

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DENEYSEL OVARYUM HASARI OLUŞTURULMUŞ
RATLARDA ASTAKSANTİN'İN KORUYUCU ETKİSİ**

(DOKTORA TEZİ)

Araş. Gör. Abdulsamed KÜKÜRT

**Danışman
Prof. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN**

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KARS 2019

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL OVARYUM HASARI OLUŞTURULMUŞ
RATLARDA ASTAKSANTİN'İN KORUYUCU ETKİSİ

Araş. Gör. Abdulsamed KÜKÜRT

Biyokimya Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

Danışman

Prof. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN

2019 - KARS

Bu çalışma, Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Proje kodu: 2016-TS-41

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyokimya Anabilim Dalı Doktora programı çerçevesinde Araş. Gör. Abdulsamed KÜKÜRT'ün Prof. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN danışmanlığında doktora tezi olarak hazırladığı “*DeneySEL Ovaryum Hasarı Oluşturulmuş Ratlarda Astaksantin Koruyucu Etkisi*” adlı bu çalışma yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy *birliği* ile *kabul* edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18.06.2019

Adı ve Soyadı

Başkan: Prof. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN

Üye : Prof. Dr. Emine ATAKIŞI

Üye : Doç. Dr. Metin ÖĞÜN

Üye : Doç. Dr. Hacı Ahmet DEVECİ

Üye : Doç. Dr. Gökhan NUR

İmza
Mahmut
.....
Emine
.....
M.Öğün
.....
Hacı Ahmet
.....
Gökhan
.....

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun /06/2019 gün ve / sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Özgür ÇELEBİ
Enstitü Müdürü V.

ÖNSÖZ

Ovaryumlar, dişilerde cinsiyet hormonlarını salgılayan ve ovumun oluşumunu sağlayan organlar olarak tanımlanmaktadır. Ovaryumların fizyolojik işlevlerinin düzgün çalışmasının, hem vücudun hem de dişi üreme sisteminin sağlığı açısından çok önemli olduğu ileri sürülmektedir. Reaktif oksijen türlerinin, ovaryum normal fizyolojik metabolizmasının yan ürünleri olarak üretildiği bildirilmektedir. Antioksidanların ise reaktif oksijen türlerinin üretimi ve atılımı arasındaki dengeyi koruyabilmek için görev yapan faktörlerden oldukları öne sürülmektedir. Bu dengede meydana gelebilecek herhangi bir bozulmanın, oogenezis, ovulasyon, fertilizasyon, implantasyon ve embriyogeneziste sorunlara yol açabildiği belirtilmektedir. Bunun neticesinde gebeliği etkileyebilecek patolojik sonuçlara neden olabileceği bildirilmektedir. Bu fizyolojik ve patolojik süreçlerin altında yatan moleküler ve hücrel mekanizmaların da tam olarak açıklığa kavuşturulamadığı kaydedilmiştir.

Antioksidan sistemde meydana gelebilecek bozulmanın patolojik sonuçlara neden olabileceği, dolayısıyla antioksidan takviyesinin, oksidatif stresi kontrol altında tutarak reproduktif hastalıkların tedavisi için olası bir strateji olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir. Bu stratejiyi doğrulayabilmek için oksidatif strese karşı antioksidan takviyesi ile ilgili daha fazla araştırma yapılması gerektiği ileri sürülmektedir. Ovaryan oksidatif stresin memeli modellerinin bu alandaki boşluğu doldurabilecek araştırmalara olanak sağlaması açısından önemli olduğu düşünölmektedir. Bu nedenle bu çalışmada 3-nitropropiyonik asit ile deneysel olarak oluşturulan oksidatif ovaryum hasarına karşı antioksidan bir madde olan astaksantin'in koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca ve bu çalışmanın her safhasında çok değerli bilgi ve deneyimleriyle daima benim için yol gösterici olan, bu süreçte yaşamış olduğum her türlü zorluk karşısında maddi ve manevi desteğini esirgemeyerek benimle büyük bir sabır ve hoşgörüyü ilgilenen, kendisinden öğrendiğim ders ve tecrübelerinden gerek akademik, gerekse yaşamım boyunca hep istifade edeceğim, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum çok kıymetli ve saygı değer danışmanım Prof. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN hocama içtenlikle teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

Değerli hocalarım Prof. Dr. Şaban MARAŞLI, Doç. Dr. Metin ÖĞÜN, Doç. Dr. Oğuz MERHAN ile doku örneklerinin incelenmesinde ve değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Serpil DAĞ'a içtenlikle teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

Çalışmam sırasında yardımlarını gördüğüm Dr. Öğr. Üyesi Mushap KURU ve Dr. Öğr. Üyesi Mustafa MAKAV'a içtenlikle teşekkür ederim.

Kıymetli babam ve anneme, bana bu yolda gösterdiği maddi, manevi destek ve sabrı için hayat arkadaşım sevgili eşim ve kızıma içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
SİMGELER, KISALTMALAR ve BİRİMLER	I
ŞEKİL LİSTESİ	III
TABLO LİSTESİ	III
RESİM LİSTESİ	IV
ÖZET	V
SUMMARY	VI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. 3-Nitropropiyonik asit	3
2.1.1 3-Nitropropiyonik asitin Toksisitesi ve Etki Mekanizması	3
2.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Biyokimyası	5
2.2.1. Nitrik Oksit	8
2.2.2. Lipit Peroksidasyonu	9
2.2.2.1. Malondialdehit	10
2.3. Antioksidan Savunma	11
2.4. Total Antioksidan/ Oksidan Kapasite	13
2.5. Total Tiyol	14
2.6. Paraoksonaz 1	14
2.6.1 Paraoksonaz 1'in Biyokimyasal Önemi	15
2.7. Sialik Asit	17
2.7.1. Sialik Asitin Biyokimyasal Önemi	18
2.8. Astaksantin	19
2.8.1. Astaksantin'in Biyokimyasal Önemi	20
3. MATERYAL ve METOT	23
3.1. Materyal	23
3.2. Metot	24
3.2.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler	24
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler	24
3.2.3. Biyokimyasal Analizler	25
3.2.3.1. Redükte Glutasyon Analizi	26
3.2.3.2. Malondialdehit Analizi	27
3.2.3.3. Nitrik Oksit Analizi	28
3.2.3.4. Total Sialik Asit Analizi	30

3.2.3.5.	Paraoksonaz Aktivitesi	30
3.2.3.6.	Total Antioksidan/Oksidan Kapasite Analizleri	31
3.2.3.7.	Total Ti yol Analizi	32
3.2.3.8.	Lipit Profili Analizleri	32
3.2.4.	Histopatolojik Analizler	32
3.2.5.	İstatistiksel Analizler	33
4.	BULGULAR	34
4.1.	Biyokimyasal Bulgular	34
4.2.	Histopatolojik Bulgular	43
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	46
6.	KAYNAKLAR	57
7.	ÖZGEÇMİŞ	72

SİMGELER, KISALTMALAR ve BİRİMLER

ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-etil benzthiazoline-6-sülfonik asit)
ADP	: Adenozin Difosfat
AMP	: Adenozin Monofosfat
ApoA1	: Apolipoprotein A1
CAT	: Katalaz
CHOL	: Kolesterol
CRP	: C-Reaktif Protein
CYP	: Sitokrom
DTNB	: 5,5'-Ditiobis 2-Nitrobenzoik Asit
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
Equiv	: Ekvivalan
GMP	: Guanozin Monofosfat
GSH	: Redükte Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSR	: Glutasyon Redüktaz
GSSG	: Okside Glutasyon
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HHE	: 4-Hidroksi-2-Heksenal
HNE	: 4-Hidroksi-2-Nonenal
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
MDA	: Malondialdehit
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
nNOS	: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
3-NPA	: 3-Nitropropionik asit
PUFA	: Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
RNT	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
SOD	: Süperoksit Dismütaz
TAK	: Total Antioksidan Kapasite
TBA	: Tiyobarbütirik Asit
TCAA	: Trikloro Asetik Asit
TG	: Trigliserid
TNF- α	: Tümör Nekrozis Faktör -Alfa
TOK	: Total Oksidan Kapasite
VCl ₃	: Vanadyum (III) Klorür
ZnSO ₄	: Çinko Sülfat

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1. Reaktif oksijen türlerinin potansiyel kökenleri ve detoksifikasyon yolları	5
Şekil 2. Nitrik oksit oluşumu	8
Şekil 3. Çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu	10
Şekil 4. PON1'in genel yapısı	15
Şekil 5. Paraoksonaz ve HDL arasındaki ilişkinin şematik görüntüsü	16
Şekil 6. HDL molekülünün şematik gösterimi	17
Şekil 7. Astaksantin'in moleküler yapısı	21
Şekil 8. Astaksantin'in hücre zarındaki pozisyonunun şematik görüntüsü	21
Şekil 9. GSH analizi standart grafiği	27
Şekil 10. MDA analizi standart grafiği	28
Şekil 11. Nitrat analizi standart grafiği	29
Şekil 12. Nitrit analizi standart grafiği	29
Şekil 13. TSA analizi standart grafiği	30
Şekil 14. Tam kan GSH konsantrasyonları	36
Şekil 15. Plazma MDA konsantrasyonları	37
Şekil 16. Plazma NO konsantrasyonları	37
Şekil 17. Plazma TSA konsantrasyonları	38
Şekil 18. Plazma TT konsantrasyonları	38
Şekil 19. Plazma PON1 aktivitesi	39
Şekil 20. Plazma lipit profili konsantrasyonları	40
Şekil 21. Günlere göre plazma TAK konsantrasyonları	41
Şekil 22. Günlere göre plazma TOK konsantrasyonları	41
Şekil 23. Günlere göre plazma OSİ seviyeleri	41
Şekil 24. Ovaryum dokusu TAK konsantrasyonları	42
Şekil 25. Ovaryum dokusu TOK konsantrasyonları	42
Şekil 26. Ovaryum dokusu OSİ seviyeleri	42

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1. Tam kan GSH, plazma MDA, NO, TSA, TT, CHOL, TG, HDL, LDL konsantrasyonları ve PON1 aktivitesi	34
Tablo 2. Günlere göre TAK, TOK ve OSİ seviyeleri	35
Tablo 3. Ovaryum dokusu TAK, TOK, OSİ seviyeleri	35
Tablo 4. Plazma K, AS, 3-NPA+ASTA ve 3-NPA gruplarının biyokimyasal parametreleri arasındaki korelasyonlar	36



RESİM LİSTESİ

	Sayfa No
Resim 1a. 3-NPA grubu ovaryum histopatolojik görüntüsü	43
Resim 1b. 3-NPA grubu ovaryum histopatolojik görüntüsü	44
Resim 2. 3-NPA+AS grubu ovaryum histopatolojik görüntüsü	44
Resim 3. AS grubu ovaryum histopatolojik görüntüsü	45
Resim 4. K grubu ovaryum histopatolojik görüntüsü	45



ÖZET**Deneyisel Ovaryum Hasarı Oluşturulmuş Ratlarda Astaksantin'in Koruyucu Etkisi**

Bu çalışmada 3-nitropropiyonik asit (3-NPA) ile deneyisel ovaryum hasarı oluşturulmuş ratlarda astaksantin'in koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma herbirinde sekiz adet olacak şekilde 4 eşit gruba ayrılan 32 adet dişi Wistar rat ile yapıldı: kontrol (K) grubu; fosfat çözeltisi (PBS), Astaksantin (AS) grubu; astaksantin (80 mg/kg) 14 gün, 3-NPA grubu; 3-NPA (12,5 mg/kg) günde iki kez 7 gün, 3-NPA+AS grubu; 14 gün astaksantin (80 mg/kg) ve günde iki kez 7 gün 3-NPA (12,5 mg/kg) uygulandı. Tüm enjeksiyonlar intraperitoneal olarak yapıldı. Hayvanlar normal rat yemi ve musluk suyu ile *ad libitum* beslendi. Plazma ve ovaryum dokusunda total antioksidan kapasite (TAK), total oksidan kapasite (TOK) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) seviyeleri ile tam kan redükte glutatyon (GSH) seviyesi, plazma paraoksonaz aktivitesi (PON1), lipit profili, malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO), total sialik asit (TSA) ve total tiyol (TT) konsantrasyonları spektrofotometrik olarak analiz edildi. Ovaryum dokusu ayrıca histopatolojik olarak değerlendirildi. 3-NPA'nın histopatolojik olarak ovaryum hasarı oluşturduğu, TAK (P<0,001), GSH (P<0,001), HDL (P<0,01) seviyeleri ile PON1 aktivitesinde (P<0,01) önemli düşüş, TOK, OSİ (P<0,001), MDA, NO, TSA, CHOL, LDL (P<0,01) ve TG (P<0,05) seviyelerinde önemli artış gözlemlendi. Sonuç olarak, astaksantin'in 3-NPA ile birlikte verilmesi 3-NPA'nın yukarıda belirtilen tüm biyokimyasal parametrelere yaptığı olumsuz etkiyi düzelttiği ve histopatolojik olarak hasar oluşmasını önlediği gözlemlendi. 3-NPA ile indüklenen ovaryan toksisitesinin oksidatif hasara bağlı olabileceği ve astaksantin verilmesiyle gerçekleşen düzelmelerin antioksidan özellikleriyle ilişkili olabileceği kanaatini taşımaktayız.

Anahtar kelimeler: Astaksantin, 3-nitropropiyonik asit, Ovaryum hasarı, Paraoksonaz, Sialik asit

SUMMARY

Protective Effect of Astaxanthin on Experimental Ovarian Damage in Rats

This study aimed to investigate the protective effect of astaxanthin on 3-nitropropionic acid (3-NPA) induced experimental ovarian damage in rats. 32 female Wistar rats were divided into 4 equal groups of eight each: control group (C); phosphate solution (PBS), astaxanthin (AS) group; astaxanthin (80 mg/kg) for 14 days, 3-NPA group; 3-NPA (12.5 mg/kg) twice a day for 7 days, 3-NPA+AS group; administered astaxanthin (80 mg/kg) for 14 days and 3-NPA (12.5 mg/kg) for 7 days. All injections were administered intraperitoneally. Rats fed ad libitum with standard rat chow and tap water. Plasma and ovarian tissue total antioxidant capacity (TAC), total oxidant capacity (TOC) and oxidative stress index (OSI) levels, whole blood reduced glutathione (GSH), plasma paraoxonase (PON1) activity, lipid profile, malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), total sialic acid (TSA) and total thiol (TT) concentrations were analyzed spectrophotometrically. Also, ovarian tissue histopathology was performed. We observed 3-nitropropionic acid-induced histopathological ovarian damage, significantly decreased the TAC ($P<0.001$), GSH ($P<0.001$), HDL ($P<0.01$) levels and PON1 activity ($P<0.01$), and significantly increased TOC, OSI ($P<0.001$), MDA, NO, TSA, CHOL, LDL ($P<0.01$) and TG ($P<0.05$) levels. In conclusion, co-treatment with astaxanthin restored the negative effect of 3-NPA on all biochemical parameters cited above and improved the histopathological ovarian damage. Ovarian toxicity induced by 3-NPA might be due to oxidative damage. The improvement of astaxanthin seems to be related to their antioxidant properties.

Keywords: Astaxanthin, 3-nitropropionic acid, Ovarian damage, Paraoxonase, Sialic acid

1. GİRİŞ

Dişi memelilerin başlıca üreme organı olan ovaryumlar, folikül adı verilen yapılardan oluşmaktadır. Bu foliküller, ilk gelişim aşamalarında granüloza hücreleri ve foliküler gelişimin ileriki aşamalarında ise teka hücreleri adı verilen iki somatik hücre tipiyle çevrilebilen oosit içermektedir. Bu granüloza ve teka hücreleri birlikte cinsiyet steroid hormonları olan östrojen ve progesteronu üretmektedirler. Doğumda, genellikle yenilenmeyen bir havuz olarak kabul edilen, ovaryan folikül rezervi kurulmaktadır. Bu sınırlı sayıdaki foliküllerin, fertilize olabilen bir gamet üretimi yoluyla bir dişinin ömrü boyunca doğurganlığı desteklemesi için gerekli olduğu kaydedilmektedir (Hirshfield 1991).

Doğumdan sonra ovaryumda var olan rezerv foliküller yaşam boyunca folliküler dalga denilen gelişim aşamaları ile aktive olmaktadır. Özellikle pubertas ile birlikte ovulasyonlu siklusların başlamasıyla folikül atılımı oluşmaktadır. Bundan dolayı da bir dişi doğumda ovaryumlarında var olan oosit sayısı hayatını sürdürmektedir. Folliküler dalgalarla var olan bu rezerv sayısı zamanla azalım göstermekte ve tükenmektedir. İnsanlarda bu durum karşımıza menapoz olarak çıkmaktadır (Petrelli ve Mantovani 2002).

Günümüz kötü çevre şartları, kontrolsüz kullanılan zirai ilaçlar, gıda sektöründe yapılan hileler ve çeşitli zehirlenmeler nedeniyle erkek yada dişilerde fertilitite oranlarında düşme veya doğurganlıkta ciddi azalmalar yaşanmaktadır. Alınan kimyasalların özellikle oosit kalitesini bozması, implantasyonu engellemesi, spermanın çiftleşmeden sonra dişi genital kanalında yaşam kalitesini bozması, erken embriyonal ölümlere neden olması, seksüel aktiviteyi doğrudan veya dolaylı etkilemesiyle infertilite oluşmakta ve üreme kabiliyeti sekteye uğramaktadır (Petrelli ve Mantovani 2002, Sengupta ve ark. 2014).

Fizyolojik olarak düşük seviyelerdeki reaktif oksijen türlerinin (ROT) folikülogenezis, oogenezis, embriyogenezis ve gebeliğe kadar çeşitli sinyal iletim yollarında önemli bir düzenleyici olarak rol oynadıkları bildirilmektedir (Agarwal ve ark. 2008). Oksidan türlerin üretiminin artmasının ve/veya antioksidan sistemin

etkinliğinin azalmasının neden olduğu yüksek seviyedeki ROT'un oksidatif strese yol açabildiği belirtilmiştir (Ciani ve ark. 2015).

Organizmada birçok etkenden dolayı (kimyasallara maruz kalma, enfeksiyöz etkenler, hastalıklar v.b.) aşırı ROT üretimi şekillenebilmektedir. Yüksek konsantrasyondaki ROT'un ovaryumda birikiminin, foliküler fonksiyon üzerinde zararlı etkilere neden olduğu ve dişi üreme hastalıklarının gelişmesinde önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (Agarwal ve ark. 2005). Ovaryumlarda oluşan oksidatif stresin foliküllerde granüloza hücre apoptozu ve foliküler atreziye neden olarak oositlere zarar verdiği öne sürülmektedir (Jancar ve ark. 2007). Birçok çalışmada, memelilerde foliküler atrezinin ana nedenlerinden biri olan granüloza hücre apoptozun oksidatif stresten kaynaklandığı kaydedilmektedir (Murdoch 1998, Ciani ve ark. 2015, Zhang ve ark. 2015, Li ve ark. 2017).

Çeşitli bitki ve mantarlar tarafından üretildiği bildirilen ve doğal bir toksin olan 3-nitropropionik asitin (3-NPA) süksinat dehidrojenazın (SDH) bir inhibitörü olduğu kaydedilmektedir. 3-NPA'nın SDH'nin inhibisyonu ile ROT seviyelerini artırarak mitokondriyal kökenli oksidatif strese neden olan etkili bir oksidan olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark. 2000, Shen ve ark. 2012). Ayrıca 3-NPA'nın *in vivo* ovaryan oksidatif stresi indükleyebileceği belirtilmektedir (Zhang 2015).

Antioksidanların organizmada oksidatif dengenin sağlanması ve hücrelerin oksidatif stresin zararlı etkilerinden korunmasında önemli rol oynayan savunma ajanları oldukları bildirilmektedir (Davies 1995, Ciani ve ark. 2015).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. 3-Nitropropiyonik asit

3-nitropropiyonik asit (P-nitropropiyonik asit, bovinosidin, hiptagenik asit) olarak adlandırılan madde, kimyasal olarak saf formda, suyla kolayca çözünebilen, sarı, kristalimsi katı bir maddedir (Burdock ve ark. 2001).

2.1.1. 3-Nitropropiyonik Asitin Toksisitesi ve Etki Mekanizması

Toksisitenin mekanizmasında dopaminerjik toksisite, striatal arterin yaralanması veya glutamat taşıyıcı aktivitesinin yüksek olmasının etkili olabileceği ifade edilmektedir (Nishino ve ark. 1997). 3-NPA'nın farelerde ve ratlarda LD50 dozlarının 60-120 mg/kg arasında olduğu kaydedilmektedir (Burdock ve ark. 2001). Ratlarda, toksisitenin ilerlemesi üç aşamaya ayrılmıştır;

- I. Aşama; uyku hali,
- II. Aşama; kürek ve yuvarlanma hareketleriyle koordine olmayan yürüyüş,
- III. Aşamada; belirgin çiğneme hareketleriyle ventral veya lateral yaslanma.

Ölümün genellikle solunum yetmezliğinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Hamilton ve Gould 1987). Subakut uygulamadan sonra en sık görülen şiddetli motor anormalliklerinin arka bacağı uzatılması, distonik duruş ve yalpalayarak yürüme olduğu belirtilmiştir. Ancak kronik uygulamalarda bu semptomlara rastlanmadığı bildirilmektedir (Guyot ve ark. 1997).

3-Nitropropiyonik asitin temel etki mekanizmasının, mitokondriyal kompleks II'nin bir bileşeni ve krebs döngüsünde süksinik asitin fumarik asite dehidrojenasyonundan sorumlu olan, SDH'nin inhibisyonu olduğu, bu etkiyi; SDH ile reaksiyonu sonucu oluşan 3-nitroakrilatın enzimin aktif bölgesine kovalent bir eklenti yaparak geri dönüşümsüz katalitik inaktivasyona neden olarak yaptığı ileri sürülmektedir (Alston ve ark. 1977).

3-Nitropropiyonik asitin ikincil etki mekanizmasının toksisitesine özgü olmadığı kaydedilmektedir. 3-NPA'nın parçalanmasında nitrik oksit (NO) oluşumuna bağlı olarak bir vazodilatör reaksiyonu ile oluşan düşük kan basıncı

nedeniyle geridönüşümlü sistemik vasküler hasar ile karakterize olduğu ifade edilmektedir (Castillo ve ark. 1993). 3-NPA'nın dolaylı olarak yağ asitlerinin mitokondriyal beta-oksidasyonunu da inhibe ederek oksidatif strese neden olan serbest radikal oluşumu için substrat sağladığı bildirilmektedir (Esfandiari ve ark. 1997).

3-nitropropionik asitin eksitotoksitesinin ATP seviyesinin ve oksijen tüketiminin düşmesine neden olan mitokondriyal solunumun bozulmasıyla ilişkili olduğu ifade edilmektedir (Erecinska ve Nelson 1994). Eksitotoksik kaskadında ATP seviyesinin düşmesiyle N-metil-D-aspartat reseptörünün aktivasyonu ile hücreye kitlesel Ca^{2+} akışına neden olarak nekroz veya apoptoza yol açan membran potansiyelinin azalmasına sebep olduğu kaydedilmektedir (Portera-Caillau ve ark. 1995). 3-NPA'nın neden olduğu metabolik bozulma nedeniyle Na-K pompasının çökmesinin geri dönüşümsüz depolarizasyona da yol açması, 3-NPA patogeneğinde eksitotoksitenin rolünü desteklediği ifade edilmektedir (Riepe ve ark. 1992).

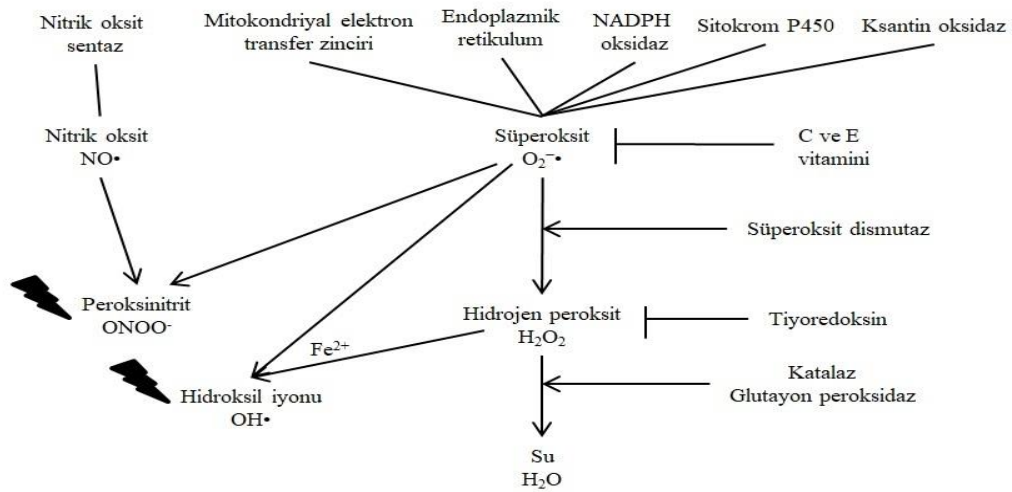
Yaş ve cinsiyetin ratların 3-NPA'ya karşı duyarlılığını etkileyen faktörlerden olduğu ve genç hayvanların 3-NPA toksisitesinden daha az etkilendiği rapor edilmiştir (Bossi ve ark. 1993). Bunun nedeninin, SDH aktivitesi ve mitokondriyal fonksiyonların genel olarak yaşla birlikte azalmasından ileri geldiği öne sürülmüştür (Fattoretti ve ark. 1998).

