düzeyi hem AH0 ($p < 0,001$) hemde AH25 ($p < 0,001$) gruplarından anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. KH25 grubunun değerleri ise sırasıyla AH25 ($p = 0,006$) ve KH50 ($p < 0,001$) istatistiksel açıdan anlamlı şekilde düşük olduğu bulunmuştur.

SIGARA DUMANINA MARUZİYET



Şekil 4.12 Sigara dumanına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum MDA değerleri.

a: KS25 X KS50 gruplarının karşılaştırmasını göstermektedir.

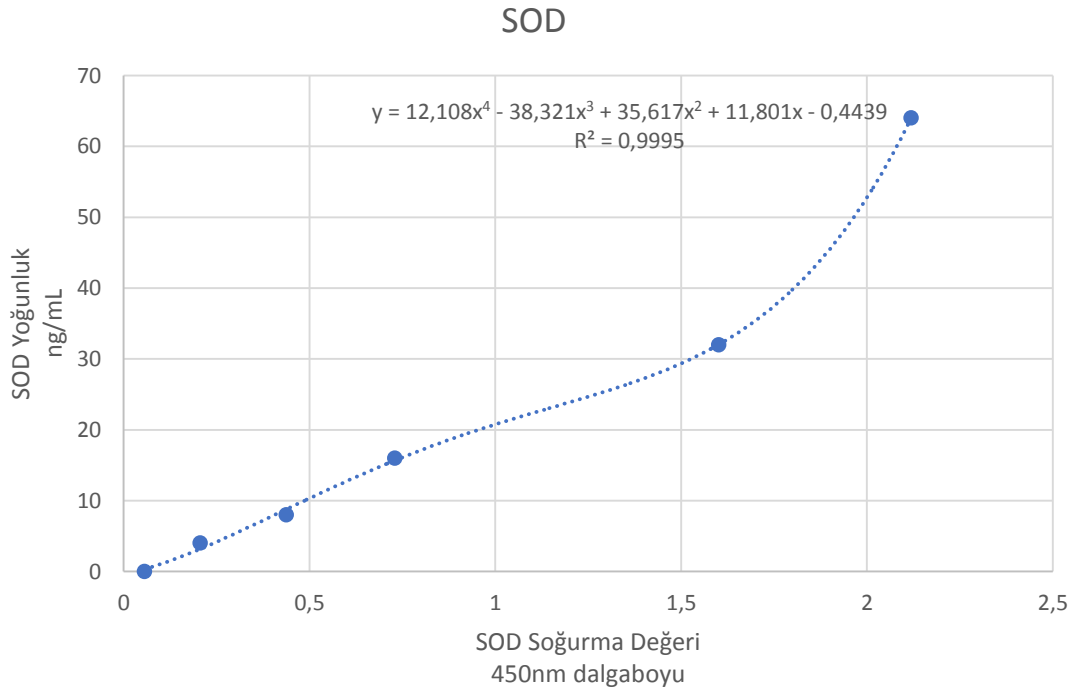
Şekil 4.12'de Sigara dumanına maruz kalan gruplar arasında yapılan değerlendirmelerde KS25 grubu serum MDA düzeyi KS50 grubundan anlamlı ($p = 0,016$) olarak yüksek olduğu bulunmuştur.

4.4.Sigara Dumanı ve EGCG Uygulamasının Antioksidan Düzeyleri Üzerine Etkisi

Sigara dumanının oluşturduğu oksidatif stresin, antioksidan sistem üzerindeki değişiklikleri izleyebilmek için serum SOD, GPx ve CAT enzim düzeyleri ölçülmüştür.

4.4.1. Sigara dumanı ve EGCG uygulamasının serum SOD düzeyine etkisi

Serum SOD düzeyleri hesaplanmasında yoğunlukları bilinen standartların ELISA okuyucuda elde edilen soğurma değerleri kullanılarak “ $y = 12,108x^4 - 38,321x^3 + 35,617x^2 + 11,801x - 0,4439$ ” formülü hesaplanmıştır. “y” yoğunluk (konsantrasyon) değerini vermektedir. “x” değeri ise örneklerin ELISA okuyucuda elde edilen soğurma (absorbans) değerini temsil etmektedir. Formülde “x” değeri yerine konulduğunda her bir hayvanın serum SOD yoğunluğu hesaplanmıştır. Denklemden $R^2 = 0,9995$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.13) .



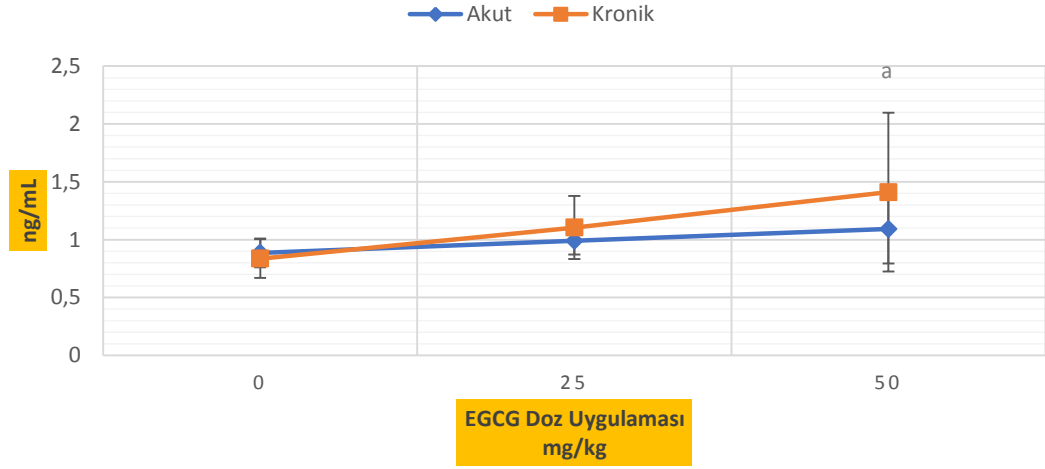
Şekil 4.13 SOD Standart Eğrisi

Tablo 4.5 Tüm Grupların Serum SOD değerleri

<i>Gruplar</i>	<i>Ortalama Değeri</i>	<i>Standart Sapma Değeri</i>	<i>Ortalama En Yüksek Değeri</i>	<i>Ortalama En Düşük Değeri</i>
AH0	0,886	0,124	1,01	0,762
AS0	1,395	0,567	1,962	0,828
AH25	0,99	0,118	1,108	0,872
AS25	0,985	0,22	1,205	0,765
AH50	1,092	0,299	1,391	0,793
AS50	0,854	0,105	0,959	0,749
KH0	0,837	0,168	1,005	0,669
KS0	1,066	0,236	1,302	0,83
KH25	1,105	0,272	1,377	0,833
KS25	1,188	0,441	1,629	0,747
KH50	1,411	0,685	2,096	0,726
KS50	1,472	0,833	2,305	0,639

Tablo 4.5'te verilen SOD değerleri için grup (akut veya konik uygulama) , maruziyet (sigara dumanı veya ortam havası) ve doz (0, 25 veya 50 mg/kg uygulamayı) parametrelerinin üçünün birlikte etkisi (üçlü etkileşim) dikkate alındığında anlamlı fark göstermemektedir ($p=0,373$) . Doz-maruziyet ($p = 0,081$) ve grup-maruziyet ($p=0,834$) ikili etkileşimleri anlamlı fark bulunamamıştır. Grup-doz arasında anlamlı fark görülmektedir ($p=0,009$) .

ORTAM HAVASINA MARUZİYET

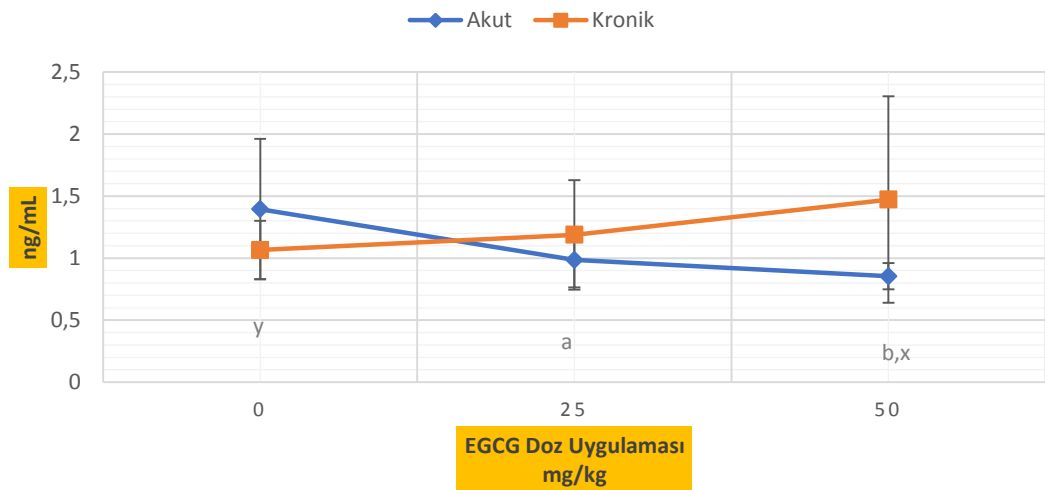


Şekil 4.14 Ortam havasına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum SOD değerleri

a: KH0 X KH50 gruplarının karşılaştırmasını göstermektedir.

Şekil 4.14'te Ortam havasına maruz kalan gruplar arasında yapılan değerlendirmelerde KH0 grubu serum SOD düzeyi grubundan istatistiksel açıdan anlamlı olarak düşük olduğu bulunmuştur.

