

I
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NİKOTİN VERİLEN FARELERDE ASTAKSANTİN'İN LİPİT
PEROKSİDASYONU ÜZERİNE KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Sadık ÖZTÜRK
Biyokimya Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Doç.Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN

2009-KARS

II
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NİKOTİN VERİLEN FARELERDE ASTAKSANTİN'İN LİPİT
PEROKSİDASYONU ÜZERİNE KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Sadık ÖZTÜRK
Biyokimya Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Doç.Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN

Bu Çalışma KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Tarafından Desteklenmiştir.Proje No:2008-VF-027

2009-KARS

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Sadık ÖZTÜRK tarafından hazırlanmış olan "Nikotin Verilen Farelerde Astaksantin'in Lipit peroksidasyonu Üzerine Koruyucu Etkisinin Araştırılması" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy.....ile edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:...../...../.....

Adı Soyadı

imza

Başkan :.....

Üye :.....

Üye :.....

Üye :.....

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... gün vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER	Sayfa No
Simgeler Kısaltmalar	I
Grafikler Dizini.....	II
Tablolar Dizini.....	III
Şekiller Dizini.....	IV
ÖNSÖZ	1
1.GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	3
1.1. Nikotin ve Sigara	3
1.2. Nikotinin Kimyasal Yapısı	3
1.3. Nikotinin Metabolizmasına	5
1.4. Nikotinin Toksik Etkileri	7
1.2. Serbest Radikaller	8
1.2.1. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROP) Sınıflandırılması	9
1.2.2. Nikotinin Lipit Peroksidasyonu	10
1.3. Antioksidanlar	12
1.3.1.Astaksantin Nedir?	16
2. MATERYAL METOD	18
2.1. Materyal	18
2.1.1. Kan Örneklerini Alınması	19
2.2. Tüm Kanda İndirgenmiş Glutatyon (GSH) Tayini	20
2.2.1. Deneyin Prensibi	20
2.2.2. GSH ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	20
2.2.3. Deneyin Yapılışı	20
2.2.4. GSH Sonuçlarının Hesaplanması	21
2.3. Plazmada Malonaldehit (MDA) Tayini	23
2.3.1. MDA Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	23
2.3.2. Deneyin Yapılışı	23
2.3.3.MDA Sonuçlarının Hesaplanması	24
2.4. İstatistiksel Analizler	25
3.BULGULAR	26
4.TARTIŞMA SONUÇ	29
5.ÖZET	34

6.SUMMAR

35

7.KAYNAKLAR

36

Simgeler ve Kısaltmalar

BHA	:Bütillenmis hidroksianizol
BHT	:Bütillenmis hidroksitoluen
CAT	:Katalaz
CYP	:Sitokrom P-450
GSH	:Glutatyon
GSH-Px	:Glutatyon Peroksidaz
GST	:Glutatyon-S-Transferaz
H₂O₂	:Hidrojen peroksit
HOCI	:Hipoklorik asit
kDa	:Kilo Dalton
LO	:Alkoksil radikal
LOO	:Peroksil radikal
LOOH	:Lipid hidroperoksit
MDA	:Malondialdehit
O₂	:Süperoksit radikal
OH	:Hidroksil radikali
PG	:Propil gallat
PUFA	:Doymamış yağ asitleri
ROS	:Reaktif Oksijen Türleri
SOD	:Süper Oksit Dismutaz
TBAT	:Tyobarbütik asit türevleri
TCAA	:Triklorasetik asit
SSS	:Merkezi sinir sistemi

Grafikler Dizini	Sayfa No
Grafik 2.2.1 GSH Standart Eğri Grafiği	22
Grafik 2.3.1 MDA Standart Eğri Grafiği	25
Grafik 3.1 Tam kan GSH Düzeyleri	27
Grafik 3.2 Plazma MDA Düzeyleri	28

Tablolar Dizini	Sayfa No
Tablo 2.2.1 GSH Ölçüm Tablosu	21
Tablo 2.3.1 MDA Ölçüm Tablosu	24
Tablo 3.1 Farelerde GSH ve MDA Düzeyleri	26

Şekiller Dizini	Sayfa No
Şekil 1.2.1. Nikotinin kimyasal yapısı	4
Şekil 1.2.2. Nikotinin moleküler yapısı	4
Şekil 1.3.1. Nikotinin metabolizmadaki dönüşümü	6
Şekil 1.2.2.1.Oksidatif strese antioksidan savunma enzimleri	11
Şekil 1.3.1.. Karotenoidlerin sınıflandırılması	15
Şekil 1.3.1.1.: Astaksantin kimyasal yapısı	16

ÖNSÖZ

Sigara içerdiği 55 kadar kanserojen madde nedeniyle kanserojenik ve mutajenik etkiler ortaya çıkarmaktadır. İçilen her sigara ile yaklaşık 2-3 mg nikotin ve 20-30 ml karbonmonoksit vücuda alınmaktadır. Günümüzde gelişmiş ülkelerde sigara kullanımı önlenilmekte ve buna bağlı ölüm oranları azalmaktadır. Sigara kullanımı, hematolojik, endokrin sistem kardiyovasküler ve akciğer hastalıkları ile akciğer kanseri gibi hastalıkların ortaya çıkmasında rol oynamaktadır. Bağımlılık yapan ve zarar veren diğer uyuşturucular gibi nikotinde merkezi sinir sisteminde biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonlarda olumsuz etkiler ortaya çıkarmaktadır. Günlük içilen sigara sayısına ve sigara içme süresine bağlı olarak antioksidan enzim aktivitelerinde değişiklikler meydana geldiği yapılan çalışmalarla bildirilmektedir. Doğal antioksidan olarak bilinen askorbik asit, karotenoidler ve tokoferoller en güçlü antioksidanlar diye adlandırılmaktadır. karotenoid ailesinden olan astaksantin özellikle deniz canlılarının (karides, yengeç, istakoz ve balık yumurtaları) kabuklarında doğal olarak bulunan bir pigmenttir. Bu bağlamda metabolizmanın antioksidan kapasitesi ve antioksidanlarca zengin besin maddelerinin tüketiminin önemi artmaktadır. Deniz ürünleri bakımından zengin olan ülkemizde gerek bu ürünlerin gerekse bunlardan elde edilen yan ürünlerin kullanımının oldukça ekonomik olduğunu düşünülürse, astaksantin gibi antioksidanların elde edilmesi ve kullanımı ile ilgili çalışmaların önem kazanacağı kanaatindeyiz. Bu bağlamda çalışmada deniz ürünlerinden elde edilen astaksantin farelerde nikotin ile oluşturulan oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

Eski çağlarda savaşlar ve salgın hastalıklar nedeni ile insan ömrü oldukça kısaydı, ileri yaşlara ulaşabilen insan sayısı oldukça azdı. Bundan 30-40 yıl öncesinde ülkemizde ortalama insan ömrü 60 yılın altında idi. Bugün ise doğan bir bebeğin 70 yaşının üzerine kadar yaşayabileceği hesaplanmaktadır. Geçen yüzyılda bilim ve teknoloji alanında yaşanan gelişmeler sonucunda insan ömrü 20 yıl kadar uzamış ve 65 yıla ulaşmıştır (57). Gelişmiş ülkelerde her 5-6 kişiden bir tanesinin 65-70 yaşına ulaşabildiği gözlenmektedir. İnsan ömrünün uzaması ile birlikte toplumlarda, ileri yaşlarda ortaya çıkan sağlık sorunları ve sosyal sorunlar giderek daha fazla önem kazanmaya başlamıştır. İleri yaşlarda ortaya çıkan sağlık sorunları kronik ve dejeneratif hastalıklardır. Hipertansiyon, kalp-damar hastalıkları, şeker hastalığı, beyin ve sinir sistemi hastalıkları, kas-iskelet sistemi hastalıkları ve kanser gibi hastalıklar olup, sık olarak karşılaşılan ve ölümlerin başlıca nedeni olarak bildirilmektedir (10, 55).

Hastalıklardan korunabilmenin tek yolu, hastalıkların epidemiyolojisinin aydınlatılması ile mümkün olabilmektedir. Bu epidemiyolojide başlıca çevresel ve bireysel faktörler rol oynamaktadır. Sağlıklı olmak veya hastalanmak, bu iki temel faktörün etkisi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bireysel özelliklerin, bu arada genetik faktörlerin, sağlıkla ilgili davranışların ve çevresel faktörlerin olumlu olduğu durumda hastalıklar oluşmamaktadır. Sağlıklı beslenme, düzenli egzersiz, sigara ve diğer tütün ürünlerini kullanmamak olarak ifade edilen bu kurallar "sağlıklı yaşam ilkeleri" olarak bilinmektedir. Sağlıklı yaşam ilkelerine uygun davranıldığı takdirde yukarıda sayılan hastalıkların önemli bir kısmından korunmak mümkün olmaktadır (57).

Bireysel davranışlar içinde sigara ve diğer tütün ürünlerinin kullanılması durumunda çok sayıda hastalığa yatkınlık artmaktadır. Geçtiğimiz 50-60 yıl boyunca yapılmış olan çok sayıda araştırma, sigara kullanımı ile hastalıklar arasında önemli ilişkilerin olduğunu ortaya koymaktadır (19).

