

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serbest Radikaller Hakkında Genel Bilgi	3
2.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri	4
2.1.1.1. Radikaller	6
2.1.1.1.A. Süperoksit Anyon Radikali ($O_2^{\cdot -}$)	6
2.1.1.1.B. Hidroksil Radikali (OH^{\cdot})	7
2.1.1.2. Non-Radikaller	8
2.1.1.2.1. Hipokloröz asit ($HOCl$)	8
2.1.1.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	9
2.1.2. Serbest Radikallerin Kaynakları	10
2.1.2.1. Normal Biyolojik İşlemler	11
2.1.2.2. Oksidatif Stres Yapan Etmenler	12
2.1.2.3. Yaşlanma Süreci	12
2.2. Serbest Radikallerin Hücrel Yapılara Etkisi	13
2.2.1. Proteinlere Etkisi	13
2.2.2. Karbonhidratlara Etkisi	14
2.2.3. Nükleik Asitler ve DNA' ya Etkisi	14

2.2.4.	Lipitlere Etkisi	15
2.3.	Lipit Peroksidasyonu	16
2.3.1.	Lipit Peroksidasyonunun Mekanizması	17
2.3.1.1.	Başlama	17
2.3.1.2.	Yayıma	18
2.3.1.3.	Sonlanma	19
2.3.2.	Biyolojik Sistemlerde Lipit Peroksidasyonunun Sonuçları	19
2.4.	Antioksidan Savunma Sistemleri	20
2.4.1.	Endojen Antioksidanlar	21
2.4.1.1.	Enzimatik Antioksidanlar	21
2.4.1.1.1.	Glutasyon-S-Transferaz (GST)	21
2.4.1.1.2.	Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	22
2.4.1.1.3.	Glutasyon Redüktaz (GSSG-R)	22
2.4.1.1.4.	Süperoksit Dismütaz (SOD)	23
2.4.1.1.5.	Sitokrom Oksidaz	23
2.4.1.1.6.	Katalaz (CAT)	24
2.4.1.2.	Nonenzimatik Antioksidanlar	24
2.4.2.	Eksojen Antioksidanlar	24
2.5.	Glutasyon (GSH)	25
2.5.1.	Glutasyon Metabolizması	28
2.5.2.	Glutasyonun Biyokimyasal Önemi	30
2.5.3.	Glutasyona Bağlı Enzim Sistemleri	31
2.5.4.	Glutasyonun Tayin Yöntemleri	32
2.5.4.1.	Spektrofotometrik Yöntem	32
2.5.4.2.	HPLC Yöntemi	33
2.5.4.3.	Fluorometrik Yöntem	33
2.6.	Kolestaz	34
2.6.1.	Safra Renkli Maddelerin Oluşumu	35
2.6.2.	Kolestaz ve Oksidatif Stres	36
2.6.3.	Kolestaz Tipleri	39

3. MATERYAL ve METOT	41
3.1. MATERYAL	41
3.1.1. Hayvan Materyali	41
3.1.2. Dokuların Alınması ve Homojenizasyonu	41
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Aletler	42
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeleri	43
3.1.5. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	43
3.2. METOT	45
3.2.1. Dokuda Lipit Peroksidasyonu (MDA) Tayini	45
3.2.1.1. Prensip	45
3.2.1.2. Metot	46
3.2.2. Dokuda GSH Tayini	46
3.2.2.1. Prensip	46
3.2.2.2. Metot	46
3.3. İstatistiksel Hesaplamalar	47
4. BULGULAR	48
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	52
6. KAYNAKLAR	57
7. ÖZGEÇMİŞ	65

ÖZET

Bu çalışmada, karbon tetraklorüre (CCl₄) bağlı karaciğer kolestazı oluşturuldu. Antioksidan özelliği bilinen üzüm (*Vitis vinifera*) ve nar (*Punica granatum*) meyvelerinin, oluşan lipid peroksidasyonuna etkisi araştırılmaya çalışıldı.

Çalışmada 12 adet kontrol, 36 adet uygulama olmak üzere toplam 48 adet Swiss albino tipi fare kullanıldı. Uygulama grubundaki hayvanlara 12 hafta boyunca her gün oral yolla karbon tetraklorür (CCl₄) 2 ml/kg verildi. Uygulama sonunda 8 adet farenin karaciğer dokuları histopatolojik olarak incelendi. Kolestaz teşhisi konulan farelerin 10 tanesinin karaciğer dokuları alındı. Diğer 20 adet fare iki ayrı gruba ayrılarak I. Gruba 500 mg/kg çekirdekli üzüm, II. Gruba 500 mg/kg nar meyveleri 8 hafta boyunca verildi.

Sağlıklı, kolestazlı ve kolestaz tespiti sonrası üzüm ve nar verilen fare gruplarından alınan karaciğer dokularında GSH ve MDA analizleri yapıldı.

Sonuçta kolestazın lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve bunun sonucunda MDA düzeylerinde bir artış meydana geldiği, GSH düzeylerinde ise azalma olduğu görüldü. Üzüm ve nar uygulaması yapılan kolestazlı grupların, kolestazlı gruba göre MDA düzeylerinde bir azalışın meydana geldiği, GSH düzeylerinin ise yükseldiği görülmüştür (p< 0,05).

2008, 65 sayfa

Anahtar kelimeler: Kolestaz, Malondialdehit (MDA), Redükte Glutasyon (GSH), Lipid peroksidasyonu, *Vitis vinifera*, *Punica granatum*

ABSTRACT

In this study related to cholestasis produced on liver by carbon tetrachloride, the effects of grape (*Vitis vinifera*) and pomegranate (*Punica granatum*) which has antioxidant characteristics on lipid peroxidation to be searched.

In this study 12 control and 36 experimental groups, in total 48 Swiss albino type mice were used. 2 ml/kg body wt. carbon tetrachloride (CCl₄) have been administrated via oral way during 12 weeks to experimental groups. 8 mice liver tissues have been investigated for histopatological analyses. Mice in experimental group were diagnosed cholestasis. After that in suitable laboratory condition, liver tissues were taken from 10 mice, and 20 mice were divided into two groups, and first group was fed by 500 mg/kg body wt. grape seed, on the second group was fed by 500 mg/kg body wt. pomegranate.

Later, GSH and MDA levels of mice measured. The difference between GSH and MDA levels in control group were found important as statistically.

Consequently, cholestasis caused to lipid peroxidation and there happened increase in MDA levels. Also, considering the GSH levels decrease in cholestasis animals, after feeding by grape and pomegranate, decrease in MDA levels and increase in GSH levels were observed compared to cholestasis group ($p < 0,05$).

2008, page 65

Key words: Cholestasis, Malondialdehyde (MDA), Reduced Glutathione (GSH), Lipid Peroxidation, *Vitis vinifera*, *Punica granatum*

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μmol	: Mikromol
nmol	: Nanomol
ml	: Mililitre
°C	: Santigrad derece
ATP	: Adenozin trifosfat
BHT	: Butylated hidroksitoluen
CAT	: Katalaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DTNB	: Ditiyobis nitrobenzoik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
GGT	: γ-Glutamil transpeptidaz
GSH	: İndirgenmiş Glutasyon
GSSG	: Okside Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
Gly	: Glisin
Cys	: Sistein
Glu	: Glutamat
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HOCl	: Hipokloröz asit
LOO[·]	: Peroksil radikali
LOOH[·]	: Lipit hidroperoksit
LPO	: Lipit peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
OPT	: Oftalaldehit
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismütaz
SH	: Sülfidril grubu
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Trikloroasetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Glutasyon (GSH) molekülü	26
Şekil 2. Glutasyon metabolizması	28
Şekil 3. Glutasyon (GSH)'a bağlı enzim sistemleri	31
Şekil 4. Çalışma gruplarında doku GSH düzeyleri	51
Şekil 5. Çalışma gruplarında doku MDA düzeyleri	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No:</u>
Çizelge 1. Reaktif oksijen türleri	5
Çizelge 2. Serbest radikallerin endojen ve eksojen kaynakları	11
Çizelge 3. Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri	16
Çizelge 4. Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi	25
Çizelge 5. Safra bileşimi	34
Çizelge 6. Kolestaz nedenleri	40
Çizelge 7. Kullanılan fare yeminin içeriği	42
Çizelge 8. Kontrol ve kolestazlı gruplara ait GSH ve MDA değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	50
Çizelge 9. Kolestazlı grup ile üzüm ve nar uygulaması yapılan kolestazlı gruplara ait GSH ve MDA değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	50

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim 1. Hepatosit sitoplazmasında safra pigmenti

Sayfa No:
49

1. GİRİŞ

İnsan metabolizmasında vücudun oksijen kullanımındaki normal işlemler sırasında bazı etmenlerin sebebi ile aktif oksijen formları oluşmaktadır. Oluşan aktif oksijen formları protein, karbonhidrat ve lipitlerde yapısal bozulmalara yol açmaktadır. Dolayısıyla hücre membranının hem yapısını hem de fonksiyonlarını bozarak, birçok dejeneratif hastalıklara neden olmaktadır[1].

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. 'Oksidatif stres' olarak adlandırılan bu durum özetle; serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır[1,2].

Organizma için oksidatif stres kaynağı olan gebelik, doğum ve laktasyon gibi durumlar plazmada serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır[2]. Ayrıca bulaşıcı hastalıklar, stres ve kolestaz gibi hastalıklarda da serbest radikal artışı kaçınılmazdır. Serbest radikal artışına paralel olarak lipit peroksidasyonunun son ürünü olan Malondialdehit (MDA) düzeyi de yükselir. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi iç membran özelliklerini değiştirmektedir.

Organizmada bulunan endojen ve eksojen antioksidanlar reaktif oksijen türlerini toplayarak lipit peroksidasyonunu inhibe eder. Bu antioksidanlardan biri de indirgenmiş glutatyon (GSH)'dur. Glutatyon, glutamik asit, sistin ve glisinden ibaret bir tripeptittir. GSH, serbest radikaller ve peroksidlerle reaksiyona girerek, hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktadır[3].

Kolestaz, safranın barsağa akımının engellenmesi sonucu karaciğer hücreleri ve safra yolları içinde safra birikimidir. Barsağa safra geçişinin azalması veya olmaması safra ile atılan maddelerin kanda birikmesine neden olur. Bunların başında bilirubin pigmenti gelmektedir. Kanda bilirubin düzeyinin artması sonucu deri, skleralar, mukozolar ve vücut sıvılarının sarı bir renk alması sarılık olarak adlandırılır. Safra

yollarında tıkanıklık sonucu enterohepatik döngü bozulmakta organizmada bazı patolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Retiküloendotelyal sistem fonksiyonlarında bozulma, immun sistemin baskılanması, intestinal mukozanın yapı ve fonksiyonlarında değişiklikler, barsak duvarında oksidatif hasar, safra tuzlarının enterohepatik dolaşımının bozulması dolayısıyla antibakteriyel ve deterjan etkisinin engellenmesi, bakteriyemi ve endotoksemi bunlardan başlıcalarıdır. Bunun yanında karaciğerde kolestaz sonucu; hepatositlerde dejenerasyon, karaciğer fonksiyon testlerinde bozulma, kanama pıhtılaşma sürelerinde uzama, kanama diyatezi riskinin artması, bilirubin yüksekliğine bağlı mental değişiklikler, ayrıca lipid peroksidasyonu meydana gelir[4].

Bu tez çalışmasında; farelerde karbon tetraklorür (CCl₄) ile deneysel olarak oluşturulan kolestazın üzüm (*Vitis vinifera*) ve nar (*Punica granatum*) meyveleri ile karaciğer dokusunda MDA ve GSH değişimleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller Hakkında Genel Bilgi

Atomlar, nötron ve protondan oluşan bir çekirdekle, bu çekirdeğin çevresinde dönen elektronlardan oluşurlar. Atom çekirdeğinin çevresindeki, elektronların bulunduğu boşluğa da orbital denir. Her bir orbitalde spinleri birbirine zıt ($\uparrow\downarrow$) olan iki elektron bulunur. Bu elektronlara eşlenmiş veya ortaklanmış elektronlar denir[5] .

Serbest radikaller bu ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktif olup, çevrelerindeki atom ve moleküllere adeta saldırırlar. Çok kısa ömürlü olmalarına karşın, radikal olmayan maddeler ile reaksiyona girip onları da radikal yapmaları ve bir dizi zincir reaksiyonu başlatıp, birçok radikal oluşturmalarından dolayı oldukça tehlikelidirler[6].

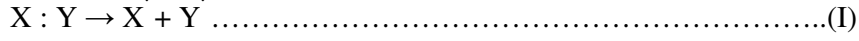
Serbest radikaller, ortaklanmamış elektronunun belirtilmesi amacıyla üst kısımlarına yazılan bir nokta (X \cdot) ile gösterilirler.

Radikaller aerobik hücrelerin tüm fraksiyonlarında, metabolizma sırasında veya patolojik durumlarda birer yan ürün olarak meydana gelebilir ve hücrelerde geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz değişikliklere neden olabilirler. Bu değişiklikler oksidasyon, fragmantasyon, köprüleşme (disülfid bağlantısı, protein-protein bağlantısı, protein-lipid bağlantısı), protein sarmalında kesilme, floresans şeklinde olur. Bunun sonucunda ciddi hücre, doku ve/veya organ hasarı meydana gelebilir[7].

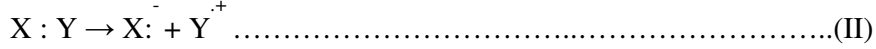
Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aştığı zaman membrandaki yağ asitleri serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Lipit peroksidasyonu, organizmada bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen uzaklaştırılmasıyla başlar ve malondialdehit (MDA) düzeyinin artmasına neden olur[8,9].

Serbest radikaller 3 yolla meydana gelirler[10].

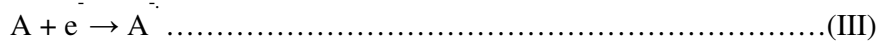
1. Kovalent bağı normal bir molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi (Homolitik ayrılma ile radikal oluşumu):



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi (Heterolitik ayrılma ile iyon oluşumu):



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi veya transferi (Elektron transferi ile radikal oluşumu):



2.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşmuş radikallerdir[2,10]. Oksijen atomunun dış yörüngesini oluşturan p orbitalinde iki elektron eksik olmasından dolayı “diradikal” olarak değerlendirilir. Bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. Radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girer. Oksijen metabolizmada en son suya indirgenirken, kısmi olarak indirgenmesi ile de çok sayıda reaktif oksijen türleri oluşmaktadır[2,10,11].

Oksijen bu kararsız yapısını giderebilmek için başka bir oksijen atomunun dış yörüngesindeki iki elektronu ortaklaşa kullanarak “Oksijen Radikalleri”ni oluşturur. Serbest oksijen radikalleri, oksijenin belirli koşullarda kısmen indirgenmesi sonucu çok kısa ömürlü ve güçlü oksidan nitelikli oksijen metabolitleridir. Reaktif oksijen türleri, maruz kalınan miktar ve süreye bağlı olarak hücre fonksiyonlarını bozarlar[12]. Oksijen serbest radikali teriminin $O_2^{\cdot -}$ ve OH^{\cdot} gibi radikallerin yanında, H_2O_2 ve 1O_2 gibi reaktif, fakat radikal olmayan türleri ifade etmek için de kullanılmasının doğru olmadığı belirtilmektedir. Bunun yerine daha genel olan reaktif oksijen türleri teriminin kullanılması uygun olur. Oksidan terimi ise H_2O_2 , OH^{\cdot} ve $HOCl$ gibi moleküller için geçerlidir. Oysa O_2 hem oksidan, hem redüktandır.[13-16]. Çizelge 1’de çeşitli reaktif oksijen türleri gösterilmiştir.

Çizelge1. Reaktif oksijen türleri[5].

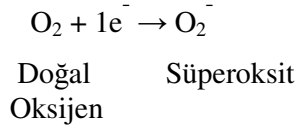
RADİKALLER	NON-RADİKALLER
Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikali (OH^{\cdot})	Lipit hidroperoksit (LOOH)
Peroksil radikali (ROO^{\cdot})	Hipokloröz asit (HOCl)
Alkoksil radikali (RO^{\cdot})	N-Halojenli aminler (R-NH-X)
Semikinon radikali (HQ)	Singlet oksijen (1O_2)
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	Ozon (O_3)
	Azotdioksit (NO_2)

2.1.1.1. Radikaller

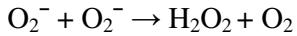
2.1.1.1.A. Süperoksit Anyon Radikali (O_2^-)

Moleküler oksijen (O_2), birer elektronu eksik iki oksijen atomundan oluşmuştur. Ancak bu molekülün reaktif bir özelliği yoktur. Çünkü her iki atom da denge halindedir. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali (O_2^-) meydana gelir[2,17].

Süperoksit radikali bir oksitleyici gibi davranarak bir elektron daha alabilir. Böylece oluşan peroksi anyonu ortamdan iki proton alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturabilir. Süperoksit radikali aldığı elektronu başka bir elektron alıcıya vererek tekrar oksijene oksitlenebilir. Böylece bir indirgeyici (redüktör) olarak davranabilir. Süperoksit bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit hem redüktan hem de oksidandır[2].