SIGARA DUMANINA MARUZİYET



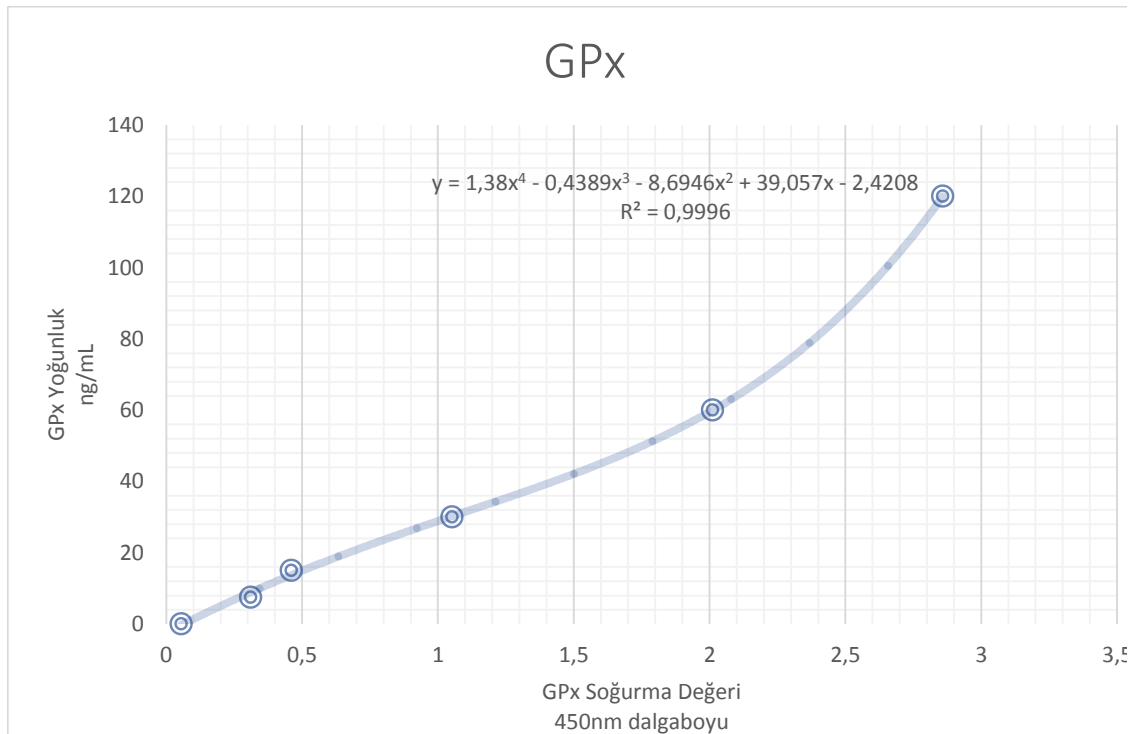
Şekil 4.15 Sigara dumanına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum SOD değerleri.

a: AS0 X AS25, b: AS0 X AS50; x: KS50 X AS50, y: KS50 X AS50 gruplarının karşılaştırmasını göstermektedir.

Şekil 4.15'te Sigara dumanına maruz kalan gruplar arasında serum SOD düzeyine göre yapılan değerlendirmelerde AS0 grubu sırasıyla AS25 ve AS50 grubundan istatistiksel olarak ($p = 0,048$, $p = 0,01$) yüksek bulunurken; KS50 grubu da AS50 ve KS0 grubundan istatistiksel açıdan anlamlı ($p = 0,003$, $p = 0,05$) olarak yüksek olduğu bulunmuştur.

4.4.2. Sigara dumanı ve EGCG uygulamasının serum GPx düzeyine etkisi

Serum GPx düzeyleri hesaplanmasında yoğunlukları bilinen standartların ELISA okuyucuda elde edilen soğurma değerleri kullanılarak “ $y = 1,38x^4 - 0,4389x^3 - 8,6946x^2 + 39,057x - 2,4208$ ” formülü hesaplanmıştır. “y” yoğunluk (konsantrasyon) değerini vermektedir. “x” değeri ise örneklerin ELISA okuyucuda elde edilen soğurma (absorbans) değerini temsil etmektedir. Formülde “x” değeri yerine konulduğunda her bir hayvanın serum GPx yoğunluğu hesaplanmıştır. Denklemden $R^2 = 0,9996$ olarak hesaplanmıştır (**Şekil 4.16**).



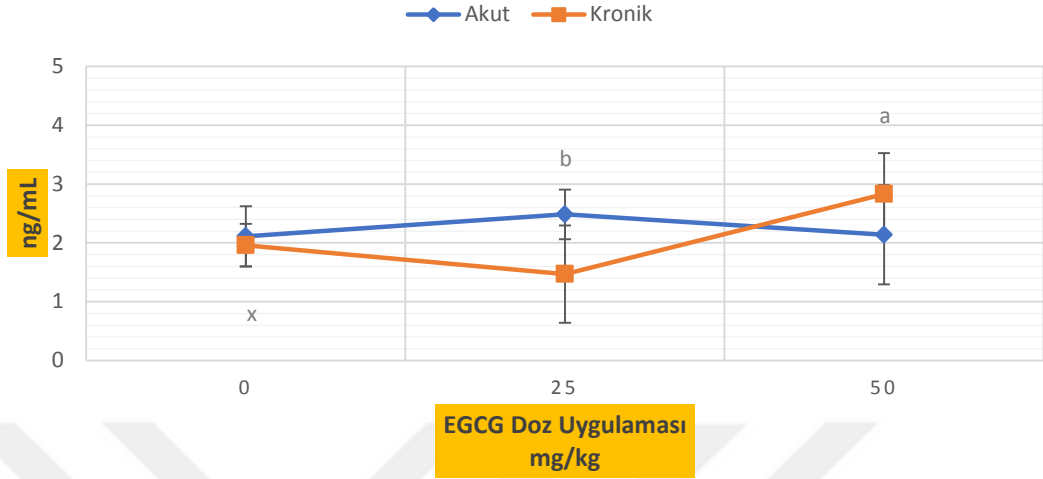
Şekil 4.16 GPX standart eğrisi

Tablo 4.6 Tüm Grupların Serum GPx değerleri

<i>Gruplar</i>	<i>Ortalama Değeri</i>	<i>Standart Sapma Değeri</i>	<i>Ortalama En Yüksek Değeri</i>	<i>Ortalama En Düşük Değeri</i>
AH0	2,113	0,511	2,624	1,602
AS0	2,213	0,55	2,763	1,663
AH25	2,485	0,423	2,908	2,062
AS25	1,253	0,414	1,667	0,839
AH50	2,136	0,844	2,98	1,292
AS50	1,918	0,362	2,28	1,556
KH0	1,96	0,361	2,321	1,599
KS0	2,704	0,642	3,346	2,062
KH25	1,469	0,826	2,295	0,643
KS25	3,238	1,185	4,423	2,053
KH50	2,831	0,697	3,528	2,134
KS50	3,574	0,934	4,508	2,64

Tablo 4.6' da verilen GPx değerleri için grup (akut veya konik uygulama) , maruziyet (sigara dumanı veya ortam havası) ve doz (0, 25 veya 50 mg/kg uygulamayı) parametrelerinin üçünün birlikte etkisi (üçlü etkileşim) dikkate alındığında anlamlı fark ($p = 0,003$) göstermektedir

ORTAM HAVASINA MARUZİYET

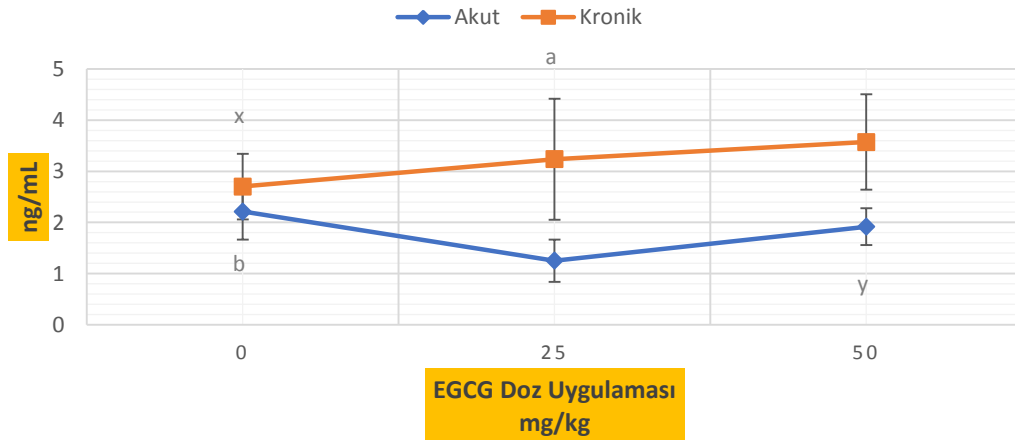


Şekil 4.17 Ortam havasına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum GPx değerleri

a: KH25 X KH50, b: KH25 X AH25; x: KH50 X KH0 gruplarının karşılaştırmasını göstermektedir.

Şekil 4.17’de Ortam havasına maruz kalan gruplar arasında yapılan değerlendirmelerde KH25 grubu serum GPx düzeyi açısından KH50 ($p < 0,001$) ve AH25 ($p = 0,005$) istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu, KH50 grubunun ise KH0 grubundan istatistiksel olarak yüksek ($p = 0,027$) olduğu bulunmuştur.