1.1. Nikotin ve Sigara

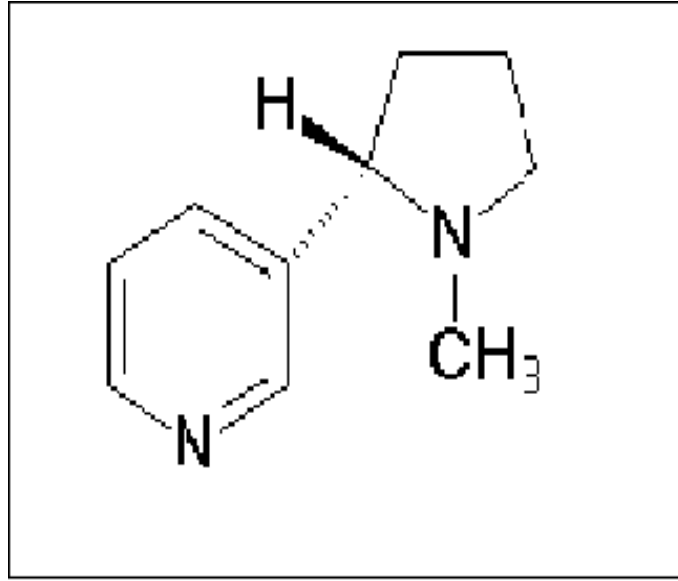
İlk defa 1828'de izole edilen nikotin organik yapılı bir bileşiktir. Doğal olarak tütün bitkisinin yapraklarında yüksek yoğunlukta bulunan nikotin, yanmış tütünün distilasyonu ile elde edilmektedir. Bununla birlikte, nikotin düşük miktarlarda *Solanaceae* familyasından domates, patates, patlıcan ve yeşil biberde de bulunmaktadır (68).

Sigara içmek dünyada yaygın bir sağlık problemi olarak bilinmektedir. Sigara dumanında bağımlılık yapan asıl vazoaktif madde nikotindir. Nikotin vücuttaki kolinerjik reseptörleri etkileyerek birçok kardiyovasküler ve toksik etkilere karşı tolerans oluşumuyla birlikte karışık bir doz-yanıt ilişkisini sergilemektedir (69).

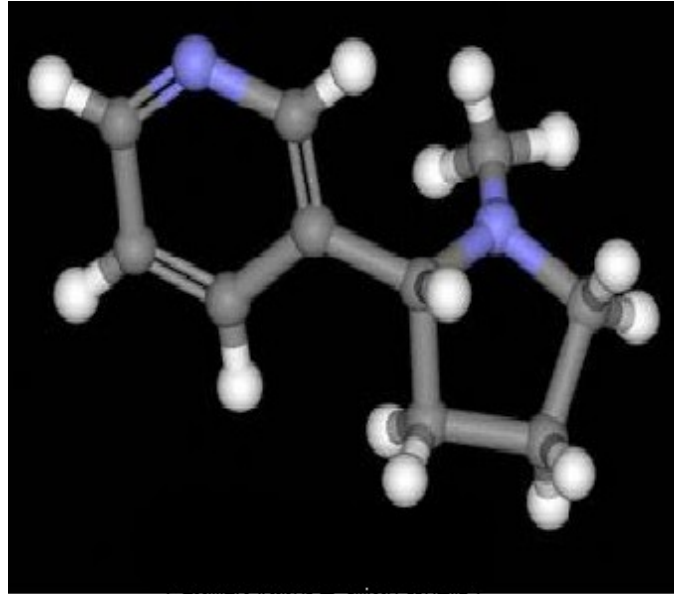
1.2 Nikotinin Kimyasal Yapısı

Nikotin, üçüncü dereceden aminlerden meydana gelen piridin ve pirolidin zincirlerinden oluşmakta ve iki tane stereoizomeri bulunmaktadır. Aktif izomeri kolinerjik reseptörlere bağlanan ve sigarada bulunan S-nikotindir. R-nikotin ise, kolinerjik reseptörlerin zayıf bir agonistidir. R-izomer total nikotinin sadece %0.1-0.6'sı kadardır (30, 69).

Nikotin suda çözünebilir ve doğranmış tütün yapraklarının bir bardak suda 12 saat ekstraksiyonu ile elde edilebilir, renksiz, buharlaşabilen, oksidasyonu sonucu kahverengiye dönüşen ve yanmış tütün gibi kokan sıvı bir alkaloid'tir. Nikotinin molekül ağırlığı 162.23 kDa'dır. Atmosferik basınçta 246 °C'de kaynamakta, su, eter ve alkol'de çözünebilmektedir (70).



Şekil 1.2.1 Nikotinin kimyasal formülü (69)



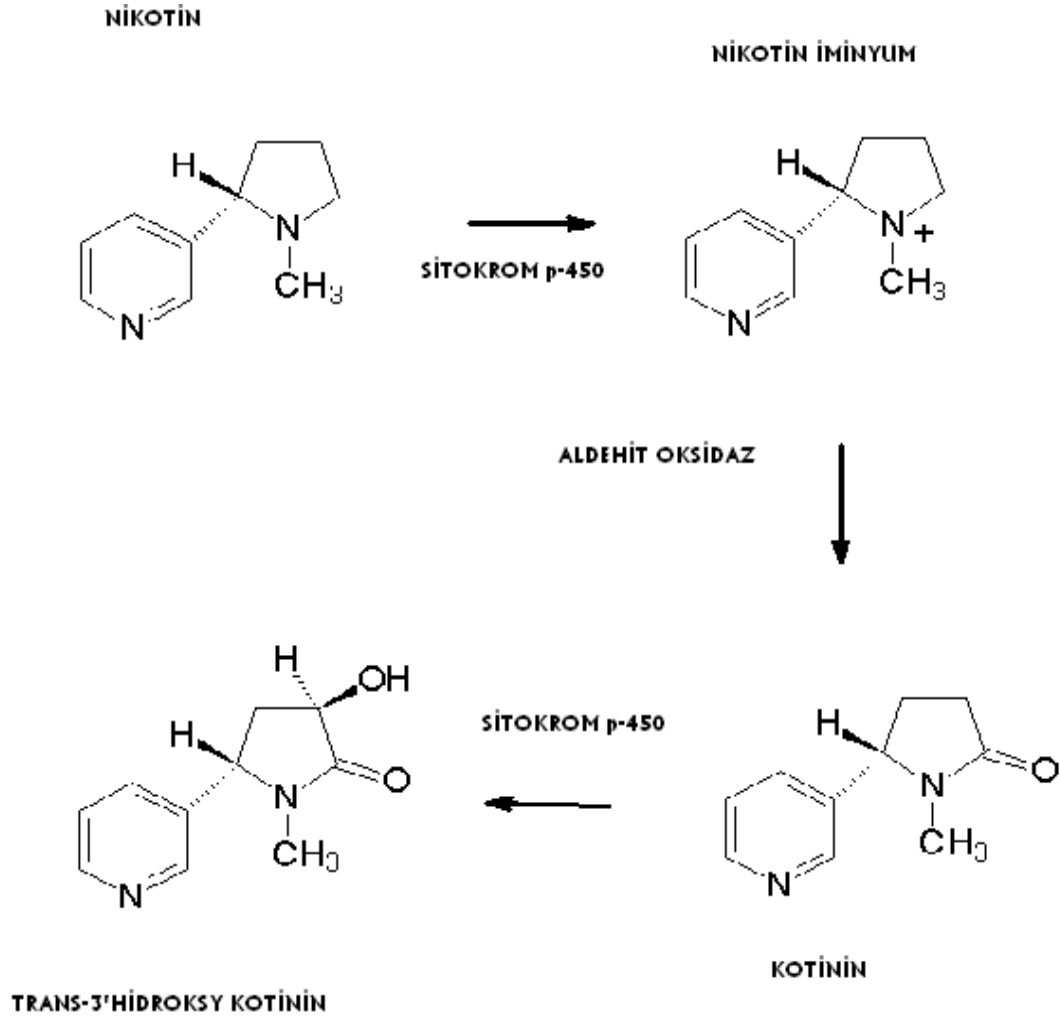
Şekil 1.2.2 Nikotinin moleküler yapısı (70).

Nikotin su ve yağda çözünebilme özelliğine sahip olduğundan, vücuda alındığında kanla hızlı bir şekilde yayılabilmekte ve kan-beyin bariyerini rahatlıkla geçebilmektedir. Serbest formu solunumla, dokulardan, deriden ve gastro intestinal sistemden absorbe olabilmektedir. Alkali çözeltilerde noniyonize durumda bulunduğundan, deri ve mukoz membranlardan kolaylıkla geçebilmektedir. Nikotinin en çok karaciğer, böbrek ve akciğere, en az ise adipoz dokuya yatkınlığı bulunmaktadır (70).

1.3 Nikotinin Metabolizması

Nikotinin hücresel membranlardan geçişi ortamın pH'sı ile yakından ilişkilidir. Asidik pH'da iyonize olan nikotin, hücre membranlardan geçemez. Fizyolojik pH'da ise nikotinin % 23-31'i noniyonize halde olup biyolojik membranları kolaylıkla geçebilmektedir (12). Solunum yoluyla alınan nikotin, 5 dakika içerisinde maksimum konsantrasyona ulaşmaktadır. Nikotinin dağılım yarı ömrü 7-10 dk. olup, eliminasyon yarı ömrü ise 1-4 saattir. Akciğerlerden beyne geçişi ise, 7-10 sn. içerisinde olmaktadır (12, 30). Nikotinin düşük dozları nikotinik reseptörlerini aktive ederek adrenalini salgılanmasını artırmaktadır. Artan adrenalin miktarı, solunum sayısını, kan basıncını ve kan glikoz düzeyini artırmaktadır. Yüksek dozda alınan nikotin ise asetil kolin reseptörlerini bloke ederek, toksik etki göstermektedir. Yine, nikotinin insektisit etkisi de asetil kolin reseptörlerinin bloke edilmesinden kaynaklanmaktadır (68, 70).

İnsanlarda, nikotinin yaklaşık %70-80'i kotinine dönüşmektedir. Bu dönüşüm iki aşamada olmaktadır. İlk aşamada nikotin, sitokrom p-450 (CYP) enzim sistemi ile nikotin iminyum iyonuna, ikinci aşamada ise aldehit oksidaz ile kotinine dönüşmektedir (30, 69).



Şekil 1.3.1 Nikotinin metabolizmadaki dönüşümü (65).

Oluşan kotinin; nikotinin ana metaboliti olup, hem aktif hemde pasif içicilerde sigaranın etkisinin belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Kotinin; kotiniglukuronid, 3-hidroksi kotinin ve 3-hidroksi kotinin glukuronide metabolize olabilmekte ve %10'u değişmeden idrarla atılmaktadır. Plazma total kotininin konsantrasyonunu hesaplarken, bu dört metaboliti toplanmaktadır (5, 16, 69).