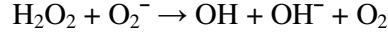


İki süperoksit radikali birbiri ile etkileşerek, biri oksitlenirken diğeri indirgenir ve böylece H_2O_2 ve O_2 meydana gelir. Süperoksit radikalının ortamdan temizlendiği bu tepkimeye *dismütasyon tepkime* denir.



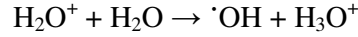
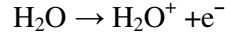
2.1.1.1.B. Hidroksil Radikali (OH[·])

Hidrojen peroksitin, süperoksit ile indirgenmesi sonucu oluşur. Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir [18].

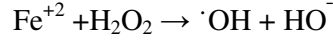


Hidroksil radikalinin yapımına neden olan önemli tepkimeler şunlardır [18].

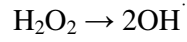
a) **İyonlaştırıcı radyasyonun suya etkisi:**



b) Fenton tepkimesi:

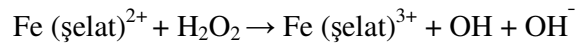
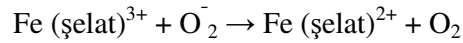


c) **Hidrojen peroksidin fotolizi:**

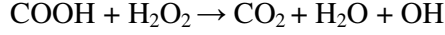


d) Ozona elektron transferi ile OH oluşabilir. Bu nedenle ozon toksisitesinde OH'ın önemli rolü vardır.

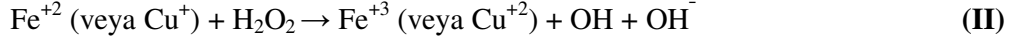
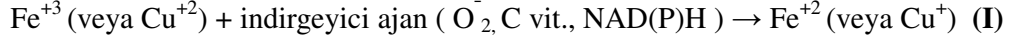
e) İnvivoda OH üretimi bakımından en önemli tepkime Haber-Weiss tepkimesidir. İnvivoda O₂⁻ radikalinin H₂O₂ ile OH üretmesi şelat yapmış demir tarafından katalizlenir.



f) Radikal tepkimeleri sonucu oluşabilen bir organik radikal, H₂O₂ ile tepkimeye girerek OH üretebilir.



Hidroksil radikalinin mekanizması ise iki reaksiyon sonucunda gerçekleşir.



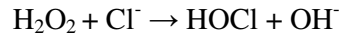
Görüldüğü gibi O_2^- radikalinin elektron verici olduğu tepkime Haber-Weiss tepkimesi dışında da biyolojik moleküller metal iyonlarını indirgeyerek H_2O_2 varlığında OH yapımını sağlarlar [19].

Hidroksil radikali en reaktif ve en zarar verici oksidan radikaldır. Su dahil ortamda rastladığı her molekül ile tepkimeye girer. Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipit peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. Hücre zarı su içermediğinden OH^\cdot 'in başlıca hedefi yağ asididir. Zar lipitlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini arttırıp hücre ölümüne sebep olabilir[20,21].

2.1.1.2. Non-Radikaller

2.1.1.2.1. Hipokloröz asit (HOCl)

Hidrojen peroksit molekülünün bir klor atomu (Cl) ile reaksiyona girmesi sonucu hipokloröz asit oluşur

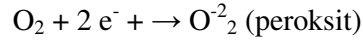


HOCl, fagositik hücreler tarafından bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynar. Aktive olan nötrofiller, monosit, makrofajlar ve eozinofiller O_2^- radikalini üretirler. Radikal üretimi fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde büyük önem arz eder. Özellikle nötrofiller içerdikleri myeloperoksidaz enzimi aracılığıyla O_2^- 'nin

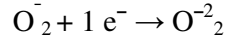
dismütasyonu ile H_2O_2 'i klorür iyonu ile birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'e dönüştürür[22,23].

2.1.1.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

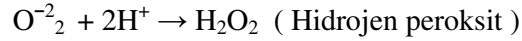
Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit meydana gelir. Peroksit molekülü de iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi (H_2O_2) oluşturur.



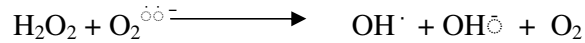
veya



Peroksit molekülü, iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksiti meydana getirir.



H_2O_2 , hücre membranlarından kolay geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Yüksüz ve boyutlarının küçük olması biyolojik membranlardan geçişini kolaylaştırır. Kendisi bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Geçiş metal iyonları varlığında daha da hızla gerçekleşen bir reaksiyonla süperoksit anyon radikali ile birlikte en reaktif ve en zarar verici serbest radikal olan hidroksil radikali kolayca yıkılabilir[2,5,10].



Bu reaksiyona Haber- Weiss reaksiyonu adı verilir. Haber- Weiss reaksiyonu katalizörlü veya katalizörsüz oluşabilir. Fakat katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerlerken, demir gibi geçiş metalleri ile katalizlenen ikinci şekli ise oldukça hızlıdır[2].

Peroksizomlar çok önemli hücre içi H_2O_2 kaynağıdır. Bu organeldeki D- amino asid oksidaz, ürat oksidaz, L- hidroksil asid oksidaz ve yağ asidi açıl- CoA oksidaz gibi oksidazlar süperoksit üretmeden bol miktarda H_2O_2 üretimine sebep olurlar. Fakat peroksizomlarda katalaz aktivitesi çok yüksektir. Bu sebeple bu organelden sitozole ne kadar H_2O_2 geçtiği bilinmemektedir[2].

Bu reaktif maddeler bazı biyolojik molekülleri hasara uğratabilirler. Etrafındaki moleküller ile reaksiyona girerek onlardan elektron alıp kararlı hale gelirler. Reaktif oksijen türleri maruz kalınan miktar ve süreye bağlı olarak hücre fonksiyonlarının bozulmasına neden olurlar[5,16].

2.1.2. Serbest Radikallerin Kaynakları

Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu, normal metabolik olayların seyri sırasında meydana gelebildiği gibi organizmada bazı yabancı maddelerin (ksenobiyotikler) metabolize edilmesi sırasında ve organizmanın radyasyon gibi dış etkenlere maruz kalmasıyla da meydana gelebilir. Bu nedenle serbest radikal oluşturulan mekanizmalar endojen ve eksojen olarak ikiye ayrılmaktadır.

Çizelge 2. Serbest radikallerin endojen ve eksojen kaynakları[24].

Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
*Mitokondriyal elektron transport zinciri	*İlaç oksidasyonları (Örn:Parasetamol, CCl ₄)
*Kloroplast elektron transport zinciri	*İyonize radyasyon
*Oksidan enzimler: -Ksantin oksidaz -İndolamin dioksijenaz -Tryptofan dioksijenaz -Galaktoz oksidaz -Siklooksijenaz -Lipooksijenaz -Mono aminooksidaz	*Güneş ışığı *X- ışınları *UV- ışınları *Isı şoku
*Fagositik hücreler: -Nötrofiller -Monosit ve makrofajlar -Eozinofiller -Endotelyal hücreler	*Glutasyon okside eden maddeler *Ortam havası -Sigara dumanı -Ozon -Kükürtdioksit -Egzoz gazları
*Oto-oksidasyon reaksiyonları (Fe ⁺² , epinefrin)	

Temel olarak serbest radikallerin kaynakları aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır[17, 25].

2.1.2.1. Normal Biyolojik İşlemler

a. Oksijenli solunum

b. Katabolik ve anabolik işlemler

2.1.2.2. Oksidatif Stres Yapan Etmenler

- a.** İskemi-hemoroji-travma, radyoaktivite- entoksikasyon
- b.** Ksenobiyotik maddelerin etkisi
 - Alışkanlık yapan maddeler
 - İnhale edilenler
 - İlaçlar
- c.** Stres ile artan katekoleminlerin oksidasyonu
- d.** Fagositik enflamasyon hücrelerinde salgılanma
- e.** Uzun süreli metabolik hastalıklar
- f.** Diğer nedenler (sıcak, soğuk, güneş ışınları)

2.12.3. Yaşlanma Süreci

Serbest radikallerin düzeyi yaşlanma süreci ile paralel bir artış gösterir. Yaşlanma ile protein karboksilasyonunun artışı ve katalize edici tüm enzimlerin azalmasının bu dengesizlikte önemli rolleri vardır. Serbest radikallerin yaşlanma sebebi mi, yoksa sonucu mu olduğunu söylemek oldukça zordur. Ancak serbest radikallerin en azından başlamış olan yaşlanma olayını hızlandırdıkları ve yaşlanma ile beraber ortaya çıkan birçok hastalığın fizyopatolojisinde önemli rol oynadıkları söylenebilir[26,27].

Diğer bir sınıflandırmada ise doğada serbest radikallerin endojen ve eksojen olmak üzere iki temel kaynağı olduğu belirtilmektedir[5, 24].

2.2. Serbest Radikallerin Hücresel Yapılara Etkisi

Serbest radikaller savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranda oluştukları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Serbest radikaller hücrelerin; DNA, lipit, protein, karbonhidrat ve enzim gibi önemli biyomoleküllerin tüm sınıfları ve tüm hücre bileşenleri ile etkileşme özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olurlar[10,28].

2.2.1. Proteinlere Etkisi

Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenme dereceleri aminoasit dizilimine bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, methionin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Örneğin, aminoasit içeren paparin ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz enzimleri serbest radikallerle karşı karşıya kaldıklarında inhibe olurlar. Özellikle bu moleküller serbest radikallerle reaksiyona girerek sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu reaksiyonlar sonucunda immünoglobulin G (Ig G) ve albumin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler[2,28].

Oksidan maddeler proteinlerde dekarboksilasyona, peptid bağlarının hidrolizine, disülfid bağları ve çapraz bağlar oluşturarak hücre içi esansiyel olan Ca-ATPaz, Na/K ATPaz gibi enzimlerde fonksiyon kaybı sonucu hücre içi ve hücre dışı iyon dağılımının bozulmasına neden olur. Ayrıca enzimler de protein yapıda olduklarından dolayı serbest radikaller enzim aktivitelerinde değişikliklere neden olurlar[2,9].

2.2.2. Karbonhidratlara Etkisi

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerinde de önemli etkileri vardır. Oksidan maddelerin karbonhidrat metabolizması üzerine etkisi, glikolitik ATP sentezinin azalması ve ATP kullanımının artması yönündedir. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehidler meydana gelir. Bunlar diyabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklarda önemli rol oynarlar. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitoetik etki göstererek kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar[2,9].

Oksidatif stres, diyabet ve diyabetin daha sonraki komplikasyonlarının patogeneğinde önemli bir rol oynar. Özellikle iyi kontrol edilemeyen diyabette oksidatif aktivitenin artması sonucu serbest radikal oluşumun arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kaldığı bildirilmiştir[29].

Yapılan bir araştırmaya göre diyabetiklerde plazma ve eritrosit lipid peroksit düzeylerinin sağlıklı kişilere göre anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir[30].

2.2.3. Nükleik Asitler ve DNA' ya Etkisi

İyonize edici radyasyonlarla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açar. Sitotoksite büyük ölçüde nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine ve DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Başta hidroksil radikali olmak üzere oksidan maddeler, nükleik asit bazlarının modifikasyonuna ve DNA şeridinin kırılmalarına neden olmaktadır. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek DNA zincirinde kırılmaların yanı sıra DNA polimerazın inhibisyonuna neden olur. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçer ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hücre ölümüne yol açar. Bu yüzden DNA, serbest radikal hasarından kolayca zarar görebilen önemli bir hedeftir. Oksidatif hasardan en fazla etkilenen mitokondrial

DNA' dır. Yaşlı insanlarda mitokondrial DNA' nın fazla miktarda hasara uğradığı gösterilmiştir[28,31].

2.2.4. Lipitlere Etkisi

Bütün biyomoleküller serbest radikallerden etkilenirler. Fakat lipitler serbest radikallere karşı en hassas olanlarıdır. Organizmada en çok görülen serbest radikal hasarı lipit peroksidasyonu şeklinde olup, membranda doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen çıkmasıyla lipit (L.) radikali oluşur ve zincir şeklindeki reaksiyonların sonunda sitotoksik ürünler olan aldehitler ayrıca pentan gibi hidrokarbon gazları meydana gelir. Bu toksik ürünlerden aldehitlerin en son basamağında yer alan malondialdehit (MDA) ise lipit peroksidasyonunun saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır[32,33].

Serbest radikallerin oluşumu hücredeki antioksidan savunma sistemlerini aşarsa, membrandaki yağ asitleri serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup, hücrenin diğer bölümlerine hasar yayarlar. Böylece birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olurlar. Orotik asit, etanol ve fosfor tarafından meydana getirilen karaciğer hasarını lipit peroksidasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir[34].

Çizelge 3. Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri[16].

Doymamış yağlar	<ul style="list-style-type: none">• Kolesterol ve yağ asitlerinde oksidasyon• Lipitlerde çapraz bağlanmalar• Organel ve hücrelerde çapraz bağlanmalar
Karbonhidratlar	<ul style="list-style-type: none">• Polisakkaritlerin depolimerizasyonu
Proteinler	<ul style="list-style-type: none">• Peptid zincirlerinde kopma• Denatürasyon
Kükürlü aminoasitler	<ul style="list-style-type: none">• Protein denatürasyonu ve çapraz bağlanma• Enzimlerde inhibisyon
Nükleik asitler	<ul style="list-style-type: none">• Tek ve çift iplik kırılmaları• Proteinlerde çapraz bağlar• Baz içermeyen bölgeler
Nükleik asit bazları	<ul style="list-style-type: none">• Hidroksilasyonlar• Mutasyonlar, kimyasal modifikasyonlar• Şekerlerde benzer reaksiyonlar

2.3. Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu bir zincir reaksiyonu olup, daha ileri peroksidasyonu başlatan serbest radikaller için devamlı bir kaynak sağlar. Lipit peroksidasyonu; fosfolipit, glikolipit, gliserid ve steroidlerin yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin oksidan maddeler aracılığıyla alkol, aldehit, hidroksi asit, etan ve pentan gibi ürünlere yıkılmasını kapsayan, potansiyel olarak yıkıcı etkileri olan zincir reaksiyonudur. Bu şekilde meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür[2, 9].

Serbest oksijen gruplarının dokulara yönelik olarak meydana getirdikleri hasar ve bunların önemli sonuçlarından biri olan lipit peroksidasyonunun şiddetini belirleyen en önemli kriterlerinden biri malondialdehit (MDA) düzeylerinin tespit edilmesidir. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir. Fakat lipit peroksidasyonunun derecesiyle iyi ilişki gösterir. Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan MDA kan plazmasında kolaylıkla teşhis edilebilmekte olup, oksidatif stres ölçümlerinde kullanılır. Ayrıca MDA plazmada çözünür olduğundan idrarda da saptanabilir[2].

Üç yada daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu, malondialdehit (MDA) üretimiyle sonuçlanmaktadır. Membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olan MDA; deformabilite, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzeyindeki belirleyicilerin kümeleşmesi gibi iç membranın bazı özelliklerini değiştirmektedir. Ayrıca diffüze olabildiğinden DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilmektedir. MDA bu özelliklerinden dolayı mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir[2,35].

2.3.1. Lipit Peroksidasyonunun Mekanizması

Biyolojik membranlarda serbest radikallerle uyarılan lipit peroksidasyonu Başlama, Yayılma ve Sonlanma reaksiyonları olmak üzere üç aşamada gerçekleşir[36].

2.3.1.1. Başlama

Peroksidasyon, serbest radikallerin doymamış yağ asitlerinin yan zincirindeki metilenik karbonlardan hidrojen atomu çıkartmak için yaptıkları atakla başlar. Demir ve bakır gibi eşlenmemiş elektronlara sahip olan geçiş iyonlarının varlığı peroksidasyonun başlaması için gereklidir. Hidrojen atomunun zincirden çıkarılması karbon atomu üzerinde eşlenmemiş bir elektron bırakır ve karbon merkezli radikal (L.) oluşumuna yol açar. Aerobik hücrelerde sık görülen bu olay radikallerin moleküler düzenlenme ile konjuge dien şekline çevrildikten sonra moleküler oksijenle reaksiyona girerek peroksi radikalini (LOO.) üretmesidir[35].

2.3.1.2. Yayılma

Bu peroksi radikali diğeri bir peroksi radikali ile birleşir ya da membran proteinleri ile etkileşebilir. Fakat en önemlisi peroksi radikallerinin membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomu çıkarabilmeleri ve peroksidatif zincir reaksiyonu yaymalarıdır. Böylece yan zincirlerden hidrojen atomunun çıkarılması ile her defasında lipit hidroperoksitleri (LOOH) ve yeni bir peroksi radikali oluşmaktadır. Peroksidasyon, bir kere başladıktan sonra otokatalitik olarak yayılabilmekte ve yüzlerce yağ asidi zincirleri lipit hidroperoksitlerine çevrilebilmektedir[35,36].