SIGARA DUMANINA MARUZİYET



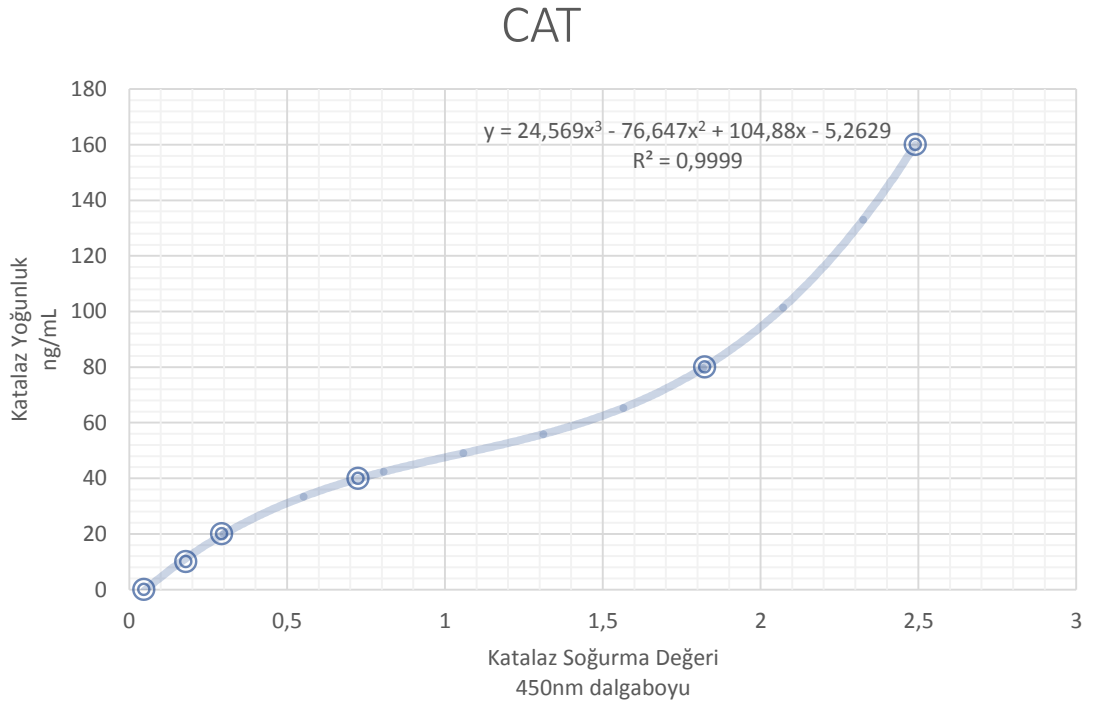
Şekil 4.18 Sigara dumanına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum GPx değerleri.

a: AS25 X KS25, b: AS25 X AS0; x: KS50 X KS0; b: KS50 X AS50 gruplarının karşılaştırmasını göstermektedir.

Şekil 4.18'de Sigara dumanına maruz kalan gruplar arasında yapılan değerlendirmelerde AS25 grubunun serum GPx düzeyi sırasıyla KS25 ve AS0 gruplarından anlamlı ($p < 0,001$, $p = 0,009$) olarak düşük olduğu bulunmuştur. KS50 grubunun serum GPx düzeyi ise hem KS0 ($p = 0,018$) hem AS0 ($p < 0,001$) gruplarından istatistiksel olarak yüksek olduğu görülmektedir.

4.4.3. Sigara dumanı ve EGCG uygulamasının serum CAT düzeyine etkisi

Serum CAT düzeyleri hesaplanmasında yoğunlukları bilinen standartların ELISA okuyucuda elde edilen soğurma değerleri kullanılarak “ $y = 24,569x^3 - 76,647x^2 + 104,88x - 5,2629$ ” formülü hesaplanmıştır. “y” yoğunluk (konsantrasyon) değerini vermektedir. “x” değeri ise örneklerin ELISA okuyucuda elde edilen soğurma (absorbans) değerini temsil etmektedir. Formülde “x” değeri yerine konulduğunda her bir hayvanın serum CAT yoğunluğu hesaplanmıştır. Denklemden $R^2 = 0,9999$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.19) .



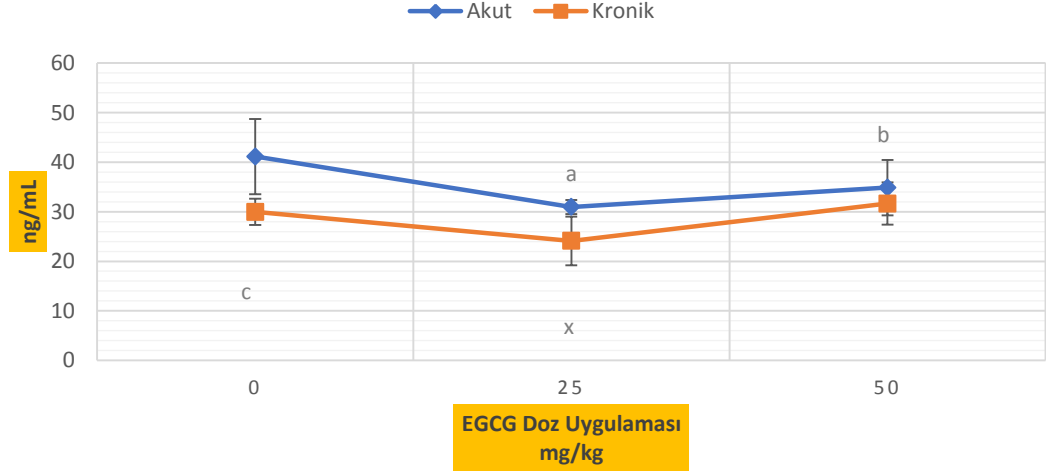
Şekil 4.19 CAT Standart Eğrisi

Tablo 4.7 Tüm Grupların Serum CAT değerleri

<i>Gruplar</i>	<i>Ortalama Değeri</i>	<i>Standart Sapma Değeri</i>	<i>Ortalama En Yüksek Değeri</i>	<i>Ortalama En Düşük Değeri</i>
AH0	41,151	7,588	48,739	33,563
AS0	35,635	9,6	45,235	26,035
AH25	30,955	1,4	32,355	29,555
AS25	30,054	4,258	34,312	25,796
AH50	34,88	5,598	40,478	29,282
AS50	29,668	4,62	34,288	25,048
KH0	29,973	2,647	32,62	27,326
KS0	31,008	3,265	34,273	27,743
KH25	24,11	4,903	29,013	19,207
KS25	27,1	6,231	33,331	20,869
KH50	31,662	4,237	35,899	27,425
KS50	28,749	4,376	33,125	24,373

Tablo 4.7'de verilen CAT değerleri için grup (akut veya konik uygulama) , maruziyet (sigara dumanı veya ortam havası) ve doz (0, 25 veya 50 mg/kg uygulamayı) parametrelerinin üçünün birlikte etkisi (üçlü etkileşim) dikkate alındığında anlamlı fark göstermemektedir ($p=0,787$) . Doz-maruziyet ($p = 0,266$) , grup-maruziyet ($p=0,1$) ve grup-doz ($p = 0,182$) ikili etkileşimleri anlamlı fark bulunamamıştır. Sadece ana etki bakımından grubun ve dozun etkileri anlamlı ($p < 0,001$) bulunmuştur.

ORTAM HAVASINA MARUZİYET

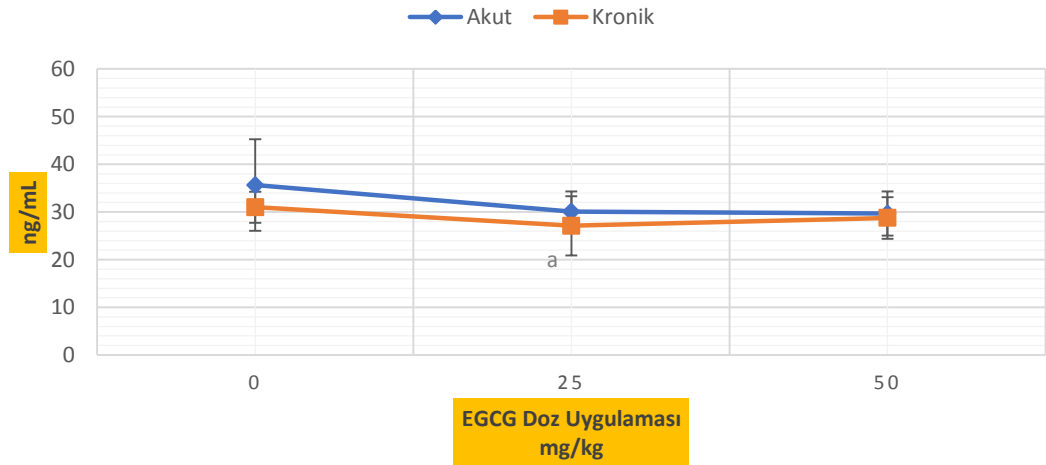


Şekil 4.20 Ortam havasına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum CAT değerleri.

a: AH0 X AH25, b: AH0 X AH50, c: AH0 X KH0; x: KH50 X KH25 gruplarının karşılaştırmasını göstermektedir.

Şekil 4.20’de Ortam havasına maruz kalan gruplar arasında yapılan değerlendirmelerde AH0 grubunun serum CAT düzeyi, AH25 ($p = 0,002$), AH50 ($p = 0,04$) ve KH0 ($p = 0,001$) gruplarından arasında istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur. KH50 grubunun CAT düzeyi ise KH25 grubundan anlamlı olarak yüksek olduğu ($p = 0,024$) bulunmuştur.

SIGARA DUMANINA MARUZİYET



Şekil 4.21 Sigara dumanına maruz kalan uygulama gruplarının ortalama serum CAT değerleri.

a: AS25 X KS25, gruplarının karşılaştırmasını göstermektedir.

Şekil 4.21'de Sigara dumanına maruz kalan gruplar arasında serum CAT düzeyine göre yapılan değerlendirmelerde AS25 grubu ile KS25 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p = 0,004$) .



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sunulan çalışmada, CD1 erkek fareler üzerinde EGCG maddesinin 21 günlük kronik ve 1 günlük akut uygulamalarının, farklı yoğunluklarda tek doz olarak verilmesinin antioksidan sistem, karaciğer hasarı, oksidatif stres ve kotinin düzeyi üzerine etkisi incelenmiştir.