Kotininin yarı ömrü nikotinden daha uzun olup, kan dolaşımında kalma süresi 48-96 saat'tir. Nikotine göre, kan kotinin düzeyi daha etkili olduğundan dolayı nikotinin etkisinin bir göstergesi olarak kotinin kabul edilmektedir. Yine kan ve tükürkte de kotininini tespit etmek mümkün olmaktadır (11, 40, 54).

1.4 Nikotinin Toksik Etkileri

Nikotinin, 60 mg'ı bir erişkini birkaç dakika içinde solunum felci sonucu öldürebilmektedir. Nikotinin hepsi içiciye geçmez veya insanı öldürecek kadar yeterli bir sürede emilmez. Düşük dozda nikotin toksisitesinin bulguları; bulantı, kusma, salivasyon, periferik vazokonstriksiyona bağlı soluk almada zorluk, güçsüzlük, barsak hareketlerinin artışına bağlı karın ağrısı, diyare, soğuk terleme, baş ağrısı, kan basıncında artma, taşikardi, tremorlar, baş dönmesi, dikkat toplamada güçlük, konvüzyon ve duyuşal bozukluklardır (28, 40).

Ayrıca, nikotin derin uykuda (REM uyku) azalmaya yol açmaktadır (28). Kanserin asıl nedeni sigaradaki diğer kimyasallar ve nikotindir. Nikotin metabolitleri; N-nitrozonornikotin ve 4-(N-metil-N-nitrozamin)-1-(3-pridil)-1-bütanon sigara dumanındaki başlıca kanserojenlerdir (9).

Nitrozamin yapılı metabolitleri, DNA iplikçiklerinde belirgin kırılmalara neden olmaktadır. Vitamin E ve β -karotenin, DNA kırılmalarına karşı önemli bir koruyucu etki sağladığı bildirilmektedir (11, 45). Yine, oksijen radikallerini uzaklaştıran SOD (Süper oksit dismutaz), CAT (Katalaz) gibi enzimleri DNA hasarını azaltmaktadır (11).

1.2. SERBEST RADİKALLER

Bir ya da daha fazla sayıda ortaklanmamış elektrona sahip element veya bileşiklere “serbest radikaller” denilmektedir (26). Serbest radikallerdeki ortaklanmamış elektronlar, daha kararlı geçerken, kararlı halde bulunan bir bileşikten elektron alarak, bu bileşiği ise serbest radikal haline dönüştürmektedirler. Serbest radikallerin başlattığı bu zincirleme reaksiyonlar dizisi, antioksidanlar tarafından durduruluncaya kadar devam etmektedir (40).

Oksijen, yaşam için vazgeçilmez bir molekül olmasına rağmen aynı zamanda vücut içinde reaktif oksijen (ROS) türlerinin oluşmasına neden olmaktadır. ROS metabolizmaya zarar verebilecek bir dizi reaksiyonu başlatmakta ve bunlar canlı için aynı zamanda bir tehdit unsuru haline gelmektedir. Organizmada serbest radikaller gerek normal metabolik faaliyetlerin bir yan ürünü olarak, gerekse radyasyon, ilaçlar ve diğer zararlı kimyasalların etkisi ile oluşmaktadır. Metabolizma yan ürünleri olarak süperoksit anyonları ($\cdot\text{O}_2$, $\text{O}_2\cdot$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) gibi mutajenler meydana gelir. Ayrıca NADPH oksidaz gibi bazı enzimler küçük miktarlarda ROS üretilmektedir. Hücre içi ROS'un %90'dan fazlası aerobik solunum reaksiyonları zincirinde mitokondrinin iç membranında üretilmektedir (6, 23, 72). İki tarafı keskin bir bıçak gibi kabul edilen ROS, düşük dozlarda çeşitli stres tepkilerinde arabulucu gibi rol oynarken, yüksek dozlarda (oksidatif stres gibi) hücrel zararlar yol açmaktadır (43, 44). Oksidan ve mutajen özellikte olan bu metabolizma yan ürünleri DNA, proteinler ve diğer makromoleküller de hasara, hücrelerin ölümüne neden olarak kronik hastalıkların oluşumuna neden olmaktadır (36).

1.2.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Sınıflandırılması

Doymamış yağ asitlerinin alil grubundan bir hidrojen çıkarsa lipid radikali meydana gelmektedir. Oluşan lipit radikali oksijen ile reaksiyona girmekte ve lipit peroksi radikalini oluşturur. Lipit peroksit radikali diğer lipitlerle zincir reaksiyonu başlatmak ve lipit hidroperoksitler oluşturmaktadır. Ortamda bulunan demir ve bakır iyonları lipid peroksidasyonunu hızlandırmaktadır. Lipit radikalleri yüksek derecede sitotoksik ürünlere de dönüşebilmektedir. Bunlar arasında en çok bilineni ürün aldehid grubundan olan malondialdehid (MDA)'tir (36, 39).

1 - Radikaller:

Süperoksit radikal (O_2^-)

Hidroksil radikal (OH^-)

Alkoksil radikal (RO^-)

Peroksil radikal (ROO^-)

2 - Radikal olmayanlar:

Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Lipid hidroperoksit (LOOH -)

Hipoklorik asit (HOCl -)

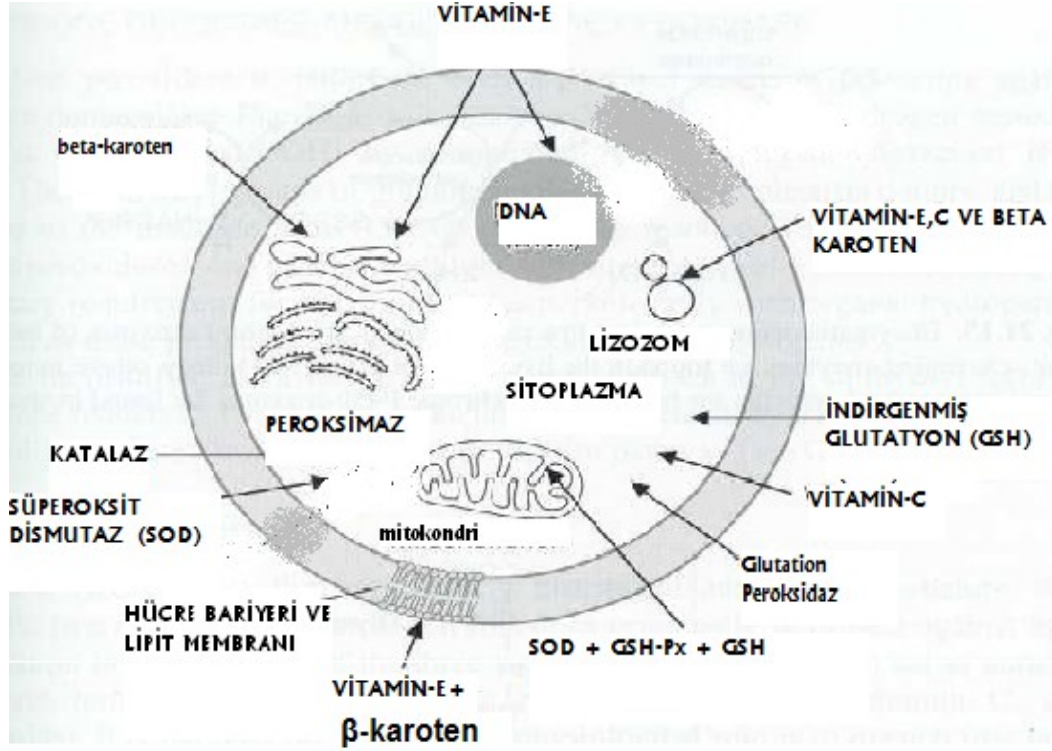
3 - Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)

H_2O_2 membranlardan kolaylıkla diffüze olup, hücreler üzerinde bazı fizyolojik etkilere sahiptir. Fakat ortaklanmamış elektrona sahip olmadığından radikal olarak adlandırılmamaktadır. Bu nedenle ROS terimi süperoksit gibi radikaller ve hidrojen peroksit gibi radikal olmayan yapılar için ortak olarak kullanılan bir ifadedir (49). Oksijen molekülü, orbitalinde ortaklanmamış elektron taşıyorsa süperoksit radikali olarak adlandırılmaktadır. Diğer ROS grubunda ise normal oksijenden çok daha hızlı bir biyolojik molekül olan "singlet oksijen" bulunmaktadır. Singlet oksijen molekülü yapısında iki adet ortaklanmamış elektron taşımaktadır. Singlet oksijen hücre membranındaki uzun zincirli doymamış yağ asitleriyle doğrudan reaksiyona girerek lipit peroksitlerin oluşumuna yol açmaktadır (26).

1.2.2. Nikotin ve Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıkların patojenezinde önemli bir faktördür. Etanol ve kokain gibi bağımlılık yapıcı maddeler, glutasyonu (GSH) azaltarak veya lipit peroksidasyonunu artırarak oksidatif stresi indüklemektedirler. Her iki etki de mitokondriyal fonksiyonları etkilemektedirler. Bu nedenle nikotin verilen sıçanların karaciğer, akciğer ve beyinlerinde, mitokondriyal ve mikrozomal yapılarında TBAT (Tiyobarbitürik Asit Türevleri) seviyeleri artmakta, ancak 4-HNE (4-hidroksinonenal) spesifik GST (Glutasyon-S-Transferaz) aktivitesi ise sadece mitokondriyal fraksiyonda indüklenmektedir. Sitozolik fraksiyonlarda ise bu indüklenme olmamaktadır. Genel olarak oksidatif stres GSH seviyelerinde azalmaya, lipit peroksidasyonda ve GST aktivitelerinde artışa neden olmaktadır (6, 32) Nikotin verilmesinin perifer ve santral sinir sisteminde ROS'nin oluşumu ile indüklenen oksidatif strese yol açtığı bildirilmektedir (32, 33, 52, 70).