Cinsiyete bağlı duyarlılık için erkeklerin dişilere göre daha duyarlı olduğu ve bunun cinsiyet hormonları ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Nishino ve ark. 1998). Altı haftadan küçük deney hayvanlarına sistemik uygulama sonrası beyinde toksik etki oluşturmadığı, 7-14 haftalık deney hayvanlarında % 25 oranında striatal hasar olduğu, 16 haftadan büyüklerde ise % 80 striatal lezyon olduğu ve ölüm görüldüğü bildirilmiştir (Davies 1995).

Ratların 3-NPA uygulamasına farelerden daha duyarlı oldukları bildirilmiştir. Rat türleri arasında ise 3-NPA toksisitesine en duyarlı Fischer ratlar, daha az duyarlı olan ise Lewis ratlar oldukları belirtilmektedir. Wistar ve Sprague Dawley ratların da 3-NPA'ya duyarlı oldukları bildirilmektedir (Ouary ve ark. 2000, Brouillet ve ark. 2005).

2.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Biyokimyası

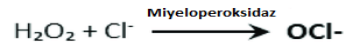
Reaktif oksijen türleri terimi hem serbest radikaller hem de radikal olmayan ara ürünler için kullanılmaktadır. Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren türler olarak tanımlanmaktadır. Bu tamamlanmamış elektron kabuğunun serbest radikale yüksek reaktivite kazandırdığı kaydedilmektedir. Serbest radikallerin birçok elementten üretilebildiği, ancak biyolojik sistemlerdeki en önemli kaynaklarının oksijen ve azot olduğu bildirilmiştir (Şekil 1, Burton ve Jauniaux 2011).



Şekil 1. Reaktif oksijen türlerinin potansiyel kökenleri ve detoksifikasyon yolları (Burton ve Jauniaux 2011)

Tüm hücre ve dokuların, elektron transfer zincirinde sürekli olarak düşük bir miktardaki moleküler oksijeni ROT'lara dönüştürdüğü belirtilmektedir. ROT'ların organizmada aktif fagositlerde meydana gelen solunum patlaması da dahil olmak üzere birçok yolla üretilebildiği ileri sürülmektedir (Alfadda ve Sallam 2012). Aynı zamanda "oksidatif patlama" olarak da bilinen solunum patlaması, süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi ROT'ların farklı hücre türlerinden hızlı salınması olayı olarak tanımlanmaktadır. Genellikle, bu kimyasalların, organizmanın bakteri veya mantarlar tarafından enfeksiyonu sonucu nötrofiller ve makrofajlar gibi immün sistem hücreleri tarafından üretildikleri öne sürülmektedir. Ayrıca $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 gibi ROT'ların hayvanlarda, oositin fertilizasyonundan sonra ovaryumlardan salındıkları da bildirilmiştir (Yang ve ark. 2016).

Fagositlerde, bakterileri parçalamak için, meydana gelen solunum patlamasının immün sistemde önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir. $O_2^- \cdot$ birçok hücrede yaygın olarak bulunan bir enzim ailesi olan nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz tarafından üretilmektedir. Nötrofiller ve monositlerin, H_2O_2 ile Cl^- 'u birleştirerek bakterilerin yok edilmesinde rol oynayan hipoklorit üretmek için myeloperoksidazı kullandıkları bildirilmektedir (Yang ve ark. 2016).



Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun, aerobik metabolizmanın doğal bir sonucu olduğu ve doku oksijen homeostazının korunmasında önemli payı bulunduğu bildirilmiştir. Oksijen homeostazı sürdürülmediğinde, hücresel ortamda oksidatif stresin meydana geldiği öne sürülmektedir. Mitokondride normal metabolik yan ürünler olarak $O_2^- \cdot$, H_2O_2 ve hidroksil ($\cdot OH$) radikallerinin üretildikleri belirtilmiştir. Mikrozomal sitokrom P450 enzimleri, flavoprotein oksidazlar ve peroksizomal enzimler, ROT'un diğer önemli hücre içi kaynaklarından oldukları kaydedilmektedir (Seifried ve ark. 2007, Lu ve ark. 2018).

Reaktif oksijen türlerinin hem sağlıkta hem de hastalıkta kilit rol oynadıkları, normal damar hücrelerinin işleyişi ve damar çapı düzenlemesinin sürdürülmesi gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli bir role sahip oldukları belirtilmektedir (Salman ve Ashraf 2013). ROT'ların biyolojik sistemlerde, farklılaşma, çoğalma, büyüme, apoptoz, hücre iskeleti, migrasyon ve kasılma düzenlemelerine katıldıkları ve büyüme faktörü uyarımı ile enflamatuvar yanıtın kontrolünde rol oynadıkları belirtilmektedir (Brieger ve ark. 2012, Kuru ve ark. 2018).

Fizyolojik koşullar altında en yaygın $O_2^- \cdot$ anyonunun bulunduğu ve ana kaynağının mitokondri olduğu ileri sürülmektedir (Cadenas ve Davies 2000). $O_2^- \cdot$ anyonunun dioksijene bir elektronun eklenmesiyle oluştuğu, ancak sulu çözeltilerde kendiliğinden reaksiyona girerek H_2O_2 ve moleküler oksijene (O_2) ($O_2^- \cdot + O_2^- \cdot + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$) dönüşebilir olması nedeniyle kararsız olduğu kaydedilmektedir (Lu ve ark. 2018).

Solunum zincirinde elektronların transfer olayının tam olarak verimli olmadığı ve özellikle kompleks I ve III'ten elektronların moleküler oksijene sızmasıyla $O_2^- \cdot$ anyonu oluşumuna neden oldukları belirtilmektedir. Oluşum hızının, zincirde mevcut olan elektronların sayısı ile belirlendiği ve böylece hiperoksi ve yüksek glukoz konsantrasyonunda arttığı bildirilmektedir. Kompleks IV için son elektron alıcısı olarak hareket eden oksijenin mevcudiyetinin azalmasının elektronların birikmesine neden olduğu öne sürülmektedir. $O_2^- \cdot$ anyonunun yüklü olması nedeniyle zardan geçemediği ve mitokondri matriksi içinde kaldığı bildirilmiştir (Burton ve Jauniaux 2011). $O_2^- \cdot$ anyonu Fe^{3+} iyonunu Fe^{2+} ya indirgeyerek O_2 'ye ($O_2^- \cdot + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$) dönüşebilmektedir (Lu ve ark. 2018).

Süperoksit anyonunun benzer şekilde endoplazmik retikulumda elektrontransport zincirinden elektronların sızmasıyla da üretilebildiği bildirilmektedir (Tu ve Weissman 2004). Süperoksit dismutaz (SOD) enzimleriyle detoksifiye edilerek H_2O_2 'ye dönüştürülmektedir (Lu ve ark. 2018)

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmamakla birlikte, serbest radikallerin üretilmesi ve detoksifikasyonu yakından ilişkili olduğu buyüzden ROT içerisinde anıldığı belirtilmiştir (Lu ve ark. 2018). Polar olmadığı için hücre ve organellerin zarlarından kolayca geçebilmekte ve bu nedenle geniş çapta sinyal iletim yollarında ikinci bir haberci olarak rol oynamaktadır. H_2O_2 , katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleriyle suya detoksifiye edilmektedir. $O_2^- \cdot$ ve H_2O_2 seviyelerindeki dengesizliğin, onlardan çok daha tehlikeli olan $\cdot OH$ radikali oluşumuna neden olabileceği bildirilmektedir (Halliwell ve Gutteridge 2007).

Hidroksil radikalının pürinleri ve pirimidinleri modifiye ederek DNA iplikçik kopmalarına ve DNA hasarına neden olduğu belirtilmektedir (Agarwal 2004). $\cdot OH$ radikalının ana kaynağının metal katalizörlü Haber-weiss reaksiyonu olduğu bildirilmiştir (Kehrer 2000); $O_2^- \cdot + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + \cdot OH$

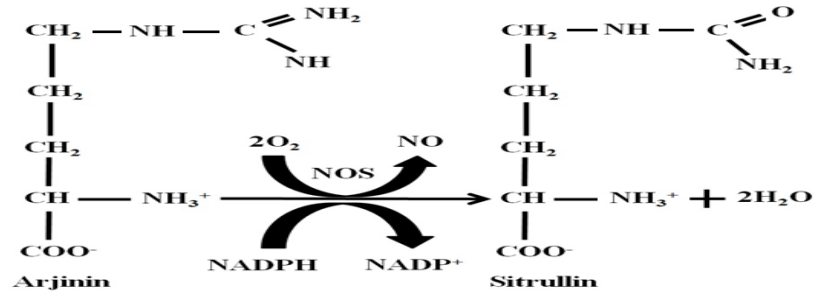
İkinci kaynağının ise Fenton-tip reaksiyonu olduğu belirtilmiştir (Liochev 1999, Lu ve ark. 2018); $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$

Hidroksil radikalının, yakın çevresinde bulunan herhangi bir biyolojik molekül ile reaksiyona girebildiği ve çok reaktif olduğu için bilinen bir temizleyicisinin bulunmadığı bildirilmiştir (Burton ve Jauniaux 2010).

2.2.1. Nitrik Oksit

Reaktif oksijen türleri kadar önemli olan diğer bir reaktif tür grubuna reaktif azot türleri (RNT) denilmektedir. Serbest bir radikal olan NO, bu grubun en önemli üyesini oluşturmaktadır. NADPH-bağımlı enzimlerden olan nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından katalize edilen arjininin sitrülline dönüştürüldüğü reaksiyon sırasında üretilmektedir (Şekil 2) (Drew ve Leeuwenburgh 2002, Bolisetty ve Jaimes 2013, Ogun ve ark. 2016). NOS'un nöronal (nNOS), indüklenebilir (iNOS) ve endotelial (eNOS) olmak üzere üç izoformu bulunduğu ve her hücre komponentinde bulunduğu bilinmektedir (Forstermann ve Sessa 2012, Atakişi ve Merhan 2017).

Nitrik oksitin, tek bir eşleşmemiş elektron içeren yüksüz lipofilik bir molekül olduğu kaydedilmektedir. NO'nun çok reaktif bir radikal olmasa da, protein fonksiyonu ve tüm organizmaların fonksiyonu üzerinde etkisi olan, ayrıca biyomoleküllerdeki nitrozatif hasarı tetikleyebilen başka reaktif ara maddeler oluşturabilmesi açısından önemli olduğu bildirilmiştir (Drew ve Leeuwenburgh 2002). Bu nedenle; NO'nun bir oksidan veya bir antioksidan olarak işlev görebildiği belirtilmiştir. Aynı zamanda nörotransmitter ve kan basıncı düzenleyicisi olan NO'nun patolojik durumlar sırasında güçlü oksidanlar üretebildiği öne sürülmektedir (Salman ve Ashraf 2013).



Şekil 2. Nitrik oksit oluşumu (Ozcan ve Ogun 2015).

Nitrik oksitin sitokrom C oksidazı inhibe edebildiği bildirilmiştir. Mitokondride bulunan NO'nun, mitokondriyal biyogenez, solunum ve oksidatif stres gibi çeşitli işlemlerin aktivitesini değiştirebilen reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin üretimini arttırdığı ileri sürülmektedir (Bolisetty ve Jaimes 2013).

Hücre sel fonksiyonlar için önemli düzenleyici görevi olan NO'nun oluşturduğu nitrosatif stres ile redoks duyarlı transkripsiyon faktörünü aktive ederek enflamasyon ilişkili kanserogenezde kritik bir rol oynadığı bildirilmektedir. NO'nun plazmadaki seviyesinin artması ile askorbik asit ve ürik asit konsantrasyonunu azaltabildiği ve lipit peroksidasyonunu başlatabildiği belirtilmektedir (Salman ve Ashraf 2013). Aşırı miktarda O_2^- anyonunun, NO ile etkileşimi peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) oluşmasına yol açmaktadır; $O_2^- + NO \rightarrow ONOO^-$

Peroksinitritin kendiliğinden ayrılarak nitrojen dioksit (NO_2) ve $\bullet OH$ oluşturabilen güçlü bir pro-oksidan olduğu belirtilmektedir (Pacher ve ark. 2007). Sitotoksik bir radikal olan $ONOO^-$ 'nin doku hasarına neden olduğu ve düşük dansiteli lipoproteinleri (LDL) okside ettiği bildirilmektedir. Ayrıca doğrudan protein oksidasyonuna ve DNA oksidasyonuna neden olabildiği kaydedilmektedir (Halliwell 2007).

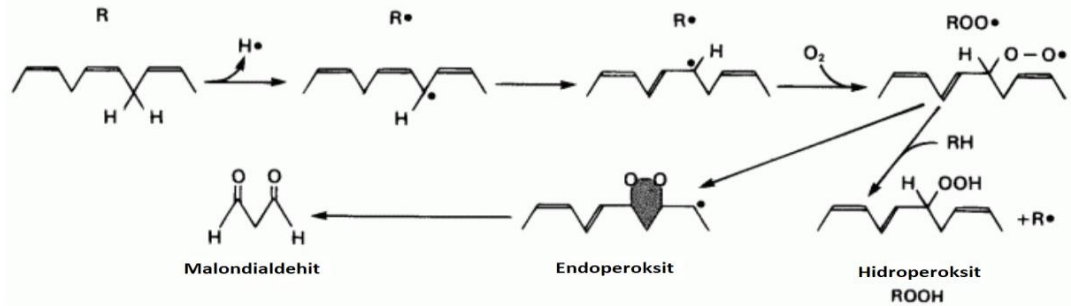
2.2.2. Lipit Peroksidasyonu

Mitokondri ve ekstramitokondriyal bölgelerde üretilen ROT'lar, oksidatif değişikliklere karşı oldukça hassas olan ve hücre sel membranlarda bulunan fosfolipitler gibi kompleks lipitlerde ve lipoproteinlerde bulunan çoklu doymamış yağ asitleriyle (PUFA: polyunsaturated fatty acids) reaksiyona girmektedir. PUFA'ların ROT'lar tarafından kimyasal olarak modifiye edilerek bozulmasına neden olan sürece lipit peroksidasyonu adı verilmektedir (Van Kuijk ve ark. 1990).

Hücre sel membranlardaki lipit peroksidasyonu ROT'un katkısıyla veya PUFA zincirinde iki çift bağ arasında yer alan metilen grubundan ROT tarafından hidrojen atomunun (allilik hidrojen) ayrılması ile başlatılmaktadır. PUFA'dan oluşan konjuge dienler, zarlarda içinde oldukça yüksek oranda bulunan oksijenle reaksiyona girerek bir peroksil radikali oluşturmaktadır. Peroksil radikalleri bilhassa komşu

PUFA zincirleri için oldukça reaktif olduklarından, onlardan hidrojeni çıkararak lipid peroksidasyon sürecini yaymaktadırlar. Bu reaksiyonda bir lipid hidroperoksit ve karbon merkezli radikal oluşmaktadır. Lipid hidroperoksit yerine siklik lipid endoperoksitler de oluşturulabilmektedir. Lipit peroksitlerinin, geçiş metal iyonları (demir, bakır iyonları) varlığında, bunlarla reaksiyona girerek alkoksil radikalleri meydana getirebildikleri belirtilmiştir (Halliwell ve Gutteridge 2007, Reed 2011). Dahası, metal iyonlarının lipid peroksit molekülünün kararsızlaşmasına neden olarak daha küçük ürünlere ayrışmasına neden olabildiği bildirilmiştir. Oluşan bu ürünler, basit hidrokarbonlardan çeşitli ketonlar ve aldehitlere kadar çeşitlilik göstermektedir. Lipit peroksitlerinin ayrışma ürünlerinin, akrolein, malondialdehit (MDA), 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) ve 4-hidroksi-2-heksenal (HHE) gibi aldehitler oldukları kaydedilmektedir (Van Kuijk ve ark. 1990, Esterbauer ve ark. 1991).

Yaygın olarak kullanılan lipid peroksidasyon belirteçlerinin MDA ve HNE olduğu bildirilmiştir. HNE'nin, linoleik asit gibi ω -6 PUFA'nın bir peroksidasyon ürünü olarak oluşturulduğu, MDA'nın ise esas olarak, araşidonik asit gibi ikiden fazla çift bağ bulunduran PUFA'nın peroksidasyon ürünü olduğu bildirilmektedir (Şekil 3, Halliwell ve Gutteridge 2007).



Şekil 3. Çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu (Halliwell ve Gutteridge 2007).

2.2.2.1. Malondialdehit

Malondialdehitin araşidonik asit ve daha büyük PUFA'ların enzimatik veya enzimatik olmayan süreçlerle parçalanması sonucu oluşan bir son ürün olduğu kaydedilmiştir. MDA'nın, ROT'lardan kimyasal olarak daha istikrarlı ve zar geçirgen olduğu, HNE ve metilglioksaldan daha az toksik olduğu belirtilmektedir. MDA'nın

oksidatif stresi belirleyen en popüler ve güvenilir belirteçlerden biri olması nedeniyle omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin lipid peroksidasyonunun tespitinde uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmakta olduğu ifade edilmektedir. MDA oluşuktan sonra, enzimatik olarak metabolize edilebilmekte veya hücrel proteinler yada DNA üzerinde reaksiyona girerek biyomoleküler hasara neden olan ürünler oluşturabildiği bildirilmektedir. İlk çalışmalar, MDA'nın, mitokondriyal aldehit dehidrogenaz ile oksidasyonunu takiben asetaldehite dekarboksilasyonunu ile asetat, CO₂ ve H₂O'ya metabolize olduğunu göstermektedir. Öte yandan, sitoplazmik MDA'nın fosfoglukoz izomeraz ile metilglioksala ve glioksalaz sisteminin enzimleriyle D-laktata metabolize edildiği bildirilmiştir. MDA'nın bir kısmının ise, N-epsilon-(2-propenal)lizin veya N-2-(propenal)serin olarak idrarla atıldığı kaydedilmektedir (Ayala ve ark. 2014).

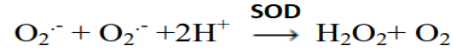
2.3. Antioksidan Savunma

Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda mevcut olduğunda, oksitlenebilir substratlarla ilişkili olarak, genellikle kendileri okside olurken oksidatif prosesleri önemli ölçüde inhibe eden veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmaktadır (Vaya ve Aviram 2001).

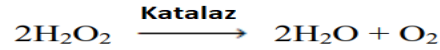
Antioksidanların, medikal tedavi amacıyla oksidatif strese bağlı hastalık süreçlerine karşı uygulanmasına olan ilginin gün geçtikçe arttığı öne sürülmektedir. Hücrelerin kullandıkları, vitaminler (A, C ve E) ve enzimler (SOD, CAT, GSH-Px ve tioredoksin redüktaz) gibi çok çeşitli güçlü antioksidanlar bulunmaktadır. Hücreler için mevcut olan diğer non-enzimatik antioksidanlar arasında GSH, eksojen serbest radikal temizleyiciler, karotenoidler ve polifenoller yer almaktadır (Biswas ve ark. 2005, Lehoux 2006).

Antioksidanların, potansiyel oksidanları çıkararak veya bunları nispeten kararlı bileşiklere dönüştürerek serbest radikal oluşumunu azalttıkları bildirilmektedir (Vaya ve Aviram 2001). Birincil savunma mekanizmasının işlevi, hücre içi hedeflerle reaksiyona girmeden önce serbest radikalleri temizleyerek doğrudan oksidatif hasarı önlemektir (Curtin ve ark. 2002). SOD, GSH-Px, CAT ve glutatyon redüktaz (GSR) birincil savunma mekanizmasının elemanlarını

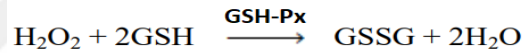
oluşturmaktadır (Lu ve ark. 2018). SOD, $O_2^{\cdot-}$ radikalinin H_2O_2 'ye aşağıdaki gibi dönüştürülmesinden sorumludur (Curtin ve ark. 2002).



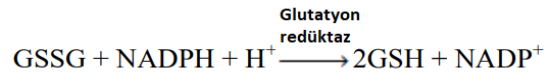
Hidrojen peroksit CAT aracılığı ile suya ve moleküler oksijene dönüştürülmektedir;



Glutasyon sistemi serbest radikallere karşı önemli hücrel savunma mekanizması olarak görev yapmaktadır. GSH sadece doğrudan ROT temizleyicisi değil, aynı zamanda hücre içi redoks durumunun düzenlenmesinde önemli role sahip olan bir antioksidandır. Sistem GSH, GSH-Px ve GSR'den oluşmaktadır. GSH-Px, kosubstrat olarak GSH'yı kullanarak H_2O_2 'nin suya indirgenmesini katalize etmektedir:



Okside glutasyon (GSSG) daha sonra aşağıda belirtildiği gibi NADPH kullanarak GSR ile GSH'a indirgenmektedir:



Hücrelerin GSH'yi yeniden üretme kabiliyeti (GSSG'nin azaltılması yoluyla veya GSH'nin sentezi yoluyla) hücrenin oksidatif stresi yönetmedeki verimliliğini yansıttığı bildirilmiştir (Curtin ve ark. 2002, Lu ve ark. 2018). Ayrıca, biyolojik sistemlerde yaygın olarak bulunan diğer küçük moleküller, C vitamini, ürik asit ve bazı polifenoller de birincil savunma sisteminin bir parçası olarak görev yapmaktadırlar (Vaya ve Aviram 2001, Lu ve ark. 2018).

İkincil antioksidan savunma mekanizmaları aynı zamanda zincir kırma reaksiyonu olarak bilinmektedir. Bu mekanizma zararlı radikalleri hapsederek etkilerini erken bir aşamada durdurma görevi görmektedir. E vitamini (α - tokoferol)

gibi antioksidanların, tüm hücrel membranlarda bulunduğu ve hücreyi lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu görevi olduğu bildirilmektedir (Vaya ve Aviram 2001). β -karoten en verimli süpürücü etkisini E vitamini ile ortaya koyarken, E vitamininin β -karotenin konjuge çift bağı oksidasyondan koruduğu belirtilmiştir (Lu ve ark. 2018).

2.4. Total Antioksidan/Oksidan Kapasite

Plazma ve vücut sıvılarında bulunan antioksidanların toplam etkisini total antioksidan kapasite (TAK), oksidanların toplam etkisini ise total oksidan kapasite (TOK) yansıtmaktadır. Vücudun antioksidan/oksidan durumu antioksidan enzimlerin aktivitesi ve oksidan/antioksidan moleküllerin konsantrasyonu ayrı ayrı ölçülerek değerlendirilebilmekle beraber, genel antioksidan/oksidan durumu TAK ve TOK ölçümü ile daha kolay değerlendirilebilmektedir (Erel 2004, Erel 2005).

Antioksidanların serum veya plazma konsantrasyonlarının laboratuvarlarda ayrı ayrı ölçümlerinin yapılmasının zaman alıcı olması, yoğun iş yükü oluşturması ve pahalıya mal olan karmaşık teknikleri gerektirmesi gibi birçok açıdan olumsuzlukları bulunmaktadır. Bu nedenle TAK ölçümünün en çok kabul gören yöntem olduğu belirtilmektedir (Wijnberger ve ark. 2003, Vlachos ve ark. 2006).

Total antioksidan kapasiteye katkıda bulunan temel moleküller (albümin, ürik asit, askorbik asit, α - tokoferol, bilirubin vb.) bulunmaktadır (Erel 2004). İnsan plazmasında TAK'ın % 85'inden fazlasını albümin, ürik asit ve askorbik asitin oluşturduğu kaydedilmiştir (Gitto ve ark. 2009)

Antioksidanlarda olduğu gibi serum ya da plazmada farklı oksidan moleküllerin ayrı ayrı ölçümü pratik olmadığından ve bu oksidanların bir arada etki etmesi her birinin tek başına oluşturduğundan daha fazla oksidan etki ortaya çıkarmasından dolayı TOK ölçümünün daha yararlı olduğu bildirilmektedir (Erel 2005). TOK; total peroksid, serum oksidasyon aktivitesi ve reaktif oksijen metabolitleri gibi isimler de almaktadır (Erel 2005).

2.5. Total Tiyol

Tiyoller, bir sülfhidril grubu (-SH) içeren organik bileşikler sınıfını oluşturmaktadır. Bir karbon atomuna bağlı bir sülfür atomu ve bir hidrojen atomundan oluşmaktadır. Plazmadaki protein tiyolleri, protein sülfhidril grupları ile homosistein, sisteinilglisin, sistein ve GSH'dan oluşan protein mix disülfürler içermektedir. İnsan plazmasında indirgenmiş homosistein, sisteinilglisin, sistein ve glutasyon tiyolleri bulunmaktadır. Bu tiyoller düşük moleküler kütleli disülfidler, homosistin, sistinilglisin, sistin ve GSSG şeklinde de bulunmaktadır (Rossi ve ark. 2008). Hücre içinde düşük moleküler ağırlıklı sülfidril/disülfür havuzunu özellikle indirgenmiş formda olan GSH/GSSG oluşturmaktayken, plazmada ve bütün olarak hücre dışında ise disülfid formunda bulunan sistein/sistin oluşturmaktadır (Dalle-Donne ve ark. 2008).