Yapılan çalışmalarda sigara dumanının içinde oksidatif strese sebep olacak maddelerin bulunduğu ve hücre hasarına sebep olduğu gösterilmiştir¹⁶⁸. EGCG üzerine yapılan çalışmalar bu flavanoidin antioksidan özelliğe sahip olduğunu göstermiştir¹⁶⁹. Ancak sigara dumanının oluşturduğu oksidatif strese karşı EGCG'nin etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Kotinin değerlerinin, tek sefer EGCG uygulama yapılan ve ortam havasına maruz kalan hayvanlarda akut dönem uygulamalarının kotinin düzeyine etki etmediği, ancak kronik uygulamaya maruz bırakılanlarda arttırdığı görülmektedir. Kronik gruplara bakıldığında ise 50 mg/kg EGCG uygulamasının, 25 mg/kg uygulamasına göre anlamlı olarak yüksek kotinin değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Xu ve ark. tarafından yapılan serum kotinin düzeyinin araştırıldığı çalışmada 12 hafta boyunca sigara dumanına maruz kalan farelerdeki kotinin düzeyi, ortam havasına maruz kalan hayvanlara göre 3,2 kat; 24 hafta sonunda 4,8 kat artmıştır⁶. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara baktığımızda akut olarak ortam havası uygulanan grupta kotinin düzeyinde değişiklik olmamıştır. Fakat kronik grupta, kotinin düzeyinin sigara dumanı ve nikotine maruz kalma süresiyle arttığı gösterilmiştir.

Kim ve ark yaptığı çalışmada CYP2A6 enziminin uyarılmasıyla nikotinin kotinine dönüştürülmesinin arttırıldığı, böylece nikotinin uyardığı mitokondrilerin aşırı ROS üretmesinin engellediği sonucuna varmışlardır. Kotinin artmasıyla sitotoksisitenin azaldığını ve kotininin karaciğer hücreleri için daha güvenli bir metabolit olduğunu gözler önüne sermişlerdir¹⁷⁰. Elde ettiğimiz sonuçlarla birlikte, kotinin düzeyinin özellikle 50 mg/kg EGCG dozunda yükselmesi, nikotinin yıkımının EGCG ile artabileceğini, böylece sigara dumanının neden olduğu ROS üretiminin azaltılarak karaciğer üzerindeki olumsuz etkilerinin engellenebileceği kanısına varılmaktadır.

Çalışmamızda AST ve ALT değerleri karaciğer hasarını gözlemleyebilmek için değerlendirilmiştir. Çalışmamızda akut ve kronik uygulama yapılan grupların AST değeri değerlendirildiğinde akut grupların sigara dumanına maruziyet sürelerinin daha az olmasından dolayı bu gruplarda AST değerleri, kronik gruplara göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Grupları kendi içlerinde değerlendirdiğimizde ise grupların ortalama değerler arasında anlamlı değişiklikler görülmemektedir. Bu durum EGCG uygulamasının, hiç uygulanmayan gruplardan farklı etkiye sahip olmadığını göstermektedir. Ancak testis üzerinde yapılan çalışmalarda EGCG'nin nikotine bağlı sitotoksositeye karşı koruyucu etkilerinin olduğu bulunmuştur¹⁷¹. Serum AST değerleri uygulamanın akut veya kronik olmasına, uygulanan doza ve ortam havası veya sigara dumanı solunmasına bağlı olarak değişmektedir.

Çalışma gruplarımızda ALT değerleri arasında yapılan değerlendirmelerde EGCG'nin etkisinin sigara dumanı veya ortam havası uygulanmasının etkisinden bağımsız olarak, doza bağlı olarak ortaya çıktığı görülmektedir. Ancak kronik gruplarda ALT değerleri sigara dumanı uygulanan gruplarda anlamlı olmamakla birlikte, ortam havasına maruz kalan gruplardan yüksek olarak bulunmuştur. Bu durum sigara dumanına maruziyetin ALT değerlerini yükselttiği ve dolayısıyla karaciğer hasarına sebep olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca sigara dumanına akut olarak maruz kalan 50 mg/kg EGCG uygulanan grubun AST değeri, kronik olarak 50 mg/kg EGCG uygulanan gruba göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur. Bu durum EGCG'nin kronik olarak uygulanması durumunda koruyucu etki gösterebileceğini işaret etmektedir. 25 mg/kg EGCG uygulanan ve sigara dumanına maruz kalan gruplarda ise ALT değerleri birbirine yakın çıkmıştır.

ALT ve AST değerleri açısından kronik grupların kendi aralarında yapılan değerlendirmede veriler arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Kronik uygulamalarda EGCG flavonoidinin karaciğer üzerinde toksisiteye sebep olmadığı, anlamlı kanısını desteklemektedir.

Oksidatif stresin değerlendirilebilmesi için MDA düzeylerine bakıldığında doza, ortam havasına ve sigara dumanına bağlı olarak etkilerin değiştiği görülmektedir. Sigara dumanı uygulaması yapılan akut gruplarda EGCG uygulamasının, hiç uygulanmayan grupla aynı MDA düzeyine sahip olması, ancak kronik grupta 50 mg/kg EGCG'nin anlamlı şekilde MDA düzeyini düşürmesi, 50 mg/kg EGCG dozunun veya üstündeki

güvenli dozların kronik olarak uygulanması, sigara dumanının zararlı etkilerine karşı, EGCG'nin olumlu etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda EGCG'nin antioksidan sistem üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde kronik uygulama gruplarında 25 mg/kg ve 50 mg/kg EGCG uygulamasının GPx ve SOD antioksidan enzim düzeylerini yükselttiği görülmüştür. Sigara dumanına maruz kalan ve 50 mg/kg EGCG uygulanan kronik gruplarının GPx ve SOD düzeylerini, 50 mg/kg EGCG uygulanan akut gruplarının GPx ve SOD düzeylerinden istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ayrıca kronik gruplar arasında yapılan değerlendirmelerde hiç EGCG uygulanmamış gruplarda bahsedilen iki enzimin düzeyleri, 50 mg/kg EGCG uygulanan grupların düzeylerinden istatistiksel açıdan anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu bilgiler göz önüne alındığında 50 mg/kg EGCG maddesinin kronik olarak uygulanması GPx ve SOD antioksidan enzim düzeylerini arttırdığı kanısına varılmaktadır.

GPx ve SOD için uygulama gruplarından elde edilen bulgular Wu ve ark.ları tarafından EGCG'nin antioksidan sistem üzerindeki etki mekanizmasının genetik olarak aydınlatılmaya çalışıldığı deneylerle açıklanabilmektedir¹⁷². Çalışmamızda elde edilen sonuçlara baktığımızda akut dönemde 180 dakika süren ortam havasına veya sigara dumanına maruziyetten sonra hayvanların kan örnekleri alınmış ve değerlendirilmiştir. EGCG'nin oksidatif etkisinden dolayı ilk etaptaki enzim düzeylerinde düşüş görülmüş, ancak gen düzeyinde oluşturacağı etkilerin gözükmesi için sürenin yetersiz olduğunu kanısına ulaşılmaktadır. Nitekim kronik uygulama zamanlarına bu durumun tam tersi mevcuttur. Kronik grupların verileriyle birlikte değerlendirildiğinde EGCG'nin gen üzerinden etkisinin 21 günlük aralıksız uygulamada ortaya çıktığı ve doza bağlı olarak hem GPx hem de SOD düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Akut uygulama gruplarında sigara dumanına maruz kalan hayvanların 50 mg/kg EGCG doz uygulamasının, 25 mg/kg EGCG uygulamasına göre anlamlı olmamakla birlikte yüksek olduğu görülmüştür.

CAT enzimi için sonuçları değerlendirdiğimizde sigara dumanı ve ortam havası uygulanan gruplarda, 25 mg/kg ve 50 mg/kg EGCG uygulamasının CAT düzeyini anlamlı olmamakla birlikte düşürdüğü görülmüştür. Bu sonuç Chan ve ark. tarafından bulunan sonuçlarla örtüşmektedir. Yaptıkları çalışmada sigara dumanına maruz kalan hayvan grubunda CAT düzeyi anlamlı şekilde yükselirken; sigara dumanına maruz kalan ve yeşil çay verilen grupta CAT seviyesi ortam havasına maruz kalan grubun

seviyesine düşmüştür¹⁷³. Hem kronik hem de akut gruplarda grafiklerin benzer şekilde oluşması, etkilerinin görülmesinin zamandan bağımsız olarak ortaya çıktığını; EGCG uygulamasının vücutta hızlı bir şekilde CAT düzeylerine etki ettiğini düşündürmektedir. CAT düzeylerindeki değişmelerin EGCG uygulamasından kaynaklandığı görülmektedir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında EGCG'nin oksidatif strese karşı doğrudan antioksidan etkilerinin olabileceğini ve CAT enzimine ihtiyacı azalttığı kanısına varılmaktadır.