Oksidatif stres deyimini araştırmacılar tarafından, prooksidan/antioksidan dengesinde potansiyel hasara öncülük eden dengesizlik olarak ifade etmekte ve antioksidan seviyelerindeki azalmanın sonucu olarak ROS veya reaktif azot türlerinin düzeylerinin artışından kaynaklandığı bildirilmektedir (40). Karaciğer ve Akciğerler oksidatif hasara karşı oldukça duyarlı organlardır. Yine karaciğer reaktif metabolitlerin tutulmasında ve eliminasyonunda sorumlu bir organdır. Hepatik GSH ilaçların detoksifikasyonunda ve ROS temizlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Glutasyon doğrudan ROS ve elektrofilik metabolitler ile reaksiyona girmekte ve yararlı tiyol gruplarını oksidasyondan kormaktadır. Doku hasarı ve hücrel savunma sisteminin azaldığı durumlarda karaciğer % 20 ve daha fazla oranda GSH tüketiminin yapıldığı bir organdır (6, 18, 40).



Şekil 1.2.2.1 Oksidatif streste antioksidan savunma enzimleri (37).

Antioksidanlar, oksidatif stresin indüklediği dejeneratif hastalıklarda son derece önemlidir. Vitamin-E veya α -tokoferol'ün lipit peroksidasyona karşı önemli biyolojik antioksidanlardan biri olduğuna inanılmaktadır. Birçok çalışma, doku hasarındaki lipit peroksidasyon aracılı serbest oksijen radikaline karşı koruyucu rolünün olduğuna dikkat çeker. Çalışmalar akut sigara içiminin, plazma lipoproteinleri üzerinde oksidatif stres oluşturduğunu ve hem sigara içicilerinde hemde içmeyenlerde vitamin-E, C ve karotence zengin diyetler ve lenfositler DNA'daki endojen oksidatif hasarı önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Şekil 1.2.2.1)(32, 33, 37, 47).

1.3. Antioksidanlar

Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan serbest radikallere karşı vücutta doğal bir savunma mekanizması oluşturan bileşiklere “antioksidanlar” adı verilmektedir. Antioksidanlar doğal ve doğal olmayan antioksidanlar olarak 2 gruba ayrılır (24, 36).

Doğal antioksidanlar arasında enzimler (SOD, CAT, GSH-Px, sitokrom-C-oksidad, hidroksiperoksidaz), makromoleküller (seruloplazmin, transferrin, ferritin, myoglobin, haptoglobilin) ve mikromoleküller (β -karoten, Vitamin-A, Vitamin-C, tokoferoller, tiol içerenler, GSH, N-asetil sistein, metionin, kaptopril, ubikinon) sayılabilir (29).

Doğal olmayan antioksidanlar, bütillenmiş hidroksianizol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve propil gallat (PG) gibi doğal olmayan antioksidanlar ise endüstriyel üretimlerde gıdaların oksidasyonunu önlemek ve raf ömrünü uzatmak için kullanılan sentetik maddelerdir (25).

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirmektedirler;

1. Süpürme etkisi: Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirirler. Antioksidan enzimler ve bazı mikromoleküller bu yolla etki eder.

2. Söndürme etkisi: Oksidanlara bir hidrojen molekülüne aktarılarak inaktive etmesine denir. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol gibi maddeler bu grupta yer almaktadır.

3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi: Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır metaller oksidanları kendilerine bağlayarak etkisiz hale getirirler.

4. Onarma etkisi: Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar (29).

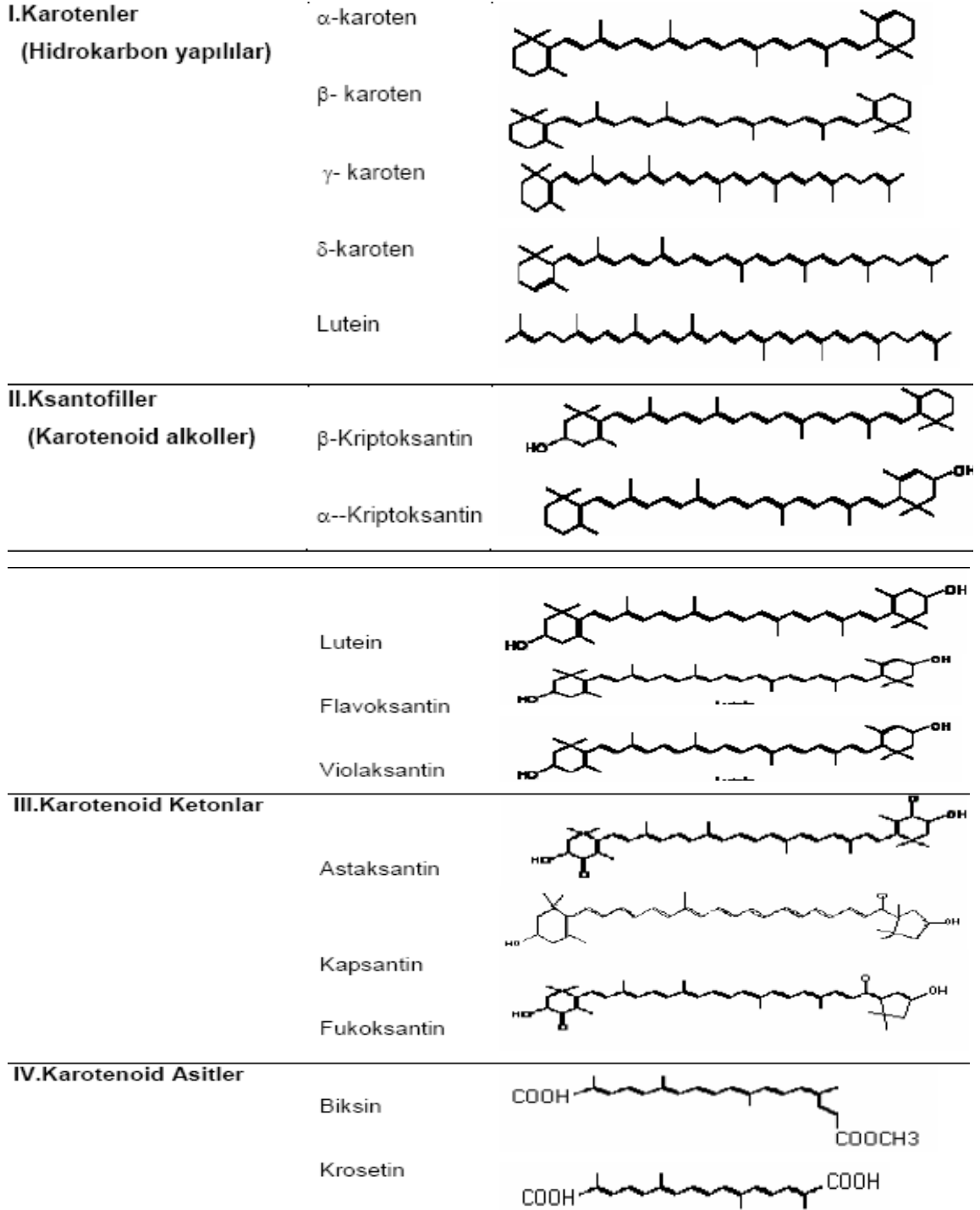
Mitokondriyel sitokrom sistemi, sitozoldaki organelleri oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır. Bu sistemin yetersizliğinde doğal enzimler devreye girmektedir. Doğal enzimler tarafından etkisiz hale getirilemeyen oksidanlar hücre membran lipitlerinde 'Lipit Peroksidasyonunu' başlatmaktadır. Lipid peroksidasyonu, hücre membranlarında bulunan uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur ve sonuçta ortaya çıkan biyo-aktif aldehitler hücre hasarına neden olmaktadır (48, 51).

Tokoferoller (Vitamin-E), askorbik asit (Vitamin-C), karotenoidler, bioflavonoidler ve retinoidler karasal kaynaklı ürünlerde ve alglerde bulunan antioksidan maddelerdir. Tokoferollerin antioksidan aktivite özellikleri singlet oksijeni süpürme kapasitesi $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ tokoferole doğru gittikçe azalır (36). İnsan vücudunda tokoferol sentezlenemediği için dışarıdan alınmak zorundadır. Vücuda alınan tokoferoller ince barsakta emilir ve lenf yolu ile dolaşıma katılır. Vitamin-E antioksidan özelliği, serbest radikallerin başlattığı lipid peroksidasyonunu inhibe etmesinden ileri geldiği bildirilmektedir (22).

Suda çözünebilen bir vitamin olan Vitamin-C vücut sıvısında askorbat olarak bulunmaktadır. Vitamin-C elektron vererek dehidroaskorbik asite okside olmakta ve superoksit, hidrojen peroksit, hipoklorit, hidroksil radikali, peroksil radikalleri ve singlet oksijen radikallerini süpürücü etki gösterir. Vitamin-C lipit peroksidasyonunu başlatmadan peroksil radikallerini su fazında inhibe ederek, biyolojik membranları peroksidatif hasardan koruduğu bildirilmektedir (16, 29, 47).

Diğer önemli antioksidan maddeler arasında karotenoidler yer almaktadır. Karotenoidler; fitoplanktonlar, algler, bitkiler ile sınırlı sayıdaki mantar ve bakteriler tarafından üretilen, 700'ün üzerinde yağda çözünebilir organik maddelerdir (2). Karotenoidler havuç, domates, greyfurt, portakal, ıspanak gibi sebze ve meyvelere kırmızı, turuncu, sarı ve yeşil renklerini veren maddelerdir. Alglerin fotosentetik pigmentleri arasında yer alan karotenoidler fotosentez işleminde aktif olarak rol almamaktadır. Bu nedenle karotenoidler alglerde aksesuar pigmentler arasında kabul edilmekte ve pek çok alg grubunda yaygın olarak bulunmaktadır (3).