Yayıma zincirinin uzunluğu birçok faktöre bağlıdır;

1. Membrandaki lipit/protein oranı: Membran proteini ile etkileşen radikalın şansı membranın protein içeriği arttıkça yükselir.
2. Yağ asidi bileşimi radikalın membranda doymamış yağ asidi içeriğinin artması peroksidasyona olan duyarlılığı arttırmaktadır. Halbuki kolesterolün varlığı peroksidasyonu baskılamaktadır. Normal insan eritrositlerinde lipit peroksidasyonunun derecesi ile membran kolesterol konsantrasyonu arasında belirgin bir negatif korelasyon bulunmuştur. Plazma membranında kolesterolün varlığı bazı radikallerin yollarının kesilmesine neden olduğu gibi yağ asidi zinciri ile kolesterolün hidrofobik halkasının etkileşmesi membranın iç yapısını değiştirir[35].
3. Oksijen konsantrasyonu.
4. E vitamini gibi zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanların varlığı: Biyolojik membranlarda serbest radikal toplayıcısı olarak görev yapan E vitamini kendi hidrojen atomunu peroksi radikallerine vererek hidroperoksitlerin oluşumuna yol açar. Bu hidroperoksitler daha sonra glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ile kendilerine karşılık gelen nontoksik hidroksi bileşiklerine ayrılmaktadır[35].

2.3.1.3. Sonlanma

Demir ve bakır iyonları veya bu iyonların fosfat esterleri ile oluşturduğu basit şelatları (Fe^{+2} ADP), hem, hemoglobin ve miyoglobin içeren bazı demir proteinleri lipit hidroperoksitlerini bozarak peroksidasyonu sonlandırmaktadır. Bu kompleks bozunma reaksiyonlarının ürünlerini; etan, pentan gibi hidrokarbon gazları, ROOH, RCOOH, ROH ve RCHO gruplarını içeren kısa zincirli yağ asitleridir[36].

2.3.2. Biyolojik Sistemlerde Lipit Peroksidasyonunun Sonuçları

Lipit peroksidasyonu sonucu açığa çıkan ürünler, membran permeabilitesini ve mikroviskozitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Membranlardaki yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan kısa zincirli yağ asitleri ve triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi aminoasitleri içeren yapısal proteinlerin oksidasyonu, membran permeabilitesinin artmasına ve membrandaki akışkanlığın azalmasına neden olmaktadır. Lipit hidroperoksitleri ve lipit peroksi radikalleri serbest oksijen radikalleri gibi aynı hücrenin birçok komponentiyle reaksiyona girerek sellüler ve metabolik fonksiyonlar üzerinde toksik etkilerini şu şekilde gösterirler[36,37].

- Membrana bağlı reseptörlerin ve enzimlerin inaktivasyonuna yol açarlar[37].
- Membranın salgılama fonksiyonunun kaybına neden olurlar.
- Trans membran iyon gradiyentini bozarlar. Ca^{+2} gibi iyonlara karşı non spesifik permeabiliteyi artırırlar.
- Mitokondride oksidatif fosforilasyonu olumsuz yönde etkilerler.
- Mikrozomal enzim aktivitelerinde değişikliklere yol açarlar.
- Subsellüler organellerin (lizozom gibi) bütünlüğünün kaybolmasına neden olurlar.

2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu koruyucu mekanizmaların bir kısmı serbest radikal oluşumunu önlerken, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemektedir. Bu işlevleri yapan maddelere genel olarak *Antioksidanlar* denir. Diğer bir ifadeyle, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların organizmada oluşturduğu hasarı önlemek için vücutta şekillenen savunma mekanizmalarına *Antioksidanlar* veya *Antioksidan Savunma Sistemleri* denir[5,9].

Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve reaktif oksijen türlerini toplayarak lipit peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar etkilerini, serbest radikallerin meydana gelişini önlemek ve mevcut olanları etkisiz hale getirmek suretiyle göstermektedirler[9]. Antioksidanlar etkilerini, şimdiye kadar tespit edilebilen altı değişik mekanizma ile gösterirler. Bu mekanizmalar birbirinden bağımsız veya bir arada işleyebilmektedir[5,7,38].

1. Oksijen ile reaksiyona girerek ya da onun yerini alarak lokal oksijen konsantrasyonunu azaltabilirler.
2. Hidroksil (OH) radikali yapısında yer alan hidrojen atomları bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyerek peroksidasyonun başlamasını önleyebilirler.
3. Membran lipitlerini direkt etkileyerek peroksit oluşturabilen singlet oksijeni (1O_2) baskılayabilir ya da temizleyebilirler.
4. Peroksitleri, alkol gibi nonradikal ürünlere çevirebilirler. Örneğin; GSH-Px, peroksitleri bu yolla temizleyen bir antioksidandır.
5. Metal iyonlarını bağlayarak, reaktif grupların (OH, $Fe^{+2}/Fe^{+3}/O_2$ kompleksleri gibi) veya lipit peroksitlerden peroksil ve alkoksil radikallerinin oluşumunu önleyebilirler.
6. Zinciri kırabilirler. Yani, zincir oluşumuna neden olabilen serbest radikallerle reaksiyona girebilirler ve yağ asidi zincirlerinden sürekli hidrojen iyonu salınımını

önleyebilirler. Bir oksidatif zincirde antioksidanlar farklı basamaklarda etki gösterirler. Lipit peroksidasyonunu (LPO) yukarıdaki mekanizmalardan ilk dört tanesi ile önleyenler "Koruyucu Antioksidanlar"olarak adlandırılır. Beşinci mekanizma ile etki eden antioksidanlar koruyucu olmakla birlikte reaksiyon sırasında tüketilebilir ya da tüketilemezler. Altıncı mekanizma ile etki eden zincir kırıcı antioksidanlar ise radikallerle kompleks yaptıklarında kırma reaksiyonu sürecinde tüketilirler[5].

Antioksidanlar endojen antioksidanlar ve eksojen antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılabilirdiği gibi enzim olanlar ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar[2,16].

2.4.1. Endojen Antioksidanlar

2.4.1.1. Enzimatik Antioksidanlar

Hücrede, hücresel karışıklıkları azaltıp, oksidatif strese neden olan etmenlerin etkilerini yok ederek hücrenin en uygun koşullarında kalması için uğraşan antioksidan enzim sistemler mevcuttur. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon-S-Transferaz (GST), Süperoksit Dismütaz (SOD), Sitokrom Oksidaz ve Katalaz (CAT), lipit peroksidasyonunu ve toksik oksijen radikallerini etkisiz hale getirebilen en önemli antioksidan savunma sistemleri arasındadır[2,5,39].

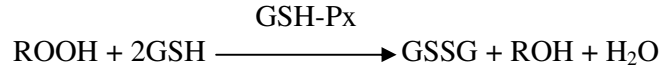
2.4.1.1.1. Glutasyon-S-Transferaz (GST)

Ksenobiyotiklerin (yabancı maddeler) biyotransformasyonunda önemli rol alan bir enzimdir. GST'lar antioksidan aktivitelere ilave olarak çok önemli biyokimyasal fonksiyonlara da sahiptirler. GST'lar temel olarak ksenobiyotik bileşiklerin, ilaçların, karsinogenlerin, pestisit ve herbisit gibi çevre kirleticilerin yer aldığı grupların detoksifikasyonunda rol oynarlar[2, 23].



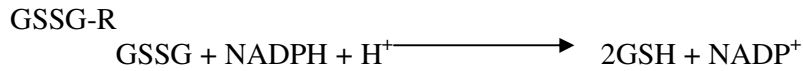
2.4.1.1.2 Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

GSH-Px, hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlayan ve yağ asidi peroksitlerinin alkollere dönüşümünü katalize eden enzimdir. GSH-Px'in bu etkisiyle hücrel ve subsellüler membranların oksidatif etkiden korunmasını sağladığı belirtilmiştir. GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizlemektedir[2,23].



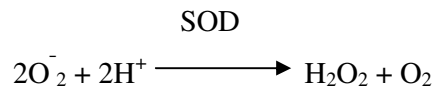
2.4.1.1.3. Glutatyon Redüktaz (GSSG-R)

Hidroperoksitlerin redükte olması esnasında meydana gelen okside glutatyon (GSSG), GSSG-R'ın katalizlediği reaksiyonla tekrar redükte glutatyona (GSH) dönüşür. Reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH'a ihtiyaç vardır[2].



2.4.1.1.4. Süperoksit Dismütaz (SOD)

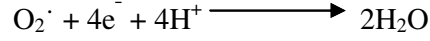
Bu enzim, süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder.



Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipit peroksidasyonunu inhibe eder[2].

2.4.1.1.5. Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin bir enzimi olup, aşağıdaki reaksiyonla süperoksiti detoksifiye eder.



Fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden bu reaksiyonda süperoksit üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşar. Bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek peroksitin zararlı etkilerine engel olurlar[2].

2.4.1.1.6. Katalaz (CAT)

Dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Görevi, hücreler için zararlı olan hidrojen peroksiti suya ve oksijene parçalamaktır.



Katalazın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşı olup, büyük moleküllü lipit hidroperoksitlerine ise etki etmez[2].

2.4.1.2. Nonenzimatik Antioksidanlar

β - karoten, α - tokoferol (vitamin E), askorbik asit (vitamin C), urat, seruloplazmin, sistein, miyoglobin, transferin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, albumin, methionin, melatonin, karnozin ve glutatyon önemli nonenzimatik antioksidanlardır[9].

2.4.2. Eksojen Antioksidanlar

Vitamin A, vitamin C, vitamin E, allopurinol, oksipurinol, folik asit, pterin aldehit, adenozin, lokal anastezikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar, trolox-C (vitamin E analogu), mannitol, DMSO (Dimetil sülfoksit), sitokinler, demir şelatörleri ve mannitol eksojen antioksidanlardır. Vitamin E, vitamin C, tioller ve karotenoidlerin serbest radikallerin zararlı etkisi sonucu oluşan doku ve makromolekül (DNA, lipit, protein) hasarına karşı vücudu koruduğu ve hücrenin antioksidan sistemini güçlendirdiği bildirilmiştir. Vitamin E'nin bilinen en önemli fonksiyonlarından birisi antioksidan özelliği nedeniyle doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu önlemesidir[39,40].

Oksidatif stres sonucu meydana gelen oksidan maddelerin zararlı etkilerinden korunmak amacıyla sitokinler, barbitüratlar, demir şelatörleri, ksantin oksidaz inhibitörleri ve mannitol gibi ajanların kullanımı oldukça yaygındır[9].

Son yıllarda oksidan maddelerin olumsuz etkilerinin azaltılması veya ortadan kaldırılması yönünde çeşitli nonenzimatik antioksidan besinlerin tespiti yoğunluk kazanmıştır. Bu besin maddelerinden biri de kefirdir. Kefir sütteki tüm besin öğelerini içerir ve süte göre vitamin B₁, B₂ ve folik asit yönünden zengindir. Kefirin antioksidatif etkisinin yanında antifungal, antibakteriyel, hipokolesterolemik ve immunmodülatör etkisinin olduğu da belirtilmiştir[41].

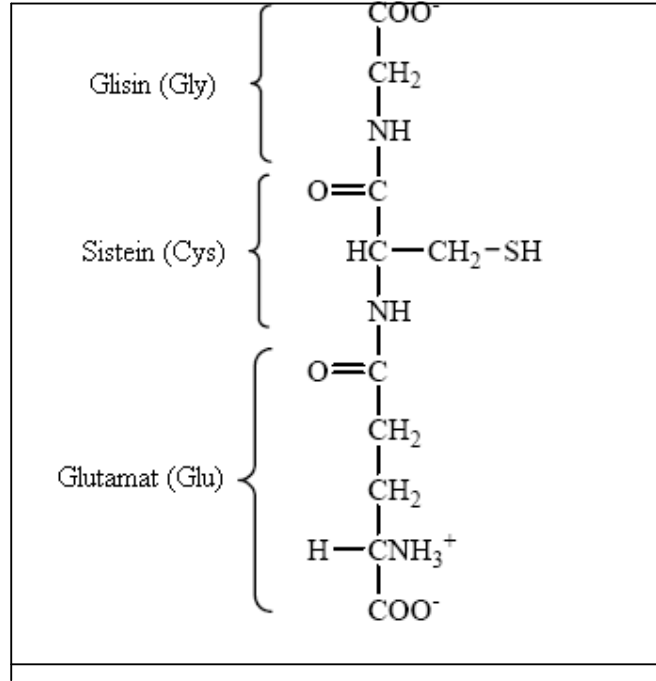
Çizelge 4. Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi[16].

Enzimatik Antioksidanlar	Nonenzimatik Antioksidanlar	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon (GSH)	Albumin
Katalaz (CAT)	α - Tokoferol (vit E)	Seruloplazmin
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Askorbik asit (vit C)	Transferrin
Glutasyon-S-Transferaz (GST)	β -Karoten	Ferritin
Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	Flavonoidler	Laktoferrin
Fosfolipit hidroperoksit	Ürat	Melatonin
glutasyon peroksidaz (PLGSH-Px)	Bilirubin	Sistein

2.5. Glutasyon (GSH)

İlk kez 1890 yılında “philothion” olarak adlandırılan glutasyon (gamma-glutamil-sisteinil glisin) RH_2 formülü ile gösterilmiştir. Daha sonra bileşik glutasyon olarak adlandırılmış, glutamat ve sisteinden oluşmuş bir dipeptid olduğu ileri sürülmüştür. 1929 yılında ise Kendall ve arkadaşları tarafından bugünkü gamma-glutamil-sisteinil glisin adıyla bilinen bir tripeptid olduğu bildirilmiştir[42, 43].

Glutasyon (GSH) hemen hemen tüm aerobik canlılarda en yaygın olarak bulunan, düşük molekül ağırlıklı intrasellüler tiyol bileşiği olup bütün canlı hücrelerde milimolar (0.5-10 mM), plazmada ise mikromolar (μM) derişimlerde bulunur. Tripeptid yapısında olan GSH molekülü, gamma-glutamil köprüsü ve sülfidril grubu şeklinde iki kısımdan meydana gelmiştir[42, 44].



Şekil 1. Glutatyon (GSH) molekülü[45].

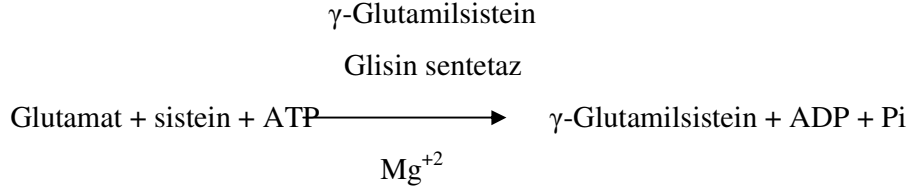
Hücre içerisinde belirli miktarlarda bulunan GSH'ın, protein ve DNA sentezi, transport, enzim aktivitesi, metabolizma ve oluşan oksidatif strese karşı hücre savunması gibi çok önemli biyolojik fonksiyonları olduğu bilinmektedir. Çok yönlü fonksiyonlarının olmasından dolayı GSH, enzim mekanizmaları, makromolekül biosentezi, ara metabolizma, ilaç metabolizması, radyasyon, kanser toksisitesi, transport mekanizmaları, immünoloji, endokrinoloji ve yaşlanma gibi değişik konularda yapılan araştırmalar için önemli bir yer tutmaktadır[42,43].

GSH bir çok reaksiyonda koenzim olarak görev yaparken ilaçlar ve diğer yabancı maddeler, metabolik aktivite sırasında oluşan östrojen, prostoglandin ve lökositler gibi bileşiklerle konjugatlar oluşturarak metabolizma olaylarına katılmaktadır. Hücre dışına taşınabilen GSH membranda bulunan γ -glutamil transpeptidaz (GGT) enziminin etkisiyle aminoasitlerle birleşip bunların transportunda rol oynamaktadır. Taşınan GSH hücre membranı ve yakın çevrelerinde oluşan indirgenme

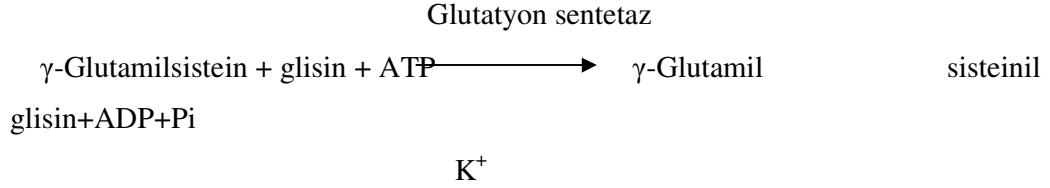
tepkimelerine katılır, plazmaya ve diğer hücrelere geçebilir. Bu bakımdan glutatyonun, sisteinin depo ve transport formu olduğu düşünülmektedir[42, 44].

Glutatyonun biyosentezi, sitozolde iki aşamada meydana gelmektedir.