Çalışmamızda EGCG'nin sigara dumanının oluşturduğu oksidatif stresi önlemede CAT enziminin ve oksidatif stresin belirlenmesinde MDA'nın akut gruplarda etkilerinin değerlendirilmesinde anlamlı sonuçlar bulunmamıştır. Elde edilen AST ve ALT düzeyleri arasında yapılan değerlendirmelerde, uygulama dozlarının yükseltilmesiyle net etkinin ortaya çıkacağı düşünülmektedir. EGCG'nin sigara dumanının oluşturduğu oksidatif stresin azaltılması üzerindeki olumlu etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, en net etki GPx ve SOD enzim düzeylerinin anlamlı olarak artmasıyla gözlemlenmiştir. GPx ve SOD enzimleri üzerinde tespit edilen olumlu sonuçların gelecek çalışmalarda uygulama dozu ve süresinin artırılması ile tüm parametrelerde gözlemlenebileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda sigara dumanına maruz bırakılan farelerde, EGCG'nin akut ve kronik şekilde intraperitoneal olarak 25 mg/kg ve 50 mg/kg dozlarında verilmesinin ardından antioksidan sistem, karaciğer hasarı, oksidatif stres ve kotinin düzeyi üzerine etkisi incelenmiştir. EGCG'nin çalışmamızda elde edilen sonuçları göz önüne aldığında antioksidan sistem üzerinde özellikle de GPx ve SOD enzimlerinde artış olmuştur. Karaciğerde kronik uygulamalarda mevcut durumda toksisiteye sebep olmadığı görülmüştür. Oksidatif strese MDA düzeylerindeki düşümlere ve kotinin düzeylerini yükselmesine bakılarak olumlu katkısının olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, EGCG uygulamasının sigara dumanına maruz kalan bireylerin oksidatif stresten korunmasında etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmanın sonuçlarının, daha uzun süreli ve daha yüksek dozlarda deneneceği, total antioksidan ve total oksidan durumlarına bakılacağı yeni çalışmalarla olumlu sonuçların pekiştirilmesine önemli katkılar sağlayacağı öngörülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Drope J, Schluger NW. *The Tobacco Atlas*. 6. baskı. American Association for Cancer Society; 2018. https://files.tobaccoatlas.org/wp-content/uploads/2018/03/TobaccoAtlas_6thEdition_LoRes.pdf. Erişim Ekim 31, 2019.
2. Chen JH, Tipoe GL, Liang EC, vd. Green tea polyphenols prevent toxin induced hepatotoxicity in mice by down regulating inducible nitric oxide derived prooxidants. *Am J Clin Nutrition*. 2004;80(3):742–751.
3. Zhou J, Farah BL, Sinha RA, vd. Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG), a green tea polyphenol, stimulates hepatic autophagy and lipid clearance. *PLoS One*. 2014;9(1). doi:10.1371/journal.pone.0087161
4. Misaka S, Kawabe K, Onoue S, vd. Effects of Green Tea Catechins on Cytochrome P450 2B6, 2C8, 2C19, 2D6 and 3A Activities in Human Liver and Intestinal Microsomes. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2013;28(3):244–249. doi:10.2133/dmpk.DMPK-12-RG-101
5. Yüksel N. Sitokrom P450 Enzim Sistemi ve İlaç Etkileşimleri. *Klin Psikiyatr Derg*. 2001:5–16.
6. Xu X, Su Y, Fan ZH, Pruitt JC. *Cotinine Concentration in Serum Correlates with Tobacco Smoke-Induced Emphysema in Mice.*; 2014. doi:10.1038/srep03864
7. Guyton A, Hall JE. *Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji*. 13. baskı (Yeğen Çağlayan B, Alican İ, Solakoğlu Z, ed.). Ankara: Elsevier - Güneş Tıp Kitabevleri; 2017.
8. Lopez AM, Hendrickson RG. Toxin-induced hepatic injury. *Emerg Med Clin North Am*. 2014;32(1):103–125. doi:10.1016/j.emc.2013.09.005
9. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci*. 2002;65(2):166–176. doi:10.1093/toxsci/65.2.166
10. Navarro VJ, Senior JR. Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med*. 2006;354(7):731–739. doi:10.1056/NEJMra052270

11. Aranda-Michel J, Sherman KE. Tests of the liver: use and misuse. *Gastroenterologist*. 1998;6(1):34–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9531115>.
12. Verslype C. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *Acta Clin Belg*. 2004;59(5):285–289. doi:10.1056/NEJM200004273421707
13. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9–19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613
14. Mackay J, Eriksen M. *The Tobacco Atlas*. 1. baskı. World Health Organization; 2002.
15. İzzettin Barış Y. *Tütün Kullanımının Tarihçesi*. https://www.toraks.org.tr/userfiles/file/TuTuN_KULLANIMININ_TARİHÇESİ-I_Barış.pdf. Erişim Ekim 29, 2019.
16. Karadag B, Karakoç F, Ceran O, Ersu R, Inan S, Dagli E. Does passive smoke exposure trigger acute asthma attack in children? *Allergol Immunopathol (Madr)*. 31(6):318–323. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14670286>. Erişim Ekim 29, 2019.
17. Committee of Indoor Pollutants. *Indoor Pollutants | The National Academies Press*. Washington D.C.: National Academy Press; 1981. <https://www.nap.edu/catalog/1711/indoor-pollutants>. Erişim Ekim 29, 2019.
18. Kocyigit A, Selek S, Celik H, Dikilitas M. Mononuclear leukocyte DNA damage and oxidative stress: the association with smoking of hand-rolled and filter-cigarettes. *Mutat Res*. 2011;721(2):136–141. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.01.013
19. Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect*. 1985;64:111–126. doi:10.1289/ehp.8564111
20. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Barry Halliwell and John M. C. - Gutteridge Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th baskı. Oxford: Oxford University Press; 2015.

21. Jauslin ML, Meier T, Smith RAJ, Murphy MP. Mitochondria-targeted antioxidants protect Friedreich Ataxia fibroblasts from endogenous oxidative stress more effectively than untargeted antioxidants. *FASEB J.* 2003;17(13):1972–1974. doi:10.1096/fj.03-0240fje
22. Kayaalp SO, Güven H. *Kayaalp Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 1. baskı.; 2005. https://www.kitapyurdu.com/kitap/rasyonel-tedavi-yonunden-tibbi-farmakoloji/146039.html&manufacturer_id=41240. Erişim Ekim 29, 2019.
23. Brunnemann KD, Yu L, Hoffmann D. Assessment of Carcinogenic Volatile N-Nitrosamines in Tobacco and in Mainstream and Sidestream Smoke from Cigarettes. *Cancer Res.* 1977;37(9):3218–3222.
24. *Tütün Ürünlerinin Zararlarının Önlenmesi ve kontrolü Hakkında Kanun*. Turkey; 1996. <https://www.mevzuat.gov.tr/MevzuatMetin/1.5.4207.pdf>. Erişim Kasım 1, 2019.
25. Organization WH. *WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2019*. World Health Organization; 2019. https://www.who.int/tobacco/global_report/en/. Erişim Ekim 29, 2019.
26. *Curbing the epidemic: government and the economics of tobacco control*. World Bank Publications Department; 1999. doi:10.1136/tc.8.2.196
27. Doll R. Risk from tobacco and potentials for health gain. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1999;3(2):90–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10091873>. Erişim Ekim 29, 2019.
28. Asma S, Mackay J, Yang Song S, vd. *The GATS Atlas*.; 2015. doi:http://dx.doi.org/10.1002/cncr.23197
29. Coghlin J, Hammond SK, Gann PH. Development of epidemiologic tools for measuring environmental tobacco smoke exposure. *Am J Epidemiol.* 1989;130(4):696–704. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a115391
30. Hatsukami DK, Hecht SS, Hennrikus DJ, Joseph AM, Pentel PR. Biomarkers of tobacco exposure or harm: application to clinical and epidemiological studies. 25-26 October 2001, Minneapolis, Minnesota. *Nicotine Tob Res.* 2003;5(3):387–396. doi:10.1080/1462220031000094222
31. Human Metabolome Database: Showing metabocard for Cotinine

- (HMDB0001046). <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0001046>. Erişim Ekim 29, 2019.
32. Malkawi AH, Al-Ghananeem AM, de Leon J, Crooks PA. Nicotine exposure can be detected in cerebrospinal fluid of active and passive smokers. *J Pharm Biomed Anal.* 2009;49(1):129–132. doi:10.1016/j.jpba.2008.10.003
 33. Poulton J, Rylance GW, Taylor AW, Edwards C. Serum thiocyanate levels as indicator of passive smoking in children. *Lancet (London, England).* 1984;2(8416):1405–1406. doi:10.1016/s0140-6736(84)92102-0
 34. Stevens KR, Muñoz LR. Cigarette smoking: Evidence to guide measurement. *Res Nurs Health.* 2004;27(4):281–292. doi:10.1002/nur.20024
 35. Benowitz NL. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev.* 1996;18(2):188–204. doi:10.1093/oxfordjournals.epirev.a017925
 36. Nakajima M, Yamamoto T, Nunoya KI, vd. Role of human cytochrome P4502A6 in C-oxidation of nicotine. *Drug Metab Dispos.* 1996;24(11):1212–1217.
 37. Messina ES, Tyndale RF, Sellers EM. A major role for CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;282(3):1608–1614.
 38. Benowitz NL, Jacob P, Fong I, Gupta S. Nicotine metabolic profile in man: Comparison of cigarette smoking and transdermal nicotine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;268(1):296–303.
 39. Crooks PA, Dwoskin LP. Contribution of CNS nicotine metabolites to the neuropharmacological effects of nicotine and tobacco smoking. *Biochem Pharmacol.* 1997;54(7):743–753. doi:10.1016/s0006-2952(97)00117-2
 40. Dwoskin LP, Teng L, Buxton ST, Crooks PA. (S)-(-)-Cotinine, the major brain metabolite of nicotine, stimulates nicotinic receptors to evoke [3H]dopamine release from rat striatal slices in a calcium-dependent manner. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;288(3):905–911. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10027825>. Erişim Ekim 30, 2019.
 41. Aboud LG, Reynolds DT, Booth H, Bidlack JM. Sites and mechanisms for nicotine's action in the brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 1981;5(4):479–486.