Karotenoidleri merkezi iskeleti 8 izoprenoid ünitesinin yan yana dizilmesiyle meydana gelmektedir. Genel formülleri $C_{40}H_{56}$ 'dır (3, 17). Yapılarında çok sayıda çift bağ bulundurmaktadır. Yapılarındaki çift bağlar, cis ya da trans izomeri oluşturabilme özelliğine sahiptir. Doğada genellikle trans izomeri formunda bulunmaktadır (17). Karotenoidler çeşitli özelliklerine göre; karotenler, ksantofiller, karotenoid ketonlar ve karotenoid asitler olarak dört ana grupta adlandırılmaktadırlar (Şekil 1.3.1) (3).

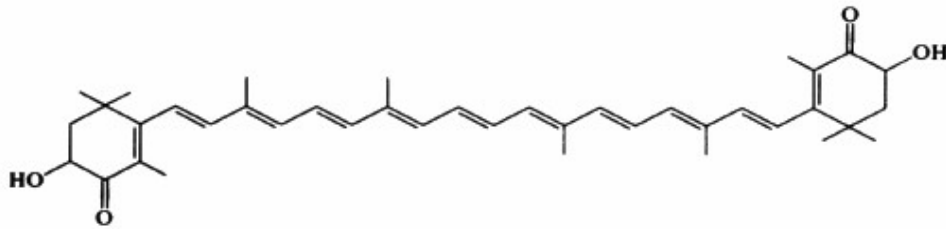


Şekil 1.3.1 Karotenoidlerin Sınıflandırılması (3).

1.3.1 ASTAKSANTİN

Mikroalgler; balık türlerinin büyüme safhalarında kullanılan önemli besin kaynağıdır. Bunun yanı sıra bazı krustase ve balık türlerinin juvenil ve larva safhalarında tükettiği zooplankton kültüründe besin kaynağı olarak kullanılmaktadırlar. Bu nedenle mikroalgler su ürünleri yetiştiriciliğinin olmazsa olmazlarından. Yine insan sağlığına olumlu etkileri nedeni ile halen insanlar tarafından yaygın bir şekilde tüketilen başlıca iki türün (*Spirulina* ve *Chlorella*) tabletleri dünya sağlıklı gıdalar pazarında yer almaktadır. Antioksidan etkiye sahip olan, astaksantini hücresi içerisinde yüksek miktarda biriktirme özelliğine sahip olan *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*)'in kapalı sistemlerde (panel ya da tübüler fotobiyoreaktörler) üretimi yapılmaktadır (53)

Karotenoidlerin keton ailesinden olan astaksantin özellikle deniz canlılarının (karides, yengeç, istakoz ve balık yumurtaları) kabuklarında doğal olarak bulunan kırmızı renkli bir pigment olup, hücre membran yapısının korunmasında etkili bir mekanizmaya sahip olduğu bildirilmektedir (25, 62, 63). Bazı canlılar renk pigmenti yönünden oldukça zengindirler. Astaksantin içeren *Haematococcus pluvialis* bir *Chlorophyte* alg türünden olup, organizmasında en yüksek düzeyde astaksantin biriktirmektedir (64).



Şekil 1.3.1.1 Astaksantin Kimyasal Yapısı (3)

Astaksantin diğer karotenoidlerden gore ısıya karşı dayanıklı olup, renk değişikliği gostermemektedir. Diğer antioksidanlara kıyasla yapısında oksijen içermesi ve lipofilik olması nedeniyle kan beyin bariyerini kolaylıkla geçebilmektedir ve santral sinir sistemi ile beyin hücrelerini koruyucu etki gosterdiği bildirilmektedir (53, 61).

Mitokondrium içinde gerçekleşen birden fazla oksidatif reaksiyon sonucunda oluşan serbest oksijen radikalleri hücrede oksidatif hasara neden olduğu bildirilmektedir (23).Yapılan çalışmalarda astaksantinin sıçan karaciğer hücrelerinde gerçekleşen peroksidasyona karşı Vit.-E'den 100 kat daha iyi koruduğu bildirilmiştir (4, 46, 53).

2. MATERYAL ve METOT

2.1 Materyal

Çalışma 14.05.2009 tarih 17 sayılı Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (KAÜHADEK) Başkanlığının verdiği izninden sonra yapılmıştır.

Çalışma materyalini *ad libitum* beslenen 30-35 gr. ağırlığında, 5-6 haftalık toplam 28 adet Swiss Albino erkek fare ile oluşturuldu. Uygulamaya başlamadan önce 4 gruba ayrılarak 10 gün süreyle adaptasyonları sağlandı. Denekler kontrol (K), Nikotin (N), Astaksantin (AS) ve Astaksantin+Nikotin (AS+N) grubu olmak üzere 4 eşit gruba (n=7) ayrıldı.

Konrol Grubu (K) : Çalışma süresince kontrol grubuna intra peritoneal (İ.P.) serum fizyolojik uygulandı.

Nikotin Grubu (N) : 0.45mg/kg/gün nikotin 20 gün süre ile günde 2 kez (12 saat aralıklarla) İ.P. uygulandı.

Astaksantin Grubu (As) : 80 mg/kg/gün astakantin 20 gün süre ile günde 2 kez (12 saat aralıklarla) İ.P. uygulandı.

Astaksantin+Nikotin Grubu (As+N) : 0.45 mg/kg/gün nikotin + 80 mg/kg/gün astaksantin 20 gün süre ile günde 2 kez (12 saat aralıklarla) İ.P. uygulandı.

Analizlerde Kullanılan Cihazlar

1. Spektrofotometre (UV-1201, Shimadzu)
2. Santrifüj (Heraeus christ)
3. Etüv (nüve)
4. Su Banyosu (SB100,Nüve)
5. Otomatik Pipetler
6. Hassas terazi (Scatec)
7. Vorteks (labinco-524)
8. Saf su cihazı (Heridolpph,type-mon,Dst-3000)
9. Manyetik karıştırıcı (Labinco-532)
10. Derin dondurucu (Salow Environmental Equip.Co.)

Analizlerde Kullanılan Kimyasallar

1. 5,5' (2-ditiobis nitrobenzoik asit) (DTNB) (Sigma)
2. GSH standardı (Sigma)
3. Tiyobarbütirik asit (Merck)
4. n-bütanol (Merck)
5. Metafosforik asit (Merck)
6. Triklorasetik asit (Merck)
7. 1,1,3-3- tetraetoksipropan (Merck)
8. NaCl (Sigma)
9. Etilenditriлотetraasetikasit (EDTA) (Merck)
10. Nikotin (Sigma)
11. Astaksantin (Sigma)

2.1.1 Kan Örneklerinin Alınması

Uygulama sonunda farelerden, heparin'li tüplere intrakardiyak olarak kan örnekleri alındı. GSH tayini için tam kan ayrıldı. Kalan kanlar MDA tayini için 3000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Elde edilen plazma ve tam kanlar ölçümleri yapıncaya kadar -25°C' de derin dondurucuda saklandı.

2.2. Tüm Kanda GSH Tayini

Tam kanda GSH tayini Beutler ve ark'nın.(7) bildirdiği metoda göre yapıldı.

2.2.1. Deneyin Prensibi

EDTA'lı kanın distile su ile hazırlanan hemolizinde, sülfhidril(-SH) grupları taşımayan tüm proteinler çöktürülür. GSH düzeyleri, elde edilen berrak sıvıda -SH gruplarının DTNB (5,5'-2-ditiobis nitrobenzoik asit) ile oluşturduğu sarı renkli komplekslerin 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmesiyle elde edilir.

2.2.2. GSH Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

a. Çöktürücü Çözelti

1,67 g metafosforik asit, 0,2 g etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) ve 30 g NaCl alınarak hacmi 100 ml'ye tamamlandı(Bu çözelti +4° C'de 3 hafta dayanıklıdır).

b. Fosfat Çözeltisi

53,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bir miktar distile suda çözülerek hacmi litreye tamamlandı. (Bu çözelti + 4° C' de uzun süre dayanıklıdır).

c. DTNB Çözeltisi (Ellman's çözeltisi)

40 mg DTNB alındı ve % 1 'lik sodyum sitrat ile hacmi 100 ml' ye tamamlandı.

2.2.3. Deneyin Yapılışı

Kör, standart ve test tüpleri alındı. Test tüpüne, 200 µl EDTA'lı kan, standart tüpüne 200 µl standart çözeltisi 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 devirde 10 dk santrifüj edildi. Kör tüpü aynen alındı, standart ve test tüplerinden 2 ml süpernatant diğer tüplere aktarıldı. Tüm tüplere 8 ml fosfat

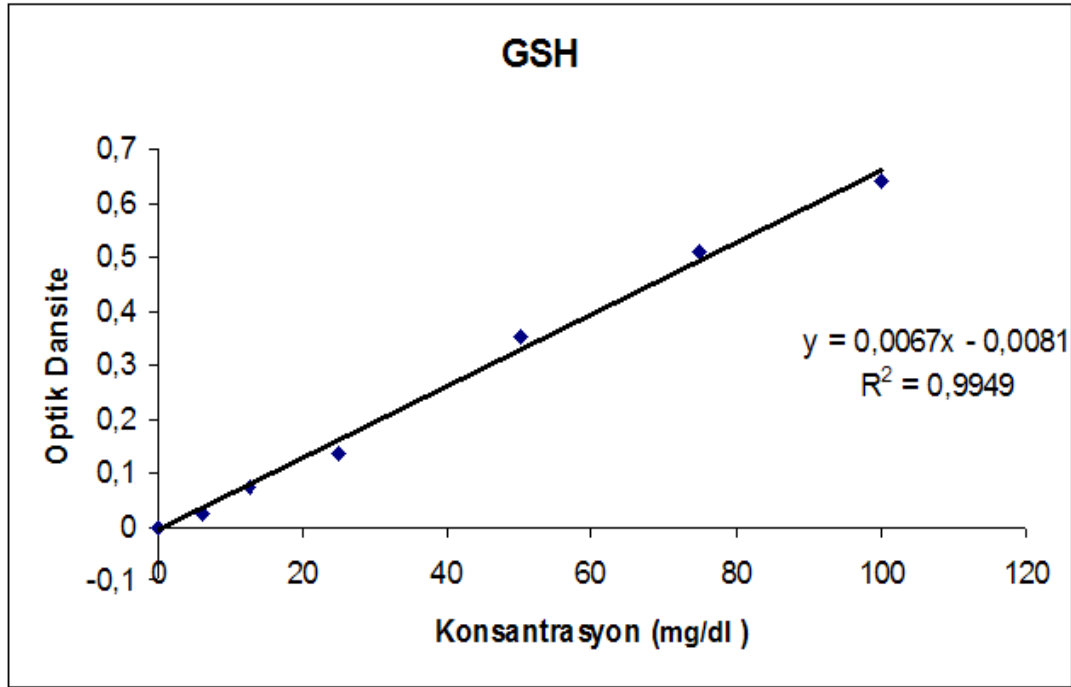
çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı. Tekrar 1 ml DTNB eklenerek 412 nm dalga boyunda köre karşı tüm tüplerin optik dansitesi okundu. Hazırlanan standart grafikten GSH düzeyleri mg/dl olarak hesaplandı.