Dinamik tiyol disülfid dengesinin, antioksidan koruma, detoksifikasyon, sinyal iletimi, apoptoz, enzimatik aktivitenin düzenlenmesi, transkripsiyon faktörleri ve hücrel sinyalizasyon mekanizmalarında kritik rol oynadığı bildirilmektedir (Erel ve Neselioglu 2014).

Vücuttaki total tiyol (TT), özellikle protein tiyol (-SH) grupları, canlı organizmanın başlıca plazma antioksidanları olarak kabul edilmektedir. Bu tiyol (-SH) gruplarının çoğu albüminde bulunur ve vücut sıvılarında bulunan başlıca indirgeme gruplarını oluşturmaktadır (Prakash ve ark. 2009)

2.6. Paraoksonaz 1

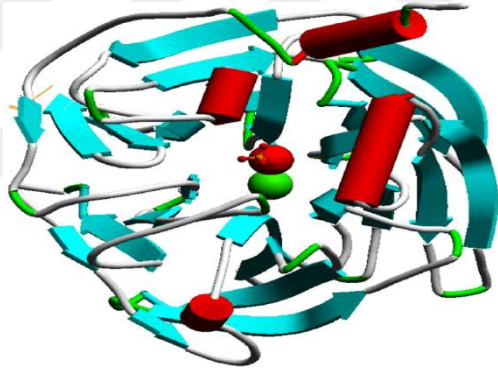
Paraoksonaz 1 (PON1) ilk olarak 1940'larda, memeli dokularında organofosfatlı pestisitleri hidrolize edebilen bir enzim olarak bildirilmiştir (Mazur 1946). Aldridge tarafından 1953'te dietil p-nitrofenil fosfatı hidrolize edebilmesi nedeniyle α -esteraz enzimi olarak tanımlanmıştır (Aldridge 1953).

PON1'in, bir aril-dialkil fosfatın dialkil fosfat ve bir aril alkole hidrolize edebilme kabiliyetinden dolayı, "Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Enzim Komisyonu" tarafından "arildialkilfosfataz" olarak sınıflandırılmıştır (Mackness ve ark. 1998). Sonraki araştırmalar, PON1'in, bir laktonaz ve bir

arilesteraz da olduğunu göstermiştir (Khersonsky ve Tawfik 2006). PON1'in ayrıca oksidatif stres koşulları altında üretilen H₂O₂'i indirgeme kabiliyeti ve okside HDL'de lipit hidroperoksitlerini hidroksitlere indirgeme kabiliyeti nedeniyle de peroksidaz benzeri bir enzim olduğu gösterilmiştir (Aviram ve ark. 1998a, 1998b).

2.6.1. Paraoksonaz 1'in Biyokimyasal Önemi

Moleküler kütlesi yaklaşık 43 kDa olan PON1, 354 amino asitten oluşan bir glikoproteindir (Gan ve ark. 1991). Enzimin HDL ile birleşimi için gerekli olan hidrofobik sinyal dizisi N terminal bölgesinde bulunmaktadır (Mackness ve ark. 1998). Enzimin merkezinde biri enzimin katalitik aktivitesi için diğeri ise enzimin stabilitesi için gerekli olan iki Ca⁺² iyonu bulunan bir tünel bulunmaktadır (Harel ve ark. 2004).



Şekil 4. PON1'in genel yapısı, HDL (kırmızı silindirler), yapısal kalsiyum katyonu (yeşil) ve bir fosfat anyonunun (çubukların) bağlandığı katalitik kalsiyum katyonuna (kırmızı) bağlanan üç alfa helezonu gösterilmektedir (Rochu ve ark. 2007).

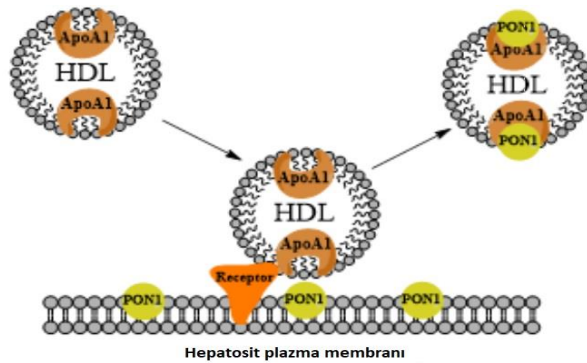
Merkezi tünel enzimin aktif bölgesini oluşturmaktadır. PON1 tarafından etkili bir şekilde hidrolize edilen substratların hidrofobik olması, enzimin aktif bölgesinin hidrofobik olmasından ileri geldiği bildirilmektedir (Aviram ve ark. 1998a).

Paraoksonaz 1 enzimi HDL ile yakından ilişkili bir glikoproteindir. Karaciğer tarafından salgılanan PON1'in, antioksidan enzim olarak kabul edildiği, organizmada organofosfat pestisitler ve nörotoksik bileşiklerin hidrolizinden sorumlu olduğu kaydedilmektedir (Fuhrman 2012, Mehdi ve Rizvi 2012). Aynı zamanda kolesterol (CHOL) akışıyla ilişkili olarak makrofajları artırdığı, homosistein tiyolaktonu

parçalayarak protein modifikasyonunu önlediği ve serbest radikalleri stabilize ettiği belirtilen PON1'in, böylece membran bütünlüğünü koruduğu kaydedilmektedir (Chistiakov ve ark. 2017).

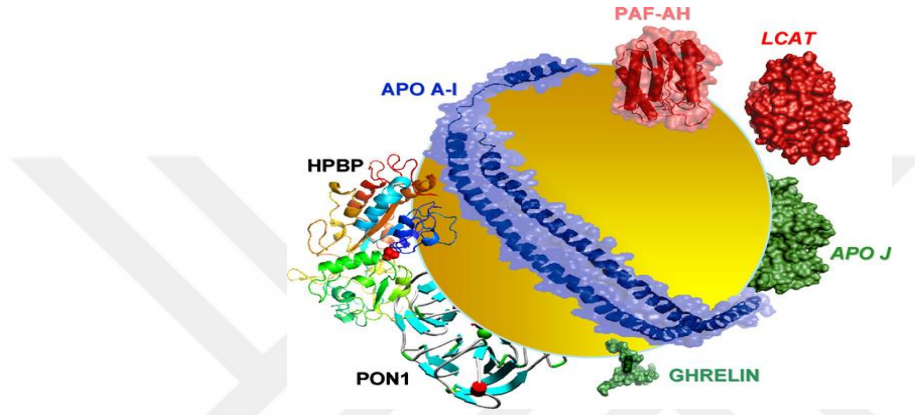
PON1'in antioksidan aktivitesinin, sistein-284 üzerinde bulunan serbest sülfhidril grubundan kaynaklandığı ifade edilmektedir (Kuo ve La Du 1995). PON1'in LDL oksidasyonunun önlenmesi sırasında hidrolitik fonksiyonunun bir miktar inaktivasyona uğradığı belirtilmiştir (Aviram ve ark. 1998b). PON1'in, hem H_2O_2 'yi hem de kolesterol linoleat hidroperoksitleri gibi lipit peroksitlerini hidrolize ederek oksidatif strese karşı önemli rolü olduğu ileri sürülmüştür (Shekhanawar ve ark. 2013). Paraoksonda bulunan O-P tipi ester bağı, fosfolipid peroksitler ve kolesterol ester peroksitler ile ilişkili lipoproteinlerde mevcut olabileceğinden, PON1'in fosfotriesteraz özelliğinin de oksidatif strese karşı korumaya katkıda bulunabileceği belirtilmiştir (La Du 1996). PON1'in H_2O_2 kaynaklı lipit peroksidasyonuna karşı koruyuculuğunun yanında okside fosfolipidlerin oluşturduğu ve $ONOO^-$ birikimini de engellediği tespit edilmiştir (Rozenberg ve ark. 2003).

Paraoksonaz 1'in HDL ile ilişkili kolesterol ester hidroperoksitlerini, LDL ile ilişkili olanlardan daha hızlı bir şekilde indirgelediği, bunun sebebinin organizmadaki PON1'in ağırlıklı olarak HDL ile ilişkili olmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Bundan dolayı PON1'in aslında, LDL yerine HDL'yi oksidatif strese karşı korumak için çalıştığı belirtilmektedir (Bowry ve ark. 1992).



Şekil 5. Paraoksonaz ve HDL arasındaki ilişkinin şematik görüntüsü. HDL geçici olarak reseptör aracılığı ile hücre yüzeyine bağlanır, daha sonra PON1 hücre yüzeyinden ayrılır ve Apolipoprotein A1 tarafından tutularak HDL'ye bağlanır (Sorenson ve ark. 1999).

Serum PON1 enzimi plazmada HDL ile birlikte bulunmaktadır. PON1'in plazma lipoproteinlerinin oksidasyonunun önlenmesinde görev aldığı bildirilmektedir (Mackness ve ark. 1985). PON1 enziminin HDL'nin apolipoprotein A1 ve apolipoprotein J (clustrein) proteinleri ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Hasselwander ve ark. 1998). PON1 enziminin, N-terminal ucunda bulunan hidrofobik yapıdaki sonlanma bölgesi aracılığı ile fosfolipidler ve lipoproteinlere bağlandığı bildirilmektedir (Sorenson ve ark. 1999).



Şekil 6. HDL molekülünün şematik gösterimi. (PON1: Paraoksonaz, HPBP: İnsan Fosfat Bağlayıcı Protein, PAF-AH: Trombosit Aktive Edici Faktör Asetilhidrolaz, LCAT: Lesitin Kolesterol Asetil Transferaz, GHRELIN: Ghrelin hormonu (açlık hormonu)) (Rochu ve ark. 2007).

Dolaşımdaki PON1 ve HDL arasında sıkı bir ilişki olduğu, PON1'in sadece HDL tarafından serbestleştirildikten sonra endojen substratı ile etkileşebildiği ve biyolojik özelliklerini sergileyebildiği belirtilmiştir. Bunun karşılığında da PON1'in HDL'yi oksidasyondan koruduğu kaydedilmiştir (Blatter Garrin ve ark. 2006).

2.7. Sialik Asit

Sialik asitler (SA), nöyraminik asidin genel çekirdek yapısında, bilinen 50'nin üzerinde türevden oluşan, negatif yüklü dokuz-karbonlu monosakaritlerin geniş bir ailesini oluşturmaktadır (Vimr ve Lichtensteiger, 2002).

Sialik asitler tipik olarak, en dıştaki hücre yüzeyi glikokonjüгатlarına bağlı terminal rezidüer olarak bulunmaktadır. Memeliler, virüsler ve bakteriler dâhil çeşitli organizmalarda tespit edilmişlerdir. Asetilasyon ve glikolilasyonu içeren çeşitli doğal modifikasyonlar gösterdikleri de bildirilmiştir (Schauer 2009). Bu

kimyasal çeşitliliğin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, bir hipoteze göre; sialik asitlerdeki modifikasyonların, konakçı patojen etkileşimleri ile evrimsel seleksiyon sonucu meydana geldiği öne sürülmektedir. Sialik asit rezidüleri içindeki kimyasal varyasyonlara ek olarak, sialik asitler ve temelindeki glikanlar arasındaki çeşitli glikozidik bağlantılardan (α -2,3-, α -2,6- ve α -2,8-) ek çeşitlilik ortaya çıkmaktadır (Harduin-Lepers ve ark. 2005). Ayrıca sialik asitler, bu glikanların temel karbonhidrat zincirine çeşitli potansiyel bağlantıları ve sialik asit kalıntıları üzerinde çeşitli modifikasyonları nedeniyle hücre yüzeyi glikanlarının yapısal çeşitliliğine katkıda bulunmaktadır (Schauer 2009).

2.7.1. Sialik Asitin Biyokimyasal Önemi

Sialik asitler terminal lokalizasyonları ve hücre yüzeylerinde bulunmalarından dolayı hücre dışı ortama maruz kalmaktadırlar. Bu nedenle hücre tanıtım alanlarının maskelenmesi ve hücre etkileşimlere aracılık etmektedirler. Bununla birlikte içsel veya dışsal reseptör görevi gördüklerinden çeşitli fizyolojik ve patolojik işlemlerde önemli rol oynadığı ve tümör metastazı ile de yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (Varki 2008). Makromolekülleri fagositik bozulmalardan veya doğal immün yanıtı korumak için, moleküllerin tanıtım alanlarının korunmasında rol oynamaktadır (Ley 2003). SA'ların hücrelerin kimliği gibi görev yaparak onları immünolojik saldırılara karşı korudukları kaydedilmektedir (Schauer 2009). Buna karşılık, yüzeylerinde SA bulundurmayan yabancı hücrelerin, konakçı immün savunma sistemi tarafından bozulmaya eğilimli oldukları ifade edilmektedir (Pangburn 2000).

Kompleman sistem, patojenlerin ve diğer konakçı hücrelerin yok edilmesine katılan immün sistemin temel bir bileşeni olarak tanımlanmaktadır. Serbest ve zara bağlı kompleman regülatörlerin, hücreleri ve dokuları, istenmeyen kompleman aracılı yaralanmalardan korudukları bildirilmektedir. Kompleman faktör H'nin (FH), kandaki ve hücre yüzeylerindeki alternatif yolu kontrol etmek için gerekli olan çözünebilir bir kompleman regülatör olduğu kaydedilmiştir. FH fonksiyonu için, hücre tanıtım ligandlarını (polianyonlar, C3b/C3d) normal şekilde tanınması gerektiği ileri sürülmektedir (Ferreira ve ark. 2010). FH'nin, hücre yüzeyi glikokonjugatlarının

SA'larına bağlandığı ve konakçı hücreleri, immün yanıtın başlangıcında alternatif kompleman yolunun öldürme basamağından koruduğu ileri sürülmüştür (Pangburn 2000). Yani bakterilerin (örneğin; *Pseudomonas aeruginosa*) kendi glikan düzenini taklit etmek ve konakçı kanından FH'yi almak için yüzeylerinde SA bulduklarını ve böylece kendilerini kompleman aracılı immün yanıtı korudukları bildirilmiştir (Parente ve ark. 2017).

Sialik asitler mikrobiyal infeksiyonlardan sorumlu en sık bulunan monosakkaritler oldukları için hastalıkların patogeneğinde de önemli role sahiptir. Çünkü çeşitli bakteriyel ve viral patojenler, sialik asit aracılı etkileşimler yoluyla konakçı hücrelere bağlanmaktadır (Suzuki ve ark. 2000, Lehmann ve ark. 2006). Bu yabancı patojenler, konakçı hücrelere tutunmayı kolaylaştırmak için yüzeylerinde SA tanıyan proteinleri bulundurmaktadır (Varki 2008). SA'lar immünoglobulin benzeri lektinler (Siglecs) olarak bilinen hücre yüzey proteinlerine tutunmaktadır (Haines-Menges ve ark. 2015). Pek çok patojenin, konakçı immün tepkisini manipüle etmek için konakçıdan SA'ları sentezledikleri veya aldıkları da bildirilmiştir (Khatua ve ark. 2013).

2.8. Astaksantin

Astaksantin çeşitli mikroorganizmalarda ve deniz canlılarında bulunan bir ksantofil karotenoiddir (Higuera-Ciapara 2006). Karotenoidler; siyanobakteriler, algler, bitkiler, bazı mantarlar ve bazı bakteriler tarafından doğal olarak sentezlenebilmekte, ancak memeliler tarafından üretilmemektedir. Gıda kaynaklarından karotenoid alımının, karotenoidlerin antioksidan özellikleri nedeniyle meme, akciğer, ovaryum, kolorektal, prostat kanseri ve kardiyovasküler veya göz hastalıkları gibi birçok hastalık riskini azalttıkları kaydedilmiştir (Merhan 2017). Astaksantin'in diğer karotenoidlerden daha güçlü biyolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Pashkow 2008).

Astaksantin deniz ürünlerinden veya *Haematococcus pluvialis*'ten elde edilmektedir. *Haematococcus pluvialis*, yüksek tuzluluk, azot eksikliği, yüksek sıcaklık ve ışık gibi stres koşullarında yüksek astaksantin içeriği biriktiren yeşil bir mikro algdir (Sarada ve ark. 2012). *Haematococcus pluvialis*'ten üretilen astaksantin,

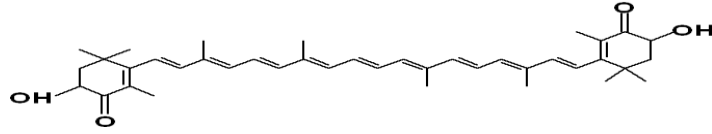
insan tüketimi için ana kaynaktır (Kidd 2011). Astaksantin, somon, alabalık ve karides yemlerinde bir pigment kaynağı olarak kullanılmaktadır (Higuera-Ciapara 2006). İnsanlarda ve hayvanlarda diyet takviyesi olarak kullanılmakta olan astaksantin tüketiminin, insanlarda ve hayvanlarda çeşitli bozuklukların risklerini önleyebileceği veya azaltabileceği ifade edilmektedir (Guerin ve ark. 2003). Astaksantin'in bir besin takviyesi olarak kullanımının gıdalarda, yemlerde, nutrasötikler ve ilaçlarda hızla arttığı belirtilmektedir (Ambati ve ark. 2014).

2.8.1. Astaksantin'in Biyokimyasal Önemi

Astaksantin'in doğal kaynakları alg, yosun, maya, somon, alabalık, krill, karides ve kerevittir. Ticari astaksantin esas olarak *Phaffia* mayası, *Haematococcus* ve kimyasal sentez yoluyla üretilmektedir. *Haematococcus pluvialis*, doğal astaksantin'in en iyi kaynaklarından birini oluşturmaktadır (Ranga Rao ve ark. 2010). Diyetle astaksantin alımı için karides, yengeç ve somon tercih edilebileceği bildirilmiştir. Günde 3,6 mg astaksantin takviyesinin sağlığa faydalı olabileceği ileri sürülmektedir (Iwamoto ve ark. 2000).

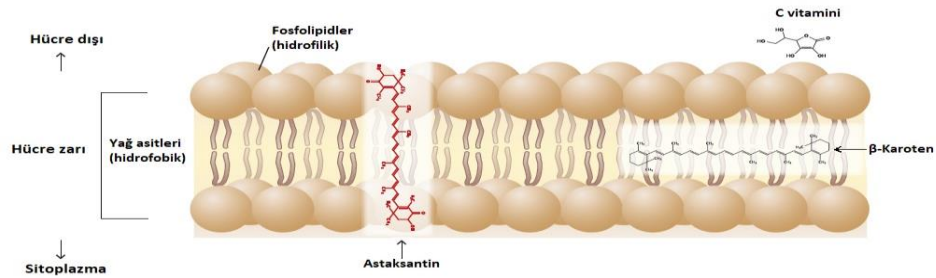
Astaksantin, yapısında karbon hidrojen ve oksijen atomları içeren bir karotenoiddir (Şekil 7). Birbirleriyle bir polien zinciri ile bağlı iki terminal halkadan oluşmakta olan bu molekül, her iki ucunda hidroksil (-OH) grubu bulunan β -iyonon halkasının 3,3' pozisyonlarında bulunan iki asimetrik karbona sahiptir. Şayet, -OH grubu bir yağ asidi ile reaksiyona girer ise mono-ester, her iki -OH grubu yağ asitleri ile reaksiyona girdiğinde ise sonuç olarak bir di-ester oluşmaktadır (Higuera-Ciapara 2006)

Astaksantin stereoizomer, geometrik izomer, serbest ve esterleşmiş gibi çeşitli formlarda bulunabilmektedir (Higuera-Ciapara 2006). Stereoizomerler (3S, 3'S) ve (3R 3'R) doğada en bol bulunanlardır. *Haematococcus* (3S, 3'S)-izomerini biyosentez ederken maya *Xanthophyllomyces dendrorhous* (3R,3'R)-izomerini üretmektedir (Hussein ve ark. 2006). Sentetik astaksantin (3S, 3'S) (3R, 3'S) ve (3R, 3'R) izomerlerinden oluşmaktadır (Foss ve ark. 1987). Astaksantin, $C_{40}H_{52}O_4$ moleküler formülüne sahiptir ve molar kütlesi 596,84 g/mol'dür (Higuera-Ciapara 2006).



Şekil 7. Astaksantin'in moleküler yapısı (Higuera-Ciapara 2006).

Astaksantin, konjuge çift bağ, -OH, keto grupları içermekte ve hem lipofilik hem de hidrofilik özellikleri bulunmaktadır (Higuera-Ciapara 2006). Kırmızı renk, bileşiğin ortasındaki konjuge çift bağdan kaynaklanmaktadır. Bu tür çift bağ bulundurmasından dolayı elektronları vererek ve serbest radikallerle reaksiyona girerek daha istikrarlı bir ürün olmaları için güçlü bir antioksidan görevi gördükleri kaydedilmektedir (Guerin ve ark. 2003). Hücre zarı ile içeriden dışarıya doğru bağlanabilir olmasının, astaksantin'e diğer antioksidanlara göre daha iyi biyolojik aktivite gösterme yetisi kazandırdığı bildirilmektedir (Şekil 8, Yuan ve ark. 2011).



Şekil 8. Astaksantin'in hücre zarındaki pozisyonunun şematik görüntüsü (Yamashita 2013).

Oksidatif hasara yol açabildiği bildirilen oksidatif moleküllerin, karotenoidler gibi endojen ve eksojen antioksidanlar tarafından inhibe edilebildikleri ve astaksantin'in de oksidasyonu inhibe edebilen antioksidan moleküllerden olduğu kaydedilmektedir (Naguib 2000).

Karotenoidler, zincir reaksiyonlarını sonlandırmak için singlet oksijenini ve temizleyici radikalleri söndürerek antioksidan aktivite gösteren uzun konjuge çift bağlı polien zincirinden oluşmaktadır. Karotenoidlerin biyolojik yararları, hücre zarlarıyla fiziksel ve kimyasal etkileşiminden ileri gelen antioksidan özelliklerinden kaynaklandığı, astaksantin'in, lutein, likopen, α -karoten ve β -karoten gibi çeşitli karotenoidlere kıyasla daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu öne sürülmektedir (Naguib 2000, Merhan ve ark. 2016).

Astaksantin kaynağı olarak *Haematococcus biomass* ile beslenen ratlarda plazma ve karaciğer CAT, SOD, peroksidaz ve tiyobarbütirik asit reaktif maddeler (TBARS) yüksek bulunduğu ve serbest radikallere karşı astaksantin'in β -karoten ve lutein'den daha iyi koruma sağladığı bildirilmiştir (Ranga Rao 2010). Astaksantin'in, yapısında bulunan her bir iyonon halkası üzerinde bulundurduğu -OH grubu ve keto kısımları sayesinde yüksek antioksidan özellik gösterdiği belirtilmektedir (Hussein ve ark. 2006, Liu ve Osawa 2007). Ayrıca antioksidan aktivitesinin, zeaksantin, lutein, kantaksantin ve β -karoten'den 10 kat ve α -tokoferolden ise 100 kat daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Miki 1991).

Karotenoidlerde bulunan fonksiyonel grupların pro-oksidatif katkı olmadan yüksek antioksidan aktivite gösterebildiği bildirilmektedir (Martin 1999). Astaksantindeki polien zinciri, radikalleri hücre zarı içinde hapsetmekte ve terminal halkası da hücre zarının dış ve iç kısımlarındaki radikalleri temizleyebilmektedir. Diyetine astaksantin eklenen tavşanlarda serum SOD ve tioredoksin redüktaz aktivitesinde artışa ve paraoksonaz aktivitesinde ise azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Augusti ve ark. 2012). Başka bir çalışmada ratlarda etanol ile oluşturulmuş gastrik ülser modelinde astaksantin ile beslenen ratların antioksidan enzim seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir (Kamath ve ark. 2008). Astaksantin'in lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği de bildirilmektedir (Goto ve ark. 2001).

Bu çalışmada, 3-nitropropionik asit ile ratlarda oluşturulan oksidatif ovaryum hasarına karşı astaksantin'in koruyucu etkisi biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırılmıştır.

3. MATERYAL ve METOT

Bu çalışma, Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığının (KAÜ-HADYEK) 25.06.2016 tarih ve 2016/034 kodlu etik kurul onayı ile yapıldı.

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan Wistar albino dişi ratlar (32 adet 8-10 haftalık ve 190-210 g ağırlığında), Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden temin edildi. Çalışmanın deneysel aşamaları Kafkas Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yürütüldü. Çalışmada kullanılacak ratların seksüel siklus dönemlerini belirlemek amacıyla vaginal sitoloji yapıldı. Yapılan sitolojik değerlendirmede çekirdekli süperfisiyal hücreler tespit edilen folliküler evredeki ratlar çalışmaya dahil edildi (Sharp ve LaRegina 1998). $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, %60-65 nem ve 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlığın sağlandığı deney koşulları altında, bir haftalık adaptasyon dönemini takiben her grupta 8 adet olacak şekilde oluşturulan 4 gruba yem ve içme suyu *ad libitum* olarak verildi. Uygulama grupları ve uygulama şekilleri aşağıda tarif edildiği şekilde tasarlandı:

Kontrol grubu (K): İntraperitoneal (i.p.) taşıt madde (astaksantin için) PBS (pH 7,4) solüsyonu uygulandı.