doi:10.1016/0149-7634(81)90018-x

42. Crooks PA, Li M, Dwoskin LP. Metabolites of nicotine in rat brain after peripheral nicotine administration. Cotinine, nornicotine, and norcotinine. *Drug Metab Dispos.* 1997;25(1):47–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9010629>. Erişim Ekim 30, 2019.
43. Pérez-Stable EJ, Herrera B, Jacob P, Benowitz NL. Nicotine metabolism and intake in black and white smokers. *J Am Med Assoc.* 1998;280(2):152–156. doi:10.1001/jama.280.2.152
44. Youssef M, Saad-Hussein A. Effects of Environmental Tobacco on Blood Lead Level and Anthropometric Status of Egyptian Preschool Children. *J Occup Environmental Med.* 2005;11(3):197–206. <https://www.researchgate.net/publication/230766766>. Erişim Ekim 29, 2019.
45. Kuo HW, Yang JS, Chiu MC. Determination of urinary and salivary cotinine using gas and liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002;768(2):297–303. doi:10.1016/s1570-0232(01)00613-4
46. Bramer SL, Kallungal BA. Clinical considerations in study designs that use cotinine as a biomarker. *Biomarkers.* 8(3–4):187–203. doi:10.1080/13547500310012545
47. Matt GE, Wahlgren DR, Hovell MF, vd. Measuring environmental tobacco smoke exposure in infants and young children through urine cotinine and memory-based parental reports: empirical findings and discussion. *Tob Control.* 1999;8(3):282–289. doi:10.1136/tc.8.3.282
48. Dhar P. Measuring tobacco smoke exposure: quantifying nicotine/cotinine concentration in biological samples by colorimetry, chromatography and immunoassay methods. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;35(1):155–168. doi:10.1016/j.jpba.2004.01.009
49. Florescu A, Ferrence R, Einarson TR, vd. Reference values for hair cotinine as a biomarker of active and passive smoking in women of reproductive age, pregnant women, children, and neonates: systematic review and meta-analysis. *Ther Drug Monit.* 2007;29(4):437–446. doi:10.1097/FTD.0b013e318074df6e

50. Henderson FW, Reid HF, Morris R, vd. Home air nicotine levels and urinary cotinine excretion in preschool children. *Am Rev Respir Dis.* 1989;140(1):197–201. doi:10.1164/ajrccm/140.1.197
51. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P. Intracellular Adenosine Triphosphate (ATP) Concentration: A Switch in the Decision Between Apoptosis and Necrosis. *J Exp Med.* 1997;185(8):1481–1486. doi:10.1084/jem.185.8.1481
52. Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA. Oxidants and antioxidants: State of the art. *Am J Med.* 1991;91(3):S2–S13. doi:10.1016/0002-9343(91)90278-6
53. Halliwell B, Gutteridge JMC. [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *İçinde: ;* 1990:1–85. doi:10.1016/0076-6879(90)86093-B
54. Riley PA. Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation. *Int J Radiat Biol.* 1994;65(1):27–33. doi:10.1080/09553009414550041
55. Cadenas E, Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(3–4):222–230. doi:10.1016/S0891-5849(00)00317-8
56. Choi S., Benzie IF., Collins A., Hannigan B., Strain J. Vitamins C and E: acute interactive effects on biomarkers of antioxidant defence and oxidative stress. *Mutat Res Mol Mech Mutagen.* 2004;551(1–2):109–117. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.03.006
57. AKKUŞ İ. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri.* 1. baskı. Mimoza Yayınları; 1996.
58. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* 1999;31(4):261–272. doi:10.1080/10715769900300841
59. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
60. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. 2006. doi:10.1016/j.bbamem.2006.02.015

61. Halliwell B. Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. *Nutr Rev.* 2009;52(8):253–265. doi:10.1111/j.1753-4887.1994.tb01453.x
62. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984;219(1):1–14. doi:10.1042/bj2190001
63. Wickens AP. Ageing and the free radical theory. *Respir Physiol.* 2001;128(3):379–391. doi:10.1016/s0034-5687(01)00313-9
64. Burton GJ, Jauniaux E, Medicine F. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011;25(3):287–299. doi:10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016
65. Oyewole AO, Birch-machin MA. Mitochondria-targeted antioxidants. 2019. doi:10.1096/fj.15-275404
66. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Vet Fakültesi Derg.* 2004;15:91–96. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/yyuvfd/issue/13746/166430>. Erişim Ekim 6, 2019.
67. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014;224:164–175. doi:10.1016/j.cbi.2014.10.016
68. Paridah M., Moradbak A, Mohamed A., vd. We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 % . *Intech.* 2019;i(tourism):13. doi:http://dx.doi.org/10.5772/57353
69. Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(11):1287–1312. doi:10.1016/s0891-5849(01)00724-9
70. Tu BP, Weissman JS. Oxidative protein folding in eukaryotes: Figure 1. *J Cell Biol.* 2004;164(3):341–346. doi:10.1083/jcb.200311055
71. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47–95. doi:10.1152/physrev.00018.2001
72. Durmuş AS. Serbest Pksijen Radikalleri, Antioksidanlar ve Kırık İyileşmesi. *Fırat Üniversitesi Doğu Araştırmaları Derg.* 2005;3(3):20–27. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/fudad/issue/47052/591576>. Erişim Ekim 6, 2019.

73. Karakan M, Nazlıkul H. Oksidatif Stres ve Serbest Radikallerin Vücut Üzerindeki Etkisi. *Bilim Tamamlayıcı Tıp Regülasyon ve Nöral Ter Derg.* 2017;11(2):7–11. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/barnat/issue/42335/509401>. Erişim Ekim 6, 2019.
74. Altın A, Atalay H, Bilal T. Serbest Radikaller ve Stres İle İlişkisi. *Balıkesir Sağlık Bilim Derg.* 2018;7(1):51–55. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/balikesirsbd/issue/38836/452948>. Erişim Ekim 6, 2019.
75. Devasagayam TPA, Tilak JC, Bolor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India.* 2004;52:794–804. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15909857>. Erişim Ekim 3, 2019.
76. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 1982;47(5):412–426. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6290784>. Erişim Ekim 12, 2019.
77. Siems WG, Sommerburg O, Grune T. Erythrocyte free radical and energy metabolism. *Clin Nephrol.* 2000;53(1 Suppl):S9-17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10746800>. Erişim Ekim 12, 2019.
78. Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Derg.* 2014;35(4). <https://dergipark.org.tr/tr/pub/iucerrahpasa/issue/656/6741>. Erişim Ekim 12, 2019.
79. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Perkins JA. *Robbins Basic Pathology*. 10. baskı. Elsevier; 2017.
80. ERSOY A, DİLEK K. Red Blood Cell Membrane Lipid Peroxidation And Changes Of Antioxidative Homeostasis In Patients On Chronic Hemodialysis. *Turkish J Nephrol.* 1999;8(1):1–4. <https://turkjnephrol.org/en/red-blood-cell-membrane-lipid-peroxidation-and-changes-of-antioxidative-homeostasis-in-patients-on-chronic-hemodialysis-136602>. Erişim Ekim 12, 2019.
81. Devasagayam TPA, Bolor KK, Ramasarma T. Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian J Biochem Biophys.* 2003;40(5):300–308. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22900323>. Erişim

Ekim 3, 2019.

82. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338(1):668–676. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.072
83. Yarıktaş M, Döner F, Doğru H, Aynalı G, Yönden Z, Delibaş N. Baş-boyun malign tümörlerinde malondialdehit düzeyleri ve antioksidan enzim aktiviteleri. *SDÜ Tıp Fakültesi Derg.* 2009;10(4). doi:10.17343/sdutfd.70864
84. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys.* 1986;246(2):501–514. doi:10.1016/0003-9861(86)90305-x
85. Ocakoglu Ö, Balc H, Özkök A, vd. *Primer Açık Açılı Glokomlu ve Senil Kataraktlı Hastalarda Oksidatif Stresin Rolü.* C 38.; 2008.
86. Yildirim O, Ateş NA, Ercan B, vd. Role of oxidative stress enzymes in open-angle glaucoma. *Eye (Lond).* 2005;19(5):580–583. doi:10.1038/sj.eye.6701565
87. Yazar S, Eken A, Üniversitesi E, Fakültesi E, Toksikoloji FA. *Rat Kan ve Doku Örneklerinde Oksidatif Stres Parametreleri.*
88. Wright A, Bubb WA, Hawkins CL, Davies MJ. Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues. *Photochem Photobiol.* 2002;76(1):35–46. doi:10.1562/0031-8655(2002)076<0035:sompoe>2.0.co;2
89. Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radic Biol Med.* 1990;8(1):95–108. doi:10.1016/0891-5849(90)90148-C
90. Cadenas E, Sies H. The Lag Phase. *Free Radic Res.* 1998;28(6):601–609. doi:10.3109/10715769809065816
91. Kovacic P, Pozos R, Somanathan R, Shangari N, O’Brien P. Mechanism of Mitochondrial Uncouplers, Inhibitors, and Toxins: Focus on Electron Transfer, Free Radicals, and Structure -Activity Relationships. *Curr Med Chem.* 2005;12(22):2601–2623. doi:10.2174/092986705774370646
92. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in

- DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004;266(1–2):37–56. doi:10.1023/b:mcbi.0000049134.69131.89
93. Steinman HM. Bacterial Superoxide Dismutases. İçinde: *Oxygen Radicals in Biology and Medicine.* Boston, MA: Springer US; 1988:641–646. doi:10.1007/978-1-4684-5568-7_101
94. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane. *J Biol Chem.* 2004;279(47):49064–49073. doi:10.1074/jbc.M407715200
95. Fang Y-Z, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 2002;18(10):872–879. doi:10.1016/s0899-9007(02)00916-4
96. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008;4(2):89–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23675073>. Erişim Eylül 26, 2019.
97. Rhee SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med.* 1999;31(2):53–59. doi:10.1038/emm.1999.9
98. Sundaresan M, Yu Z-X, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for Generation of H₂O₂ for Platelet-Derived Growth Factor Signal Transduction. *Science (80-).* 1995;270(5234):296–299. doi:10.1126/science.270.5234.296
99. Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 1997;23(1):134–147. doi:10.1016/s0891-5849(96)00629-6
100. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999;32(8):595–603. doi:10.1016/s0009-9120(99)00075-2
101. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993;49(3):481–493. doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625
102. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000;49(2 Suppl 1):3–8. doi:10.1016/s0026-0495(00)80077-3
103. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* 1987;1(5):358–364. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2824268>. Erişim Ekim 3, 2019.