I. Aşama



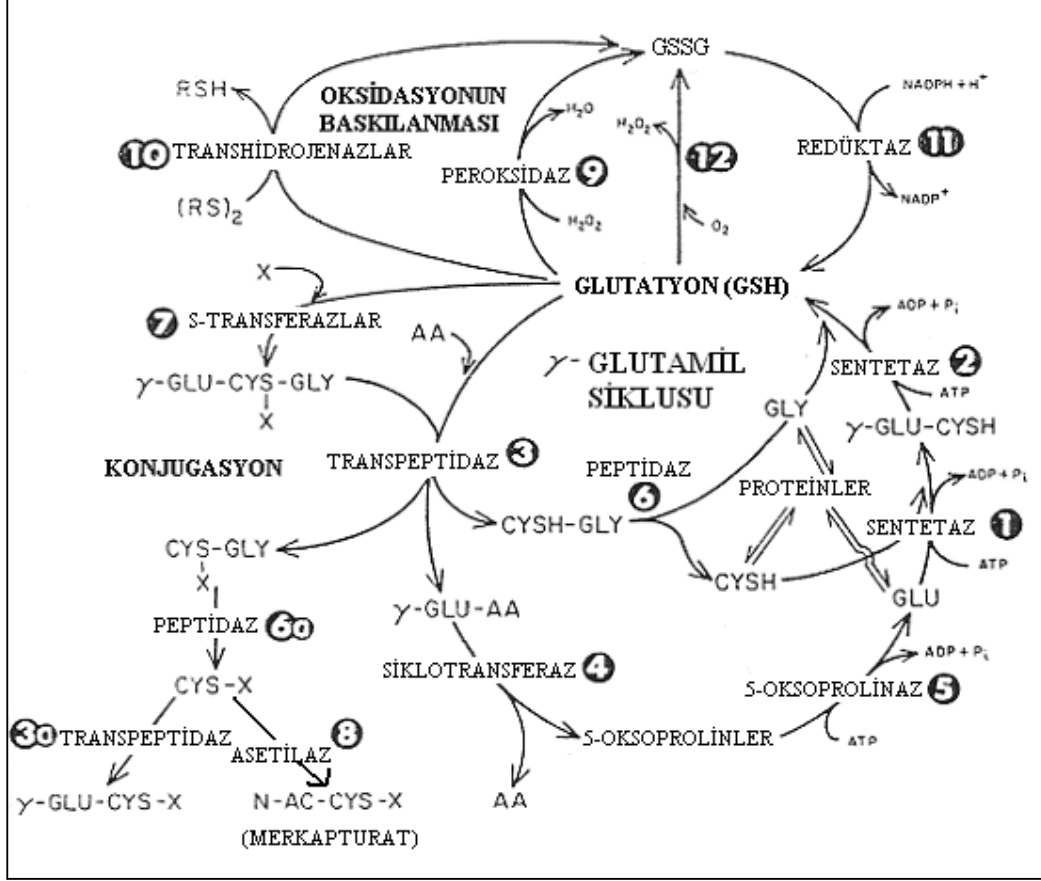
II. Aşama



GSH hücre içi düzeylerinin düzenlenmesi amacıyla, Glutamil sistein sentetazı, non allosterik feed-back inhibisyon yoluyla kontrol etmektedir[42, 44].

Glutatyon biyosentezinde inhibitör etkili bir bileşik olan bütionin sülfoksimin, γ -glutamil sisteinil sentetaz enzimini inhibe eder. Bu bileşik glutamin sentetaz inhibitörü olan metionin sülfoksim'in analogudur. Metionin sülfoksim, γ -glutamil sistein sentetaz enzimini de inhibe eder. Metionin sülfoksim, ATP tarafından fosforillenerek enzimin aktif bölgesine geri dönüşümsüz olarak bağlanır[42, 43].

2.5.1. Glutatyon Metabolizması



Şekil 2. Glutatyon metabolizması[42].

AA: Aminoasitler, 1: γ -glutamil sistein sentetaz, 2: GSH sentetaz, 3 ve 3a: γ -glutamil transpeptidaz, 4: γ -glutamil siklotransferaz, 5: 5-Oksoprolinaz, 6 ve 6a: Dipeptidazlar, 7: GSH-S-Transferaz, 8: N-Asetilaz, 9: GSH Peroksidaz, 10: Transhidrojenazlar, 11: Glutatyondisülfit redüktaz(GSSG), 12: O₂ tarafından GSH'ın oksidasyonu.

Glutasyon metabolizması genel olarak aşağıdaki şekilde özetlenebilir[42, 43].

GSH'un sentez ve yıkımını gösteren genel reaksiyonlar (Reaksiyon 1-5) arasındadır. Gammaglutamil döngüsü olarak da adlandırılan Meister Döngüsü ile aminoasitlerin hücre zarından transportu sağlanır. Bu döngüde GSH, GSSG ve konjugatlarının yıkımı membrana bağlı bir enzim olan γ -glutamil transpeptidaz (GGT) tarafından başlatılır. Bu reaksiyon sonunda γ -glutamil aminoasitleri, γ -glutamil glutasyon ve glutasyon meydana gelir. γ -glutamil aminoasitleri başta böbrek olmak üzere diğer organ ve hücrelere serbest aminoasitlerden daha hızlı taşınır[42].

GSH'un oksidasyonu (Reaksiyon 12) ya enzimatik olmayan şekilde ya da glutasyon tiyol transferaz (Reaksiyon 10) ve glutasyon peroksidaz (Reaksiyon 9) enzimlerinin aktivitelerine bağlı olarak gerçekleşir. Glutasyon disülfid redüktaz (Reaksiyon 11) tarafından katalizlenen reaksiyon ile GSH transferaz enzimleri için substrat; peroksidaz enzimleri ve tiyol transferazlar için ise indirgeyici güç sağlamış olur[43].

Glutasyonun okside (GSSG) ve redükte (GSH) formları, bazı endojen ve eksojen bileşikler ile konjuge olurlar (Reaksiyon 7) ve oluşan S-konjugatlarının glutamat kalıntıları γ -glutamil transpeptidaz etkisi ile uzaklaştırılırken (Reaksiyon 3) parçalanmayı takiben meydana gelen dipeptit (Reaksiyon 6) asetilasyon ile merkapturat'a (Reaksiyon 8) dönüşür. Merkapturik asit sentezi olarak da bilinen bu yan yol ile asetillenen bazı ilaçların toksik etkileri GSH tarafından ortadan kaldırılır[43].

Glutasyonun dokulardaki düzeyinin düzenlenmesinde γ -glutamil transpeptidazın (GGT) rolü olduğu düşünülmektedir. GSH'un karaciğerdeki sentezi ile böbrek dokusundaki GGT enzimi tarafından yıkımı arasında bir denge vardır. Bu denge vasıtasıyla GSH'un dolaşımında sabit düzeylerde kalması sağlanır[43].

2.5.2. Glutatyonun Biyokimyasal Önemi

Glutatyon metabolizmada meydana gelen serbest oksijen türlerinin yıkıcı etkilerine karşı hücreleri koruyan en önemli antioksidan maddelerden birisidir. Glutatyon hücrelerde okside (GSSG) ve redükte (GSH) formda bulunur ve antioksidan etkisini bu iki form arasındaki döngüsü sırasında gerçekleştirmektedir. GSH'un esas reaktif grubu SH grubu, serbest radikallerin ortaklanmamış elektronu ile bağlanarak radikal oluşumunu azaltmaktadır.

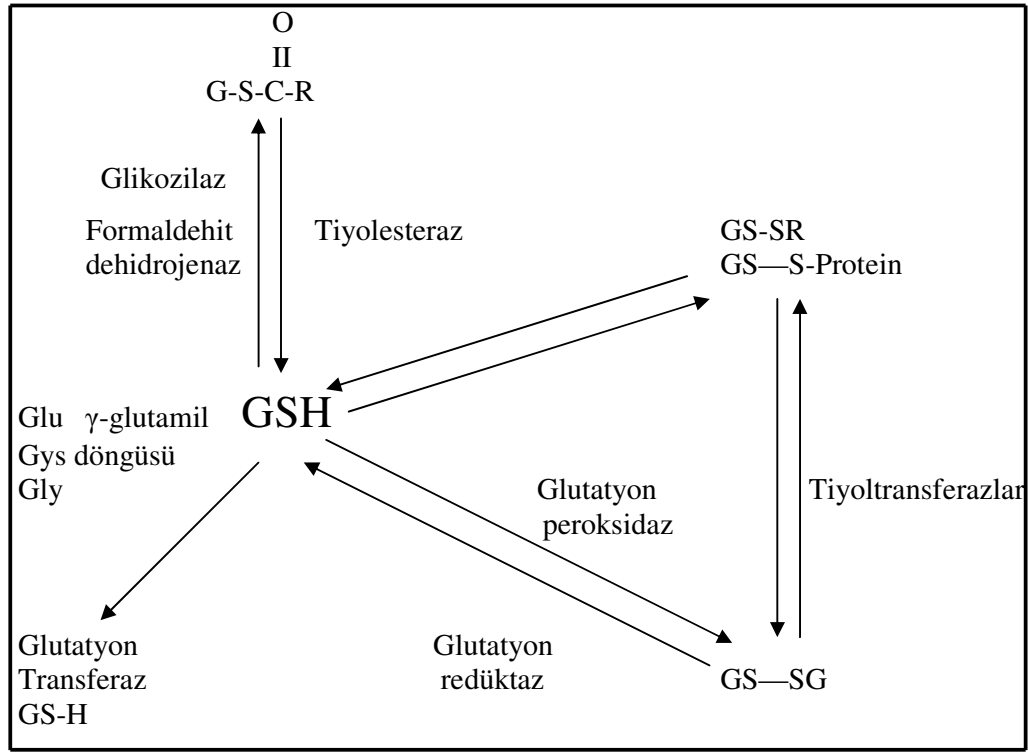
Lipit peroksidasyonunun oluşumu ile GSH konsantrasyonu azalırken, GSSG konsantrasyonu yükselir. Çevre, metabolizma ve bireye bağlı bir çok faktörün etkisiyle organizmada oksidatif stres artabilir ve buna bağlı olarak da serbest radikal oluşumu artar. Dolayısıyla hücreleri bu serbest radikallerin yıkıcı etkilerine karşı korumakla görevli GSH düzeyleri de değişmektedir. Hücrelerde oksidatif stres artarken genellikle GSH düzeyleri düşer, bununla birlikte GSSG seviyeleri yükselir[42, 43].

Glutatyonun organizmada üstlendiği biyolojik görevler şunlardır[43];

- Endojen peroksitler ve serbest radikallerin yıkımı
- Zararlı bazı bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlaması
- Aminoasitlerin membran transportunda yer alması
- Proteinlerdeki –SH grubunu koruması
- Bazı enzimler için koenzim görevi yapması
- Disülfid değişim reaksiyonlarına katılması

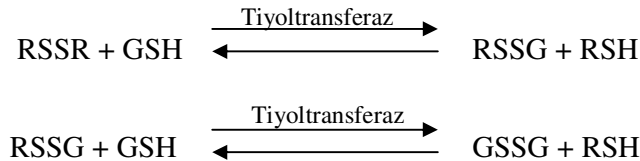
2.5.3. Glutatyona Bağlı Enzim Sistemleri

GSH, biyolojik materyallerde indirgenmiş sülfür kaynağı olarak bulunan bir bileşiktir. Bu nedenle oksijen metabolizması sırasında meydana gelen toksik ve reaktif bileşiklerin detoksifikasyonunda GSH ve GSH'a bağlı enzimlerin rolü büyük olup, aşağıda Şekil.3'da olduğu gibi özetlenebilir. GSH'un canlı organizmada çok önemli ve kilit rolleri vardır[42, 44].



Şekil 3. Glutasyon (GSH)'a bağlı enzim sistemleri[42, 44].

Tiyol grupları hücre içerisinde daima indirgenmiş durumda bulunur. Sistein aminoasidi ve CoA'nın protein sentezi ve bir takım enzimatik reaksiyonlar için indirgenmiş durumda olmaları gerekir.



Formaldehit dehidrogenaz ve glikozilaza gelince, bu enzimler reaktif aldehitlerin inaktivasyonunu katalizlerler. Reaksiyon esnasında glutatyon tiyol grubu ile aldehit arasında bir tiyohemiasetal türevi meydana gelir. Glutatyon türevi enzimatik reaksiyon ile bir tiyol estere dönüştürülür. Bu dönüşümde aldehit grubunun yükseltgenmesi, karboksilik asit yükseltgenme düzeyine eşdeğerdir. Kinetik çalışmalarına göre glutatyon formaldehit dehidrogenaz enziminin katalitik mekanizmasında esas aktivatör olarak görülmektedir[44].

2.5.4. Glutatyonun Tayin Yöntemleri

2.5.4.1. Spektrofotometrik Yöntem

Dokularda geniş bir dağılım gösteren ve bazı önemli biyolojik fonksiyonlara sahip GSH ve türevlerinin miktar tayini çalışmaları GSH'un ilk keşfedildiği yıllara dayanır. GSH indirgenmiş halde sülfidril ve oksitlenmiş glutatyon (GSSG) olarak da disülfid gruplarına sahip iki şekilde bulunur[46]. GSSG'nin miktar tayini GSH'a göre daha güçtür. Bunun nedeni de GSSG'nin normalde hücreler içerisinde ve düşük miktarlarda bulunuyor olmasıdır. GSSG'nin tayini genel olarak GSSG'nin kimyasal elektrolitik ve enzimatik olarak indirgenip GSH'a dönüştürülmesi ve oluşan GSH üzerinde saptanması esasına dayanır. Enzimatik indirgenme NADH veya NADPH tarafından maya glutatyon redüktazı varlığında oluşturulur. Daha sonra oluşan GSH, 2-nitro-5-tiyobenzoik asit ile kromoforik bir bileşik meydana getirir ve bu bileşiğin 412 nm'de spektrofotometrik olarak (ng) düzeyinde saptanması mümkündür[44, 46].

2.5.4.2. HPLC Yöntemi

GSH, izokratik ters faz HPLC metodu ile tümör hücrelerinden sağlanan biyopsi materyalinde ölçülebilmştir. Materyal sülfosalisilat çözeltisi ile ön işlemden geçirilir. GSH için konjugatlarını elde etmek amacıyla monobromobiman kullanılır ve floresans özellikli GSH konjugatları ters faz oktadesilsilan kolonundan elde edilir. İzokratik koşullar asetonitril/amonyum fosfat tamponu tetrabutylamonyum hidroksit ile sağlanır[44, 47].

2.5.4.3. Fluorometrik Yöntem

GSH ve GSSG'nin fluorometrik tayinini oftalaldehit gibi bir floresans bileşik kullanılarak geliştirilmiştir. Bu yöntemde, GSH OPT ile pH: 8 ve GSSG OPT ile pH:12'de reaksiyona girer. GSH N-etilmaleimit ile kompleks meydana getirir. Bu durumda GSSG ölçümünde GSH'un girişimi engellenmiş olur. Bu yöntemde GSH ve GSSG için verim %91-100 oranındadır[44, 47].

2.6. Kolestaz

Kolestaz terimi, safra akışının azaldığı veya tamamen durduğu bir olayı tanımlamaktadır. Safra oluşumu, karaciğer hücreleri tarafından safra bileşenlerinin plazmadan alınmasını, bunların hücre içerisinde taşınmasını ve metabolik değişikliklerini, safra sekrete edici sistemin etkinliğini, zarların akışkanlığını ve geçirgenliğini, safra kanaliküllerindeki son değişimleri kapsayan çok basamaklı karmaşık bir olaydır[48]. Safra kanaliküllerinden karaciğer içi safra yollarına verilen bu sıvı safra kesesinde toplanarak bazı değişikliklere uğrar ve son şeklini alarak barsağa dökülür. Böylece karaciğer içi safra ile safra kesesi safrası arasında bileşenlerin miktarı bakımından bazı farklılıklar bulunmaktadır[49].

Çizelge 5. Safra bileşimi[50].

	BİLEŞİMİ	
	Karaciğer	Safra kesesi
Su	96,5- 97,5	83-90
Safra tuzları	1,0- 1,8	6-11
Mukopolisakkaritler	0,4- 0,5	1,5- 3,0
Kolesterol ve Fosfolipit	0,2- 0,4	0,5- 5,0
Elektrolitler	0,7- 0,8	0,6- 1,0

Safra, en büyük kısmını oluşturan suyun yanında, safra asidi tuzları, kolesterol ve fosfolipitler (özellikle fosfatidilkolin) olmak üzere üç tür lipit içermektedir. Ayrıca, mukopolisakkaritler, sodyum, potasyum, klorür, bikarbonat gibi elektrolitler ve özellikle alkali fosfataz gibi enzimler safra yapısına katılmaktadırlar. Safra asitleri, safra yapısının başlıca organik bileşenleridir. Bunlar, kolesterolün hidroksillenmiş asit karakterli türevleri olup safradaki kolesterol ve fosfolipitleri, deterjan özelliğine dayanarak erimiş halde tutarlar ve barsaktaki lipit sindirimine yardımcı olurlar[51,52].