Astaksantin grubu (AS): 80 mg/kg/gün PBS içerisinde çözdürülmüş astaksantin 14 gün süre ile i.p uygulandı.

3-Nitropropiyonik asit grubu (3-NPA): 12,5 mg/kg/gün 3-nitropropiyonik asit 7 gün süre ile günde 2 kez (12 saat arayla) i.p. uygulandı (Zhang ve ark. 2015).

3-Nitropropiyonik asit + Astaksantin grubu (3-NPA+AS): 80 mg/kg/gün astaksantin 14 gün süre ile i.p uygulandı. Uygulamanın 8. gününden itibaren 12,5 mg/kg/gün 3-nitropropiyonik asit 7 gün süre ile günde 2 kez (12 saat arayla) i.p. uygulandı.

Uygulama öncesi ile uygulamanın 7. ve 11. günlerinde fasiyal ven'den (submandibular kanatma yöntemiyle) ve son uygulamadan 24 saat sonra anestezi

altında kalpten (intrakardiyak punktur ile) heparinli tüplere kan alındıktan sonra, hayvanlara servikal dislokasyon yöntemiyle ötenazi işlemi uygulandı.

Ötenaziyi takiben hayvanlardan cerrahi işlemlerle ovaryum doku örnekleri alındı. Bunların bir kısmı histopatolojik inceleme için % 10'luk formaldehit solüsyonu bulunan numune kaplarında muhafaza edilerek uygun şartlarda patoloji laboratuvarına gönderildi. Biyokimyasal testler için ayrılan doku örnekleri fosfat buffer salin (PBS) ile tamponlandı.

3.2. Metot

3.2.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler

Spektrofotometre (Microplate Reader Epoch-Biotek, Shimadzu UV-1201)
Deiyonize su cihazı (Nüve)
Ayarlanabilir otomatik pipetler (Isolab 5-1000 µl)
Soğutmalı santrifüj (Heraeus)
Manyetik karıştırıcı (Labinco)
Homojenizatör (Wiggen Hauser)
Buzdolabı (Bosch)
Su banyosu (Nüve)
Hassas terazi (Scaltec)
pH metre (inoLab)
Vorteks (Labinco)

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

1,1,3,3-Tetraetoksipropan (Sigma)
3-Nitropropiyonik Asit (Sigma-Aldrich)
5,5'-(2-Ditoyobis Nitrobenzoik Asit) (DTNB) (Sigma)
Aseton (Sigma-Aldrich)
Astaksantin (Carbosynth)
Çinko Sülfat (Znso4) (Merck)
Disodyum Hidrojen Fosfat (Fluka)
Etanol (Sigma-Aldrich)

Etilendiamin Tetra Asetik Asit (Merck)
Hidroklorik Asit (Merck)
Kalsiyum Klorür (Sigma-Aldrich)
Metafosforik Asit (Merck)
Monosodyum Hidrojen Fosfat (Fluka)
N- Bütanol (Merck)
N-(1-Naftil)Etilendiamin Dihidroklorür (NEDD) (Merck)
Nöraminik Asit (NANA) (Sigma)
Paraokson (Supelco)
P-Dimetil Amino Benzaldehid (Merck)
Perklorik Asit (Merck)
Redükte Glutasyon (GSH) (Merck)
Sodyum Hidrojen Fosfat (Merck)
Sodyum Hidroksit (Sigma-Aldrich)
Sodyum Klorür (Sigma-Aldrich)
Sodyum Nitrat (Sigma-Aldrich)
Sodyum Nitrit (Sigma-Aldrich)
Sodyum Sitrat (Merck)
Sülfanilamid (Alfa-Aesar)
Tiyobarbütirik Asit (Merck)
Total Antioksidan Kapasite Kiti (Rel Assay)
Total Oksidan Kapasite Kiti (Rel Assay)
Total Tiyol Kiti (Rel Assay)
Triklor Asetik Asit (Merck)
Tris-HCL (Sigma-Aldrich)
Vanadyum (III) Klorür (VCl_3) (Merck)

3.2.3. Biyokimyasal Analizler

Plazma örneklerinin hazırlanması: Kan örnekleri, 3000 rpm/15 dakika santrifüj edilerek plazma elde edildi. Plazma numuneleri analizlerin yapılacağı güne kadar $-40^{\circ}C$ 'de derin dondurucuda saklandı.

Doku homojenizasyonu: 0,1 M Fosfat tamponu (PBS, pH 7,4): 250 mL'lik balon joje içerisine bir miktar distile su alındıktan sonra üzerine 18,93 g NaCl, 3,075 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 2,075 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'dan eklendi. Çözdürüldükten sonra hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlandı.

Biyokimyasal testler için alınan 0,1 g ovaryum doku örnekleri fosfat tamponu ile (PBS) 5 kat sulandırıldı. Ardından buz üzerinde, 12.000 rpm/2 dk homojenizatör vasıtasıyla homojenize edilerek, soğutmalı santrifüj cihazında 15000 rpm/10 dk santrifüj edildi. Biyokimyasal analizler için süpernatant alınarak testlerin yapılacağı güne kadar -40°C 'de saklandı.

3.2.3.1. Redükte Glutasyon Analizi

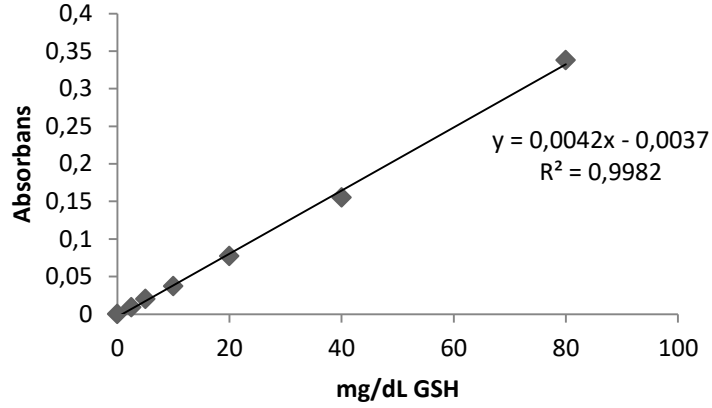
Tam kan GSH analizi, Beutler ve ark. (1963) belirttiği yöntem ile spektrofotometrik olarak yapıldı.

Analizin prensibi: Sülfhidril (-SH) grubu taşımayan tüm proteinler çöktürülür. Çöktürmeden sonra -SH grupları DTNB (5,5'-2-ditiobis nitrobenzoik asit) ile sarı renkli kompleksler oluşturur. Bu komplekslerin absorbanslarının 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmesiyle GSH konsantrasyonu hesaplanır.

Analizde kullanılan çözeltiler: Çöktürücü (1,67 g metafosforik asit, 0,2 g etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) ve 30 g NaCl alınarak hacmi 100 mL'ye tamamlandı), Fosfat çözeltisi (53,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bir miktar distile suda çözdürüldükten sonra hacim litreye tamamlandı) ve DTNB Çözeltisi (Ellman's çözeltisi) (% 1'lik sodyum sitratta 40 mg DTNB çözdürüldükten sonra hacim 100 mL'ye tamamlandı).

Analizin yapılışı: Kör, standart ve test tüpleri alındı. Test tüpüne, 200 μL EDTA'lı kan, standart tüpüne 200 μL standart çözeltilerinden (2,5 - 5 - 10 - 20 - 40 - 60 ve 80 mg/dL GSH) alınarak üzerine 1800 μL distile su ve 3 mL çöktürücü çözelti eklendi. Kör tüpüne ise 800 μL distile su ve 1200 μL çöktürücü çözelti ilave edildi. Tüpler vorteksle karıştırılarak buzlu suda 5 dk bekletildi. Daha sonra 3000 rpm/10 dk santrifüj edildi. Kör tüp aynen alındı, standart ve test tüplerinden 2 mL süpernatant diğer tüplere aktarıldı. Tüm tüplere 8 mL fosfat çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı.

Tekrar 1 mL DTNB eklenerek 412 nm dalga boyunda köre karşı tüm tüplerin optik dansitesi okundu. Standart grafikten yararlanılarak GSH düzeyleri mg/dL olarak hesaplandı.



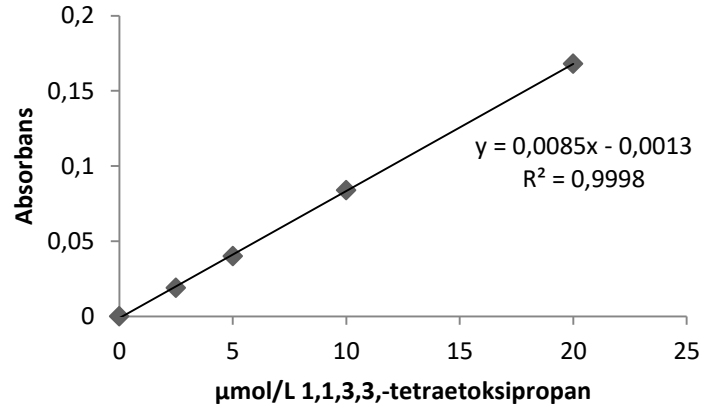
Şekil 9. GSH analizi standart grafiği

3.2.3.2. Malondialdehit Analizi

Plazma MDA analizi, Yoshioka ve ark. (1979) belirttiği yöntem ile spektrofotometrik olarak yapıldı.

Analizde kullanılan çözeltiler: % 20'lik Trikloroasetik asit (TCAA) ve % 0,67 tiyobarbütirik asit (TBA).

Analizin yapılışı: Kör, standart ve test tüplerine sırasıyla 0,5'er mL distile su, standart çözeltisi (2,5-5-10-20-40 µmol/L 1,1,3,3,-tetraetoksipropan) ve numune konuldu. Kör tüpüne 3 mL, standart ve test tüplerine ise 2,5 mL % 20'lik TCAA eklendi. Tüm tüplere 1 mL TBA eklenerek tüpler su banyosunda 90 °C/30 dk bekletildi. Tüpler soğutulduktan sonra 4 mL n-bütanol ilave edildi. Tüpler vorteksle çalkalandıktan sonra 3000 rpm/10 dk santrifüj edildi. Renkli süpernatant (n-bütanol tabakası) spektrofotometrede 535 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Tespit edilen absorbanslar standart grafik yardımıyla değerlendirilerek MDA konsantrasyonu hesaplandı ve sonuçlar µmol/L olarak verildi.



Şekil 10. MDA analizi standart grafiği

3.2.3.3. Nitrik Oksit Analizi

Miranda ve ark. (2001) belirttiği yöntem ile spektrofotometrik olarak yapıldı.

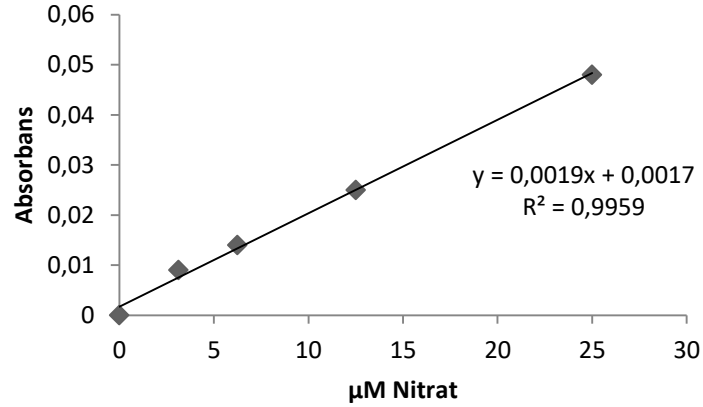
Analizin prensibi: Belirtilen analiz metodunda Vanadyum (III) klorür etkisiyle nitrat nitrite dönüştürülür. Oluşan nitrit, asidik ortamın etkisiyle sülfanilamid ve N-(1-Naftil) etilendiamine dihidroklorür ile reaksiyona girerek renkli diazonyum kompleksini oluşturur. Daha sonra bu kompleks bileşik 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülür. Nitrat ve nitritin konsantrasyonlarının toplamı NO konsantrasyonunu vermektedir.

Analizde kullanılan çözeltiler: % 10'luk çinko sülfat çözeltisi, 0,3 M NaOH, 1 M HCl çözeltisinde çözdürülmüş % 0,8'lik Vanadyum (III) Klorür çözeltisi, Griess ayracı (eşit oranlarda karıştırılmış % 0,1 N-1-Naftil-etilendiamine dihidroklorür ile % 5'lik HCl'de hazırlanmış % 2'lik sülfanilamid çözeltisi), 1 mM nitrit (NaNO₂) standart çözeltisi ve 1 mM nitrat (NaNO₃) çözeltisi.

Numunelerin deproteinizasyon işlemi: 400 µL numune üzerine 200 µL 0,3 M NaOH ilave edilerek vortekslendi ve 5 dakika beklendikten sonra 200 µL % 10'luk ZnSO₄ ilave edilerek işlem tekrarlandı. Daha sonra numuneler 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve analiz için süpernantant alındı.

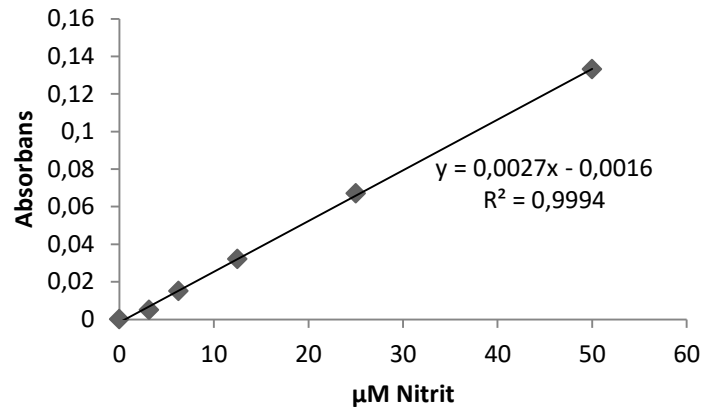
Nitrat analizi: Kör kuyucuğuna distile su, standart kuyucuklarına (25-12,5-6,25-3,125 ve 1,5625 µM) standart ve geriye kalan kuyucuklara ise numune 100 µL

olarak konuldu. Tüm kuyucuklara VCl_3 'den 100 μL konuldu. Ardından üzerine griess ayırıcından 100 μL eklenerek 37°C dereceye ayarlanmış etüvde 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda 540 nm dalga boyunda köre karşı absorbansları ölçüldü. Standartlardan yararlanılarak sonuçlar hesaplandı.



Şekil 11. Nitrat analizi standart grafiği

Nitrit analizi: Yukarıda tarif edilği şekilde 100'er μL distile su, standart ve numune ilgili kuyucuklara konuldu. Ardından griess ayırıcından 100 μL eklenerek 37°C de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda 540 nm dalga boyunda köre karşı absorbansları ölçüldü. Standartlardan yararlanılarak sonuçlar hesaplandı.



Şekil 12. Nitrit analizi standart grafiği

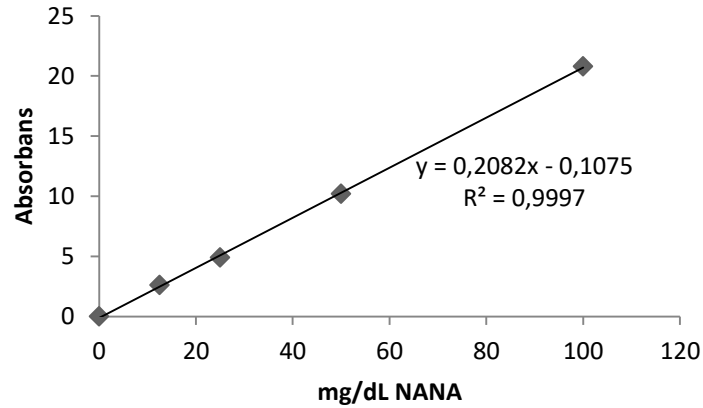
Nitrik oksit konsantrasyonunun hesaplanması: Nitrat ve nitrit sonuçlarının toplanması ile nitrik oksit tespit edildi. Sonuçlar μM olarak verildi.

3.2.3.4. Total Sialik Asit Analizi

Sydow'un (1985) belirttiği yöntem ile spektrofotometrik olarak yapılmıştır.

Analizde kullanılan çözeltiler: % 5'lik perklorik asit çözeltisi ve taze hazırlanmış Ehrlich ayracı (50 mL yoğun HCl'de 5 g p-dimetilaminobenzaldehit çözdürüldükten sonra distile su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı).

Analizin yapılışı: Numuneden ve standartlardan (100, 50, 25, 12,5 mg/dL) 0,2 mL bir kapaklı cam tüplere konuldu. Üzerine 1,5 mL plazma üzerine hazırlanmış olduğumuz % 5'lik perklorik asit çözeltisinden 1,5 mL eklenerek benmaride 5 dk kaynatıldı ve soğutuldu. Ardından santrifüj (2500 rpm 4 dk) işlemi yapıldı ve süpernatanttan 1 mL başka kapaklı cam tüplere alındı. Üzerlerine Ehrlich ayracında 0,2 mL eklenerek 15 dakika kaynatıldı. Soğutulduktan sonra üzerlerine 1 mL distile su konularak 525 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunan optik dansiteleri (OD) ile hazırlanmış olduğumuz standart eğriden yararlanılarak sonuçlar hesaplandı ve mg/dL olarak verildi.



Şekil 13. TSA analizi standart grafiği

3.2.3.5. Paraoksonaz Aktivitesi

Eckerson (1983) ve Gülcü'nün (2003) metotlarına göre spektrofotometrik olarak yapıldı.

Analizin prensibi: PON1 enziminin paraoksonu (0,0-dietil-0-p-nitrofenilfosfat) hidrolizi ile oluşan p-nitrofenolün spektrofotometrede 412 nm dalga

boyunda kinetik olarak ölçülmesidir. PON1 aktivitesi, 1 dakikada 1 µmol paraoksonun dönüştürdüğü p-nitrofenol molekülü sayısı (Ünite), olarak hesaplandı.

Analizde kullanılan çözeltiler: 0,1 M HCl çözeltisi (1 M HCl çözeltisinden 10 mL alınarak distile su ile hacim 100 mL'ye tamamlanır) ile 0,1 M Tris çözeltisinin (1,21 g tris distile suda çözdürüldükten sonra hacmi 100 mL'ye tamamlanır), kullanılmasıyla hazırlanan 20 mM'lık Tris-HCl tampon solüsyonu (29 mL 0,1 M HCl ve 50 mL 0,1 M Tris çözeltileri karıştırılıp pH 8'e ayarlandıktan sonra hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır) ve 2 mM CaCl₂ ile 2 mM paraoksondan oluşan çalışma ayracı (29,4 mg CaCl₂.2H₂O'nun bir miktar Tris-HCl tampon solüsyonunda çözdürüldükten sonra üzerine 1,5mL asetonda çözdürülmüş 44µL paraokson eklenir ve hacim tris-HCl tamponu solüsyonu ile 100 mL'ye tamamlanır).

Analizin yapılışı: Kör kuyucuğuna 8 µL distile su ve numune kuyucuklarına ise 8 µL numune konulduktan sonra, üzerine bütün kuyucuklara 280 µL çalışma ayracı eklenir. Spektrofotometre ile 25°C'de ve 412 nm dalga boyunda, 2 dk boyunca kinetik olarak köre karşı okundu.

Sonuçların hesaplanması:

$$U/L (\mu\text{mol/dk/L}) = \frac{\Delta A/dk \times Sf \times 10^6}{\epsilon \times 1/0,6}$$

$\Delta A/dk$; dakikada absorbans değişimi, ϵ ; 1829 (p-nitrofenolün molar absorpsiyon katsayısı), Sf; Seyreltme faktörü (total hacim/numune hacmi), 10^6 ; µmol'e çevirme faktörü, $1 / 0,6$; plate ışık yolunun uzunluğu.

3.2.3.6. Total Antioksidan/Oksidan Kapasite Analizleri

Plazma ve ovaryum TAK ve TOK analizleri ticari kit (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep/Türkiye) kullanılarak spektrofotometrik yöntemlerle yapıldı. Oksidatif stres indeksi TAK ve TOK verileri kullanılarak hesaplandı. OSİ= [(TOK, µmol/L)/(TAK, µmol /L) × 100]. OSİ birimi AU (Arbitrary Unit) olarak verildi (Erel 2004, 2005).

3.2.3.7. Total Tiyol Analizi

Plazma TT analizi ticari kit (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep/Türkiye) kullanılarak spektrofotometrik yöntemlerle yapıldı.

Analizin prensibi: Bu yöntemde numunede bulunan dinamik disülfid bağları sodyum borohidrid (NaBH₄) ile fonksiyonel tiol gruplarına (-SH) indirgenir. Kullanılmayan sodyum borohidrid (NaBH₄) kalıntıları formaldehit ile tamamen tüketilir. Böylece DTNB'nin ekstra indirgenmesi ve daha sonra oluşan disülfid bağının indirgenmesi önlenmiş olur. İndirgenmiş ve native tiyol grupları dâhil olmak üzere tüm tiyol grupları, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) ile reaksiyon sonrası tespit edilir (Erel ve Neselioglu 2014).

3.2.3.8. Lipit Profili Analizleri

TG, CHOL ve HDL ölçümü ticari kit (Spinreact Co., Spain) kullanılarak spektrofotometrik yöntemlerle yapıldı. LDL konsantrasyonu Friedewald formülü ($LDL = CHOL - HDL - (TG/5)$) ile hesaplanarak bulundu.

3.2.4. Histopatolojik Analizler

Histopatolojik incelemeler amacıyla, hayvanların sistemik nekropsilerini takiben ovaryumlardan doku örnekleri alındı ve % 10'luk tamponlu nötral formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Rutin işlemlerin ardından hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen Eosin (HE) ile boyanıp ışık mikroskopunda incelendi.

Ovaryum follikülleri; primordial, primer, preantral ve antral folliküller olarak kategorize edildi (Borgeest ve ark. 2002) ve histopatolojik yönden incelendi. Ovaryum follikülleri; belirgin bir çekirdeğe sahip olan sağlam bir oosit tek sıralı yassı granüloza hücreleri tarafından sarılmış ise primordial follikül, oositi çevreleyen granüloza hücreleri tek sıralı ve küboidal ise primer follikül, belirgin nüklousa sahip oositi çok sıralı follikül epitel hücreleri tarafından sarılmış ise preantral follikül, oositi çevreleyen granüloza hücreleri 5 sıra veya daha fazla ise ve antrum mevcut ise antral follikül olarak kategorize edildi.

3.2.5. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi işlemi için SPSS 18.0 Paket Program kullanıldı. Öncelikle verilerin normalliği değerlendirildi. Bunun için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testi yapıldı. Verilerin normal dağılım göstermesinin tespit edilmesiyle gruplar arası karşılaştırma tek yönlü varyans analiziyle (one way ANOVA) post hoc karşılaştırma Tukey HSD testi ile değerlendirildi. Bağımlı örneklemelerin istatistiksel karşılaştırması repeated measured ANOVA ile, post hoc karşılaştırması ise Bonferroni ile değerlendirildi. Gruplar arası korelasyon analizi (Spearman's correlation test) ile parametrelerin negatif (-) ya da pozitif (+) ilişkine bakıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma ($X \pm SD$) şeklinde belirtildi. İstatistiksel analizde $P < 0,05$ veya daha küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

Tam kan GSH konsantrasyonu ve plazma PON1 aktivitesi ile MDA, NO, TSA, TT, CHOL, TG, HDL ve LDL konsantrasyonları Tablo 1’de, uygulama öncesi (0. gün) ile uygulamanın 7., 11., günleri ve uygulama sonrası (15. gün) plazma TAK, TOK ve OSİ seviyeleri Tablo 2’de, ovaryum dokusu TAK, TOK ve OSİ değerleri ise Tablo 3’te gösterildi. Plazma K, AS, 3-NPA+AS ve 3-NPA gruplarının biyokimyasal parametreleri arasındaki korelasyonlar ise Tablo 4’te verildi.