104. Duncan BB, Schmidt MI, Chambless LE, Folsom AR, Heiss G. *Inflammation Markers Predict Increased Weight Gain in Smoking Quitters*. *C* 11.; 2003. doi:10.1038/oby.2003.181
105. Myatt L. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta*. 2010;31:S66–S69. doi:10.1016/j.placenta.2009.12.021
106. Catalá A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids*. 2009;157(1):1–11. doi:10.1016/j.chemphyslip.2008.09.004
107. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med*. 1995;18(6):1033–1077. doi:10.1016/0891-5849(94)00209-3
108. Simic MG. DNA markers of oxidative processes in vivo: relevance to carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Cancer Res*. 1994;54(7 Suppl):1918s-1923s. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8137312>. Erişim Ekim 13, 2019.
109. Rayner BS, Hua S, Sabaretnam T, Witting PK. Nitric oxide stimulates myoglobin gene and protein expression in vascular smooth muscle. *Biochem J*. 2009;423(2):169–177. doi:10.1042/BJ20090716
110. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev*. 2007;87(1):315–424. doi:10.1152/physrev.00029.2006
111. Bayraktar NM, Kılıç S, Özdemir İ, Aydemir S, Ulu R. Hipertansiyonlu Hastalarda Eritrosit İçi Antioksidan Enzim ve Serum Malondialdehit Düzeylerinin Araştırılması. *Sağlık Bilim Derg*. 2005;14(2):76–82. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/eujhs/issue/44509/551910>. Erişim Ekim 12, 2019.
112. O'grady SM. Oxidative stress, autophagy and airway ion transport. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2019;316(1):C16–C32. doi:10.1152/ajpcell.00341.2018
113. Filomeni G, Desideri E, Cardaci S, Rotilio G, Ciriolo MR. Under the ROS: Thiol network is the principal suspect for autophagy commitment. *Autophagy*. 2010;6(7):999–1005. doi:10.4161/auto.6.7.12754
114. Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J*. 2012;441(2):523–540.

doi:10.1042/BJ20111451

115. Scherz-Shouval R, Elazar Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol.* 2007;17(9):422–427. doi:10.1016/j.tcb.2007.07.009
116. Malhomme de la Roche H, Seagrove S, Mehta A, Divekar P, Campbell S, Curnow A. Using natural dietary sources of antioxidants to protect against ultraviolet and visible radiation-induced DNA damage: An investigation of human green tea ingestion. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2010;101(2):169–173. doi:10.1016/j.jphotobiol.2010.04.006
117. Meewes C, Brenneisen P, Wenk J, vd. Adaptive antioxidant response protects dermal fibroblasts from UVA-induced phototoxicity. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(3):238–247. doi:10.1016/s0891-5849(00)00463-9
118. Shindo Y, Witt E, Han D, Epstein W, Packer L. Enzymic and Non-Enzymic Antioxidants in Epidermis and Dermis of Human Skin. *J Invest Dermatol.* 1994;102(1):122–124. doi:10.1111/1523-1747.ep12371744
119. Schäfer M, Farwanah H, Willrodt A, vd. Nrf2 links epidermal barrier function with antioxidant defense. *EMBO Mol Med.* 2012;4(5):364–379. doi:10.1002/emmm.201200219
120. Słowińska M, Nynca J, Cejko BI, vd. Total antioxidant capacity of fish seminal plasma. *Aquaculture.* 2013;400–401:101–104. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2013.03.010
121. Amir Aslani B, Ghobadi S. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sci.* 2016;146:163–173. doi:10.1016/J.LFS.2016.01.014
122. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969;244(22):6049–6055. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5389100>. Erişim Ekim 12, 2019.
123. Chaudière J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol.* 37(9–10):949–962. doi:10.1016/s0278-6915(99)00090-3
124. Blondet NM, Messner DJ, Kowdley K V., Murray KF. Mechanisms of Hepatocyte Detoxification. *Physiol Gastrointest Tract.* Ocak 2018:981–1001.

doi:10.1016/B978-0-12-809954-4.00043-8

125. Gongora MC, Lob HE, Landmesser U, vd. Loss of Extracellular Superoxide Dismutase Leads to Acute Lung Damage in the Presence of Ambient Air. *Am J Pathol.* 2008;173(4):915–926. doi:10.2353/ajpath.2008.080119
126. Arteel GE, Sies H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2001;10(4):153–158. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21782571>. Erişim Ekim 12, 2019.
127. Çimen Ç, Öter Ç, Demir H, Savran A. Rat Eritrositlerinden Elde Edilen Katalaz Enziminin Karakterizasyonu ve Kinetiğinin İncelenmesi. *YYÜ Vet Fak Derg.* 2005;16(1):15–20.
128. Özkan A, Gündüz G, Çıplak B, Fıskın K. Antioxidant Enzymes Activities in Chemically Warfared Samples of *Dociostaurus maroccanus* Obtained From an Epidemic Population. *Turkish J Biol.* 2000;24(1):141–149. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/tbtkbiology/issue/11749/140264>. Erişim Ekim 6, 2019.
129. Heck DE, Shakarjian M, Duck Kim H, Laskin JD, Vetrano AM. Mechanisms of oxidant generation by catalase. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05603.x
130. Nicol CJ, Zielenski J, Tsui L-C, Wells PG. An embryoprotective role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in developmental oxidative stress and chemical teratogenesis. *FASEB J.* 2000;14(1):111–127. doi:10.1096/fasebj.14.1.111
131. Deaton CM, Marlin DJ. Exercise-associated oxidative stress. *Clin Tech Equine Pract.* 2003;2(3):278–291. doi:10.1053/S1534-7516(03)00070-2
132. Çiftçi M, Küfrevioğlu Öİ, Gündoğdu M, Özmen İ. Effects of Some Antibiotics on Enzyme Activity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase From Human Erythrocytes. *Pharmacol Res.* 2000;41(1):107–111. doi:10.1006/PHRS.1999.0566
133. Keha E, Küfrevioğlu Öİ. *Biyokimya*. 8. baskı. Erzurum: Aktif Yayınevi; 2011.
134. Karabulut H, Gülay MŞ. ANTİOKSİDANLAR. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Vet Fakültesi Derg.* 2016;1(1):65–65. doi:10.24880/maeuafd.260790

135. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione Transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45(1):51–88. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857
136. Gyamfi MA, Ohtani II, Shinno E, Aniya Y. Inhibition of glutathione S-transferases by thoningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, in vitro. *Food Chem Toxicol.* 2004;42(9):1401–1408. doi:10.1016/j.fct.2004.04.001
137. Kasnak C, Palamutoğlu R. Doğal Antioksidanların Sınıflandırılması ve İnsan Sağlığına Etkileri. *Turkish J Agric - Food Sci Technol.* 2015;3(5):226. doi:10.24925/turjaf.v3i5.226-234.171
138. Armstrong RN. Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases. *Chem Res Toxicol.* 1997;10(1):2–18. doi:10.1021/tx960072x
139. Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Sci.* 2012;196:67–76. doi:10.1016/j.plantsci.2012.07.014
140. Bendich A, Machlin LJ, Scandurra O, Burton GW, Wayner DDM. The antioxidant role of vitamin C. *Adv Free Radic Biol Med.* 1986;2(2):419–444. doi:10.1016/S8755-9668(86)80021-7
141. Rizwan M, Rodriguez-Blanco I, Harbottle A, Birch-Machin MA, Watson REB, Rhodes LE. Tomato paste rich in lycopene protects against cutaneous photodamage in humans in vivo: a randomized controlled trial. *Br J Dermatol.* 2011;164(1):154–162. doi:10.1111/j.1365-2133.2010.10057.x
142. Kidd P. Glutathione: Systemic Protectant Against Oxidative and Free Radical Damage. 1997. <https://www.semanticscholar.org/paper/Glutathione%3A-Systemic-Protectant-Against-Oxidative-Kidd/bca0093fc64a468cafe76bc901e2869577cc4a1f>. Erişim Ekim 12, 2019.
143. Liebman JF, Greenberg A. *Mechanistic principles of enzyme activity*. VCH Publishers; 1988.
144. Hodgson E, Smart RC. *Introduction to Biochemical Toxicology*. 3. baskı. Wiley and Sons Inc; 2000.