Tablo 2.2.1 GSH Ölçümü

	KÖR	STANDART	TEST
EDTA'lı Kan	-	-	200µl
Standart		200µl	-
Distile Su	800µl	1800µl	1800µl
Çöktürücü Çözelti	1.2ml	3ml	3ml
Buzlu suda 5 dakika bekletildikten sonra 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek başka tüplere süpernatantdan 2 ml aktarıldı.			
Fosfat Çözeltisi	8ml	8ml	8ml
	Karıştırıldı		
DTNB	1ml	1ml	1ml
412 nm'de tüplerin optik dansiteleri köre karşı okundu.			

2.2.4. GSH Sonuçlarının Hesaplanması

Standart GSH çözeltisinden 20, 40, 60, 80, 100 mg/dl dilüsyonlar hazırlanarak standart grafiği çizildi. Standart GSH grafiğinden ölçümü yapılan numunelerin absorbansları değerlendirilerek mg/dl olarak GSH düzeyleri hesaplandı.



Grafik 2.2.1 GSH Standart Grafiği

2.3. Plazmada Malondialdehit (MDA) Tayini

Plazma MDA tayini Yoshiko ve ark.'nın (66) bildirdiği metoda göre yapıldı.

2.3.1. MDA lmde Kullanılan zelteler

a. Triklorasetik asit (TCAA) (% 20' lik)

20 g TCAA alınarak bir miktar distile suda çözüldü ve distile su ile hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

b. Tiyobarbütirik asit (TBA) (% 0,67)

1,675 g TBA alınarak bir miktar distile suda çözüldü ve hacmi 250 ml'ye tamamlandı.

2.3.2. Deneyin Yapılışı

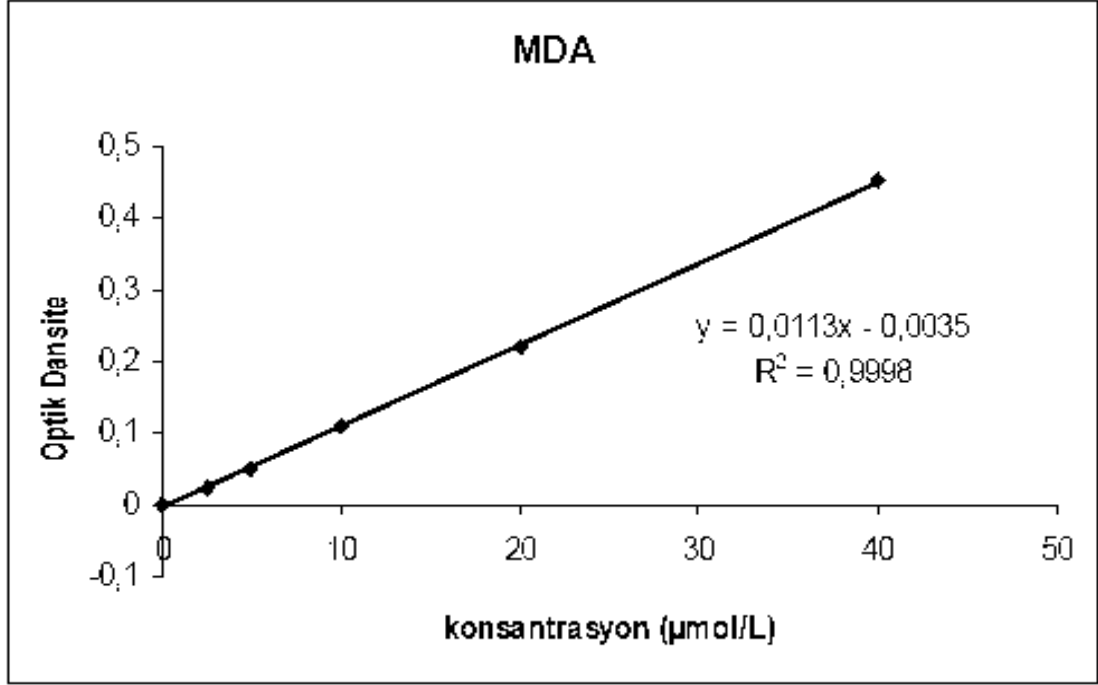
Kr ve test olarak işaretlenen 10 ml'lik kapaklı cam tüpler kullanıldı. Test tüpüne 0.5 ml plazma alındı. Kr tüpüne 3 ml, test tüpüne ise 2,5 ml %20'lik TCAA ilave edildi. Daha sonra 1 ml TBA eklenerek tüpler 90°C'lik su banyosunda 30 dk süreyle kaynatıldı. Soğutulan tüplere 4 ml n-butanol eklendi. Vortekslenen tüpler 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. stte oluşan renkli n-bütanol tabakasının 535 nm'de köre karşı spektrofotometrik olarak absorbansları okundu. Okunan absorbansların MDA için çizilen standart grafikten değerleri $\mu\text{mol/L}$ olarak hesaplandı.

Tablo 2.3.1 MDA Ölçümü

	KÖR	TEST
Plazma	--	500 µl
TCAA	3 ml	2.5 ml
TBA	1 ml	1 ml
90 °C' de 30 dk kaynatılan tüpler su altında soğutuldu.		
N-BÜTANOL	4 ml	4 ml
3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi.		
N-bütanol tabakası 535 nm'de köre karşı okundu		

2.3.3. MDA Sonuçların Hesaplaması

0,494 ml 1,1,3,3,- tetraetoksipropan 100 ml etil alkolde çözülerek 20 mmol/L' lik stok standart çözelti hazırlandı. Stok standart çözeltiden 0,1 ml alınarak hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Bundan 20 µmol/L' lik standart çözelti elde edildi. Bu çözeltiden 2.5-5-10-20-40 µmol/L'lik dilüsyonlar hazırlanarak MDA standart grafiği çizildi.



Grafik 2.3.1 MDA Standart Grafiği

2.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Elde edilen verilerin istatistik analizleri SPSS paket programı (SPSS 10.0 for Windows) kullanılarak yapıldı. Farklılık gözlenen uygulamalara DUNCAN testi uygulandı. Sonuçlar; Ortalama±standart hata (Ort±SE) olarak verildi.

3. BULGULAR

Çalışmadan elde edilen plazma MDA ve GSH değerlerine ait bulgular ve istatistiksel önemleri tablo 3.1'de bulguların istatistiksel değerlendirilmesi ise ile grafik 2.2.1., grafik 2.3.1.'de gösterilmiştir.

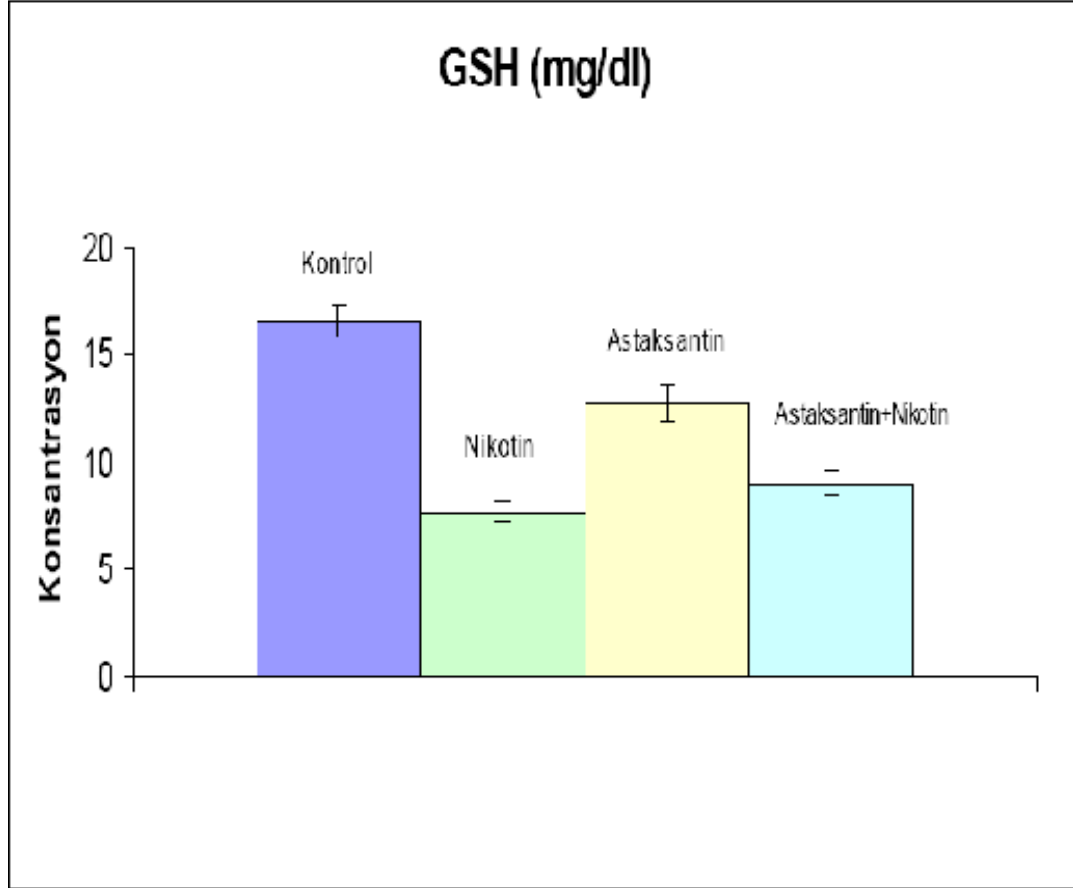
Plazma GSH düzeyleri kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde en yüksek GSH düzeyleri kontrol grubunda tespit edildi ($p<0.001$). Kontrol grubu GSH değerleri As grubuna göre $p<0.01$ düzeyinde yüksek, As+N grubuna göre ise $p<0.001$ düzeyinde yüksek bulundu. Nikotin grubu As grubuna göre $p<0.001$ düzeyinde, As+N grubunun ise $p<0.05$ düzeyinde yüksek olduğu tespit edildi. As grubu değerlerinin As+N grubuna göre $p<0.05$ düzeyinde yüksek olduğu belirlendi.