Tablo 1. Tamkan GSH, Plazma MDA, NO, TSA, TT, CHOL, TG, HDL, LDL konsantrasyonları ve PON1 aktivitesi

Parametreler	K	AS	3-NPA+AS	3-NPA	P değeri
GSH mg/dL	65,33±6,17 ^c	58,62±5,23 ^c	48,42±3,79 ^b	36,18±10,33 ^a	***
MDA µmol/L	6,15±2,43 ^a	5,79±1,94 ^a	6,69±2,47 ^a	10,46±2,66 ^b	**
NO µmol/L	0,51±0,07 ^a	0,42±0,09 ^a	0,52±0,11 ^a	1,16±0,43 ^b	***
TSA mg/dL	78,31±8,42 ^a	76,76±5,18 ^a	70,52±4,84 ^a	96,98±8,04 ^b	***
TT µmol/L	269,07±52,34	281,42±41,03	258,61±55,34	197,12±55,44	ÖD
PON1 U/L	77,91±12,37 ^b	83,24±8,76 ^b	74,22±18,05 ^b	47,57±13,12 ^a	***
CHOL mg/dL	60,70±6,61 ^a	61,64±7,38 ^a	64,54±9,32 ^{ab}	74,13±6,91 ^b	**
TG mg/dL	55,66±7,29 ^a	57,71±6,44 ^{ab}	63,27±10,97 ^{ab}	68,45±7,79 ^b	*
HDL mg/dL	30,07±4,31 ^b	32,48±4,91 ^b	29,01±4,34 ^b	21,81±5,01 ^a	**
LDL mg/dL	19,49±4,08 ^a	17,62±8,19 ^a	22,90±10,95 ^a	38,63±9,65 ^b	***

^{a,b,c}: Her satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farkı göstermektedir. *: P<0,05, **: P<0,01, ***: P<0,001, ÖD: İstatistiksel olarak önemli değil

Tablo 2. Günlere göre TAK, TOK, OSİ seviyeleri

TAK mmol/L	K	AS	3-NPA+AS	3-NPA	P değeri
0.gün	1,49±0,22	1,50±0,18 ^x	1,48±0,15	1,52±0,11 ^{yz}	ÖD
7.gün	1,45±0,23	1,74±0,11 ^{xy}	1,53±0,26	1,57±0,23 ^z	ÖD
11.gün	1,54±0,19 ^b	1,85±0,20 ^{c,y}	1,48±0,28 ^{ab}	1,19±0,19 ^{a,x}	***
15.gün	1,45±0,23 ^a	1,96±0,24 ^{b,y}	1,51±0,24 ^a	1,28±0,25 ^{a,xy}	***
P değeri	ÖD	***	ÖD	***	
TOK µmol/L	K	AS	3-NPA+AS	3-NPA	P değeri
0.gün	24,24±4,25	27,35±5,26 ^y	24,87±5,35 ^{xy}	25,92±7,03 ^x	ÖD
7.gün	24,85±4,52	20,33±3,84 ^x	21,39±8,07 ^x	27,20±3,14 ^x	ÖD
11.gün	24,90±2,88 ^{ab}	20,21±5,48 ^{a,x}	28,94±4,50 ^{b,xy}	39,27±9,12 ^{c,y}	***
15.gün	25,62±5,56 ^{ab}	18,18±4,67 ^{a,x}	30,86±5,79 ^{b,y}	41,13±8,30 ^{c,y}	***
P değeri	ÖD	**	*	***	
OSİ AU	K	AS	3-NPA+AS	3-NPA	P değeri
0.gün	1,68± 0,52 ^{a,x}	1,86±0,49 ^{a,y}	1,70±0,43 ^{a,x}	1,74±0,57 ^{a,x}	ÖD
7.gün	1,77±0,48 ^{a,x}	1,16±0,18 ^{a,x}	1,47±0,72 ^{a,x}	1,79±0,50 ^{a,x}	ÖD
11.gün	1,64±0,29 ^{a,x}	1,11±0,35 ^{a,x}	2,06±0,67 ^{a,x}	3,42±1,20 ^{b,y}	***
15.gün	1,80±0,50 ^{b,x}	0,95±0,33 ^{a,x}	2,11±0,54 ^{b,x}	3,27±0,54 ^{c,y}	***
P değeri	ÖD	***	ÖD	***	

^{x,y,z}: Her sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farkı göstermektedir. ^{a,b,c}: Her satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farkı göstermektedir. *: P<0,05, **: P<0,01, ***: P<0,001, ÖD: İstatistiksel olarak önemli değil.

Tablo 3. Ovaryum dokusu TAK, TOK, OSİ seviyeleri

Parametreler	K	AS	3-NPA+AS	3-NPA	P değeri
TAK mmol/L	0,66±0,13 ^{ab}	0,71±0,18 ^b	0,55±0,21 ^{ab}	0,44±0,12 ^a	*
TOK µmol/L	11,65±4,42 ^{ab}	9,98±3,80 ^a	14,84±4,60 ^{ab}	17,38±6,23 ^b	*
OSİ AU	1,78±0,63 ^a	1,53±0,92 ^a	3,22±2,06 ^{ab}	4,38±1,98 ^b	**

^{a,b}: Her satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farkı göstermektedir. *: P<0,05, **: P<0,01

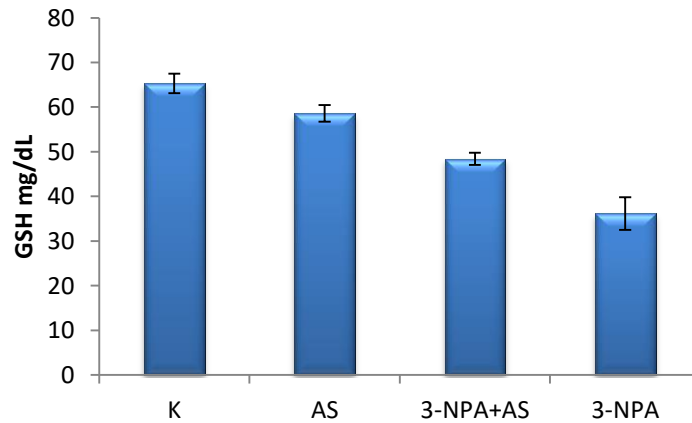
Tablo 4. Plazma K, AS 3-NPA+AS ve 3-NPA gruplarının biyokimyasal parametreleri arasındaki korelasyonlar

	PON1	NO	TSA	MDA	GSH	CHOL	TG	HDL	LDL
NO	-,513**								
TSA	-,541**	,588**							
MDA	-,605**	,663**	,405*						
GSH	,598**	-,640**	-,601**	-,508**					
CHOL	-,478**	,488**	,491**	,333	-,511**				
TG	-,298	,427*	,346	,445*	-,574**	,362*			
HDL	,488**	-,576**	-,503**	-,547**	,563**	-,346	-,379*		
LDL	-,569**	,602**	,579**	,465**	-,589**	,889**	,312	-,716**	
TT	,331	-,384*	-,346	-,142	,354	-,349	,027	,064	-,308

***. Korelasyon $P < 0,01$ düzeyinde önemlidir. **. Korelasyon $P < 0,05$ düzeyinde önemlidir.**

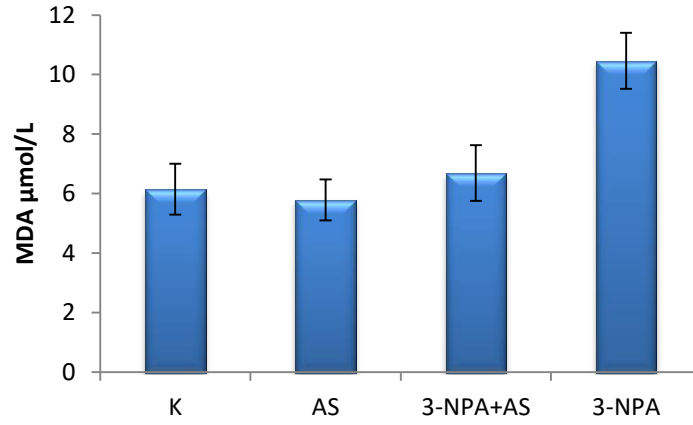
Tam kan GSH konsantrasyonu gruplar arası değişimler istatistiki olarak ($P < 0,001$) anlamlı bulundu (Şekil 14). 3-NPA uygulanan grupta kayda değer bir azalma tespit edildi ($P < 0,001$). 3-NPA+AS grubunda ise K grubuna göre yine istatistiksel olarak önemli bir azalma göze çarpmaktadır ($P < 0,001$).

AS ile 3-NPA grubu karşılaştırıldığında, ikisi arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($P < 0,001$). 3-NPA+AS grubu ile AS grubu arasında $P = 0,028$, 3-NPA grubu ile arasında $P = 0,007$ oranında fark tespit edildi. GSH ile CHOL, TG ve LDL arasında negatif ve HDL ile pozitif korelasyon bulundu ($P < 0,01$).



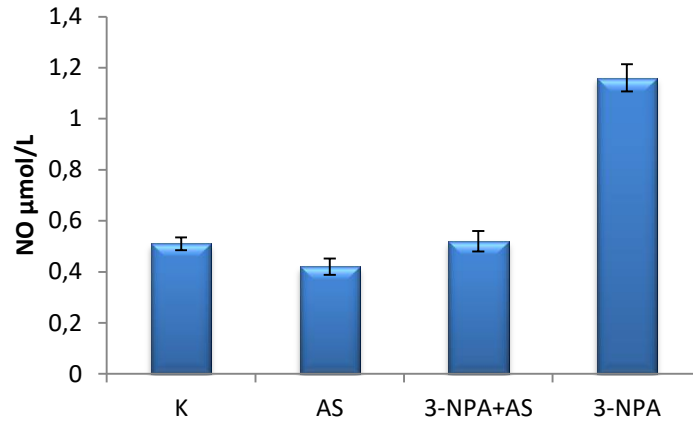
Şekil 14: Tam kan GSH konsantrasyonları.

Deney gruplarının plazma MDA konsantrasyonları arasındaki farklar istatistiksel olarak $P<0,01$ derecesinde anlamlı çıktı (Şekil 15). K grubuna göre 3-NPA grubunda MDA konsantrasyonunda artış meydana geldiği tespit edildi ($P=0,006$). AS grubu ile 3-NPA grubu arasındaki fark anlamlıdır ($P=0,003$). MDA ile GSH ve HDL arasında negatif ($P<0,01$), TG ($P<0,05$ ve $r= 0,445$) ve LDL ($P<0,01$ ve $r= 0,465$) ile arasında pozitif korelasyon tespit edildi.



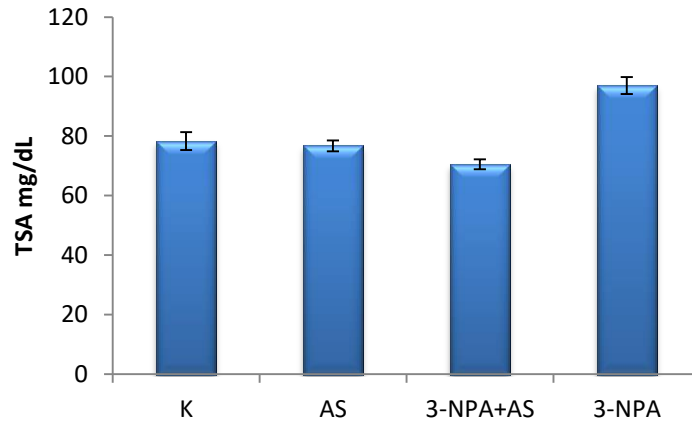
Şekil 15: Plazma MDA konsantrasyonları.

Nitrik oksit seviyelerinin anlamlı şekilde ($P<0,001$) değişkenlik gösterdiği gözlemlendi (Şekil 16). K grubuna göre 3-NPA grubunda anlamlı ($P<0,001$) şekilde artış tespit edildi. 3-NPA grubu ile tüm gruplar arasında istatistiksel olarak önemli ($P<0,001$) fark tespit edildi. NO ile TSA, MDA, CHOL ve LDL arasında $P<0,01$ düzeyinde TG ile $P<0,05$ düzeyinde anlamlı pozitif korelasyon, GSH, HDL ($P<0,01$) ve TT ($P<0,05$) arasında negatif korelasyon tespit edildi.



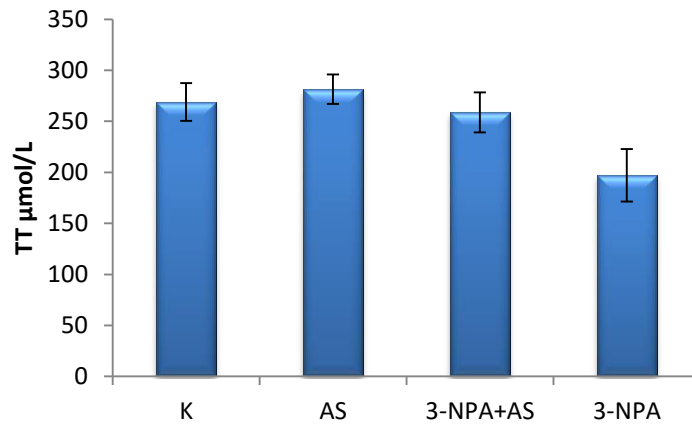
Şekil 16. Plazma NO konsantrasyonları.

Total sialik asit için gruplar arasında önemli fark tespit edildi ($P<0,001$). K grubuna göre 3-NPA grubu TSA seviyeleri anlamlı ($P<0,001$) bir şekilde artış tespit edildi. Tüm grupların 3-NPA grubuyla yapılan karşılaştırmasında TSA seviyelerindeki değişimler $P<0,001$ derecesinde anlamlı bulundu. TSA, GSH ve HDL ile ($P<0,01$) negatif, MDA ($P<0,05$ ve $r=0,405$) ve LDL ile ($P<0,01$ ve $r=0,579$) ile pozitif korelasyon vardır.



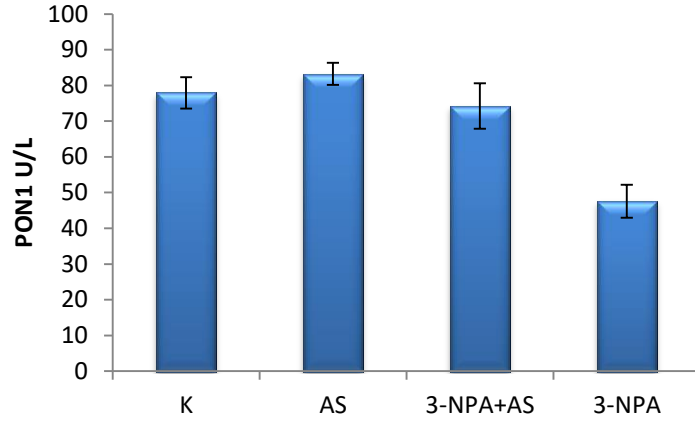
Şekil 17. Plazma TSA konsantrasyonları.

Deney gruplarının TT konsantrasyonları açısından gruplar arası sayısal bir fark olsada, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($P>0,05$) (Şekil 18). TT ile NO arasında $r= -0,384$ ve $P<0,05$ düzeyinde önemli bir negatif korelasyon tespit edildi.



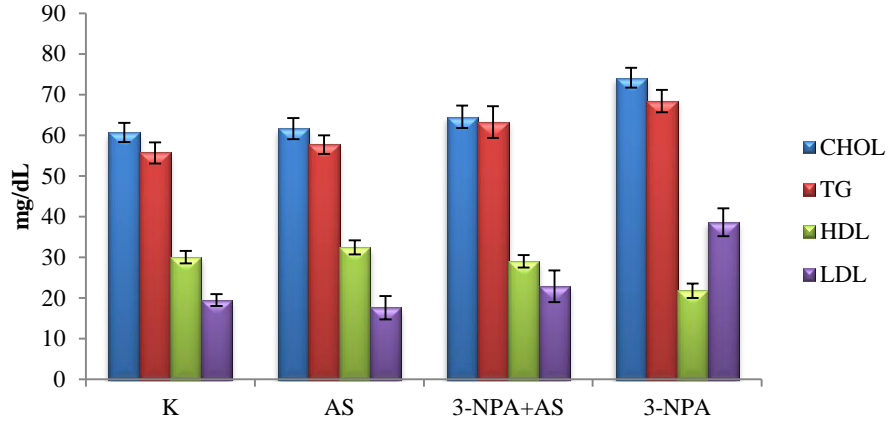
Şekil 18: Grupların plazma TT konsantrasyonları.

PON1 aktivitesinin 3-NPA grubunda K grubuna göre azaldığı tespit edildi ($P=0,001$). Gruplar arasında PON1 aktivitesindeki değişim $P<0,001$ derecesinde önemli bulundu (şekil 19). PON1 aktivitesinin NO, TSA, MDA, CHOL ve LDL ile arasında negatif (sırasıyla $r=-0,515$, $-0,541$, $-0,605$, $-0,478$ ve $-0,569$) ve GSH ile arasında pozitif ($r=0,598$) korelasyon bulundu ($P<0,01$).



Şekil 19. Plazma PON1 aktivitesi.

Gruplar arasında CHOL ve HDL ($P<0,01$), TG ($P<0,05$), LDL ($P<0,001$) seviyelerinde fark tespit edildi. 3-NPA grubunda K ile kıyaslandığında CHOL, TG ve LDL'nin arttığı, HDL seviyelerinin azaldığı tespit edildi ($P<0,05$) (Şekil 20).

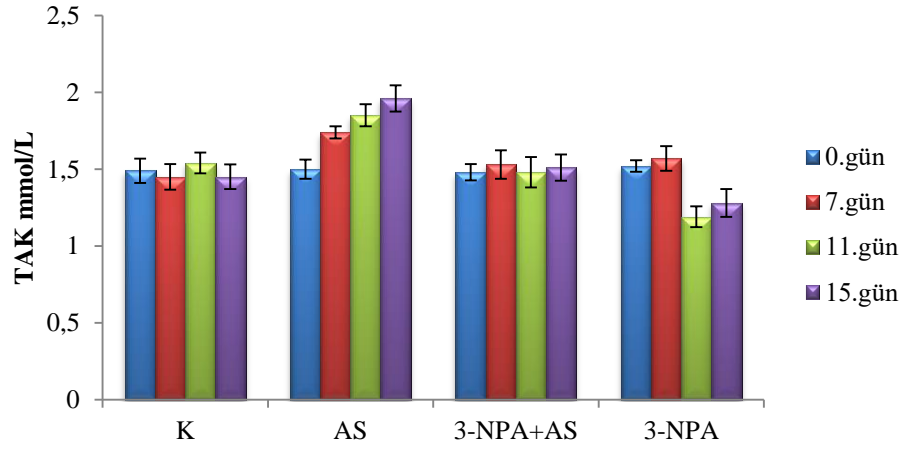


Şekil 20. Plazma lipid profili konsantrasyonları.

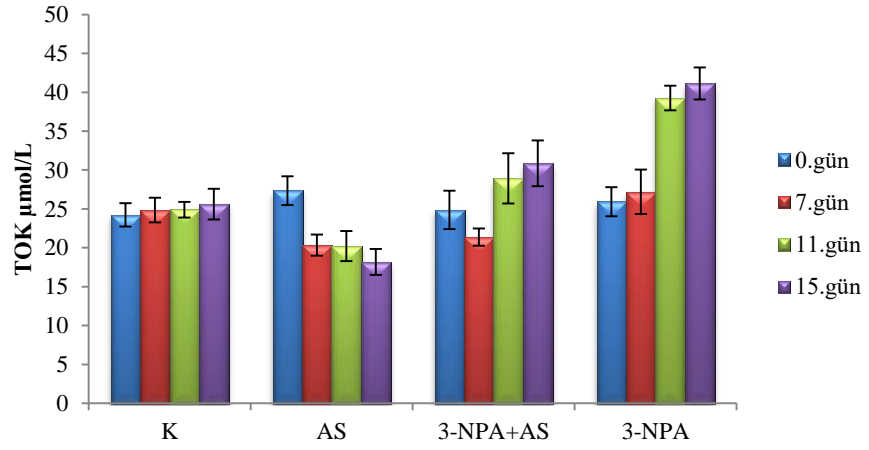
Günler arası yapılan karşılaştırmalarında 0. ve 7. günlerde TAK, TOK ve OSİ seviyelerinde istatistiksel fark tespit edilmedi. 11. ve 15. günlerde ise bütün gruplarda TAK, TOK ve OSİ seviyelerinde istatistiksel olarak önemli ($P<0,001$) fark olduğu gözlemlendi (Şekil 21, 22, 23).

Grupların günlere göre kıyaslanmasında ise AS grubunda TAK seviyesinin kademeli olarak arttığı ($P<0,001$), TOK seviyesinin ise yine kademeli olarak düştüğü ($P<0,01$) ve böylece OSİ'nin istatistiksel olarak azaldığı ($P<0,001$) tespit edildi (Şekil 21, 22).

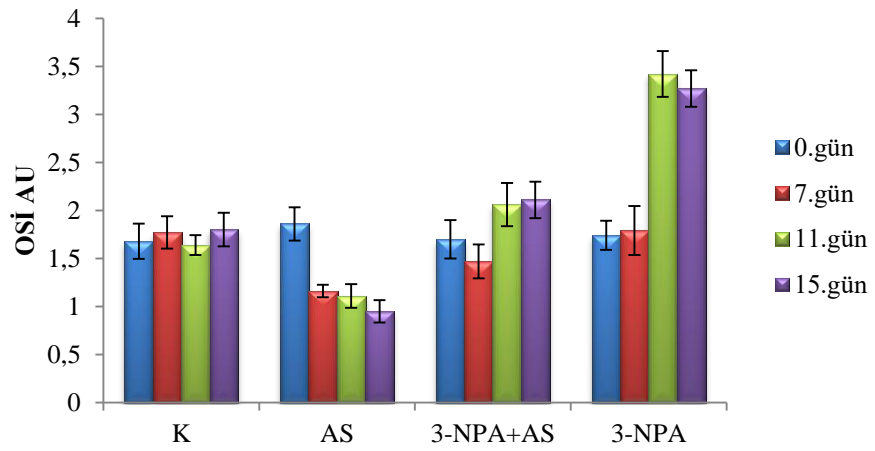
3-NPA grubunda, 7. gün TAK seviyesinin, önemli bir artış olmasada, yükseldiği görülmekteyken, 11. günde seviyesinin düşmesi ile anlamlı bir fark olduğu tespit edildi. TAK seviyesi uygulama sonunda artsada 0. ve 7. güne kıyasla anlamlı bir seviyede kaldı ($P<0,001$) (Şekil 21). 3-NPA grubu TOK seviyelerinin günler arası karşılaştırmasında $P<0,001$ derecesinde anlamlı fark olduğu gözlemlendi (Şekil 22). 3-NPA grubu için OSİ seviyelerinde anlamlı derecede artış olduğu görüldü ($P<0,001$) (Şekil 23).



Şekil 21: Günlere göre plazma TAK konsantrasyonları.

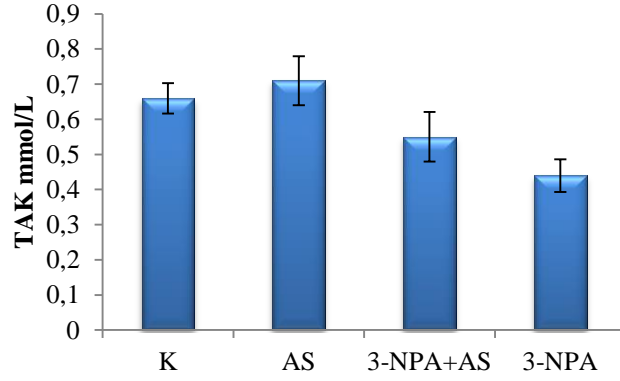


Şekil 22: Günlere göre plazma TOK konsantrasyonları.

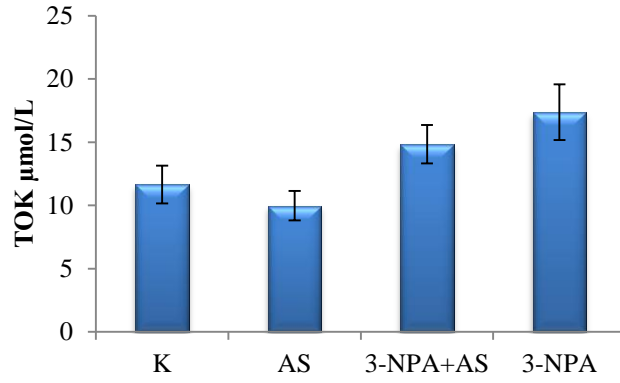


Şekil 23: Günlere göre plazma OSİ seviyeleri.

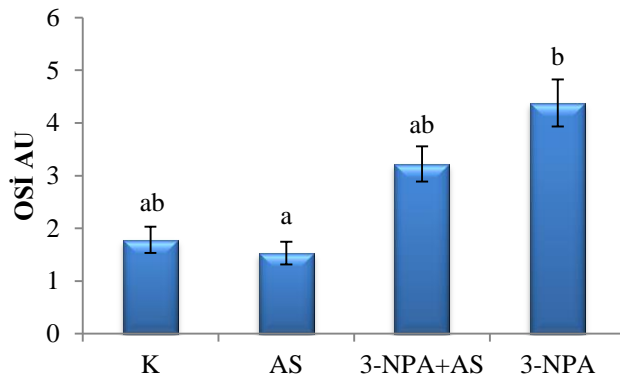
Ovaryum dokusu TAK (P=0,021), TOK (P=0,023) ve OSİ (P=0,005) seviyelerinde gruplar arasında istatistiksel fark tespit edildi (Şekil 24, 25, 26).



Şekil 24: Ovaryum dokusu TAK konsantrasyonları.