145. Arendt J. Melatonin. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1988;29(2):205–229. doi:10.1111/j.1365-2265.1988.tb00263.x
146. Kuş İ, SARSILMAZ M. Pineal Bezin Morfolojik Yapısı ve Fonksiyonları. *Türkiye Klin Tıp Bilim Derg*. 2002;22(2):221–226. <https://www.turkiyeklinikleri.com/article/tr-pineal-bezin-morfolojik-yapisi-ve-fonksiyonlari-298.html>. Erişim Ekim 12, 2019.
147. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reactive Oxygen Particles and Antioxidant Defence. *Turkish J Nephrol*. 1997;6(2):92–95. <https://turkjnephrol.org/en/reactive-oxygen-particles-and-antioxidant-defence-136703>. Erişim Ekim 12, 2019.
148. Aust O, Sies H, Stahl W, Polidori MC. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. *J Chromatogr A*. 2001;936(1–2):83–93. doi:10.1016/S0021-9673(01)01269-9
149. Siquet C, Paiva-Martins F, Lima JLFC, Reis S, Borges F. Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids-A structure–activity relationship study. *Free Radic Res*. 2006;40(4):433–442. doi:10.1080/10715760500540442
150. Peterson J, Dwyer J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr Res*. 1998;18(12):1995–2018. doi:10.1016/S0271-5317(98)00169-9
151. Cos P, Ying L, Calomme M, vd. Structure–Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. *J Nat Prod*. 1998;61(1):71–76. doi:10.1021/np970237h
152. Wanasundara UN, Shahidi F. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chem*. 1998;63(3):335–342. doi:10.1016/S0308-8146(98)00025-9
153. Sai V, Chaturvedula P, Prakash I. Tea-Aroma, Taste, Color and Bioactive Constituents The aroma, taste, color and bioactive constituents of tea. *J Med Plants Res*. 2011;5(11):2110–2124. <http://www.academicjournals.org/JMPR>. Erişim Ekim 30, 2019.
154. Chacko SM, Thambi PT, Kuttan R, Nishigaki I. Beneficial effects of green tea: A literature review. *Chin Med*. 2010;5. doi:10.1186/1749-8546-5-13
155. Çelik F. Çay (*Camellia sinensis*); İçeriği, Sağlık Üzerindeki Koruyucu Etkisi ve

- Önerilen Tüketimi. <https://www.turkiyeklinikleri.com/article/en-cay-camellia-sinensis-icerigi-saglik-uzerindeki-koruyucu-etkisi-ve-onerilen-tuketimi-46562.html>. Published 2006. Erişim Ekim 31, 2019.
156. Han XD, Zhang YY, Wang KL, Huang YP, Yang ZB, Liu Z. The involvement of Nrf2 in the protective effects of (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on NaAsO₂-induced hepatotoxicity. *Oncotarget*. 2017;8(39):65302–65312. doi:10.18632/oncotarget.18582
157. Sano M, Tabata M, Suzuki M, Degawa M, Miyase T, Maeda-Yamamoto M. Simultaneous determination of twelve tea catechins by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analyst*. 2001;126(6):816–820. doi:10.1039/b102541b
158. Kılıçalp D, Yur F, Değer Y. Elektromanyetik Radyasyona Maruz Bırakılan Kobayların Serum Bakır ve Çinko Seviyelerine Yeşil Çayın Etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Vet Fakültesi Derg*. 2008;(2):53–56.
159. Mochida I, Kawano S, Hironaka M, vd. Reduction of NO of Very Low Concentration in Air with NH₃ at Room Temperature over Calcined Active Carbon Fibers. *Energy and Fuels*. 1995;9(4):659–664. doi:10.1021/ef00052a013
160. Yu P-L, Pu H-F, Chen S-Y, Wang S-W, Wang PS. Effects of catechin, epicatechin and epigallocatechin gallate on testosterone production in rat leydig cells. *J Cell Biochem*. 2010;110(2):333–342. doi:10.1002/jcb.22541
161. Weinreb O, Amit T, Mandel S, Youdim MBH. Neuroprotective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neuritogenic properties. *Genes Nutr*. 2009;4(4):283–296. doi:10.1007/s12263-009-0143-4
162. Frei B, Higdon J V. Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo: Evidence from Animal Studies. *J Nutr*. 2003;133(10):3275S-3284S. doi:10.1093/jn/133.10.3275s
163. Mehmetoğlu İ, Muhteşem Ünlü C, Gökçe R, Kurban S. Çay, Baharat ve Bitki Kaynaklı Bazı Gıda Maddelerinin Flavonoid İçerikleri ve Antioksidan Özellikleri. *Türkiye Klin J Med Sci*. 2005:407–411. <https://www.turkiyeklinikleri.com/article/en-cay-baharat-ve-bitki-kaynakli-bazi->

gida-maddelerinin-flavonoid-icerikleri-ve-antioksidan-ozellikleri-36259.html.

Erişim Ekim 31, 2019.

164. Yang CS, Landau JM. Effects of Tea Consumption on Nutrition and Health. *J Nutr.* 2000;130(10):2409–2412. doi:10.1093/jn/130.10.2409
165. Kasper B, Salameh A, Krausch M, vd. Epigallocatechin gallate attenuates cardiopulmonary bypass-associated lung injury. *J Surg Res.* 2016;201(2):313–325. doi:10.1016/j.jss.2015.11.007
166. Shanmugam T, Selvaraj M, Poomalai S. Epigallocatechin gallate potentially abrogates fluoride induced lung oxidative stress, inflammation via Nrf2/Keap1 signaling pathway in rats: An in-vivo and in-silico study. *Int Immunopharmacol.* 2016;39:128–139. doi:10.1016/j.intimp.2016.07.022
167. Lee IT, Lin CC, Lee CY, Hsieh PW, Yang CM. Protective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate against TNF- α -induced lung inflammation via ROS-dependent ICAM-1 inhibition. *J Nutr Biochem.* 2013;24(1):124–136. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.03.009
168. Aycicek A, Ozcan AE, Ae E, Kocyigit A. Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking. doi:10.1007/s00431-005-1720-1
169. He J, Xu L, Yang L, Wang X. Epigallocatechin gallate is the most effective catechin against antioxidant stress via hydrogen peroxide and radical scavenging activity. *Med Sci Monit.* 2018;24:8198–8206. doi:10.12659/MSM.911175
170. Kim KM, Suh JW, Yang SH, Kim BR, Park TS, Shim SM. Smilax china root extract detoxifies nicotine by reducing reactive oxygen species and inducing CYP2A6. *J Food Sci.* 2014;79(10):H2132–H2139. doi:10.1111/1750-3841.12595
171. M Gawish A, Ramadan S, Hassan AM, M Issa A. Morphometrical, Histopathological, and Cytogenetical Ameliorating Effects of Green Tea Extract on Nicotine Toxicity of the Testis of Rats. *J Cytol Histol.* 2010;01(02). doi:10.4172/2157-7099.1000105
172. Wu CC, Hsu MC, Hsieh CW, Lin JB, Lai PH, Wung BS. Upregulation of heme oxygenase-1 by Epigallocatechin-3-gallate via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways. *Life Sci.* 2006;78(25):2889–2897.



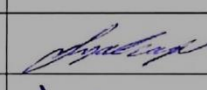
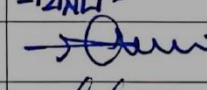
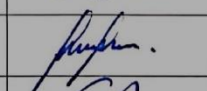
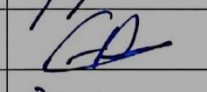
doi:10.1016/j.lfs.2005.11.013

173. Chan KH, Ho SP, Yeung SC, vd. Chinese green tea ameliorates lung injury in cigarette smoke-exposed rats. *Respir Med.* 2009;103(11):1746–1754.
doi:10.1016/j.rmed.2009.04.027



7. EKLER

Ek 1

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ		
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI		
ETİK KURUL BAŞVURU KARARI		
Prof.Dr. Şerif DEMİR'in tarafından kurulumuza sunulan "Sigara Dumanına Maruz Bırakılmış Farelerde Epigallokateşin-3-Gallat Uygulamasının Karaciğer Toksisitesi ve Kotinin Düzeyine Etkisi " isimli araştırma başvuru projesi etik yönden değerlendirilmiş olup; yönergemiz ilkelerine göre proje etiği açısından "UYGUN OLDUĞUNA" oy birliği / oy çokluğu ile karar verilmiştir.		
Toplantı Tarihi: 16.04.2019	Karar No: 2019/3/1	
UNVAN, ADI, SOYADI, GÖREVİ	KARAR	İMZA
Doç. Dr. Ertuğrul KAYA Başkan		
Dr. Öğr. Üyesi Murat KABAKLIOĞLU Başkan Vekili		
Ali GÖK Sorumlu Veteriner Hekim		
Prof. Dr. Şerif DEMİR Üye	-----	ARAŞTIRMACIDIR
Doç. Dr. Şengül CANGÜR Üye		
Dr. Öğr. Üyesi Akif KETEN Üye		-İZİNLI-
Dr. Öğr. Üyesi Meral KEKEÇOĞLU Üye		
Dr. Öğr. Üyesi Pınar GÖÇ RASGELE Üye		
Dr. Öğr. Üyesi Emel ÇALIŞKAN Üye		
İzzet GÜÇLÜ Üye		-İZİNLI-
Merve UĞUR Üye		-İZİNLI-

Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu
Düzce Üniversitesi, Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi,
Konuralp Yerleşkesi, Merkez, 81620, Düzce.
0850 800 81 81 – Dahili: 4171 Faks: 0380 5421302

8. ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Düzce İli'ninin Merkez İlçesinde doğdu. İlköğretim ve orta öğrenimini Düzce'de tamamladı. 2008-2012 yılları arasında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümün'de lisans eğitimini tamamladı. Lisans eğitiminin ardından 2012 yılında Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Enstitü Anabilim Dalı'nda başladığı lisansüstü eğitimini,2015 yılında “Menopoz Hastalarında Uyku Kalitesi” adlı tez çalışmasıyla tamamladı. Aynı yıl içinde Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora (Abant İzzet Baysal Üniversitesi Ortak Doktora Programı) eğitimine başladı.2015 yılında öğretim görevlisi olarak atandığı Yüksek İhtisas Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda 2 yıl boyunca çeşitli akademik ve idari görevlerde bulunduktan sonra 2017 yılında Düzce Üniversitesi'ne öğretim görevlisi olarak atandı. Doktorasını 2019 yılında “Sigara Dumanına Maruz Bırakılmış Farelerde Epigallokateşin Gallat (EGCG) Uygulamasının Karaciğer Toksisitesi Ve Kotinin Düzeyine Etkisi” konulu tez ile tamamladı.