Safra asitlerinin sentezi karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumundaki enzim reaksiyonları ile olmaktadır. Bunlar taurin ve glisin amino asitleri ile konjuge olarak safra tuzları şeklinde safra içine sekrete edilirler. Normal koşullarda insan safrasında glisin ile konjugasyon, taurine göre üç kat daha fazladır. Ana safra kanalı ile ince barsağa atılan safra asitleri yeniden emilerek karaciğer tarafından alınır ve tekrar safraya atılırlar (entero-hepatik dolanım). Böyle safradaki safra asitlerinin % 90 kadarı entero-hepatik dolanımdan geleni, % 10 kadarı ise yeniden karaciğer tarafından sentez edilenleri kapsamaktadır[53].

Safra asitlerinin safra akışı ile yeter miktarda atılmasının, entero-hepatik dolanımdan alınan miktarın, atılandan 5-10 kat daha fazla olmasıyla mümkün olduğu gösterilmiştir.

2.6.1. Safra Renkli Maddelerin Oluşumu

Safra ile atılan maddelerden biri bilirubin pigmentidir. Bilirubin hemoglobin yıkımındaki son ürünlerin başında gelir. Hücre membranlarında büyük bir erirlik gösterir aynı zamanda çok toksik bir maddedir[4].

Dolaşımında yaklaşık 120 gün kadar kalan kırmızı kan hücreleri özellikle karaciğer ve dalakta bulunan retikuloendotelial sistem hücreleri tarafından yıkılırlar. Hücre membranının yırtılması ile serbestleşerek doku makrofajları tarafından fagosite edilen hemoglobin burada globin ve heme ayrılır.

Hem halkası açılarak :

- Serbest demir (kanda transferrinle taşınır)
- Dört pirol çekirdeği (düz bir zincir yaparak safra pigmentlerini oluşturur) oluşur.

Oluşan safra pigmentlerinden ilki yeşil pigment biliverdindir. Biliverdin redüklenerek (indirgenerek) sarı-kırmızı renkteki bilirubini oluşturur. Bilirubin plazmada hafifçe çözünür ve albumine kovalent olmayan bağlarla bağlanarak karaciğere taşınır. Karaciğer hücre membranınca absorbe edilen bilirubin, plazma membranından ayrılarak, karaciğer hücrelerindeki Y ve Z proteinleri adı verilen iki proteinden biri ile birleşir. Ancak, hemen sonra bilirubin bu proteinden ayrılır ve

yaklaşık %80'i glukuronik asit ile birleşerek bilirubin glukuronat, %10'u sülfatla birleşerek bilirubin sülfat yapar, %10'u ise çeşitli maddelerle birleşir. Non-konjuge bilirubin yağda eriyebilir, toksiktir ve albumine sıkı bir şekilde bağlanarak yüksek kan düzeylerinde bile idrarla atılmayan bir form oluşturur. Yüksek kan düzeylerinde dokulara özellikle insanlarda beyine girebilir ve toksik hasara neden olur. Konjuge bilirubin suda eriyebilir, toksik değildir ve sadece gevşek olarak albumine bağlıdır. Plazmada normalden yüksek oranda bulunduğu (tıkanma sarılıklarında olduğu gibi) idrarla atılabilir. Bilirubin bu bileşikler halinde aktif transportla safra kanalcıklarına çıkarılır[4].

Barsaklara geçen bilirubinün yaklaşık yarısı bakteriler tarafından suda kolay eriyen ürobilinojene çevrilir. Ürobilinojenin bir kısmı barsaktan geri emilerek portal dolaşıma geçer ve böbreğe gelerek burada sarı renkli ürobiline çevrilir. İdrara rengini bu madde verir. Dışkıdaki ürobilinojenin çoğu barsak bakterileri tarafından okside edilerek sterkobiline döner ve dışkının tipik rengini verir[4].

2.6.2. Kolestaz ve Oksidatif Stres

Kolestaz, çoğu kez tek ve kesin bir mekanizmanın ürünü olan bir sendrom değildir. Safra oluşumu için daha önce belirtilen fizyolojik ve metabolik olayların herhangi bir basamağındaki bozukluktan ileri gelmektedir. Kolestaz ister ekstrahepatik, isterse intrahepatik kaynaklı olsun en belirgin bulgulardan biri lipitlerdeki (kolesterol ve fosfolipit) yükselmedir. Lipoproteinlerin sentez ve metabolizmasında karaciğerlerin temel rol oynayan bir organ olduğunun anlaşılmasından sonra lipit metabolizması bozuklukları daha kolay açıklanabilmektedir. Safra kanalı tıkanıklığı sonucu oluşan kolestaz, barsak duvarında oksidatif hasara neden olur. Bunun sonucunda ksantin oksidaz aktivitesinde artış olur. Ksantin oksidaz bilinen ilk süperkoksit radikal kaynağıdır ve hasarlanmamış dokularda bir dehidrojenaz olarak vardır, pürinlerin yıkılım yolunda hipoksantinden ksantin ve ksantinden ürik asit oluşumu basamaklarında elektron akseptörü olarak moleküler oksijenden (O_2) daha çok NAD^+ kullanır. Oksijensizliğe bağlı olarak ADP'nin ATP'ye fosforilasyonunun azaldığı durumlarda (iskemi durumlarında) ADP yıkılır ve pürin bazı, ksantin oksidazın bir

oksidaz olarak etkili olmasıyla hipoksantine dönüştürülür. Ksantin oksidazın oksidaz olarak aktivite göstermesi durumunda hipoksantin ksantine ve ksantin ürik aside dönüşürken moleküler oksijen kullanılmakta, moleküler oksijen hidrojen peroksida indirgenmektedir. Tüm bu olayların sonucunda fırçamsı kenarlardaki membranda lipid peroksidasyonu artar. Yapılan deneysel çalışmalar antioksidanlarla tedavinin mukozal oksidatif hasarı önlediğini göstermiştir. Organizmada sürekli bir şekilde oluşan serbest radikallerin zararlı etkilerini önleyen antioksidan koruyucu bileşikler olduğu gibi alınan besinlerle de önlenebilmektedir[53].

Karbontetraklorür (CCl_4), deneysel karaciğer harabiyatı oluşturmak amacıyla yaygın olarak kullanılan ve peroksidant aktivitesi bilinen maddelerden biridir. CCl_4 'ün metabolizması sonucu ortaya çıkan serbest radikaller organizmalar üzerinde olumsuz etkiler oluşturmaktadır[54]. Bunlardan biri de safra kanalı tıkanması sonucu oluşan kolestazistir[55]. Kolestazise bağlı lipid peroksidasyonu meydana gelmektedir[56].

Karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikuluma (ER) yerleşmiş olan monooksijenazlar tarafından CCl_4 'den bir klor atomu ayrılarak dayanıksız bir radikal oluşur. Bu serbest radikal, doymamış yağ asitlerinde çok sayıda bulunan metil gruplarından bir hidrojen atomu koparır ve onunla birleşir. Bu reaksiyon sonucu bir taraftan kloroform oluşurken, diğer taraftan da yağ asidi esterlerinin bir serbest radikali ortaya çıkar. Serbest radikallerin oluşumu hücredeki antioksidan savunma sistemlerini aşarsa membrandaki yağ asitleri serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Lipid peroksidasyonu (LPO), organizmada bir serbest radikal etkisi sonucunda membran yapısında bulunan doymuş yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılmasıyla başlar ve malondialdehit (MDA) düzeyinin artmasına neden olur[57,58].

Bu durumda, hücrede hücrel karışıklıkları azaltıp, stres faktörlerinin etkilerini yok ederek hücrenin en uygun koşullarında kalması için uğraşan sistemler mevcuttur. Bunlar süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon (GSH) ve katalaz (CAT) enzimleri ile Vitamin C, E ve ürik asittir[57].

Vücutta, antioksidanlar, hücre metabolizmasının doğal yan ürünü olan “serbest radikallerin” zararlı etkilerini nötralize ederek, anahtar hücre bileşenlerini korurlar. Serbest radikaller, vücut tarafından oksijen metabolize edilince veya yanınca oluşurlar. Hücreler vasıtasıyla taşınırlar, diğer moleküllerin yapılarını bozup, hücresel zarara neden olurlar. Böyle hücre hasarlarının yaşlanmaya ve çeşitli sağlık problemlerine katkıda bulunduğu inanılmaktadır. Vücutta aktif olan antioksidanlara örnek olarak A, C ve E vitaminleri ve polifenoller (çay veya meyvelerde bulunan, bitki kimyasallarının bir grubudur) verilebilir.

V. vinifera (üzüm) içerisinde bulunan proantosiyandinlerin vasküler bozuklukların tedavisinde terapötik etkinliklerinin oldukları gösterilmiştir[59]. Proantosiyandinler kondanse tanin olarak bilinen alt gruba aittir. Taninler hidroksile yapılardır, karbonhidratlar ve proteinler ile çözünmez kompleksler oluştururlar ve bu özellikleri ile bağ dokusu korunmasında önemli görevler üstlenirler[59,60]. Proantosiyandinler meyvelerde, sebzelerde, kuruyemişlerde, çekirdeklerde, çiçeklerde ve kabukta bulunan doğal antioksidanlardır ve serbest oksijen radikallerine ve oksidatif strese karşı biyolojik, farmakolojik ve terapötik etkileri vardır[61]. Resveratrol fitoaleksinin grubunda bulunan doğal, kuvvetli antioksidan etkili, fitokimyasal bir bileşik olup, üzüm bitkisinin yaprak, kök ve gövde kısımlarında da bulunmasına karşın, meyve kabuklarında en yüksek konsantrasyondadır. Resveratrol potansiyel kardiyoprotektif bir maddedir. Madde, LDL oksidasyonunu inhibe etmekte, platelet agregasyonunu ve düz kas proliferasyonunu da inhibe etmektedir. Ayrıca *invivo* çalışmalarda resveratrol, sıçan karaciğerinde yağlanmayı azaltmakta ve insan plateletleri ve nötrofillerinde de proatherojenik ürünlerin oluşmasını durdurmayı önlediği de bilinmektedir[60].

Bilimsel çalışmalarda nar suyunun yeşil çay veya kırmızı şarap ile kıyaslandığında üç misli antioksidan gücüne sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca önemli bir miktarda potasyum, lif ve vitamin C ile niasin içermektedir. Nar ve nar suyu tüketiminin kanser, kalp krizi riskini azalttığı ve özellikle eklem rahatsızlıklarına iyi geldiği bir gerçektir. Kolesterolü, şekeri dengeliyor, ishali kesiyor, bağışıklık sistemini güçlendiriyor. Nar içerdiği antioksidanlar sayesinde vücudun savunma sistemini güçlendiriyor. Narın en önemli özelliklerinden biri de genel damar sağlığını özellikle

de kalbi korumasıdır. Bunu, vücudumuzdaki bazı enzimleri arttırıp savunma mekanizmamızı daha da güçlendirerek yaparlar[62,63].

2.6.3. Kolestaz Tipleri

Kolestazlar "ekstrahepatik - intrahepatik" olarak sınıflandırılabilir. Bu iki grup kolestazın klinik-laboratuar bulgularının yanısıra, histopatolojik bulguları da her zaman birbirinden kolayca ayrılamayabilir. Safra akışının engellenmesi, ana safra kanallarının tıkanmasına bağlı ise buna ekstrahepatik kolestaz denilmektedir. Karaciğer içindeki safra yollarında safra akımının yavaşlaması ise intrahepatik kolestaz diye isimlendirilmektedir[64,65]. İntrahepatik kolestazın patojenezine ilişkin görüşler son yirmi yılda belirgin şekilde değişmiştir. Bu değişiklikler, safra ile sekrete edilen bileşiklerin neler olduğu, bunların metabolizması ve safra akışı üzerine nasıl etki yaptığı konularındaki bilgilerin artmasından ileri gelmektedir. Ayrıca diğer sekresyon yapıcı epitel için geliştirilen kavramlar, hepatositlere ve safra oluşumuna uygulandığı için, intrahepatik kolestaz konusu biraz daha açıklık kazanmaktadır[67,68].

Çizelge 6. Kolestaz nedenleri[66].

İntrahepatik Kolestaz	Ekstrahepatik Kolestaz
Hepatitler (Viral, otoimmün)	Koledak taşı
Primer bilier siroz	Kolanjiokarsinom
İlaç ve hormonlar	Pankreas başı tümörü
Sistemik infeksiyonlar ve sepsis	Papila tümörü
Karaciğerin infiltratif hastalıkları	Pankreatitler
Gebelik	Safra yollarında striktür
Selim tekrarlayan kolestaz	Sklerozan kolanjit

3. MATERYAL ve METOT

3.1. MATERYAL

3.1.1. Hayvan Materyali

Bu araştırmada, 48 adet (22-26 gr) Swiss albino tipi fare kullanıldı. Hayvanlar dişi erkek ayırımı yapılmaksızın dört eşit gruba ayrıldı. 12 saat ışık ve 12 saat karanlık, yaklaşık $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve nem oranı $\%50\pm 5$ olan bir ortam sağlandı. Her gün I. Gruba (Kontrol grubu) standart fare yemi ve su verilirken, II., III. ve IV. Gruplara standart fare yemi ve canlı ağırlık başına 2 ml/kg CCl_4 olacak şekilde ağız yoluyla yemle karıştırılarak 12 hafta boyunca her gün verildi.

12 hafta süren CCl_4 uygulamasından sonra uygun laboratuvar koşullarında deney grubunda yer alan 36 adet fareden 6'sı ve kontrol grubundaki farelerden 2'sinden alınan karaciğer örnekleri $\% 10$ 'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edilerek rutin işlemlerin ardından Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda incelendi. CCl_4 uygulamasında olan fareler ile kontrol grubunda yer alan fare karaciğer dokuları karışlaştırıldığında, CCl_4 uygulanan farelerin orta şiddette intrahepatik kolestazlı olduğu tespit edildi. Rapor sonuçlarından sonra kolestazlı 30 hayvandan 10 tanesinin uygun laboratuvar koşullarında karaciğer dokuları alındı ve biyokimyasal testler için -20°C ' de derin dondurucuda bekletildi. Bundan sonraki aşamada; kolestazlı oldukları tespit edilen farelerden geriye kalan 20 adedi iki eşit gruba ayrıldı. Hayvanların vücut ağırlıkları alınarak I. Gruba canlı ağırlık başına 500 mg /kg siyah germe çekirdekli[69] zm (*Vitis vinifera*) yem kıvamına getirilerek, II. Gruba canlı ağırlık başına 500 mg/kg nar (*Punica granatum*) meyveleri oral yolla 8 hafta boyunca her gün verildi.

3.1.2 Dokuların Alınması ve Homojenizasyonu

8 hafta sonra uygun laboratuvar koşullarında karaciğer dokuları alındı ve diğer işlemlere kadar -20°C ' de derin dondurucuda bekletildi. Derin dondurucudan çıkarılan karaciğerler homojenizasyon işlemi için tartılarak 1 gram doku başına 9 ml kadar (1:10) ml potasyum fosfat tamponu ile homojenizasyon tüpüne alındı. 60 sn 13500 rpm' de ultra turrax T.25 tipi homojenizatörde homojenize edildi, sonra

santrifüj tüpüne boşaltıldı. Bundan sonra 3500 rpm' de 5 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Santrifüjden çıkan numunelerin süpernatant kısmı ependorf tüplere alındı. Tortu kısmı atıldı. Ependorf tüpteki süpernatantlar -20 °C' de MDA ve GSH ölçümleri için derin dondurucuda saklandı.

Çizelge 7. Kullanılan fare yeminin içeriği

Karışım	%
Buğday	10
Mısır	23
Arpa	15
Kepek	8
Soya	26
Balık unu	8
Et-kemik unu	4
Melas	5
Tuz	0.8
Vitamin+mineral	0.2

Vitamin A, D3, E, K3, B1 ve B12, Nikotinamid, Folik asit, Biotin, Mn, Fe, I, Co, Se, Antioksidan(buthilhidroksitoluol) ve Ca.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Aletler

- Spektrofotometre (Tecan Spectre III, A 5082, Uniequip, Austria)
- Vorteks (Velp Scientifica, ZX³, Italy)
- Santrifüj (Helius, Germany)
- Çalkalayıcı (Heidolph promax 2020, Germany)
- Hassas terazi (Precisa, 205A SCS, Switzerland)
- PH metre (Orion, 420 A, USA)
- Manyetik karıştırıcı (Nüve, MK 318, Türkiye)
- Derin dondurucu (Arçelik, 2560, Türkiye)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

- Ayarlanabilir otomatik pipetler (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, Ependorf, Varipette 4710, Germany)
- Isısı ayarlanabilir su banyosu (Clifton, England)
- Ultra Turrax T.25 tipi homojenizatör (İKA)

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeleri

- Etanol (Merck)
- TBA (Sigma)
- TCA (Merck)
- DTNB (Sigma)
- Perchloric acid %60 (Merck)
- Trisma (Merck)
- K₂HPO₄ (Merck)
- KH₂PO₄ (Merck)
- KCl (Merck)
- NaOH (Merck)
- Na₂HPO₄ (Merck)
- 1,5 ml'lik ependorf mikro santrifüj tüpleri
- Otomatik pipet uçları
- 10 ml'lik cam ve poly etilen santrifüj tüpleri
- CCl₄ (Merck, FRG Darmstadt)

3.1.5. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

- Doku Homojenizasyonunda Kullanılan Çözeltiler

0,1 M Potasyum Fosfat Tamponu / 0.15 M KCl çözeltisi (pH: 7,4)

- 17.418 g K₂HPO₄
- 13.609 g KH₂PO₄
- 0.15 M KCl (11.475 g/L çözeltisinde 1 L'ye tamamlanır)

- Çözeltinin pH'sı NaOH ile manyetik karıştırıcıda pH: 7.4'e ayarlanır.
- Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

- GSH Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Trisma

- 48,46 gr Trisma
- 1000 ml distile suda çözünür
- pH HCl ile 8,9' a ayarlanır

TBA

- 0,67 gr TBA
- 60 ml % 10'luk perklorik asitte çözünür
- 100 ml distile su ile tamamlanır
- 4 °C' de saklanır

% 10' luk TCA Çözeltisi

- 10 mg TCA
- Distile su ile 100 ml' ye tamamlanır.