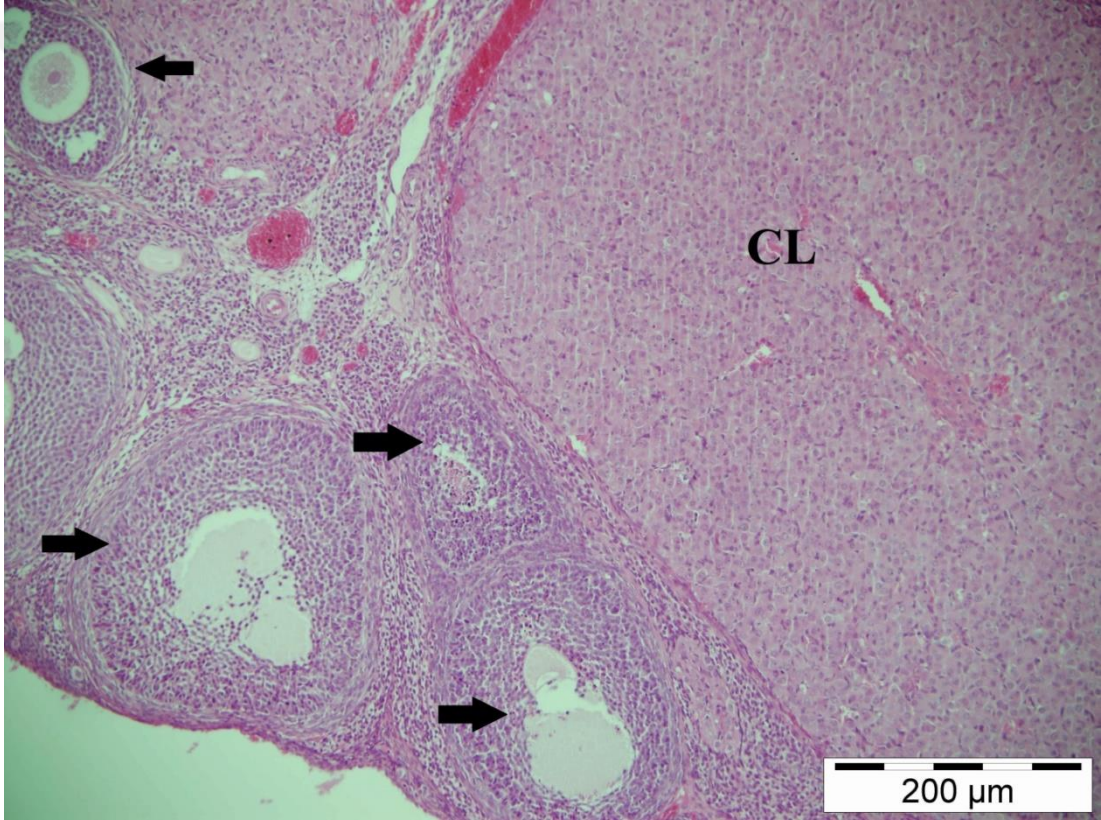
Şekil 25: Ovaryum dokusu TOK konsantrasyonları.



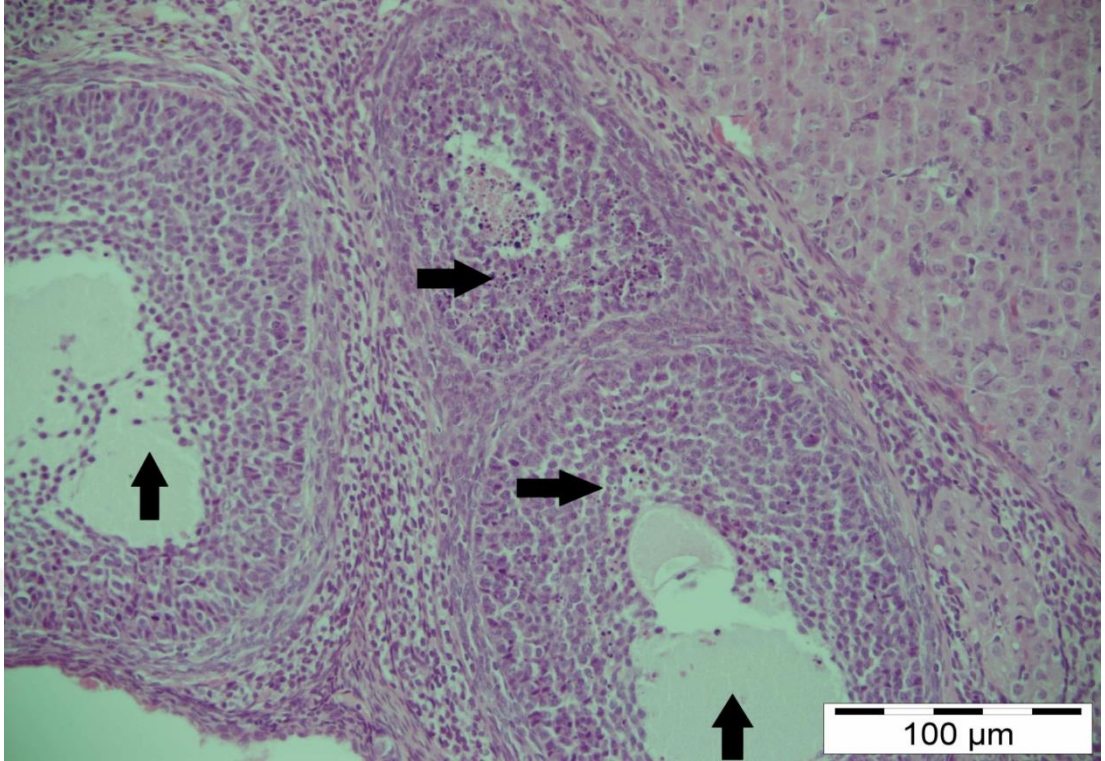
Şekil 26. Ovaryum dokusu OSİ seviyeleri.

4.2. Histopatolojik Bulgular

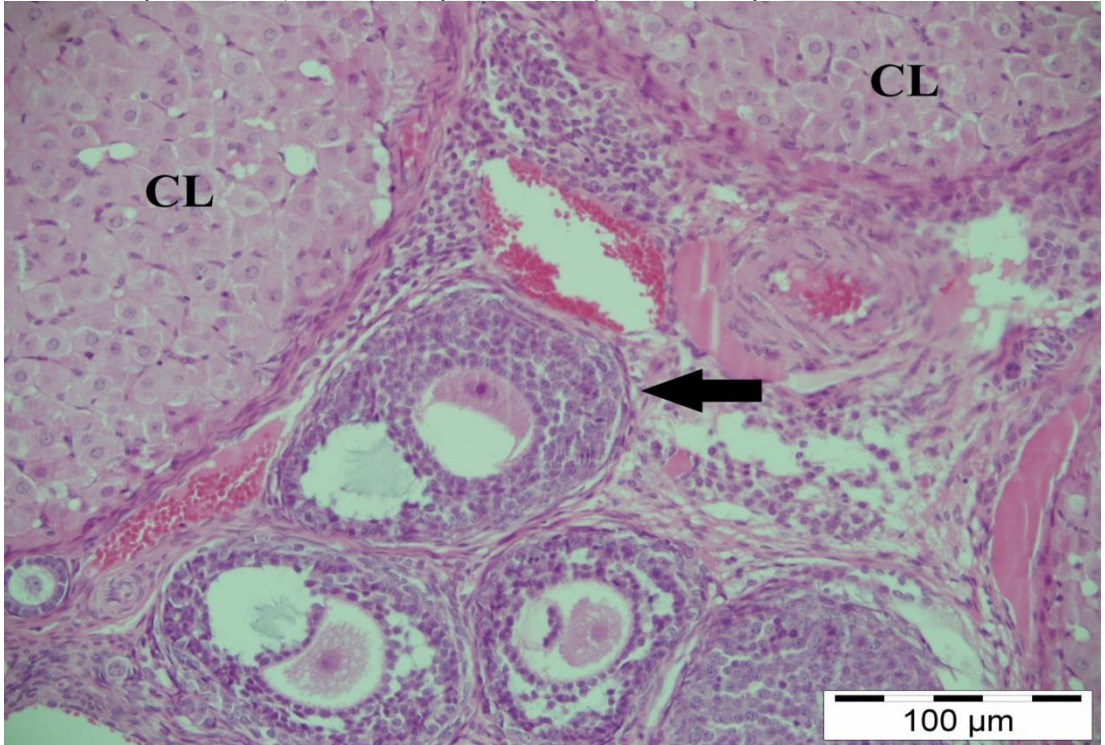
Tüm deneme grupları ovaryumlarında folliküllerin değişik gelişim aşamaları görüldü. 3-NPA grubundaki deneme hayvanlarında özellikle antral folliküllerde oositte kayıp, granüloza hücrelerinde disorganizasyon ve granüloza hücrelerinin çekirdeklerinde parçalanma ile birlikte nekrotik değişiklikler görüldü (Resim 1a, 1b). 3-NPA+AS grubu hayvanlarında ovaryumların histolojik görüntüsü (Resim 2) AS (Resim 3) ve K (Resim 4) grubu hayvanlarının histolojik görüntüsüne benzer şekildeydi ve follikül epitel hücrelerinde nekrotik değişikliklere rastlanmadı.



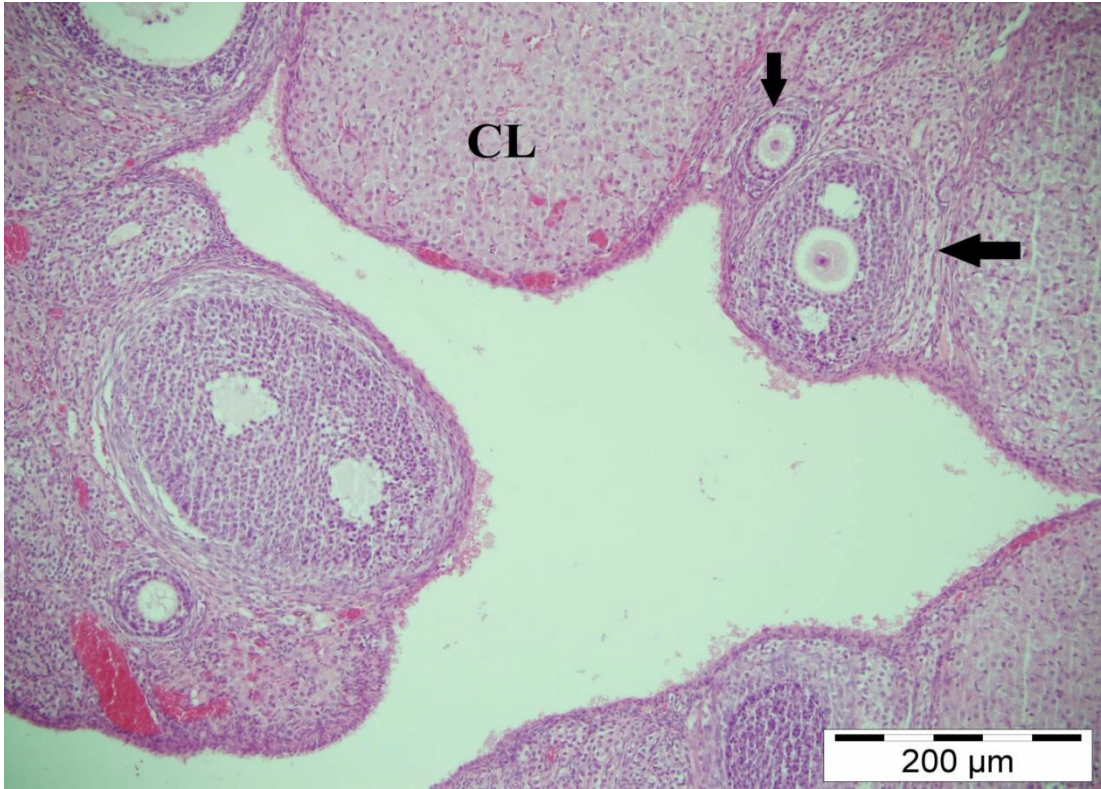
Resim 1a. 3-NPA grubu ovaryum, belirgin çekirdek ve çekirdekçiğe sahip sağlam oosit içeren antral follikül (Ters Ok), antral folliküllerde oositte kayıp (Düz Ok), Corpus Luteum (CL), ovaryum, Bar:200 µm, Haematoxylin-Eosin (HE).



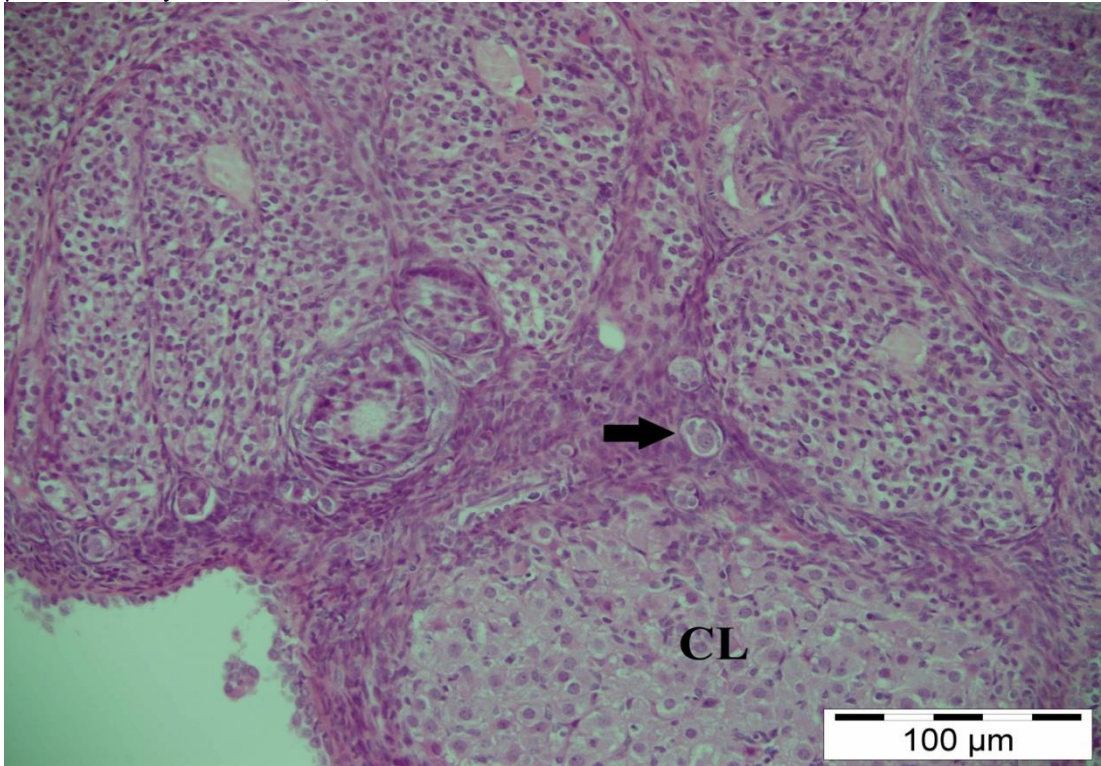
Resim 1b: 3-NPA grubu ovaryum, antral follüküllerde oosit kaybı (Dik Ok), Follükül epitel hücrelerinde yıkımlanma (Düz Ok), ovaryum, Bar:100 µm, Haematoxylin-Eosin (HE).



Resim 2: 3-NPA+AS grubu, belirgin çekirdek ve çekirdekçiğe sahip sağlam antral follükül (Ters Ok), Corpus Luteum (CL), ovaryum, Bar:100 µm, Haematoxylin-Eosin (HE).



Resim 3: AS grubu ovaryum, belirgin çekirdek ve çekirdekçiğe sahip sağlam antral follikül (Ters Ok), Tek sıralı kübik epitel ile sarılmış primer follikül (Dik Ok), Corpus Luteum (CL), ovaryum, Bar:200 µm, Haematoxylin-Eosin (HE).



Resim 4: K grubu, Tek sıralı yassı epitel ile sarılmış primordial follikül (Düz Ok), Corpus Luteum (CL), ovaryum, Bar:100 µm, Haematoxylin-Eosin (HE).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Fötal hayatta oluşturulan ovaryan folikül rezervinin canlının hayatı boyunca yenilenmediği kaydedilmektedir. Bu sınırlı sayıdaki rezerv foliküller yaşam boyunca follüküler dalga denilen gelişim aşamaları ile aktive olmaktadır. Özellikle pubertas ile birlikte ovulasyonlu siklusların başlamasıyla folikül atılımı oluşmaktadır. Bundan dolayı da bir dişi doğumda ovaryumlarında var olan oosit sayısının giderek azalmasıyla hayatını sürdürmektedir (Petrelli ve Mantovani 2002, Sengupta ve ark. 2014).

Günümüz kötü çevre şartları, kontrolsüz kullanılan zirai ilaçlar, gıda sektöründe yapılan hileler ve çeşitli zehirlenmeler sayesinde erkek veya dişilerde fertilité oranlarında düşme veya doğurganlıkta ciddi azalmalar yaşanmaktadır. Alınan kimyasalların özellikle oosit kalitesini bozduğu, implantasyonu engellediği, spermanın çiftleşmeden sonra dişi genital kanalında yaşam kalitesini bozduğu, erken embriyonal ölümlere neden olarak veya seksüel aktiviteyi doğrudan veya dolaylı etkileyerek infertilite oluşmasına ve üreme kabiliyetini sekteye uğrattığı bildirilmiştir (Petrelli ve Mantovani 2002, Sengupta ve ark. 2014).

Fizyolojik olarak düşük seviyelerdeki reaktif oksijen türlerinin folikülogenezis, oogenezis, embriyogenezis ve gebelikte çeşitli sinyal iletim yollarında önemli bir düzenleyici olarak rol oynadıkları bildirilmektedir (Agarwal ve ark. 2008). Oksidan türlerin üretiminin artmasının ve/veya antioksidan sistemin etkinliğinin azalmasının neden olduğu yüksek seviyedeki ROT'un oksidatif strese yol açtığı belirtilmiştir (Ciani ve ark. 2015). Reaktif oksijen türleri kaynaklı oksidatif stres ile dişi üreme sistemi arasındaki ilişkilerin tam olarak anlaşılamadığı bu nedenle, ovaryum oksidatif stres modellerinin bu ilişkilerin anlaşılabilmesine önemli katkılar sağlayabileceği belirtilmektedir (Zhang ve ark. 2014).

3-NPA'nın rodent modellerinde yapılmış olan çalışmalarda oksidatif strese yol açtığı bildirilmiştir (Tunez ve ark. 2004, Sandhir ve ark. 2010). Dişi farelerde yapılan bir çalışmada 3-NPA'nın yüksek dozda verilmiş olmasına rağmen, diğer dokuların aksine sadece ovaryumlar üzerine etki gösterdiği kaydedilmiştir (Shen ve ark. 2012).

Antioksidanlar, serbest radikalleri temizleyerek organizmadaki ROT seviyelerini düşürmeleriyle aşırı ROT üretimi tarafından indüklenen oksidatif stresi azaltmaya yardımcı olmaktadır. Antioksidan takviyesinin, oksidatif stresin zararlı etkilerini azaltarak fare oosit kalitesi üzerinde olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir (Lian ve ark. 2013).

Astaksantin'in, çeşitli *in vitro* çalışmalarda güçlü antioksidan davranış sergilediği, organik çözeltilerde, etkili bir lipid peroksidasyon inhibitörü ve güçlü bir singlet oksijen söndürücüsü olarak görev yaptığı bildirilmiştir (Naguib 2000). Bu çalışmada 3-NPA ile oluşturulmuş deneysel oksidatif ovaryum hasarına karşı astaksantin'in koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Ratlarda *in vivo* 3-NPA ile oksidatif ovaryum hasarı oluşturulan bu protokole, yapılan literatür taramalarında rastlanılmamıştır. Bu kapsamda 7 gün boyunca günde çift doz olmak üzere 12,5 mg/kg/gün doz 3-NPA enjeksiyonu ile oluşturduğumuz oksidatif strese karşı antioksidan olan astaksantin'in koruyucu etkilerini anlayabilmek için tam kanda GSH, plazma MDA, NO, TSA, TT, CHOL, TG, HDL, LDL konsantrasyonları ile PON1 enzim aktivitesi analizi yapıldı. Ek olarak plazma ve ovaryum dokusunda TAK, TOK, OSİ seviyeleri değerlendirildi. Ayrıca ovaryum dokusunda histopatolojik incelemeyle çalışmamız desteklendi.

Reaktif oksijen türleri terimi hem serbest radikalleri hemde H₂O₂ gibi radikal olmayan ara ürünleri kapsamaktadır (Burton ve Jauniaux 2011). Tüm hücreler ve dokular, elektron transfer zincirinde sürekli olarak küçük bir miktardaki moleküler oksijeni ROT'a dönüştürmektedir (Alfadda ve Sallam 2012). Bu çalışmada 3-NPA enjeksiyonu yapılan grupta hem ovaryumlarda hem de plazmada TAK seviyelerinde azalmaya, TOK ve OSİ seviyelerinde ise önemli (P<0,05) artışa neden olduğu tespit edildi. Bu etkiyi oluşturduğu oksidatif stres nedeniyle yaptığı düşünülmektedir.

3-NPA'nın mitokondride kompleks II'nin geri dönüşümsüz bir inhibitörü olduğu, süksinat dehidrojenazın inhibisyonu ile hücresel enerji metabolizmasını bozarak ATP üretiminde bir azalmaya neden olarak oksidatif strese yol açtığı ifade edilmektedir (Shen ve ark. 2012). Ayrıca, 3-NPA'nın, ROT'un mitokondriden salınmasına, mitokondriyal DNA hasarına ve bu nedenle mitokondriyal fonksiyon

kaybı oluşmasına neden olabileceği bildirilmiştir (Wang ve ark. 2001, Mandavilli ve ark. 2005, Bacsı ve ark. 2006). Mitokondriden aşırı ROT salınımının aslında hücresele oksidatif stresin ana kaynağını oluşturduğu kaydedilmektedir (Shen ve ark. 2012). Bu durum bulgularımızı açıklar niteliktedir. Farelerde benzer bir çalışmada intraperitoneal 3-NPA enjeksiyonunun beyin dokusunda ve ovaryum foliküler granüloza hücrelerinde yüksek ROT seviyelerine neden olduğu tespit edilmiştir (Shen ve ark. 2012). Yapılan bu çalışmada hem biyokimyasal hemde histopatolojik olarak 3-NPA'nın ROT'u artırarak oksidatif strese yol açarak ovaryum doku hasarına neden olduğu tespit edilmiştir.

Endojen antioksidanlardan GSH-PX'in etki mekanizmasının, lipid peroksidasyonu ile oluşan H_2O_2 'lerin detoksifikasyonu (Birben ve ark. 2012), CAT'ın ise temel koruyucu antioksidan olarak kabul edildiği bildirilmektedir (Patlevic ve ark. 2016). Birçok çalışmada, 3-NPA'nın SOD ve CAT aktivitelerinde artışa neden olduğunu gösterilmiştir (Fu ve ark. 1995, Binienda ve Ali 2001, Tunes ve ark. 2004). Artan enzim aktivitesinin oksidatif stresin göstergesi olduğu ve ROS konsantrasyonlarını azaltarak hücre hasarını önlediği bildirilmiştir (Binienda ve Ali 2001).

Farelerde yapılmış olan bir çalışmada 5 gün boyunca intraperitoneal 50 mg/kg 3-NPA enjeksiyonu yapılmış, sonuçta ROT türleri seviyesinde ve foliküler granüloza hücrelerindeki DNA hasarında önemli bir şekilde artış tespit edildiği ifade edilmiştir (Shen ve ark. 2012). Bir çalışmada 7 gün boyunca 15 mg/kg ve 30 mg/kg dozda 3-NPA uygulanan dişi farelerde K grubuna göre fare granüloza hücrelerinde ROT'un anlamlı şekilde arttığı, ovaryum SOD, GSH-PX ve CAT aktivitelerinin anlamlı şekilde artarken, süksinat dehidrojenazın doza bağlı bir şekilde azaldığı bildirilmiştir (Wei ve ark. 2019). Dişi farelere 7 gün 12,5 mg/kg 3-NPA enjeksiyonuna karşı proantosianidin koruyucu etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, 3-NPA grubu ovaryum ROT seviyeleri, SOD ve CAT aktivitelerinde K grubuna göre önemli derecede artış tespit edildiği bildirilmiştir (Zhang ve ark. 2015).

Çalışmamızda TAK seviyesinde 3-NPA uygulamasıyla birlikte bir düşüş gözlenmiştir. Uygulamayı takip eden 11. günde azalan TAK seviyeleri 15. günde 11.

güne göre artış sergilemiştir. 15. günde 11. güne kıyasla meydana gelen TAK seviyelerindeki bu artış K grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel bir fark oluşturmuştur ($P<0,05$). TOK seviyesi ve OSİ seviyeleri uygulamanın başından itibaren sürekli olarak artan bir seyir izleyerek önceki 3-NPA ovaryum toksisitesi modelleri çalışmalarında belirtilen verilerle (Shen ve ark. 2012, Zhang ve ark. 2015, Wei ve ark. 2019,) uyumluluk göstermektedir. Ayrıca çalışmamızın bulgularını destekler nitelikte olduğunu düşündüğümüz başka bir çalışmada, metotreksat toksikasyonunun ovaryum üzerine olası oksidatif etkisinin olup olmadığı değerlendirilmiş ve ovaryum hasar grubu serum TAK seviyelerinde anlamlı azalma, TOK ve OSİ seviyelerinde ise artış saptandığı bildirilmiştir. Dokuda ise MDA konsantrasyonunda artış meydana gelirken GSH-Px ve CAT aktivitelerinde önemli derecede azalma kaydedilmiştir (Soylu Karapinar ve ark. 2017). Çalışmamızın ovaryum dokusu TAK seviyelerindeki değişim yönünden uyumluluk gösteren başka bir çalışmada, iskemi reperfüzyon (İ/R) ile ovaryan hasar oluşturulmuş, ovaryum MDA, GSH, TAK seviyeleri değerlendirilmiştir. Buna göre İ/R grubunda MDA konsantrasyonunda önemli bir artış gözlenirken GSH ve TAK seviyelerinde ise önemli azalma bildirilmiştir (Ergenoglu ve ark. 2013).