Plazma MDA düzeyleri en yüksek nikotin grubunda tespit edildi ($p<0.001$). Kontrol ve nikotin grubuna göre As grubu MDA düzeyleri istatistiksel olarak düşük bulundu ($p<0.001$). As+N grubu MDA düzeylerinin ise kontrol grubuna göre yüksek, nikotin grubuna göre ise düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

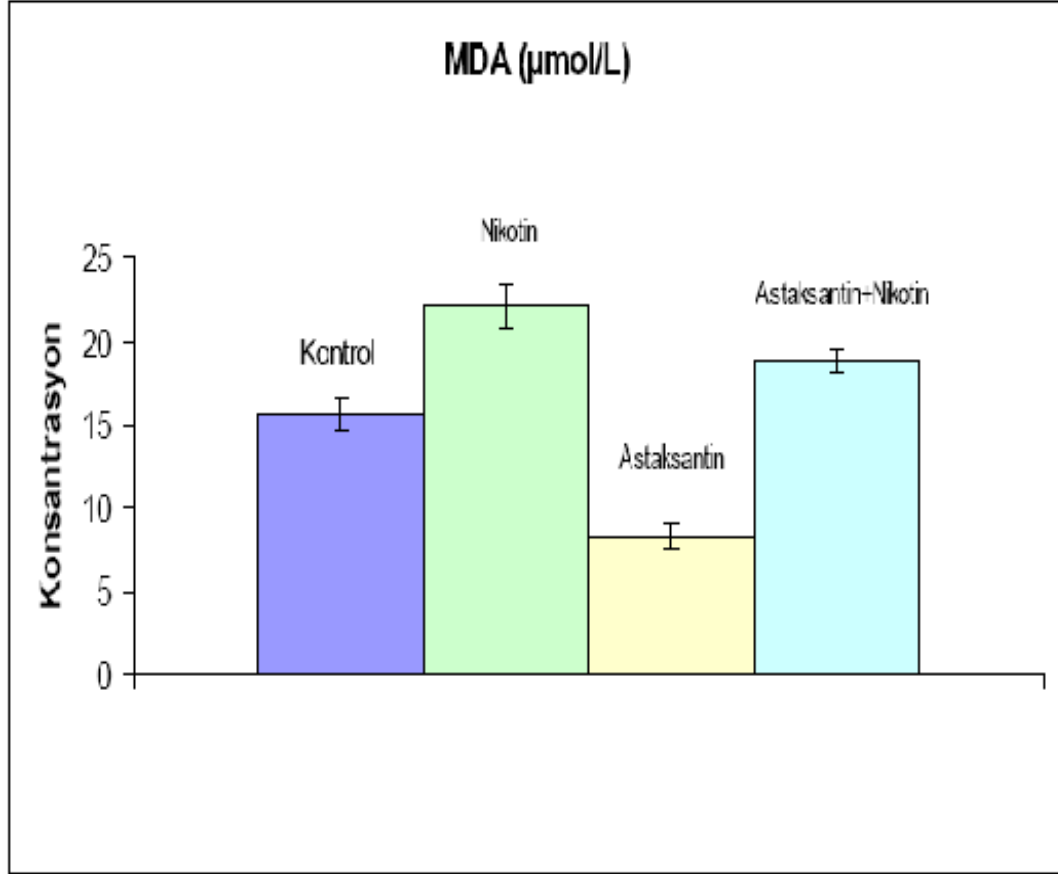
Tablo 3.1 Farelerde GSH ve MDA Düzeyleri

No:7	Kontrol	Nikotin	Astaksantin	Astaksantin+Nikotin
GSH (mg/dl)	16,58±0,77 ^a	7,69±0,5 ^c	12,70±0,877 ^b	8,97±0,61 ^c
MDA (µmol/L)	15,62±0,97 ^c	22,07±3,26 ^a	8,33±0,79 ^d	18,83±0,68 ^b

a,b,c,d aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arası farklılık önemlidir. ($p<0.05$, $p<0.001$, $p<0.01$)



Grafik 3.1 Tam Kan GSH Düzeyleri



Grafik 3.2 Plazma MDA Düzeyleri

4.TARTIŞMA SONUÇ

Çalışmada farelerde nikotinin oluşturduğu oksidatif strese karşı bir karotenoid türevi astaksantin koruyucu etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada kontrol, nikotin, astaksantin+nikotin ile astaksantin grubu GSH düzeyleri sırasıyla 16.58 ± 0.77 , 7.69 ± 0.5 , 8.87 ± 0.61 , 12.70 ± 0.77 mg/dl, MDA düzeyleri ise sırasıyla 15.62 ± 0.97 , 22.07 ± 3.26 , 18.83 ± 0.68 ve 8.33 ± 0.79 $\mu\text{mol/L}$ olarak tespit edildi.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, nikotinin etkisinin lipit peroksidasyon ürünlerinde artışa neden olduğu, serbest radikal süpürücü enzim aktivitelerinde ise düşüşler meydana getirdiği bildirilmektedir (37, 60, 65). Nikotin karaciğerde yarı ömrü uzun olan metaboliti kotinine okside olmakta ve dokularda serbest radikalleri artırarak oksidatif doku hasarını indüklemektedir (70). Nikotin uygulamalarında GSH seviyelerinde belirgin bir azalma, TBARS seviyelerinde ise artış olduğu bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda GSH'ın H_2O_2 'i suya çevirerek detoksifiye ettiği ve GSH seviyelerindeki azalmaların antioksidan sisteme zarar verdiği rapor edilmektedir. (32, 33, 52, 56)

Çeşitli metabolizma olayları sonucu ortaya çıkan serbest radikallere karşı doğal bir antioksidan olan astaksantin; lipit peroksidasyonu (1, 27), yaşa bağlı göz dejenerasyonları (24), arteryogenezis (20, 59), karsinogenezis (11, 43, 51) gibi birçok hastalıkta yararlı etkileri olduğu bildirilmektedir. Sigarada bulunan nikotinin neden olduğu serbest radikal oluşum mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen nikotinin, mitokondriyal solunum zincirini etkileyerek süperoksit anyonunu ve hidrojen peroksit radikali oluşumunu artırmakta ve karsinogeneze neden olduğu rapor edilmektedir (52, 58).

Antioksidan savunma sisteminin önemli bir bileşeni olan GSH'ın serbest radikallerin ve oksijen radikallerinin detoksifikasyonu, tiyoldisülfit değişimi, gibi birçok görevi bulunmaktadır. Antioksidan savunma sistemi, oluşan serbest radikalleri ortamdan elemine etmektedir. GSH antioksidan savunma sisteminin en önemli bileşeni olup, doğrudan serbest radikal süpürücü olarak etki göstermektedir (26). Memeli hücrelerinde bulunan GSH'ın dış kaynaklı toksinlere maruz kalındığında karaciğer, akciğer ve böbrek gibi organlarda önem kazanmakta ve mitokondriyal oksidanlara karşı antioksidan olarak görev yaptığı bildirilmektedir (18, 65). Çalışmamızda kontrol grubuna göre nikotin verilen grupta düşük bulunan GSH değerleri ve kontrol grubuna göre yüksek, nikotin grubuna göre ise düşük bulunan As+N grubu GSH değerleri literatür ile uyum göstermektedir (8, 67).

Farelerin sigara dumanı soludukları bir çok çalışmada nikotinin karaciğer GSH ve GSH Px düzeylerini arttığı tespit edilmiştir (15, 31, 33). Hepatik GSH, hem ROS'un süpürülmesinde hem de ilaçların detoksifikasyonunda önemli rol oynamaktadır (26) Yapılan çalışmalarda GSH'ın doğrudan ROS ve elektrofilik metabolitlerle reaksiyona girdiği ve tiyol gruplarını oksidasyondan koruduğu bildirmektedirler (33, 52).

Yüce ve ark'ları (67) Homosistenin antioksidan özelliklerini araştırdıkları bir çalışmada, kontrol grubuna göre düşük tesbit ettikleri GSH düzeylerini, homosisteinin lipit peroksidasyonunu engellemesine bağlamışlardır. Yüce ve ark'larının elde ettikleri veriler ile çalışmamız uyum göstermektedir (67).

Beytut ve ark'ları (8) vitamin-E ve selenyum eksikliğinde ortaya çıkan beyaz kas hastalıklarında doku GSH düzeylerinin kontrol grubuna göre düşük çıkmasını; lipid peroksidasyonuna neden olacak oksidatif stresin ve buna bağlı oksidatif doku hasarının gerçekleşmemesinden kaynaklanabileceğini ileri sürmektedirler (8). Çalışmada, nikotin uygulanan grupta GSH düzeyinin As ve As+N verilen gruplara göre yüksek çıkmasını, Vit.-C ve metabolik serbest oksijen radikallerine bağlı oluşan hücrel hasarın azaltılmasında ve organizmanın koruyucu mekanizmalarını desteklediği paylaşılmaktadır (15).