DTNB Çözeltisi

- 0,099 gr DTNB
- 25 ml absolut metanolde çözünür ve koyu renkli şişede dolapta saklanır.

- MDA Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

TBA

- 0,67 gr TBA
- 60 ml % 10'luk perklorik asitte çözünür
- 100 ml distile su ile tamamlanır
- 4 °C' de saklanır

% 10' luk TCA Çözeltisi

- 10 mg TCA distile su ile 100 ml' ye tamamlanır

Renk Ayracı

- 3 kısım TCA + 1 kısım TBA

Serum fizyolojik su

3.2. METOT

Uygulanan metotların rutin hale getirilmesi için araştırmaya başlamadan önce gerekli ön çalışmalar yapıldı. Araştırmadan daha iyi sonuçların alınması amacıyla en duyarlı metotların kullanılmasına çalışıldı. Homojenizat hazırlanması metotlarda belirtildiği şekilde yapıldı.

3.2.1. Dokuda Lipit Peroksidasyonu (MDA) Tayini

Dokuda lipit peroksidasyonu (MDA) belirlemek için Placer ve ark.[71]'nin tanımladığı spektrofotometrik yöntem kullanıldı.

3.2.1.1. Prensip

pH'nın 3.4 olduğu aerobik bir ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile üst kısımdaki organik tabakanın 100 °C'de inkübasyonu, lipit peroksidasyonunun sekonder bir ürünü olan malondialdehidi (MDA) oluşturmaktadır. Oluşan MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks yapar. Pembe rengin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile lipit peroksidasyonu saptanır.

Standart eğri çizimi için 1, 1, 3, 3 tetraethoxypropane'den 10µl alındı. Daha sonra 10 ml absolut ethanolde çözülerek +4 °C'de koyu bir şişede saklandı. Bu stok çözeltilerden farklı konsantrasyonlarda çalışma çözeltileri hazırlanarak standart eğri çizildi. Belirlenen absorban değerleri MDA standart eğrisinden nmol/gr.yaş doku olarak hesaplandı.

3.2.1.2. Metot

Her tüpe 0,2 ml süpernatant, üzerine 2 ml renk ayracı konuldu ve tüpler portüpe yerleştirildi. Tüplerin ağızlarına tıpa konularak 10 dk kaynar suda kaynatıldı. Tüpler kaynar sudan çıkartıldıktan sonra musluk suyunda soğutularak yine musluk suyu konulmuş bir kapta 10 dk bekletildi. Kör için de yine bir tüpe 0,2 ml serum fizyolojik ve 2 ml renk ayracı (3 kısım % 10'luk TCA + 1 kısım TBA) konuldu. Sonra tüpler 3000 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra tüplerin üzerindeki süpernatanttan 1 ml alındı alınarak quartz tüpe konularak 532 nm' de absorban değerleri okundu. Spektrofotometre köre karşı sıfırlandı.

3.2.2. Dokuda GSH Tayini

Dokuda GSH düzeylerini belirlemek için Sedlak ve Lindsay [72]'in tanımladığı spektrofotometrik yöntem kullanıldı.

3.2.2.1. Prensip

GSH'nın sülfidril grubunun asitte çözünerek, tiyol grubunun enzimatik veya kimyasal işlemler ile ölçülmesi bu bileşiğin miktar tayininin temelini oluşturur. Belirlenen absorban değerleri GSH standart eğrisinden $\mu\text{mol/gr.yaş}$ doku olarak hesaplandı.

3.2.2.2. Metot

0,1 ml homojenizat alındı. Üzerine 0,5 ml % 10' luk TCA konuldu ve 3000 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatanttan 0,5 ml alınarak üzerine 2 ml Tampon II konuldu ve hazırlanan DTNB' den 0,1 ml konularak 5 dk bekletildi ve 412 nm' de distile suya karşı okundu. GSH standartları da aynı protokol gerçekleştirilerek çalışıldı ve standart eğri çizilerek miktar tayini yapıldı.

3.3. İstatistiksel Hesaplamalar

One-way (ANOVA) bilgisayar programı kullanılarak gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel önemi SPSS paket programı ile gerçekleştirildi. Anlamlılık derecesi, $p < 0.05$ kabul edildi[73].

4. BULGULAR

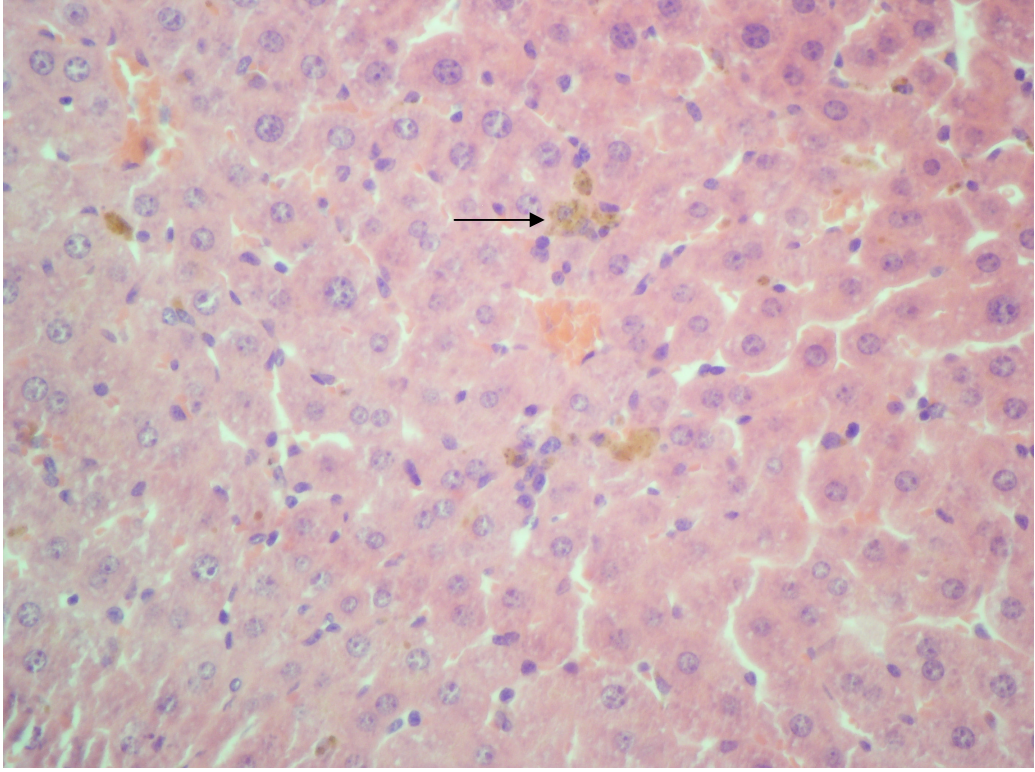
Flavanoitler, proantosiyanidinler ve polifenoller gibi yüksek antioksidan özellikli bileşikleri içeren çekirdekli siyah üzüm ve nar meyvelerinin karbon tetraklorür (CCl₄) ile kolestaz oluşturulmuş fare karaciğerlerinde, lipid peroksidasyonu (MDA) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeylerinin belirlenmesi için yapılan bu çalışmada GSH ve MDA değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması Çizelge 8 ve 9'da sunulmuştur. Resim 1'de ise fare karaciğer hücrelerinde safra pigmenti birikmesi sonucu meydana gelen kolestaz gösterilmiştir.

Çalışmada sağlıklı grup ile kolestazlı grup karşılaştırıldığında, sağlıklı grupta GSH değeri $24,68 \pm 1,38$ $\mu\text{mol/gr.yaş}$ doku, kolestazlı grupta $13,57 \pm 2,84$ $\mu\text{mol/gr.yaş}$ doku olarak saptanmıştır. Yine sağlıklı grupta MDA değeri $45,40 \pm 3,00$ nmol/gr.yaş doku, kolestazlı grupta ise $80,91 \pm 5,74$ nmol/gr.yaş doku olarak saptanmıştır. Bu sonuç bize organizmada kolestaz varlığında lipid peroksidasyonunun arttığını göstermektedir.

Kolestazlı grupta, sağlıklı grup MDA ve GSH yönünden karşılaştırıldığında, anlamlı artış gösteren MDA ile anlamlı bir düşüş gösteren GSH parametreleri, ayrıca üzüm ve nar meyveleri kolestazlı farelere verilerek bu iki parametrede meydana gelebilecek değişimler ortaya konulmaya çalışıldı. Kolestazlı grup ile üzüm uygulamasına tabi tutulan kolestazlı grup karşılaştırıldığında, kolestazlı grupta GSH değeri $13,57 \pm 2,84$ $\mu\text{mol/gr.yaş}$ doku iken, üzüm verilen kolestazlı grupta $32,7 \pm 2$ $\mu\text{mol/gr.yaş}$ doku; MDA değeri ise kolestazlı grupta $80,91 \pm 5,74$ nmol/gr.yaş doku, üzüm verilen grupta $38,8 \pm 3,1$ nmol/gr.yaş doku olarak tespit edilmiştir. Diğer taraftan kolestazlı grup ile nar verilen kolestazlı grup karşılaştırıldığında, kolestazlı grupta GSH değeri $13,57 \pm 2,84$ $\mu\text{mol/gr.yaş}$ doku iken nar uygulanan kolestazlı grupta $33,21 \pm 1,94$ $\mu\text{mol/gr.yaş}$ doku; MDA değeri ise kolestazlı grupta $80,91 \pm 5,74$ nmol/gr.yaş doku , nar verilen grupta $36,6 \pm 2,63$ nmol/gr.yaş doku olarak tespit edilmiştir.

Üzüm ve nar verilen gruplarda GSH düzeyleri kolestazlı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p < 0,05$) göstermiştir. Aynı şekilde üzüm ve nar verilen gruplarda MDA düzeyleri kolestazlı gruba göre anlamlı bir düşüş ($p < 0,05$) göstermiştir.

Kontrol ve deney gruplarına ait GSH ve MDA düzeylerinin ortalama, standart hata ve gruplar arasındaki önemi çizelge 8 ve 9'da sunulmuştur. Ayrıca gruplar arası GSH ve MDA düzeylerinin grafiksel olarak değişimi ise Şekil 4 ve 5'te belirtilmiştir.



Resim 1. Hepatosit sitoplazmasında safra pigmenti (ok). Fare 2. HEx40.

Çizelge 8. Kontrol ve kolestazlı gruplara ait GSH ve MDA değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

	Kontrol Grubu (n=10)	Kolestazlı Grup (n=10)
	X ± SD	X ± SD
MDA (nmol/gr.yaş doku)	45,40 ± 3,00 ^b	80,91 ± 5,74 ^a
GSH (µmol/gr.yaş doku)	24,68 ± 1,38 ^b	13,57 ± 2,84 ^c

n: Her gruptaki hayvan sayısı

a, b, c: Aynı satırda yer alan farklı harfler arasında istatistiksel olarak p< 0,05'e göre fark vardır.

X ± SD: Ortalama ± Standart Sapma

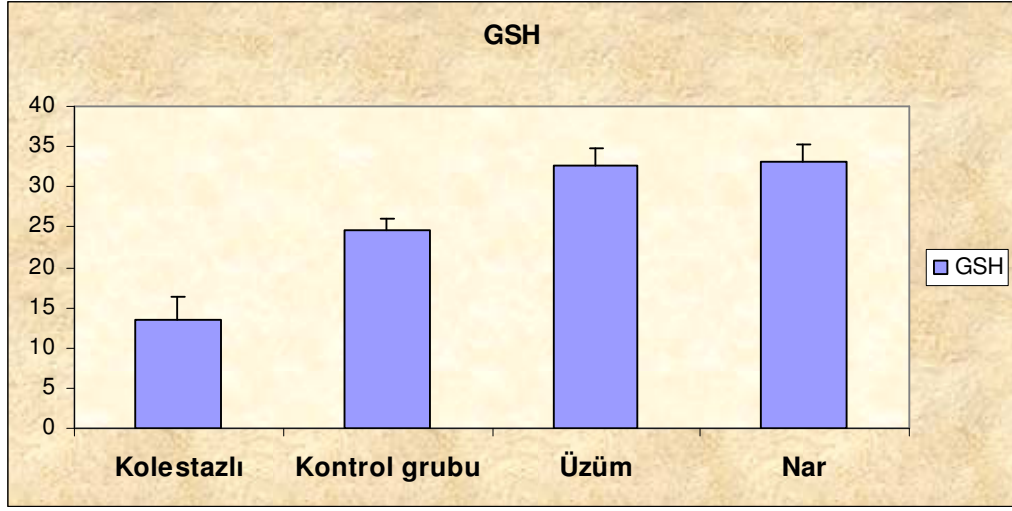
Çizelge 9. Kolestazlı grup ile nar ve üzüm verilen kolestazlı grupların GSH ve MDA değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

	Kolestazlı grup (n=10)	Üzüm verilen kolestazlı grup (n=10)	Nar verilen kolestazlı grup (n=10)
	X ± SD	X ± SD	X ± SD
MDA (nmol/gr.yaş doku)	80,91 ± 5,74 ^a	38,8 ± 3,1 ^c	36,6 ± 2,63 ^c
GSH (µmol/gr.yaş doku)	13,57 ± 2,84 ^c	32,7 ± 2 ^a	33,21 ± 1,94 ^a

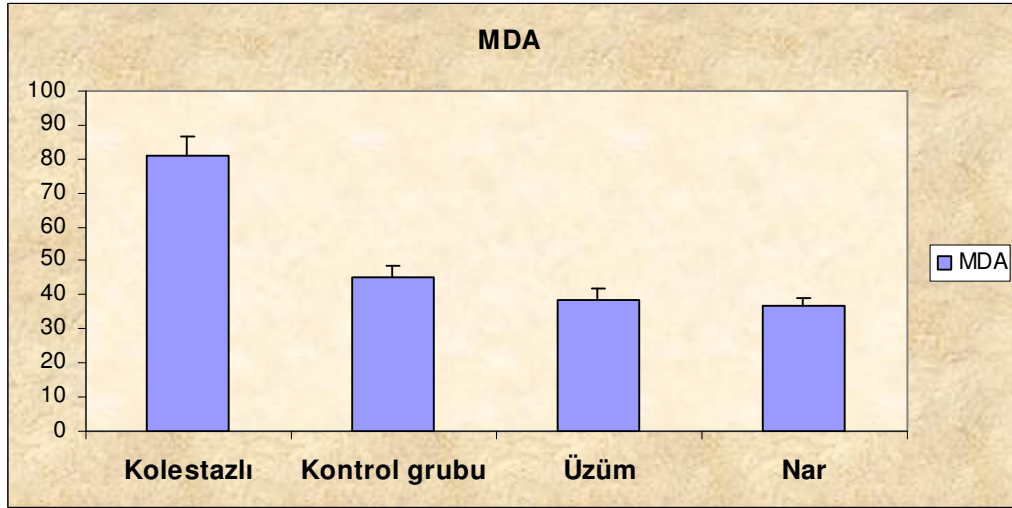
n: Her gruptaki hayvan sayısı

a, b, c: Aynı satırda yer alan farklı harfler arasında istatistiksel olarak p< 0,05'e göre fark vardır.

X ± SD: Ortalama ± Standart Sapma



Şekil 4. Çalışma gruplarında doku GSH düzeyleri



Şekil 5. Çalışma gruplarında doku MDA düzeyleri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmada deneysel karaciğer harabiyatı oluşturmak amacıyla yüksek peroksidant aktiviteye sahip CCl₄ kullanılmıştır. Yapılan histopatolojik incelemeler sonunda farelerin kolestaz olduğu ortaya konulmuştur.

Çeşitli araştırmacılar tarafından kolestaz hastalığı varlığında, serbest radikallerin artması sonucu hücrelerde lipit peroksidasyonun oluşturduğu oksidatif hasara bağlı olarak, hücre membran bütünlüğünün bozulduğu, DNA zincirlerinde kopma olduğu, proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının değiştiği bildirilmekte ve sonuç olarak çeşitli biyolojik indikatörlerin düzeylerinde artış meydana geldiği; söz konusu modifikasyonların, yangı oluşumuyla birlikte ortaya çıkan klasik bulgularla ilişkili olduğu ifade edilmiştir[54, 56,70].