Bu çalışmada 3-NPA+AS grubu TAK verileri değerlendirildiğinde uygulama boyunca dalgalı bir seyir izlediği göze çarpmaktadır. 0. günle kıyaslandığında uygulamanın 7. gününde TAK seviyeleri artış göstermesine rağmen ilerleyen günlerde azalan bir seyir izleyerek 11. günde tekrar başlardaki seviyelerine dönmüş ve yine 15. günde artmıştır. Bu gruba 7 gün boyunca astaksantin uygulaması yapılmış 8. günden itibaren beraberinde 3-NPA uygulamaya başlanılmıştır. Dolayısıyla 0. günden itibaren 7. günde TAK seviyesinin artışı antioksidan olan astaksantin uygulamasıyla açıklanabilmektedir. Zira astaksantin uygulamasının tek başına yapıldığı AS grubunda TAK seviyesi artış göstermiştir. TOK ve OSİ seviyelerinde de 8. günden itibaren verilmeye başlanan 3-NPA'nın astaksantin'in etkisini olumsuz etkilediği, 15. günde astaksantin koruyuculuğunu gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca 3-NPA grubuyla kıyaslandığında astaksantin uygulaması TAK seviyelerinin düşmesini TOK ve OSİ seviyelerinin de artmasını engelleyerek organizmayı 3-NPA'nın zararlı etkilerinden korumuş görünmektedir. Bu veriler 3-NPA+AS grubunun histopatolojik bulgularıyla da desteklemektedir. 3-NPA+AS

grubunda hem ovaryum hemde plazma TAK, TOK ve OSİ seviyelerinin K grubuna göre değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0,05$). Burada da anlamlı istatistiksel bir fark oluşmaması astaksantin'in koruyucu rolünün kanıtı olduğunun bir göstergesi olabilir.

Nitrik oksit, kan damarı tonusunun düzenlenmesi, iltihaplanma, mitokondriyal fonksiyonlar ve apoptoz da dâhil olmak üzere çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda önemli bir rol oynayan kısa ömürlü bir sinyal molekülüdür (Beltran ve ark. 2000). Güçlü bir immünoregülasyon faktörü görevi gören NO, O_2^- ile reaksiyonunu takiben peroksinitrit oluşumu yoluyla sitoplazmik redoks dengesini etkilediği kaydedilmiştir (Chung ve ark. 2001). Çalışmamızda NO seviyelerinin en yüksek olduğu grubun 3-NPA grubu olduğu tespit edildi. K, AS ve 3-NPA+AS grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmazken, 3-NPA grubunda diğer grupların hepsiyle arasında fark bulunmaktadır ($P<0,001$).

Al Mutairy ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada dişi ratlara 7 gün boyunca 25 mg/kg i.p. yolla 3-NPA uygulamasının, striatal dopamin ve GSH'nın belirgin bir şekilde tükenmesine neden olurken, TBARS ve NO seviyelerinin anlamlı şekilde artış gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmamız verileri bu çalışma ile paralellik göstermektedir. NO seviyelerinin 3-NPA grubunda yüksek çıkmasının artan oksidatif stres ile ilişkili olmakla birlikte 3-NPA'nın parçalanması sonucu oluşan NO (Castillo ve ark. 1993) miktarına bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Yaygın olarak kullanılan lipit peroksidasyon belirteçlerinden biri olan MDA esas olarak, araşidonik asit gibi ikiden fazla çift bağ bulunduran PUFA'nın peroksidasyon ürünü olarak ortaya çıkmaktadır (Halliwell ve Gutteridge 2007). MDA'nın klinik durumlarda oksidatif stresi belirleyen en popüler ve güvenilir belirteçlerden biri olduğu bildirilmiştir (Ayala ve ark. 2014). 3-NPA'nın rat striatal ve kortikal sinaptozomlarında oksidatif etkisinin incelendiği bir çalışmada, hayvanlara 4 gün boyunca i.p. yolla 20 mg/kg dozda yapılan uygulamaya karşı 1 mg/kg dozda melatoninin antioksidatif koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. Bu çalışmaya göre; 3-NPA, lipit peroksidasyon seviyelerinde ve protein karbonil içeriğinde bir artışa neden olurken, süksinat dehidrojenaz aktivitesinde bir azalmaya

neden olmuş ve SOD aktivitesinde bir artışı tetiklediği bildirilmiştir. Bu değişikliklerin melatonin uygulanan gruplarda engellendiği belirtilmiştir (Tunez ve ark. 2004). Aynı şekilde bizim çalışmamızda da 3-NPA verilen hayvanlarda lipid peroksidasyonunun anlamlı derecede artış gösterdiği ve yine antioksidan astaksantin uygulamasının bu etkiyi azalttığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda, K grubuna göre AS grubunda MDA konsantrasyonunda azalma görülürken 3-NPA grubunda ise artış meydana geldiği dikkati çekmektedir. 3-NPA grubundaki artış istatistiksel olarak önemli ($P<0,05$) bulunmuştur. 3-NPA+AS grubunda görülen artış ise istatistiksel olarak önemli bulunmamaktadır. Dolayısıyla astaksantin burada her ne kadar lipid peroksidasyonu tam olarak durduramasa da aşırı artmasını engelleyerek organizmayı lipid peroksidasyonunun zararlı etkilerinden koruduğunu düşünmekteyiz. Bu bulgular belirtilen çalışmaların (Tunez ve ark. 2004, Al Mutairy ve ark. 2010, Joseph 2013) bulgularıyla da uyumluluk içerisindedir. 3-NPA grubundaki lipid peroksidasyonunun artış göstermesinin nedeninin yukarıda belirtildiği gibi süksinat dehidrojenaz aktivitesinin inhibisyonuna bağlayabiliriz.

Çalışmada, tam kan GSH konsantrasyonu gruplar arası karşılaştırıldığında K grubuna kıyasla 3-NPA grubunda istatistiksel olarak kayda değer bir azalma olduğu tespit edildi ($P<0,001$). AS ve 3-NPA'nın birlikte uygulandığı grupta ise yine istatistiksel olarak önemli bir azalma göze çarpmaktadır ($P<0,05$). Hücrelerin GSH'yi yeniden üretme kabiliyeti (GSSG'nin azaltılması yoluyla veya GSH'nin sentezi yoluyla) hücrenin oksidatif stresi yönetmedeki verimliliğini yansıtmaktadır (Curtin ve ark. 2002, Lu ve ark. 2018). Bu nedenle çalışmamızda 3-NPA uygulamasının hücrelerin GSH'yi üretme kabiliyetini olumsuz etkilediği ve GSH seviyelerinin azalmasına neden olarak, ROT'a karşı hücrel savunmayı zaafiyete uğrattığı, hatta öyle ki 3-NPA+AS verilen grupta bile astaksantin'in bu azalmayı 3-NPA grubuna göre kısmen baskılamış gibi görülsede GSH konsantrasyonunun azalmasına engel olamadığı görüldü. K grubuna göre 3-NPA+AS grubu GSH verilerinin istatistiksel karşılaştırması da bunu göstermektedir ($P<0,001$). Ayrıca GSH konsantrasyonunun 3-NPA etkisinden dolayı oluşan serbest radikallerle mücadelesi sırasında tükenmiş olabileceği ya da 3-NPA kaynaklı oluşabilecek enerji eksikliğinin GSH sentezi üzerine inhibe edici etki yapmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Ratlara 25 mg/kg ip 3-NPA uygulamasına karşı balık yağı ile antioksidan olan quercetin'in etkisinin incelendiği bir araştırmada; 3-NPA uygulamasının striatumunda NO ve MDA seviyelerinde önemli bir artış, GSH ve SOD seviyelerinde önemli bir azalmaya neden olduğu gözlemlendiği, CAT seviyelerine ise herhangi bir etkisinin görülmediği belirtilmiştir. Serebellumda ise NO, MDA, GSH ve SOD seviyelerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı, CAT seviyelerinde ise belirgin bir artış meydana geldiği bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada balık yağı ve quercetin uygulamasının 3-NPA'ya karşı koruyucu etki oluşturduğu da ifade edilmektedir (Joseph 2013). Ratlara oral olarak 80 mg/kg dozda 3-NPA uygulanmış olan başka bir çalışmada, karaciğer SOD ve GSH-PX aktiviteleri ile MDA konsantrasyonunda ayrıca serebral SOD ve MDA'da da önemli derecede artış tespit edildiği bildirilmiştir (Fu ve ark. 1995). Çalışmamızda 3-NPA uygulaması neticesinde, MDA, NO ve TOK seviyelerindeki artış ile GSH ve TAK seviyelerinde azalma oluşması yönünden bu çalışmaları destekler niteliktedir.

Endojen antioksidan olarak görev yapan sülfidril bileşiklerinin organizmada azalması veya tükenmesi, oksidatif stresin zararlı etkilerini artırarak hücre ve membran hasarını artırdığı bildirilmiştir (Aksenov ve Makesbery 2001). Protein tiyol gruplarının oksidanları temizleyerek antioksidanları ve/veya hücresel bileşenleri saldırıdan koruduğu kaydedilmektedir. Tiyol gruplarının serumda ölçümü, dolaylı olarak antioksidan savunmaları yansıttığı belirtilmektedir (Lemarechal ve ark. 2006). Bu amaçla çalışmada plazma TT konsantrasyonlarını değerlendirmiş bulunmaktayız. Deneysel gruplarının TT konsantrasyonlarının karşılaştırılması değerlendirildiğinde gruplar arası sayısal farklar oluşmuş olmasına rağmen bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($P>0,05$). Çeşitli dokulardaki hücreler tiyollerin redoks durumunu düzenleyerek -SH içeren proteinleri oksidasyondan korudukları, GSH sisteminin de tiyol konsantrasyonunun kontrolünde önemli pay sahibi olduğu öne sürülmüştür (Aksenov ve Makesbery 2001). Bu açıdan çalışmamız TT konsantrasyonları değerlendirildiğinde, aslında 3-NPA grubunda K grubuna göre düşüş gözlenmekteyken, bu değişim istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır. Bu durum hayvan sayısının az olması gibi birçok nedenden ileri gelmiş olabileceği düşünülebilir.

Sialik asitler makromolekülleri fagositik bozulmalardan veya doğal immün tepkiden korumak için, moleküllerin tanıma alanlarının korunmasında rol oynarlar (Ley 2003). SA'lar hücrelerin kimliği gibidirler, böylece onları immünolojik saldırılara karşı koruyabilmektedirler (Schauer 2009). SA'ların bulundukları -OH grupları, karboksilik asit ve N-asetamid grupları organizmada, homeostazis, immün sistem ve enflamasyonda önemli işlev görmektedirler (Varki 2008). Birçok çalışmada, şiddetli enflamatuvar, hücresel dejenerasyon veya proliferasyon durumlarında TSA konsantrasyonunun arttığı bildirilmiştir (Deveci ve ark. 2017a, 2017b, 2018a).

Bu çalışmada TSA için yapılan gruplar arası karşılaştırmada; 3-NPA uygulaması TSA seviyelerini anlamlı bir şekilde artırırken AS uygulamasıyla bu artış 3-NPA+AS grubunda baskılanmış görülmektedir. İstatistiksel olarak gruplar arasındaki farklar $P < 0,05$ derecesinde anlamlı görülürken, bu istatistiksel önemin 3-NPA grubundaki artıştan kaynaklandığı görülmektedir. SA miktarının akut enflamatuvar reaksiyonlarda da arttığı bildirilmektedir (Hag ve ark. 1993). Akut faz proteinlerinin enfeksiyon, iltihaplanma, doku hasarı veya tahrişi, neoplazi ve strese maruz kalan hayvanlarda arttığı veya azaldığı bildirilmektedir (Kuru ve ark. 2015, Merhan ve ark. 2016). SA'nın büyük bir kısmı, akut enflamatuvar reaksiyonlarda artan proteinlere bağlı olarak bulunmakta olduğundan akut faz yanıtta görev aldığı da belirtilmektedir (Lindberg ve ark. 1991). Hücre membranında meydana gelebilecek bir hasar neticesinde SA'ların plazmada seviyelerinin yükselebileceği, ayrıca sadece oksidatif stresin de hücre yüzeyindeki SA'ların salıverilmesini indükleyebileceği ifade edilmektedir (Eguchi ve ark. 2005). Çalışmamızda 3-NPA uygulaması hem oksidatif strese neden olmuş, bunu artan OSI'den görmektediriz, hemde ovaryumlarda histopatolojik olarak desteklenen hücresel hasar oluşturmuştur. TSA seviyelerinin plazmada artış göstermesi, hasar grubunda 3-NPA'nın neden olduğu membran hasarından veya akut faz yanıt olarak membranlardan SA'ların salıverilmesiyle ilişki olabileceği kanaatini taşımaktayız.

Nur ve ark. (2018), ratlarda malatyon ile oluşturulmuş toksikasyon modelinde, toksikasyon grubu plazma TOK ve TSA seviyelerinin K grubuna göre artarken, TAK seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir. TOK ve TSA seviyelerindeki

artışın malatyonun karaciğer dokusunda hücre infiltrasyonlarına, dejenerasyona ve fokal nekroza yol açmasıyla açıklanmıştır. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde toksikasyon grubunda TOK ve TSA seviyelerinin artması ve TAK seviyelerinin azalmasıyla sonuçlanan oksidatif stresin etkisiyle hücrelerde meydana gelen dejenerasyona bağlı olarak oksidan parametrelerde artış gözlenirken antioksidan belirteçlerde ise azalma meydana gelmiştir. Astaksantin'in antioksidan etkisiyle 3-NPA toksikasyonun zararlı etkileri en aza indirilerek oksidatif dengenin sağlanmaya çalışıldığı görülmektedir.

Paraoksonaz başta karaciğer olmak üzere birçok dokuda ve plazmada bulunmaktadır (bin Ali ve ark. 2003). Plazmada HDL ile birlikte bulunan PON1 enziminin plazma lipoproteinlerinin oksidasyonunu önleme görevi olduğu ve LDL kolesterolü serbest radikallerin indüklediği oksidasyondan koruduğu belirtilmektedir. HDL kolesterol yapısında bulunan PON1 enzimi, LDL'deki aktif lipidleri parçalayarak hücrelerde enflamatuvar cevap oluşumuna karşı koruyucu etki göstermektedir (Aviram 1999). Deveci ve ark. (2015) yapmış olduğu bir çalışmada farelerde akut klorprifos-etil toksikasyonunun PON1 aktivitesi ve TAK düzeylerini azalttığı, TOK ve OSI düzeylerini ise artırdığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, PON1 aktivitesinin 3-NPA grubunda K grubuna göre azalarak istatistiksel olarak bir farkın ortaya çıkmasına neden olduğu tespit edildi ($P=0,001$). PON1 enzim aktivitesinin astaksantin'in ve 3-NPA ile birlikte verildiği grupta bir azalma meydana gelmiş olmasına rağmen bu azalmayla K grubuyla arasında oluşan PON1 aktivitesindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0,05$). Bu sonuç bize astaksantin uygulamasının koruyucu olarak görev yaptığı ve bu grupta 3-NPA'nın oksidatif etkisini baskıladığını göstermektedir.

Çalışmamızda 3-NPA grubunda CHOL, TG ve LDL'nin önemli bir şekilde arttığı HDL seviyelerinde ise yine anlamlı bir düşüş olduğu gözlemlendi ($P<0,05$). Burada HDL seviyelerinde yaşanan düşüşe bağlı olarak PON1 seviyesinde de düşüş meydana gelmiştir. Bu durum PON1'in HDL'ye bağımlı bulunmasıyla açıklanabilir (Aviram 1999). Akut faz yanıt sırasında, HDL moleküllerinin apolipoprotein A1, kolesterol esteri ve PON1 de dahil olmak üzere HDL ile ilişkili enzimlerin çoğunu

kaybettiği, bu nedenle, PON1'in negatif akut faz proteini olarak kabul edildiği bildirilmektedir (Gaidukov ve Tawfik 2005). PON1 aktivitesindeki bir azalmanın oksidatif hasarın arttığına bir göstergesi olarak kabul edildiği bildirilmiştir (Kaya ve ark. 2016). Ayrıca, 3-NPA grubu için, PON1 ve TT verilerine bakıldığında hem PON1 aktivitesi hem de TT konsantrasyonu azalmıştır. Bu durumun PON1'in yapısında disülfid bağı bulundurmaıyla (Baskol ve ark 2006) ilişkilendirilebileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca PON1 ve HDL'deki düşüş, serbest radikal üretimine bağlı olarak oluşan akut faz yanıt süresince HDL'nin PON1 dahil olmak üzere üzerindeki apoproteinleri kaybetmesiyle açıklanabilir.

Akrilamidin çeşitli dozlarıyla (2, 10, 30 mg/kg) ratlarda oluşturulan ovaryum hasarında lipit profili değerlendirilen hayvanlarda K grubuna göre ovaryan hasar oluşturulmuş grupta CHOL konsantrasyonunda anlamlı artış tespit edilmiştir. Yüksek doz akrilamid ise CHOL seviyesinde önemli derecede azalmaya neden olduğu, düşük doz grubunun TG düzeyindeki K grubuna göre anlamlı artışlara rağmen, K grubuna kıyasla hem hafif hem de yüksek doz gruplarında anlamlı düşüşler bulunduğu bildirilmiştir. Öte yandan, düşük, hafif ve yüksek doz akrilamid gruplarının her birinde HDL seviyeleri K grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada LDL seviyeleri ise düşük ve orta doz gruplarında anlamlı artış, yüksek doz grubunda ise K grubuna göre anlamlı bir fark görülmediği belirtilmiştir (Mahmood ve ark. 2016). Çalışmamızda 3-NPA ile ovaryan hasar oluşturduğumuz grupta CHOL, TG, LDL seviyelerinde anlamlı artış, HDL seviyelerinde ise önemli azalma tespit edilmiştir. Dolayısıyla verilerimiz bu çalışmayla uyumludur.

Deveci ve Karapehlivan (2018), chlorpyrifos-ethyl (CPF) ile oluşturdukları toksisite modelinde, CPF grubu plazma TAK, HDL ve PON1 aktivitesinde K grubuna göre önemli derecede düşük, plazma TOK, TSA, CHOL, TG, LDL ve VLDL seviyelerinde önemli derece artış görüldüğü kaydedilmiştir. Aynı çalışmada beyin dokusu PON1 aktivitesi ve TAK seviyeleri önemli derecede düşük, TOK ve TSA seviyeleri ise önemli derecede yüksek olarak tespit edilmiştir.

Deveci ve ark. (2017), polikistik ovaryum sendromu (PCOS) hastalarında PON1 aktivitesi ve HDL seviyesi, K grubuna göre anlamlı derecede düşük

bulunduğu, TSA seviyelerinin ise K grubundan daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Parametreler ve sendrom başlangıcı arasında da anlamlı bir ilişki olduğu da kaydedilmiştir. Ayrıca başka bir çalışmada 7,12 dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) ve flüorid ile ratlarda oluşturulmuş kronik toksikasyonunda, DMBA uygulanan gruplarda TSA, LSA düzeylerinin florid uygulanan gruplara kıyasla daha fazla arttığı gösterilmiştir (Oto ve ark. 2017). Bu alışmamızda da benzer sonuçların bulunması, toksikasyonun hücre membran lipid bileşiklerine zarar vermesiyle oluşan oksidatif stres ve doku hasarı sonucu şekillenebileceği kanatini oluşurmaktadır.

Sonuç olarak;

- a) 3-NPA maruziyeti sonucunda serbest radikal oluşabileceği, antioksidan sistemin uyarılarak serbest radikal temizleyicilerinin (TAK, GSH, PON1, TSA, TT) verdiği tepki ile gösterebileceği,
- b) 3-NPA ile oluşmuş olan düşük TT ve GSH seviyelerinin, serbest radikallerle yapılan yok etme reaksiyonu ile ilişkilendirilebileceği,
- c) Astaksantin'in 3-NPA ile birlikte verilmesinin 3-NPA'nın yukarıda belirtilen tüm biyokimyasal parametrelere yaptığı olumsuz etkiyi düzeltebileceği ve hasar oluşmasını histopatolojik olarak önleyebileceği,
- d) 3-NPA ile indüklenen ovaryum toksisitesinde şekillenen oksidatif hasara karşı astaksantin'in koruyuculuğunun, güçlü antioksidan etkisiyle ilişkili olabileceği,
- e) Oksidatif stres kaynaklı hastalıkların profilaksi ve tedavisinde özellikle ovaryan dejenerasyon kaynaklı infertilite problemlerinde astaksantin kullanımının faydalı olabileceği kanaatini taşımaktayız.

6. KAYNAKLAR

Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S: The effects of oxidative stress on female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, 10: 49, 2012.

Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, Shah R: Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*, 10: 1375-1403, 2008.

Agarwal A, Gupta S, Sharma RK: Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, 3: 28, 2005.

Agarwal A, Gupta S, Sikka S: The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 18: 325, 2006.

Agarwal A: Oxidants and antioxidants in human fertility. *Middle East Soc Fertil J*, 9: 187-197, 2004.

Aksenov MY, Markesbery WR: Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 302: 141-145, 2001.

Al Mutairy A, Al Kadasah S, Elfaki I, Arshaduddin M, Malik D, Al Moutaery K, Tariq M: Trolox ameliorates 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neurotoxicol Teratol*, 32: 226-33, 2010.

Aldridge WN: Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl pnitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem J*, 53: 117-24, 1953.

Alfadda AA, Sallam RM: Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol*, 1-14, 2012.

Alston TA, Mela L, Bright HJ: Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inhibitor of succinate dehydrogenase. *Proc National Acad Sci USA*. 74: 3767-3771, 1977.

Ambati R, Phang SM, Ravi S, Aswathanarayana R: Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications-a review. *Marine drugs*, 12: 128-152, 2014.

Atakisi E, Merhan O: Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide Involvement in Different Toxicities, Nitric Oxide Synthase-Simple Enzyme-Complex Roles, Seyed Soheil Saedi Saravi, IntechOpen, 2017.

Augusti PR, Quatrin A, Somacal S, Conterato GM, Sobieskim R, Ruviano AR, Maurer LH, Duarte MM, Roehrs M, Emanuelli T: Astaxanthin prevents changes in the activities of thioredoxin reductase and paraoxonase in hypercholesterolemic rabbits. *J Clin Biochem Nutr*, 51: 42-49, 2012.

Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Eroglu J, Hsu C, Dunlop C, La Du B: Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18: 1617-1624, 1998a.

Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN: Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest*, 101: 1581-90, 1998b.

Ayala A, Munoz MF, Argüelles S: Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014:360438. 2014.

Bacsi A, Woodberry M, Widger W, Papaconstantinou J, Mitra S, Peterson JW, Boldogh I: Localization of superoxide anion production to mitochondrial electron transport chain in 3-NPA-treated cells. *Mitochondrion* 6: 235-244, 2006.

Baskol G, Baskol M, Yurci A, Ozbakir O, Yucesoy M: Serum paraoxonase 1 activity and malondialdehyde levels in patients with ulcerative colitis. *Cell Biochem Funct*, 24: 283-6, 2006

Beltran B, Mathur A, Duchon MR, Erusalimsky JD, Moncada S: The effect of nitric oxide on cell respiration: a key to understanding its role in cell survival or death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 14602-14607, 2000.

Bennedson M, Wang X, Willen R, Wadstrom T, Andersen LP: Treatment of *H. pylori* infected mice with antioxidant astaxanthin reduces gastric inflammation, bacterial load and modulates cytokine release by splenocytes. *Immunol Lett*, 70: 185-189, 1999.

bin Ali A, Zhang Q, Lim YK, Fang D, Retnam L, Lim SK: Expression of major HDL-associated antioxidant PON-1 is gender dependent and regulated during inflammation. *Free Radic Biol Med*, 34: 824-9, 2003.

Binienda ZK, Ali SF: Neuroprotective role of L-carnitine in the 3-nitropropionic acid induced neurotoxicity. *Toxicol Lett*, 125: 67-73, 2001.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O: Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*, 5: 9-19, 2012.

- Biswas SK, Newby DE, Rahman I, Megson IL: Depressed glutathione synthesis precedes oxidative stress and atherogenesis in Apo-E(-/-) mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 338: 1368-73, 2005.
- Blatter Garrin MC, Moren X, James RW: Paraoxonase-1 and serum concentrations of HDL-cholesterol and apoA-I. *J Lipid Res*, : 515-520, 2006.
- Bolisetty S, Jaimes EA: Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *Int J Mol Sci*, 14: 6306-44, 2013.
- Borgeest C, Symonds D, Mayer LP, Hoyer PB, Flaws JA: Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. *Toxicol Sci* 68: 473-478, 2002.
- Bossi SR, Simpson JR, Isacson O: Age dependence of striatal neuronal death caused by mitochondrial dysfunction. *Neuroreport*, 4: 73-6, 1993.
- Bowry VW, Stanley KK, Stocker R: High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 10316-20, 1992.
- Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH: Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*, 142:w13659, 2012.
- Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D: 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem*, 95: 1521-40, 2005.
- Buczynska A, Szadkowska-Stanczyk I: Identification of health hazards to rural population living near pesticide dump sites in Poland. *Int J Occup Med Environ Health* 18: 331–339, 2005.
- Burdock GA, Carabin IG, Soni MG: Safety assessment of β -nitropropionic acid: a monograph in support of an acceptable daily intake in humans. *Food Chem*, 75: 1-27, 2001.
- Burton GJ, Jauniaux E: Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 25: 287-99, 2011.
- Cadenas E, Davies KJ: Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*, 29: 222-30, 2000.
- Cadirci E, Oral A, Odabasoglu F, Kilic C, Coskun K, Halici Z, Suleyman H, Nuri Keles O, Unal B: Atorvastatin reduces tissue damage in rat ovaries subjected to torsion and detorsion: biochemical and histopathologic evaluation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 381: 455-66, 2010.
- Castillo C, Valencia I, Reyes G, Hong E: 3-nitropropionic acid, obtained from astragalus species, has vasodilator and antihypertensive properties. *Drug Develop Res*, 28: 183-188, 1993.