Pek çok araştırmacı tarafından CCl₄ hasarlı karaciğer ve diğer dokularda meydana gelebilecek LPO düzeyleri eksojen antioksidanlarla değerlendirilmiştir. Biz de bu çalışmamızda içerdiği resveratrol, proantosiyanidin, flavanoidler, polifenol, antosiyanın v.b. bileşikler sayesinde antioksidan özelliği yüksek çekirdekli siyah üzüm ve nar meyvelerinin kolestaz farelerde MDA ve GSH düzeylerini nasıl etkileyebileceğini araştırmaya çalıştık.

Asma bitkisinin yapraklarında, dallarında, meyvesinde ve özellikle çekirdeklerinde bol miktarda bulunan resveratrol potansiyel kardiyoprotektif bir maddedir. Madde, LDL oksidasyonunu, platelet agregasyonunu ve düz kas proliferasyonunu da inhibe etmektedir. Ayrıca *invivo* çalışmalarda resveratrol, sıçan karaciğerinde yağlanmayı azaltmakta ve insan plateletleri ile nötrofillerinde de proaterojenik ürünlerin oluşmasını durdurmayı da sağlamaktadır. 1995 yılında İtalya'da yapılan bir araştırmada 150 mg üzüm çekirdeğinin ağrı, yanma karıncalanma hissini ve atardamarların şişme derecesini azaltmada, yaygın olarak kullanılan bir kimyasal ilaçtan daha hızlı ve uzun süreli etkili olduğu bulunmuştur[60]. 1985 yılında da Fransa'da 92 hasta üzerinde yapılan kür kontrollü bir deneyde, 28 gün boyunca 300 mg üzüm çekirdeği kullanmanın ağrı, karıncalanma, geceleyin giren bacak kramplarını ve şişkinliği %50'den daha fazla azalttığı gösterilmiştir[60].

Yapılan bir araştırmada Özel, [61] rat karaciğerlerinde iskemi/ reperfüzyonun (İ/R) neden olduğu hasarın MDA ve GSH üzerinden değerlendirilmesi ve üzüm çekirdeği

proantosiyanidin ekstresi (GSPE) uygulamasının bu parametrelerde oluşabilecek etkilerini değerlendirmeyi amaçlamıştır. Sonuçta GSPE' nin MDA düzeylerini düşürerek karaciğer dokusunu reperfüzyon hasarından koruduğu, yine GSPE verilen grupta İR grubuna göre daha az düşüş olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Bu çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi üzüm çekirdeğinin antioksidan özellik gösterdiği ortaya konulmuştur.

Diğer taraftan kolestazın organizmaya verdiği zararı ortadan kaldırmaya yönelik yapılan araştırmada Ohta ve ark. [64] sıçanlar üzerinde CCl₄ nedenli kolestaza karşı antioksidan özelliği yüksek susam ve susam yağı çalışmış, CCl₄' ün neden olduğu hasarı azalttığını saptamış; bu durumu susamın kimyasal yapısına bağlamıştır. Susamın yapısında bulunan metilendioksibenzen, izosafrol, safrol, metilendioksanilin grupları metilendioksi yapısına sahip olup, susamın antioksidan özelliği bu yapıya bağlanmıştır. Bizim çalışmamızda ise MDA'yı düşürücü etki gösteren asıl yapının üzüm ve nar meyvelerinde bulunan çeşitli fitoöstrojenlere bağlı olarak etki gösterdiği ortaya konulmuştur.

Bir başka çalışmada Güven ve ark. [74] deneysel olarak fare karaciğer ve böbreklerinde CCl₄ nedenli oksidatif hasara karşı iyi bir antioksidan olan vitamin E ile bir probiyotik olan kefirin koruyucu etkisini araştırmışlar ve kefirin vitamin E' ye göre daha koruyucu etkiye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Sultana ve ark. [75] 12-*O*-Tetradecanoyl-13-phorbol acetat hasarlı farelerde canlı ağırlık başına 5,0 mg ve 10,0 mg kg⁻¹ dozunda verilen üzümün oksidatif stresi inhibe ettiği, bununla beraber tükenmiş glutatyon ile aktiviteleri durdurulmuş antioksidan enzimlerin yeniden aktive olduklarını ortaya koymuşlardır.

Bradamante ve arkadaşları [76] ise resveratrolün iskemi/reperfüzyon modellerinde farmakolojik "preconditioning" yani ilk uygulama etkisi yarattığını vurgulamışlardır.

Erkasap ve ark. [77] resveratrolü, deney öncesi iki hafta düzenli uygulama ve hemen İskemi öncesi uygulama olarak iki ayrı zaman diliminde vermişler. Yapılan çalışmalarda resveratrolün iskemiden koruyucu etkileri 10-6 ile 10-9 g/kg aralığında farklı dozlarda araştırılmış ve en etkili dozun 10-6 g/kg olduğu gösterilmiştir. Çalışmada tüm ilaç gruplarında resveratrol 10-6 g/kg dozunda uygulanmış, gruplar

içinde iskemi sonrası en iyi hemodinamik performansı iki hafta ilaç uygulanan gruplar göstermiştir. Resveratrol üzümün yapısında bulunan bir fitoöstrojendir [78]. Fitoöstrojenlerin östrojenik ve antiöstrojenik özellikleri temel olarak endojen östrojen olan 17- β -östradiol'e yapısal ve işlevsel benzerliği nedeniyle östrojen reseptörlerine kolay bağlanmasıyla açıklanmaktadır [79].

Orhan ve ark. [80] asma yapraklarından (*Vitis vinifera*) EtOAc 25 mg/kg, *n*-BuOH 80 mg/kg ve R- H₂O 375 mg/kg olacak şekilde üç ayrı sıvı ekstrakt oluşturulup canlı ağırlık başına 500 mg/kg oral olarak vermişlerdir. Bu ekstraktlar üzerinde ayrıca bir analiz yapıp çok yüksek oranda tanin, flavonoid konsantrasyonuna sahip EtOAc ekstraktında MDA seviyesinin anlamlı bir düşüş, GSH' ın ise yükselme gösterdiği ortaya konulmuştur.

Jayaprakasha ve ark. [81] üzüm çekirdeği ekstraktları besin ürünlerini sağlıklı olarak saklama koşullarına elverişli olabileceği düşüncesinden yola çıkarak, üzüm çekirdeklerini aseton, etil asetat, metanol ve farklı çözücülerle ekstraksiyonları β -karoten-linoleate ve linoleik asit peroksidasyon yöntemiyle antioksidan aktivitelerine bakılmıştır. 100 ppm konsantrasyonda EtOAc ekstraktlarının diğerlerinden daha fazla antioksidan özellik gösterdiği saptanmıştır.

Pazos ve ark. [82] üzümü fenolik bileşimlerini elde etmek için yaptıkları çalışmada üzüm meyvelerinden çıkardıkları flavonoidleri yağlı bir balık olan uskumrunun kaslarından oluşmuş kıyma porsiyonuna uygun miktarda ekleyip -10 °C' de 5-6 ay boyunca monomer flavonoidlerle oligomer flavonoidler karşılaştırılmış, sonuçta oligomer yapıdaki polifenolün çok yüksek antioksidan özellik gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışma ile de üzümün içerdiği fitokimyasallar ile sağlık üzerine birçok olumlu etkisi olduğu ortaya konulmuştur.

Deliorman ve ark. [83] ratlarda CCl₄ 'ün neden olduğu hepatoksititeye karşı asma yaprakları ile dört farklı ekstrakt hazırlamış, hayvanlara intraperitoneal olarak vermişlerdir. Sonuç olarak bunların içinden EtOH ekstraktının 125 mg/kg oranında verilen grupta diğer gruplara göre MDA seviyelerinde önemli ölçüde azalma GSH seviyesinde ise artış söz konusu olduğunu ortaya koymuşlardır.

Biz de çalışmamızda farelere oral olarak 8 hafta boyunca her gün siyah çekirdekli üzümünden elde ettiğimiz sulu yem karışımını 500 mg/kg olarak verdik. Kolestaza

bağlı olarak oluşan lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş, GSH'ın ise artış gösterdiği saptanmıştır.

Kotamballi ve ark. [84] nar meyvesinin kabuklarından metanol ile yaptığı ekstraktı bir gruba vermiş bunun yanında aynı sayıdan oluşan başka bir gruba da CCl₄ uygulamış ve sonuçta, nar kabuğu verilen grupta süperoksit dismütaz, katalaz ve peroksidaz enzimlerinde bir azalma olmadığını bunun aksine CCl₄ uygulanan grupta bu enzimlerde azalma durumu tespit etmişlerdir.

Hayek ve ark. [85] apolipoprotein E eksikliği bulunan farelerde aterosklerotik lezyonların gelişimine nar suyunun etkisini araştırmak için yaptıkları çalışmada, erken aterogenezde önemli rol oynayan oksidatif stresin nar suyu tüketimiyle önemli oranda kolesterol birikimini düşürdüğünü ortaya koymuşlardır.

Ricci ve ark. [86] narın meyvelerini, meyve suyunu ve meyve kabuklarını ayrı ayrı etil asetat ile ekstrakte edip, antioksidan aktivitelerine bakmışlar, meyve suyunun içerisinde bol miktarda tanin bulunması dolayısıyla en yüksek antioksidan kapasitede olduğunu ortaya koymuşlardır.

Sudheesh ve ark. [87] nar meyvesinin zengin flavonoid içerikli ekstraktını ağız yoluyla ratlara her gün verip, sonrasında yaptıkları analizlerde malondialdehit ve hidroperoksit konsantrasyonlarının düştüğünü, buna karşılık katalaz, süperoksit dismütaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz düzeylerinin ise arttığını tespit etmişlerdir.

Kaur ve ark. [88] Fe-NTA (ferrintrilotriasetat) ile fare karaciğerlerinde hepatotoksitite meydana getirdikten sonra oksidatif strese karşı nar çiçeklerinden elde edilen ekstraktlar intraperitoneal olarak 50-150 mg/kg bir hafta boyunca verilmiş. Ekstraktların GSH seviyelerini koruduğunu, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon-S-transferaz aktivitelerinin de arttığını tespit etmişlerdir.

Padikkala ve ark. [89] gastiritin mide mukozasında meydana getirdiği hasara karşı nar ile yapılan çeşitli ekstraktlar uygulamışlar ve bu uygulamalar içerisinde metanol ekstraktı 250 mg/kg ve 500 mg/kg dozlarda verildiğinde süperoksit dismütaz, katalaz, glutatyon ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidanların seviyelerinin arttığı ile mide mukozasında narın koruyucu etkisinin olduğu sonucuna varmışlardır.

Sonuç olarak çeşitli nedenlerle safra kanalı tıkanıklığı ile oluşan kolestazi, çalışmamızda karbon tetraklorür (CCl₄) vererek oluşturmaya çalıştık. Hastalık varlığında meydana gelen oksidatif stresten organizmayı korumak için; doğal besinlerin içerdikleri polifenollerin endojen antioksidan enzimlerden biri olan GSH ile lipid peroksidasyonu değişimlerini nasıl etkileyebileceğini ortaya koymayı amaçladık. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda kolestaz farelere nar ve çekirdekli siyah üzümün aynı oranda (500 mg/kg) her gün oral olarak verilmesiyle MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş, GSH'ın ise buna bağlı olarak artış gösterdiği saptanmıştır. Çalışmamız ile elde ettiğimiz verilerin ve sonuçların daha sonra yapılacak olan benzer çalışmalara kaynak ve yararlı olacağı, bu konu ile ilgili daha kesin sonuçlara ulaşabilmek için ayrıntılı ve çok sayıda çalışma yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.

6. KAYNAKLAR

- [1] Tosun İ., Karadeniz B., “Çay ve Çay Fenoliklerinin Antioksidan Aktivitesi” O.M.Ü.Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Samsun, OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 20(1):78-83, 2005.
- [2] Akkuş, İ., “Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri”, 1.Baskı, Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
- [3] Tahan Şahan G., “N-asetilsisteinin Deneysel Koledok Ligasyonu Modelinde Oksidatif Stres ve Karaciğer Fibrozu Üzerine Etkisi”, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Genel Cerrahi Kliniği, İstanbul, 2005.
- [4] Kadioğlu M.B., “Tıkanma Sarılığı Oluşturulan Modelde Ursodeoksikolik Asit ve Glutaminin Bakteriyel Traslokasyon, Karaciğer Fonksiyon Testleri ve Karaciğer Histopatolojisine Olan Etkileri” Dr.Lütfü Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2005.
- [5] Tekkes, Y., “Streptozotosin ile Diabet Oluşturulmuş Farelerde Aspirin ve E Vitaminin Dokularda Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Sisteme Etkisinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniv., Fen Bil. Enstitüsü, Kahramanmaraş, 1-23, 2006.
- [6] Holley, AE., Cheeseman, KH. 1993. “Measuring free radical reactions in vivo” Br.med bull. Jul; 49(3):494-505.
- [7] Kurt H., Başaran A., Musmul A., “Sıçanlarda Karbon Tetraklorit (CCl₄)’in Oluşturduğu Oksidatif Stresin Kateşin ile Önlenmesi”, Afyon Kocatepe Üniversitesi; Kocatepe Tıp Dergisi 5:29-34, 2004.
- [8] Esterbauer, H., Cheeseman, K.M., Dianzani, M.U., Poli, G., Slater, T.F., “Seperation and Characterization of the Aldehydic Products of Lipit Peroxidations Stimulated in Rat Liver Microsomes”, Biochem. Journal. , 208: 129-140, 1982.
- [9] Yerer, M.B., Aydoğan, S., “Oksidatif Stres ve Antioksidantlar”, Erciyes Üniv. Sağlık Bilimleri Dergisi, 9(1): 49-53, 2000.
- [10] Cheeseman, K.H., Slater, T.F., “An Introduction to Free Radical Biochemistry”, British Med. Bull., Jul, 49(3): 481-493, 1993.
- [11] Dikici, İ. “Akut Viral Hepatitlerle İnterferon Tedavisi Görmüş Kronik Viral Hepatitlerde Oksidatif Stresin Araştırılması” Selçuk Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Konya, 1999.

- [12] Battal, A., Baykal, Y., Erikçi, S., Sağlam, K., Ünal, T., Kocabalkan, F., Aydın, A., Işşimer, A., “Serbest radikal temizleyici süperoksit dismutaz enziminin ve serum, bakır, çinko, selenyum düzeylerinin diabetes mellitus’un kronik komplikasyonları ile ilişkisi” GATA Bülteni, 37,218-222, 1995.
- [13] Di Mascio, P., Murphy, ME., Sies, H. “Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols”. Am. Journal Clin. Nutr. Jan;53(1 Suppl):194S-200S, 1991.
- [14] Bast, A., Haenen, G.R.M.M., Cees, J.A.D. “Oxidants and antioxidants”, State of the art. The American Journal of Medicine, 91,(Suppl 3C),30,3C-2S_3C-13S 1997.
- [15] Fırat, S. “Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon , glutatyon peroksidaz, glutatyon- S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sistein’in bu sistem üzerindeki etkisi” Gazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya A.B.Dalı, Uzm.Tezi, Ankara, 95s, 1997.
- [16] Yanbeyi, S., “Aspirin ve Antioksidant Buthylated Hydroxyanisole’ün Tavşanlarda Eritrosit Total Katalaz, Süperoksit dismutaz ve Glutatyon peroksidaz Aktiviteleri Üzerine Etkileri”, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniv. Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun, 1999.
- [17] Özdemir, G., “Reaktif Oksijen Partikülleri (ROP)”, Roche Bilimsel Eserleri Serisi, 1993.
- [18] Şengil A., Gürbilek, M., “Serbest Radikaller”, Selçuk Üniv. Tıp Fak. Dergisi, 13(4): 673-681, 1992.
- [19] Czapski, G., “Reaction of OH: In Colowick SP. Kaplan NO (eds)”, Methods in Enzymology, Academic Pres. New York, Volume 105: 209-215, 1984.
- [20] Altıntaş, S., “Kahramanmaraş’ta Bazı İş Kollarında Çalışan Boya İşçilerinde Plazma ve Eritrosit Membranı Sialik Asit, Glutatyon, Plazma Nitrik Oksit ve Lipit Peroksidasyonu Düzeylerinin Değerlendirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniv., Fen Bil. Enstitüsü, Kahramanmaraş, 8-23 2006.
- [21] Nishiyama, Y., İkedo, H., Haramaki, N., “Oxidative Stress is Related to Exercise Intolerance in Patients with Heart Failure”, Am Heart J., 135: 115, 1998.
- [22] Carr, A.C., McCall, M.R., Frei, B., “Oxidation of LDL By Myeloperoxidase and Reactive Nitrogen Species Reaction Pathways and Antioxidant Protection”, Arterioscl. Thromb Vasc Biol., 20: 1716-1723, 2000.

- [23] Rencüzoğulları, N., “Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Kadmiyum Toksikasyonu Üzerine Likopenin Etkilerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniv. Sağlık Bil. Enstitüsü, Hatay, 1-11, 2006.
- [24] Cross, C.E, Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M., Harman, D., “Oxygen Radicals and Human Disease”, *Ann Intern. Med.*, Oct. 107(4): 526- 545, 1987.
- [25] Evan, C.R., Halliwell, B., Cunt, G.G., “Free Radicals and Oxidative Stress : Enviroment”, *Drugs and Food Addivites*, Protland Press. London, 120-129, 1995.
- [26] Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T., “Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma”, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 3-4: 92-95, 1997.
- [27] Vural, H., Akkus, İ., Bor, A., “Serbest Radikaller ve Yaşlanmadaki Rolü”, *Selçuk Üniv. Tıp Fak. Derg.*, 11(1): 101-103, 1995.
- [28] Kankofer, M., “Plecantal Release/ Retention in Cows and Relation to Peroxidative Damage of Macromolecules”, *Rebrod. Dom. Anim.*, 37: 27-30 2002.
- [29] Altıntaş, Y., Güven, M., İnce, E., Açıbay, Ö., Caner, M., Sultanbek, G., Hatem, H., “The invitro Effects of Captopril on the Levels of Lipid Peroxidation and Glutathione of Erythrocytes in Type II Diabetics”, *Tr. J. Med. Sci.*, 26:139-142, 1996.
- [30] Dingiloğlu, N., Özmen, D., Bayındır, O., Kutay, F., Yılmaz, C., “Diabetiklerde Eritrosit ve Plazma Lipit Peroksitleri, Eritrosit GSH ve Glikoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Düzeyleri”, *Biyokimya Dergisi*, 18(3): 13-18, 1993.
- [31] Cape, G., Thorpe, G., Holder, R., “Serum and Tissue Antioxidant Caposity in Cevrical Intraepithelial Neoplasia Investigated Using an Enhanced Chemiluminescand Reaction”, *Annals Clin. Chem.* , 36: 86-93, 1990.
- [32] Okoda, M., Ito, Y., Inano, K., Mudo, T., Mussato, T., “Structural Changes in Oxidative Modifacation Products, Surface Change and Spectrophotometric Patterns”, *Ann Clin. Biochem.*, 34: 173-178, 1997.
- [33] Güven, A., Güven, A., Gülmez, M., Beytut, E., Erişir, M., “Aterosklerotik Farelerde Kefir ve Yoğurdun, Lipit Peroksidasyonuna ve Antioksidan Enzimlere Etkileri”, *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 9(1): 79-83, 2003.
- [34] Akdoğan M., Gültekin F., Altunbaş İ., Delibaş N., Kaleli S., “Tavşanlarda Deneysel Olarak Aşırı Demir Yüklenmesiyle Oluşturulan Oksidatif Hasarın

Karaciğer Dokusuna Yaptığı Biyokimyasal Değişiklikler”, Türk Biyokimya Dergisi; Cilt :25, Sayı:1, 2000.

- [35] Yoneyama, Y., Sawa, R., Suzuki, S., Doi, D., Yoneyama, K., Otsubo, Y., Araki, T., “Relationship Between Plasma Malondialdehyde Levels and Adenosine Diaminase Activities in Pre-eclampsia”, Clin. Chim. Acta., 322: 169-173, 2002.
- [36] Köse, K., Doğan, P., “Lipit Peroksidasyonu”, Erciyes Üniv. Tıp Fak. Derg., 1: 340-350,1992.
- [37] Freeman, B.A., Crapo, J.D., “Biology of Disease. Free Radicals and Tissue Injury”, Lab. Invest, 47: 412-426, 1982.
- [38] Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., “Oxidants, Antioxidants and the Degenerative Disease of Aging”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90(17): 7915-7922, 1993.
- [39] Ürek, R.Ö., Bozkaya, L.A., Tarhan L., “The Effect of Antioxidant Vitamin and Trace Elements of Cu, SOD, CAT, GSH-Px and LPO Levels in Chicken Tissues”, Cell Biochem. Funct., 19: 125-132, 2001.
- [40] Aydemir, T., Öztürk, R., Bozkaya, L.A., Tarhan, L., “Effect of Antioxidant Vitamins A, C, E and Trace Elements Cu, Se on CuZn SOD, GSH-Px, CAT and LPO Levels in Chicken Erythrocytes”, Cell Biochemistry and Function, 18: 109-115, 2000.
- [41] Güven, A., Güven, A., Kamiloğlu, N.N., “Kefirin Lipit Peroksidasyonuna Etkilerinin Araştırılması”, Kafkas Üniv. Vet.Fak. Dergisi, 10(2): 165-169, 2004.
- [42] Meister, A., Anderson, M.E., “Glutathione”, Ann. Rev. Biochem., 52: 711-760 1983.
- [43] Kamiloğlu, N.N., “Tuj Koyunlarında Döl Verimi ve Antioksidatif Savunma Sistemi Üzerine A Vitamini ve β -Karoten Enjeksiyonlarının Etkileri”, Doktora Tezi, Kafkas Üniv. Sağlık Bil. Enst., Kars, 29-41, 2002.
- [44] Güven, A., “Kaz Karaciğerlerinde Karbon Tetraklorür (CCl_4) ve Etil Alkol (C_2H_5OH) ile Oluşturulan Doku Hasarlarında Redükte Glutatyon (GSH), Glutatyon-S-Transferaz (GST) ve Selenyum (Se) Düzeylerinin Araştırılması”, Doktora Tezi, Kafkas Üniv. Sağlık Bil. Enst., Kars, 4-37, 2003.
- [45] Champe, P.C., Harvey, R.A., “Glikozaminoglikanlar”, Biyokimya, Lippincott’s Illustrated Reviews Serisi, Çev.; A. Tokullugil, M. Dirican, E. Ulukaya., Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 147- 156, 1997.
- [46] Ferreyra, E.C., Bernacchi, A.S., Castro, J.A., “Increased Glutathione (GSH) Content in Livers of Control and Carbontetrachloride Poisoned Rats Treated

with the Anticalmodulin Drug Trifluoperazine (TFP)", Res. Commun Chem. Path. Pharmacol., 53-3, 399-402, 1986.

- [47] Lamphug, S.M., Apeageyi, F., Mwanmut, D., Hendrickse, R.G., "Aflatoxins in Breast Milk, Neonatal Cord Blood and Serum of Pregnant Women", Br. Med. J., 296: 968, 1988.
- [48] Aşıcıoğlu Y. T., "Sıçanlardaki Kronik Alkolik Karaciğer Hasarına Likopenin Etkisi" , Uzmanlık Tezi, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü, 2005.
- [49] Erkan T., "Kolestazda Kaşıntı", İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Pediatrik Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Bilim Dalı, Türk Pediatri Arşivi; 38: 65-72, 2003.
- [50] Karalar, S., " Kolestazlı Hastalarda Eritrosit Lipitlerinin İncelenmesi" , Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi,Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı.İstanbul, 1987.
- [51] Gürakan F., "Neonatal Kolestaz: Tanısal Yaklaşım" Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Çocuk Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Ünitesi, Güncel Pediatri: 122-124.
- [52] Aydoğdu S., "Kolestazda Medikal Tedavi", Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi,Çocuk Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Bilim Dalı, Organ Nakil Merkezi Karaciğer Gurubu, Güncel Pediatri; 125-131.
- [53] Carini R., Chiarpotta E., Biasi F., Leonarduzzi G., Comoglio A., Carpi C., Poli G., "Relation Between Liver Necrosis and İntrahepatic Cholestasis in Rats Poisoned with CCL4" Boll. Soc.Ital.Biol.Sper.; Mar 31;63(3) :273-80, 1987.
- [54] Güven A., Kaya N. " Kaz Karaciğerinde Karbon Tetraklorür (CCl₄) ve Etil Alkol (C₂H₅OH) ile oluşturulan doku hasarlarında Redükte glutasyon (GSH), Glutasyon-S-Transferaz (GST) ve Selenyum (Se) Düzeylerinin Araştırılması" II. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi,Kongre Özet Kitabı; 57, Elazığ, 2004.
- [55] Sasaki T., Ohta S., Kamogawa A., Shinoda M., "Protective effects of various Chinese traditional medicines against experimental cholestasis" Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University, Tokyo, Japan; Chem.Pharm.Bull.(Tokyo); Feb;38(2):513-6, 1990.
- [56] Parola M., Leonarduzzi G., Robino G., Albano E., Poli G., Dianzani MU., "On the Role of Lipid Peroxidation in the Pathogenesis of Liver Damage Induced by Long-standing Cholestasis" Department of Experimental Medicine and Oncology, University of Torino, Italy. Free Radic Biol Med., 20(3)351-9, 1996.

- [57] Güven A., Maraşlı N., Kaya N.: “Karbon Tetraklorür (CCl₄) ve Etil Alkol’ün Fare Eritrosit Antioksidan ve Plazma Lipid Peroksidasyonuna Etkisi”, Kafkas Üni, Vet., Fak., Dergisi, 9(1): 1-4, 2003.
- [58] Güven A., Erginsoy S., Kaya N., “Kazlarda Karbon Tetraklorür Zehirlenmesinin Biyokimyasal ve Patolojik Parametrelere Etkisi”, Kafkas Üni, Vet., Fak., Dergisi, 9(2):131-136, 2003.
- [59] Saygı, B., “Meyvelerin Dünyası”, Bülten 25, Ocak-Şubat-Mart Üç Aylık Dimes Ücretsiz Yayını.,14-16, 2006.
- [60] Dumlu,U.,M.: “Üzüm Çekirdeğinde Resveratrol Tayini”, Marmara Üniversitesi,Eczacılık Fakültesi, Farmakognazi Anabilim Dalı, www.nutrisyon.com. 2006.
- [61] Özel, Y: “Ratlarda Karaciğer İskemi/ Referfüzyon Hasarında Grape Seed Proanthocyanidin’in Koruyucu Etkisinin İncelenmesi”, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2006.
- [62] Başer, K.H.C.: “Fonksiyonel Gıdalar ve Nutrasötikler”, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiriler, 29-31 Mayıs 2002.
- [63] Yalçın,A.: “A’dan Z’ye Şifalı Bitkiler Ev İlaçları-Şifalı Sular Ansiklopedisi”, Geçit Kitabevi, Yayın:9; 560, 514, 579, İstanbul 2004.
- [64] Ohta S., Suzuki M., Sato N., Kamogava A., Shinoda M., “Protective Effects of Sesamol and Its Related Compounds on Carbon Tetrachloride Induced Liver Injury in Rats” Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University, Tokyo, Japan. Yakugaku Zasshi, Nov;114(11):901-10, 1994.
- [65] Gressner AM., “Ribosomal Protein Modifications in Liver Injury Effect of Carbon Tetrachloride and Extra Hepatic Cholestasis on Protein Phosphorylation.” Clin.Chem.Clin.Biochem.; Feb.;18(2): 111-6, 1980.
- [66] Sonsuz A., “Sarılıklı Hastaya Yaklaşım:Laboratuar Bulguları” İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Hepato-Biliyer Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyum Dizisi No:28;;s:21-26, Ocak 2002.
- [67] Saraswat B.,Visen PK., Patnaik GK., Dhawan BN., “Anticholestatic Effect of Picroliv, Active Hepatoprotective Principle of Picrorhiza Kurrooa, Against Carbon Tetrachloride Induced Cholestasis” ICMR Centre for Advanced Pharmacological Research on Traditional Remedies Division of Pharmacology, Lucknow, İndia, İndian J. Exp. Biol., Apr;31(4):316-8, 1993.
- [68] Moreno MG., Muriel P., “İnducible Nitric Oxide Synthase İs Not Essential For the Development of Fibrosis and Liver Damage İnduced by CCl₄ in Mice.”

Seccion Externa de Farmacologia, Cinvestav-IPN, Mexico, Appl. Toxicol., Jul-Aug.; 26(4):326-32, 2006.

- [69] Ecevit F. M., Kelen M., “Isparta (Atabey)’ de Yetiştirilen Üzüm Çeşitlerinin Ampelografik Özelliklerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma” Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 32670 Isparta, Tr. J. of Agriculture and Forestry 23, 511-518, 1999.
- [70] Gürgöze, S.Y., Şındak, N., Yılmaz, S., Sertkaya, H., Ozan, S.T., “Bursitis Prekarpalisli Sığırlarda Kortikosteroid Tedavisinin Bazı Antioksidan Enzim ve Lipit Peroksidasyon Seviyeleri Üzerine Etkileri”, Y.Y.Ü. Vet. Fak. Dergisi, 14(2): 97-101, 2003.
- [71] Placer ZA., Cushman LL., Johnson BC., “ Estimation of Product of Lipid Peroxidation (Malonyldialdehyde) in Biolckemical Systems” , Anal. Biochem. 16, 359-364, 1966.
- [72] Sedlak J., Lindsay R.H., “Estimation of Total Protein-bound and Non-protein Sülfdryl Groups in Tissue with Ellman’s Reagent”, Anal. Biochem., 25: 192-205, 1968.
- [73] Akgül A. “Tıbbi Araştırmalarda İstatistiksel Analiz Teknikleri, SPSS Uygulamaları” Yüksek Öğretim Kurulu Matbaası. Ankara, 1997.
- [74] Güven A., Güven A., Gülmez M., “ The Effects Of Kefir On The Activities Of Gsh-Px, Gst, Cat, Gsh And Lpo Levels İn Carbon Tetrachloride-Induced Mice Tissues” J. Vet. Med. B 50, 412-416, 2003.
- [75] Sultana S., Alam A., Khan N., Sharma S., Saleem M., “Chemopreventive Effect Of Vitis Vinifera Exstracon 12-O-Tetradecanoyl-13-phorbol acetat–Induced Cutaneous Oxidative Stress And Tumor Promotion İn Murine Skin” Pharmacological Research, Vol. 46, No. 6, 2002.
- [76] Bradamante S, Piccinini F, Barengi L, et al. “Does resveratrol induce pharmacological preconditioning?” Int J Tissue React; 22:1-4, 2000.
- [77] Erkasap N., İvizler m., Dernek S., Kaygısız N., Sevin B., Kural T., “İzole Rat Kalplerine Uygulanan Reperfüzyon Hasarında Resveratrolün Hemodinamik Etkileri” Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi, 11:91-95, 2003.
- [78] Liggins J., Bluck JC., Runswick S., Et al. “Daidzein And Genistein Content Of Fruits And Nuts” J Nutr Biochem 11:326-331, 2000.
- [79] Davis S., Dalais F., Simpson E., Murkies A. Phytoestrogens İn Health And Disease.Recent Progress İn Hormone Research. 54:185-211, 1999.

- [80] Orhan N., Aslan m., Orhan D.D., Ergun F., Yeşilada E., “in-vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grape leaves (*Vitis vinifera*) in diabetic rats” *Journal of Ethnopharmacology* 108, 280-286, 2006.
- [81] Jayaprakasha G.K., Singh R.P., Sakariah K.K., “Antioxidant Activity Of Grape Seed (*Vitis Vinifera*) Extracts On Peroxidation Models In Vitro.” *Food Chemistry* 73,285-290, 2003.
- [82]. Pazos M., Gallardo J.M., Torres J.L Medina I., “Activity of Grape Polyphenols As Inhibitors of The Oxidation of Fish Muscle ” *Food Chemistry* 92, 547-557, 2005.
- [83] Deliorman O.,D., Orhan N., Ergun E., Ergun F., “Hepatoprotective Effect of *Vitis vinifera* L. Leaves on Carbon Tetrachloride- Induced Acute Liver Damage In Rats” *Journal Ethnopharmacology* 112, 145-151, 2007.
- [84] Kotamballi N., Chidambara M.,Guddadarangavvahally K., Jayaprakasha K., Ravebdra P.S., “Studies On Antioxidant Activity Of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel Extract Using In Vivo Models” *J. Agric. Food Chem.* 50, 4791-4795, 2002.
- [85] Hayek T., Kaplan M., Raz A., Coleman R., Dornfeld L., Vaya J., Aviram M., “Pomegranate Juice Supplementation To Atherosclerotic Mice Reduces Macrophage Lipid Peroxidation, Cellular Cholesterol Accumulation And Development Of Atherosclerosis.” *The Lipid Research Laboratory The Department Of Anatomy And Cell Biology, Israel*
- [86] Ricci D., Giamperi L., Bucchini A., Fraternali D., “Antioxidant Activity of *Punica granatum* fruits” *Fitoterapia* 77, 310-312, 2006.
- [87] Sudheesh S., Vijayalakshmi N.R., “Flavonoids from *Punica granatum* potential antiperoxidative agents” *Fitoterapia* 76, 181-186, 2005.
- [88] Kaur G., Jabbar Z., Athar M., Alam M.S., “*Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice” *Food and Chemical Toxicology* 44, 984-993, 2006.
- [89] Padikkala J., Babu B.H., Asheef M., Ajaikumar K.B., “The Inhibition of Gastric Injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) Methanolic Extract” *Journal of Ethnopharmacology* 96 171-176, 2005.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Şükran YERLİ

Doğum Yeri: Kadıköy

Doğum Tarihi: 26.02.1983

Medeni Hali: Bekâr

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Kars Cumhuriyet Lisesi (Y.D.A) (1998/2001)

Lisans: Kafkas Üniversitesi Biyoloji Bölümü (2001/2005)

Yüksek Lisans: Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Genel
Biyoloji Anabilim Dalı (2005/?)