Chistiakov DA, Melnichenko AA, Orekhov AN, Bobryshev YV: Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. *Biochimie*, 132: 19-27, 2017.

Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM: Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 282: 1075-1079, 2001.

Ciani F, Cocchia N, d'Angelo D, Tafuri S: Influence of ROS on Ovarian Functions, *New Discoveries in Embryology*, Bin Wu, IntechOpen, 2015

Curtin JF, Donovan M, Cotter TG: Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods*, 265: 49-72, 2002.

Dalle-Donne I, Milzani A, Gagliano N, Colombo R, Giustarini D, Rossi R: Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal*, 10: 445-73, 2008.

Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, Ghosh S, Goswami SK, Chakravarty BN, Chaudhury K: Reactive oxygen species level in follicular fluid-embryo quality marker in IVF? *Hum Reprod*, 21: 2403-7, 2006.

Davies KJA: Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*, 61: 1, 1995.

Deveci H, Nur G, Alpay M, Özmerdivenli R: Levels of paraoxonase, high-density lipoprotein and total sialic acid levels in patients with polycystic ovary syndrome. *J Cell Neurosci Oxid Stress*, 9: 630-636, 2017.

Deveci HA, Kuru M, Kükürt A, Makav M, Karapehlivan M: Determination of serum paraoxonase activity, total sialic acid concentration, and oxidative status in cattle with clinical mastitis. *Inter J Vet Sci*, 6: 136-140, 2017b.

Deveci HA, Karapehlivan M, Kaya İ, Kükürt A, Alpay M: Akut klorprifos-etil zehirlenmesine karşı kafeik asit fenetil ester'in koruyucu etkisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 62: 255-60, 2015.

Deveci HA, Karapehlivan M: Chlorpyrifos-induced parkinsonian model in mice: Behavior, histopathology and biochemistry. *Pestic Biochem Physiol*, 144: 36-41, 2018.

Deveci HA, Kükürt A, Nur G, Alpay M, Merhan O, Bozukluhan K, Yılmaz V, Karapehlivan M: Serum paraoxonase activity and total sialic acid in sheep with foot and mouth disease. *Med Weter*, 74: 199-202, 2018a.

Deveci HA, Kükürt A, Uzlu E, Sözdutmaz İ, Merhan O, Aktaş S, Alpay M, Kaya İ, Karapehlivan M: Evaluation of Paraoxonase Activity, Total Sialic Acid and Oxidative Stress in Sheep with Ecthyma Contagiosa. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 23: 453-457, 2017a.

- Drew B, Leeuwenburgh C: Aging and the role of reactive nitrogen species. *Ann N Y Acad Sci*, 959: 66-81, 2002.
- Droge W: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82: 47-95, 2002.
- Eguchi H, Ikeda Y, Ookawara T, Koyota S, Fujiwara N, Honke K, Wang PG, Taniguchi N, Suzuki K: Modification of oligosaccharides by reactive oxygen species decreases sialyl lewis x-mediated cell adhesion. *Glycobiology*, 15: 1094-101, 2005.
- Erecinska M, Nelson D: Effects of 3-nitropropionic acid on synaptosomal energy and transmitter metabolism: relevance to neurodegenerative brain diseases. *J Neurochem*, 63: 1033-1041, 1994.
- Erel O, Neselioglu S: A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clin Biochem*, 47: 326-32, 2014.
- Erel Ö: A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin. Biochem*, 38: 1103-1111, 2005.
- Erel Ö: A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable abts radical cation. *Clin. Biochem*, 37: 277-285, 2004.
- Ergenoglu M, Erbaş O, Akdemir A, Yeniçel AÖ, Yildirim N, Oltulu F, Aktuğ H, Taskiran D: Attenuation of ischemia/reperfusion-induced ovarian damage in rats: does edaravone offer protection? *Eur Surg Res*, 51: 21-32, 2013.
- Esfandiari A, Soifyoudine D, Paturneau-Jouas M: Inhibition of fatty acid betaoxidation in rat brain cultured astrocytes exposed to the neurotoxin 3-nitropropionic acid. *Dev Neurosci*, 19: 312-320, 1997.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H: Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 11: 81-128, 1991.
- Fattoretti P, Bertoni-Freddari C, Caselli U, Paoloni R, Meier-Ruge W: Impaired succinic dehydrogenase activity of rat Purkinje cell mitochondria during aging. *Mech Aging Dev*, 101: 175-182, 1998.
- Ferreira VP, Pangburn MK, Cortes C: Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. *Mol Immunol*, 47: 2187-2197, 2010.
- Forstermann U, Sessa WC: Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, 33: 829-837, 2012.
- Foss P, Renstrom B, Liaaen-Jensen S: Natural occurrence of enantiomeric and Meso astaxanthin 7*-crustaceans including zooplankton. *Comp Biochem Physiol*, 86: 313-314, 1987.

- Fu YT, He FS, Zhang SL and Zhang JS: Lipid peroxidation in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid. *Toxicol*, 33: 327-331, 1995.
- Fuhrman B: Regulation of hepatic paraoxonase-1 expression. *J lipids*, 2012:684010, 2012.
- Gaidukov L, Tawfik DS: High affinity, stability, and lactonase activity of serum paraoxonase PON1 anchored on HDL with ApoA-I. *Biochemistry*, 44: 11843-54, 2005.
- Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN: Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos*, 19: 100-6, 1991.
- Gitto E, Pellegroni S, Gitto P, Barberi I, Reiter RJ: Oxidative stress of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin. *J Pineal Res*, 46: 128-139, 2009.
- Goto S, Kogure K, Abe K, Kimata Y, Kitahama K, Yamashita E, Terada H: Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochim Biophys Acta*, 1512: 251-8, 2001.
- Goud AP, Goud PT, Diamond MP, Gonik B, Abu-Soud HM: Reactive oxygen species and oocyte aging: role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med*, 44: 1295-1304, 2008.
- Guerin M, Huntley ME, Olaizola M: Haematococcus astaxanthin: Applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol*, 21: 210-216, 2003.
- Gupta RK, Miller KP, Babus JK, Flaws JA: Methoxychlor inhibits growth and induces atresia of antral follicles through an oxidative stress pathway. *Toxicol Sci*, 93: 382-389, 2006.
- Guyot MC, Hantraye P, Dolan R, Palfi S, Maziere M, Brouillet E: Quantifiable bradykinesia, gait abnormalities and Huntington's disease-like striatal lesions in rats chronically treated with 3-nitropropionic acid. *Neurosci*, 79: 45-56, 1997.
- Hag M, Hag S, Tutt P, Crook M: Serum total sialic acid and lipid associated sialic acid in normal individuals and patients with myocardial infarction and their relationship to acute phase proteins. *Ann Clin Biochem*, 30: 383-386, 1993.
- Haines-Menges BL, Whitaker WB, Lubin JB, Boyd EF: Host sialic acids: A delicacy for the pathogen with discerning taste. *Microbiol spectr*, 2015.
- Halliwell B, Gutteridge JM: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th edition, Oxford University Press; Oxford, 2007.

Halliwell B: Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 35: 1147-50, 2007.

Hamilton BF, Gould DH: Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid: a type of hypoxic (energy deficient) brain damage. *Acta Neuropathol*, 72: 286-297, 1987.

Harduin-Lepers A, Mollicone R, Delannoy P, Oriol R. The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. *Glycobiology*, 15: 805-17.

Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RB, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL, Tawfik DS. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol*, 11: 412-9, 2004.

Hasselwander O, McMaster D, Fogarty AD, Maxwell AP, Nicholls DP, Young JS: Serum paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase in chronic renal failure. *Clin Chem*, 44: 179-182, 1998.

Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, Elis A, Aviram M: Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17: 2744-52. 1997.

Higuera-Ciapara I, Felix-Valenzuela L, Goycoolea FM: Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 46: 185-196, 2006.

Hirshfield AN: Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*, 124: 43-101, 1991.

Hoyer PB, Devine PJ, Hu X, Thompson KE, Sipes IG: Ovarian toxicity of 4-vinylcyclohexene diepoxide: A mechanistic model. *Toxicol Pathol*, 29: 91-99, 2001.

Hussein G, Sankawa U, Goto H, Matsumoto K, Watanabe H: Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *J Nat Prod*, 69: 443-449, 2006.

Iwamoto T, Hosoda K, Hirano R, Kurata H, Matsumoto A, Miki W, Kamiyama M, Itakura H, Yamamoto S, Kondo K: Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by astaxanthin. *J Atheroscler Thromb*, 7: 216-222, 2000.

Jancar N, Kopitar AN, Ihan A, Virant Klun I, Bokal EV: Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development. *J Assist Reprod Genet*, 24: 91-97, 2007.

- Joseph KD: Enhanced neuroprotective effect of fish oil in combination with quercetin against 3-nitropropionic acid induced oxidative stress in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 40: 83-92, 2013.
- Kamath BS, Srikanta BM, Dharmesh SM, Sarada R, Ravishankar GA: Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Eur J Pharmacol*, 590: 387-395, 2008.
- Kaya I, Kükürt A, Karapehlivan M: Investigation of serum oxidative stress index and paraoxonase activity levels in colostrum period of dairy cows. *Int J Livest Res*, 6: 1-7, 2016.
- Kehrer JP: The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149: 43-50, 2000.
- Khatua B, Roy S, Mandal C: Sialic acids siglec interaction: a unique strategy to circumvent innate immune response by pathogens. *Indian J Med Res*, 138: 648-662, 2013.
- Khersonsky O, Tawfik DS: The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases. *J Biol Chem*, 281: 7649-56, 2006.
- Kidd P: Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential. *Altern Med Rev*, 16: 355-364, 2011.
- Kuo CL, La Du BN: Comparison of purified human and rabbit serum paraoxonases. *Drug Metab Dispos*, 23: 935-44, 1995.
- Kuru M, Merhan O, Kaya S, Oral H, Kükürt A: The effect of short term progesterone-releasing intravaginal device treatment on acute inflammation markers for Holstein heifers. *Rev Méd Vét*, 166, 336-340, 2015.
- Kuru M, Kükürt A, Oral H, Ögün M. Clinical use of progesterone and its relation to oxidative stress in ruminants. Drevensek G (Ed). *Sex Hormones in Neurodegenerative Processes and Diseases*, IntechOpen, England, 303-327, 2018.
- La Du BN: Structural and functional diversity of paraoxonases. *Nat Med*, 2: 1186-7. 1996.
- Lehmann F, Tiralongo E, Tiralongo J: Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. *Cell Mol Life Sci*, 63: 1331-54, 2006.
- Lehoux S: Redox signalling in vascular responses to shear and stretch. *Cardiovasc Res*, 71: 269-79, 2006.

- Lemarechal H, Allanore Y, Chenevier-Gobeaux C, Kahan A, Ekindjian OG, Borderie D: Serum protein oxidation in patients with rheumatoid arthritis and effects of infliximab therapy. *Clin Chim Acta*, 372: 147-53, 2006.
- Ley K: The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med*, 9: 263-268, 2003.
- Li B, Weng Q, Liu Z, Shen M, Zhang J, Wu W, Liu H. Selection of antioxidants against ovarian oxidative stress in mouse model. *J Biochem Mol Toxicol*, 31:21997, 2017.
- Lian HY, Gao Y, Jiao GZ, Sun MJ, Wu XF, Wang TY, Li H, Tan JH: Antioxidant supplementation overcomes the deleterious effects of maternal restraint stress-induced oxidative stress on mouse oocytes. *Reproduction*, 146: 559-68, 2013.
- Lindberg G, Rastam L, Gullberg B, Eklund GA, Törnberg S: Serum sialic acid concentration and smoking: a population based study. *BMJ*, 303: 1306-7, 1991.
- Liochev SI: The mechanism of "Fenton-like" reactions and their importance for biological systems. A biologist's view. *Met Ions Biol Syst*, 36: 1-39. 1999.
- Liu X, Osawa T: Cis astaxanthin and especially 9-cis astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all trans isomer. *Biochem Biophys Res Commun*, 357: 187-193, 2007.
- Lu J, Wang Z, Cao J, Chen Y, Dong Y: A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, 16: 80, 2018.
- Mackness B, Durrington PN, Mackness MI: Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol*, 31: 329-336, 1998.
- Mackness MI, Halam SD, Peard T, Warner S, Walker CH: The separation of sheep and human serum A-esterase activity into the lipoprotein fraction by ultracentrifugation. *Comp Biochem Physiol*, 82: 675-677, 1985.
- Mahmood SAF, Amin K, Rahman HS, Othman HH: The pathophysiological effects of acrylamide in Albino Wister rats. *IJMRHS*, 5: 42-8, 2016.
- Mandavilli BS, Boldogh I, Van Houten B: 3-nitropropionic acid-induced hydrogen peroxide, mitochondrial DNA damage, and cell death are attenuated by Bcl-2 overexpression in PC12 cells. *Brain Res Mol Brain Res*, 133: 215-223, 2005.
- Martin HD, Jager C, Ruck C, Schmidt M: Anti and pro-oxidant properties of carotenoids. *J Prakt Chem*, 341: 302-308, 1999.

Mazur A: An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the phosphorus-fluorophosphate bond of alkyl fluorophosphatases. *J Biol Chem*, 164: 271-83, 1946.

Mehdi MM, Rizvi SI: Human plasma paraoxonase 1 (PON1) arylesterase activity during aging: correlation with susceptibility of LDL oxidation. *Arch Med Res*, 43: 438-43, 2012.

Merhan O, Özcan A, Atakişi E, Öğün M, Kükürt A: The Effect of β -carotene on Acute Phase Response in Diethylnitrosamine Given Rabbits. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 22: 533-537, 2016.

Merhan O, Özcan A, Atakişi E, Öğün M, Kükürt A: The effect of β -carotene on acute phase response in diethylnitrosamine given rabbits. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 22: 533-7, 2016.

Merhan O: The Biochemistry and Antioxidant Properties of Carotenoids, Carotenoids, Dragan J. Cvetkovic and Goran S. Nikolic, IntechOpen, 2017.

Miki W: Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl Chem*, 63: 141-46, 1991.

Murdoch W: Inhibition by oestradiol of oxidative stress-induced apoptosis in pig ovarian tissues. *J Reprod Fertil* 114: 127-130, 1998.

Naguib YMA: Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J Agric Food Chem*, 48: 1150-1154, 2000.

Nishino H, Kumazaki M, Fukuda A, Fujimoto I, Shimano Y, Hida H, Sakurai T, Deshpande SB, Shimizu H, Morikawa S, Inubushi T: Acute 3-nitropropionic acid intoxication induces striatal astrocytic cell death and dysfunction of the blood-brain barrier: involvement of dopamine toxicity. *Neurosci Res*, 27: 343-55, 1997.

Nishino H, Nakajima K, Kumazaki M, Fukuda A, Muramatsu K, Deshpande SB, Inubushi T, Morikawa S, Borlongan CV, Sanberg PR: Estrogen protects against while testosterone exacerbates vulnerability of the lateral striatal artery to chemical hypoxia by 3-nitropropionic acid. *Neurosci Res*, 30: 303-12, 1998.

Nur G, Husunet MT, Guler I, Deveci A, Koc E, Nur O, Kilicle PA: The effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on hepatic histopathology and oxidative stress in rats treated with malathion. *Med-Science*, 7: 604-9, 2018.

Ogun M, Ozcan A, Karaman M, Merhan O, Ozen H, Kukurt A, Karapehlivan M. Oleuropein ameliorates arsenic induced oxidative stress in mice. *J Trace Elem Med Biol*, 36: 1-6, 2016.

Oto G, Ekin S, Uyar H, Ozdemir H, Yıldız D, Karakuş Y: The evaluation of serum total sialic acid and lipid-bound sialic acid levels in chronically exposed rats to 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene and fluoride. *AIPC*, 1833: 020106, 2017.

Ouary S, Bizat N, Altairac S, Menetrat H, Mittoux V, Conde F, Hantraye P, Brouillet E: Major strain differences in response to chronic systemic administration of the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid in rats: implications for neuroprotection studies. *Neuroscience*, 97: 521-530, 2000.

Ozcan A, Ogun M: *Biochemistry of Reactive Oxygen and Nitrogen Species, Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*, Sivakumar Joghi Thatha Gowder, IntechOpen, 2015.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, 87: 315-424, 2007.

Pangburn MK: Host recognition and target differentiation by factor H, a regulator of the alternative pathway of complement. *Immunopharmacology*, 49: 149-157, 2000.

Parente R, Clark SJ, Inforzato A, Day A J: Complement factor H in host defense and immune evasion. *Cell Mol Life Sci*, 74: 1605-24, 2017.

Pashkow FJ, Watumull DG, Campbell CL: Astaxanthin: A novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *Am J Cardiol*, 101: 58-68, 2008.

Patlevic P, Vaskova J, Svorc P Jr, Vasko L, Svorc P: Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. *Integr Med Res*, 5: 250-258, 2016.

Portera-Cailliau C, Hedreen JC, Price DL, Koliatsos VE: Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci*, 15: 3775-87, 1995.

Prakash M, Shetty MS, Tilak P, Anwar N: Total Thiols: Biomedical Importance And Their Alteration In Various Disorders. *Online J Health Allied Scs*, 8: 2, 2009.

Ranga Rao A, Raghunath Reddy RL, Baskaran V, Sarada R, Ravishankar GA: Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model. *J Agric Food Chem*, 58: 8553-8559, 2010.

Reed TT: Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radic Biol Med*, 51: 1302-19, 2011.

Riepe M, Hori N, Ludolph AC, Carpenter DO, Spencer PS, Allen CN: Inhibition of energy metabolism by 3-nitropropionic acid activates ATP-sensitive potassium channels. *Brain Res*, 586: 61-6, 1992.

- Rochu D, Chabriere E, Masson P: Human paraoxonase: a promising approach for pre-treatment and therapy of organophosphorus poisoning. *Toxicology*, 233: 47-59, 2007.
- Rossi R, Giustarini D, Milzani A, DalleDonne I: Cysteinylation and homocysteinylation of plasma protein thiols during ageing of healthy humans. *J Cell Mol Med* 10:1582-4934, 2008.
- Rozenberg O, Shih DM, Aviram M: Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis: possible role for its phospholipase-A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 461-467, 2003.
- Salman KA, Ashraf S: Reactive oxygen species: A link between chronic inflammation and cancer. *AsPac J Mol Biol Biotechnol*, 21: 42-49, 2013.
- Sandhir R, Mehrotra A, Kamboj SS: Lycopene prevents 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial oxidative stress and dysfunctions in nervous system. *Neurochem Int*. 57: 579-587, 2010.
- Sarada R, Ranga Rao A, Sandesh BK, Dayananda C, Anila N, Chauhan VS, Ravishankar GA: Influence of different culture conditions on yield of biomass and value added products in microalgae. *Dyn Biochem Proc Biotechnol Mol Biol*, 6: 77-85. 2012.
- Schauer R: Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol* 19: 507-514, 2009.
- Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner J: A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem*, 18: 567-579, 2007.
- Sengupta P, Banerjee R: Environmental toxins: alarming impacts of pesticides on male fertility. *Hum Exp Toxicol*, 33: 1017-39, 2014.
- Sharp PE, LaRegina MC: *The Laboratory Rat*. New York, CRC Press, 15–19, 1998.
- Shekhanawar M, Shekhanawar SM, Krisnaswamy D, Indumati V, Satishkumar D, Vijay V, Rajeshwari T, Amareshwar M: The role of 'paraoxonase-1 activity' as an antioxidant in coronary artery diseases. *J Clin Diagn Res*, 7: 1284-7, 2013.
- Shen M, Lin F, Zhang J, Tang Y, Chen WK, Liu H: Involvement of the up-regulated FoxO1 expression in follicular granulosa cell apoptosis induced by oxidative stress. *J Biol Chem*, 287: 25727-40, 2012.
- Smith AJ, Stone TW, Smith RA: Preconditioning with NMDA protects against toxicity of 3-nitropropionic acid or glutamate in cultured cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett*, 440: 294-8, 2008.

- Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN: Human serum Paraoxonase/Arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19: 2214-25, 1999.
- Soylu Karapinar O, Pinar N, Özcan O, Özgür T, Dolapçioğlu K: Protective effect of alpha-lipoic acid in methotrexate-induced ovarian oxidative injury and decreased ovarian reserve in rats. *Gynecol Endocrinol*, 33: 653-659, 2017.
- Stampfli MR, Anderson GP: How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat Rev Immunol*, 9: 377-384, 2009.
- Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland RE Jr, Chambers TM, Kiso M, Ishida H, Kawaoka Y: Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J Virol*, 74: 11825-31, 2000.
- Tu BP, Weissman JS: Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol*, 164: 341-6, 2004.
- Tunez I, Montilla P, Del Carmen Munoz M, Feijoo M, Salcedo M: Protective effect of melatonin on 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in synaptosomes in an animal model of Huntington's disease. *J Pineal Res*, 37: 252-256, 2004.
- Tuttle AM, Stampfli M, Foster WG: Cigarette smoke causes follicle loss in mice ovaries at concentrations representative of human exposure. *Hum Reprod*, 24: 1452-1459, 2009.
- Van Kuijk FJ, Holte LL, Dratz EA: 4-Hydroxyhexenal: a lipid peroxidation product derived from oxidized docosahexaenoic acid. *Biochim Biophys Acta*, 1043, 116-8, 1990.
- Varki A: Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med*, 14: 351-360, 2008.
- Vaya J, Aviram M: Nutritional antioxidants mechanisms of action, analyses of activities and medical applications. *Curr Med Chem-Immunol Endo Metabolic Agents*, 1: 99-117, 2001.
- Vimr E, Lichtensteiger C: To sialylate, or not to sialylate: that is the question. *Trends Microbiol*, 10: 254-7, 2002.
- Vlachos GD, Bartzeliotou A, Schulpis KH, Partsinevelos GA, Lazaropoulou C, Papadima C, Papastamataki M, Antsaklis A, Papassotiriou I: Maternal-neonatal serum paraoxonase 1 activity in relation to the mode of delivery. *Clin Biochem*, 39: 923-928, 2006.

Wang J, Green P, Simpkins J: Estradiol protects against ATP depletion, mitochondrial membrane potential decline and the generation of reactive oxygen species induced by 3-nitropropionic acid in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *J Neurochem*, 77: 804-11, 2001.

Wei Q, Wu G, Xing J, Mao D, Hutz RJ, Shi F: Roles of poly (ADP-ribose) polymerase 1 activation and cleavage in induction of multi-oocyte ovarian follicles in the mouse by 3-nitropropionic acid. *Reprod Fertil Dev*, 31: 1017-32, 2019.

Wijnberger LD, Krediet TG, Visser GH, van Bel F, Egberts J: Early neonatal antioxidant capacity after preexisting impaired placental function. *Early Hum Dev*, 71: 111-6, 2003.

Yamashita E: Astaxanthin as a medical food. *Funct. Foods Health Dis*, 3: 254-8, 2013.

Yang P, Huang S, Xu A. *The Oxidative Burst System in Amphioxus*, Editor(s): Anlong Xu, *Amphioxus Immunity*, Academic Press, 153-65, 2016.

Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol*, 135: 372-6, 1979.

Yuan JP, Peng J, Yin K, Wang JH: Potential health promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. *Mol Nutr Food Res*, 55: 150-165, 2011.

Zhang JQ, Shen M, Zhu CC, Yu FX, Liu ZQ, Ally N, Sun SC, Li K, Liu HL: 3-Nitropropionic acid induces ovarian oxidative stress and impairs follicle in mouse. *PLoS One*, 9: e86589, 2014.

Zhang JQ, Xing BS, Zhu CC, Shen M, Yu FX, Liu HL: Protective effect of proanthocyanidin against oxidative ovarian damage induced by 3-nitropropionic acid in mice. *Genet Mol Res*, 14: 2484-94, 2015.

Zhang X, Li XH, Ma X, Wang ZH, Lu S, Guo YL: Redox-induced apoptosis of human oocytes in resting follicles in vitro. *J Soc Gynecol Investig*, 13: 451-8, 2006.

7. ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Kastamonu'nun Araç ilçesinde doğdu. İlkokulu Samsun'un Vezirköprü ilçesine bağlı Teberük Köyü İlkokulu'nda, ortaokulu Vezirköprü İmam Hatip Lisesi'nde, liseyi Vezirköprü Anadolu Lisesi'nde, lisans öğrenimini ise Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde tamamladı. 2011 yılında Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Halen Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve bir kız çocuğu babasıdır.