Kanda yüksek düzeyde LDL'nin ateroskleroz artırıcı etkiye sahip olduğu, HDL'nin LDL ile ters korelasyonlu olduğu ve koroner kalp hastalıklarında koruyucu özelliğe sahip olduğu bildirilmektedir(21, 59). Çalışmalarda serum LDL düzeyindeki oksidasyon oranını Vit-C, Vit-E, β -karoten ve diğer karotenoidlerin düşürdüğü bildirilmektedir (34, 38). Yine likopen veya β -karotenin, kolesterol metabolizması üzerine etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada, yüksek miktarda likopen veya β -karoten içeren makrofajlarda, hücrel kolesterol sentezlenmesinin engellendiği ve LDL reseptörlerini arttırdığı ve sonuç olarak karotenoidlerin hipokolesterolemik maddeler olabileceği bildirilmiştir (22).

Miki ve ark.'ları (50) astaksantin'in LDL oksidasyonunu azaltıp azaltamayacağına araştırdıkları bir çalışmada 2 haftadan daha uzun süre 5 kişiye 3.6 mg/gün, 5 kişiye 7.2 mg/gün, 3 kişiye de 14.4mg/gün astaksantin oral olarak verilmişler ve artan dozla paralel olarak LDL oksidasyonun azaldığını tesbit etmişlerdir (50).

Sigara kullanan insanlarda oksidan/antioksidan dengesinin bozulması sonucu lipit peroksidasyonunun arttığı ve bunun sonucu arteogenesis sürecinin başlamasına ve arteryosklerozis ve oksidatif strese neden olduğu bildirilmektedir (13, 14, 47).

Karotenoid ailesinden olan astaksantin özellikle deniz canlılarının kabuklarında doğal olarak bulunan kırmızı renkli bir pigment olup, hücre membranlarının korunmasında etkili bir mekanizmaya sahip olduğu bildirilmektedir (25). Astaksantin diğer antioksidanlara kıyasla yapısında oksijen içermesi ve lipofilik olması nedeni ile kan beyin bariyerini kolaylıkla geçebilmekte ve santral sinir sistemi ile beyin hücrelerini koruyabildiği rapor edilmektedir (61). Bu etkilerini oluşan serbest radikalleri süpürerek ya da oluşmuş olan zincir reaksiyonlarını inaktive ederek gösterdiği bildirilmektedir (41, 42, 49, 61).

Ji-one king ve ark'ları (35) 2 mg/kg dozunda intra peritoneal uyguladıkları CCl_4 karşı 2 ve 100 mg/kg miktarında oral olarak astaksantin denemelerinde, astaksantin uygulaması yapılan grupta kontrol grubuna göre CCl_4 'ün oluşturduğu konjuge dienlerin miktarının astaksantin uygulaması sonucu azaldığını bildirmektedirler. Astaksantin CCl_4 'e maruz kalan karaciğer dokusu lipit peroksidasyonunu önleyerek koruyabilmekte ve α - tokoferol üretimini ise stimüle ederek antioksidan sistemin aktive olmasına yardımcı olduğunu ileri sürmektedirler (35).

Helen ve ark'ları (33) ratlarda yaptıkları çalışmada nikotinin karaciğer üzerinde oluşturduğu oksidatif strese karşı 90 gün 200 mg/kg/gün Vit.-C uygulamalarında elde ettikleri bulgular, nikotin verilen ratlarda serbest yağ asitleri ve MDA düzeyinin yüksek olduğu, Vit-C ile nikotinin birlikte verildiği ratlarda ise oluşan karaciğer hasarına karşı MDA düzeyinde azalma olduğunu öne sürmüştür (33).

Ferriknitriлотriasetat verilerek oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda likopenin koruyucu etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada, kontrol grubuna göre Ferriknitriлотriasetat verilen gruplarda MDA düzeyi %75 artarken, likopen verilen grupta MDA düzeyinin önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir (45).

Yine Xin wang ve ark'ları yaptıkları deneysel helicobacter pylori enfeksiyonuna karşı Vit-C (400 mg/kg) ve astaksantin (10, 50, 100 mg/kg) uygulamalarda astaksantin Vit-C'ye göre lipit peroksidasyonunu azalttığı, helicobacter pylori kolonizasyonunda azalmaya, ve inflamasyonun azaldığını kaydetmişlerdir (71). Çalışmamızda kontrol grubuna göre nikotin grubunda yüksek elde edilen MDA değerlerinin astaksantin grubunda düşük ($p < 0.001$) bulunmasının nedeni oluşan serbest radikallerin astaksantin tarafından süpürme olduğu ya da zincir reaksiyonlarının inaktive edildiği düşüncesini paylaşmaktayız (42, 49, 61).

Sonuç olarak çalışmadan elde edilen bulgular değerlendirildiğinde nikotinin oksidan/antioksidan dengesinin bozulması sonucu serbest radikallere bağlı oksidatif stresse neden olduğu buna karşılık astaksantin oluşan serbest radikalleri zincir reaksiyonlarına karşı koruyucu veya bu reaksiyonlar inaktive ederek hücre membranlarını koruyucu etki gösterdiği kanaatine varıldı.

5.ÖZET

Son yıllarda artan sigara kullanımına bağlı olarak serbest radikallerin oluşumunun arttığı yapılan çalışmalarla rapor edilmektedir. Buna bağlı olarak nikotinin oluşturduğu oksidatif stresin önlenmesinde doğal antioksidanların önemi artmaktadır. Çalışmada yapısal antioksidatif özellikleri, ısıya karşı dayanıklı olması ve deniz ürünlerinde bol miktarda bulunması ve güçlü bir antioksidan olması nedeniyle astaksantin farelerde nikotin uygulaması sonucu oluşan oksidatif strese karşı antioksidatif etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal olarak 28 adet swiss albino ırkı erkek fare 4 eşit gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki farelere periton içi %0.9 NaCl solüsyonu, N grubuna 0.45 mg/kg nikotin, AS+N grubuna 0,45 mg/kg nikotin+ 40 mg/kg astaksantin, AS grubuna ise 40 mg/kg astaksantin 20 gün süreyle günde 2 kez periton içi uygulandı. Uygulamanın sonunda intrakardiyak olarak kan örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinin bir kısmı GSH analizi için ayrıldı. Geriye kalan kısım 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek plazmaları elde edildi. GSH ve MDA analizleri spektrofometrik olarak yapıldı.

Kontrol grubu GSH değerleri As grubuna göre $p < 0.01$ düzeyinde yüksek, As+N grubuna göre ise $p < 0.001$ düzeyinde yüksek bulundu. Nikotin grubu As grubuna göre $p < 0.001$ düzeyinde, As+N grubunun ise $p < 0.05$ düzeyinde yüksek bulundu. As grubu değerlerinin As+N grubuna göre $p < 0.05$ düzeyinde yüksek olduğu gözlemlendi. Plazma MDA düzeyleri en yüksek nikotin grubunda olduğu gözlemlendi ($p < 0.001$). Kontrol ve nikotin grubuna göre As grubu MDA değerleri istatistiksel olarak düşük düzeyde bulundu ($p < 0.001$). As+N grubu MDA değerleri ise kontrol grubuna göre yüksek, Nikotin grubuna göre düşük düzeyde olduğu tespit edildi ($p < 0.05$).

Sonuç olarak, nikotinin farelerde oluşturduğu serbest radikallere bağlı oksidatif strese ve oluşan serbest radikallere karşı astaksantin güçlü bir antioksidan ve hücre membran koruyucu özelliğinin olduğu kanısına varıldı.

6.SUMMARY

It has been reported various studies that, formation of free radicals were increased by smoking. According to this, prevention of oxidative stress due to nicotine gain ground by natural antioxidant. In this study, astaxanthin was used for its constitutional form, durable heat, present abundantly in aquatic animals and powerful of its antioxidant feature.

In this study 28 Swiss Albino rats were divided into 4 equal groups. In control group, 0.9% NaCl, in group N 0.45 mg/kg nicotine, AS+N group 0.45 mg/kg nicotine + 40 mg/kg astaxanthin, AS group 40mg/kg astaxanthin is peritonally applied per 2 times a day for 20 days. Blood samples were collected via intracardiac. A part of blood samples was separated for GSH analysis. Remaining blood samples were centrifuged for 15 minutes at 3000 rpm to obtain plasma. GSH and MDA analysis performed were by spectrophotometric methods.

Plasma GSH level was found high in control group ($p < 0.001$). GSH levels in control group were found to be higher compared to AS ($p < 0.001$), and compared to AS+N ($p < 0.01$). In nicotine group, GSH was found high compared to AS group ($p < 0.001$) and AS+N ($p < 0.05$). In group AS GSH levels were found to be higher compared to AS+N group ($p < 0.05$). Plasma MDA levels were found high in nicotine group ($p < 0.001$). MDA levels in AS group were found low compared to control and nicotine group ($p < 0.001$). AS+N group MDA levels were found to be high compared to control group and low compared to nicotine group ($p < 0.05$).

In conclusion, it was concluded that astaxanthin is a powerful antioxidant against nicotine induced free radical generation could protect cell membrane against oxidative stress.

7.KAYNAKLAR

1. Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M.: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Pnas sci. ;90:7915-7922,1993.
2. Astorg, P.: Food Carotenoids and Cancer Prevention An Overview of Current Research. Trend Food Science and Technol. 12(8), 406-413,1997.
3. Bağdatlıoğlu, N., Demirbükler, B.: Gıda işlemede karotenoidlerde meydana gelen gelişmeler. Gıda. 9: 48-51,1999.
4. Barros, M.P., Pinto, E., Colepicolo, P., Pedersén, M.: Astaxanthin and peridinin inhibit oxidative damage in Fe²⁺-loaded liposomes: Scavenging oxyradicals or changing membrane permeability? Biochem Biophys Res Comm.288,225-32, 2001.
5. Benowitz, N.L., Jacob, P., Fong, I., Gupta, S.: Nicotine metabolic profile in man: comparison of cigarette smoking and transdermal nicotine. J Pharmacol Exp Ther.268(1): 296-303, 1994.
6. Benzer, F., Ozan, S.T.: Fasciola hepatica ile enfekte koyunlarda lipit peroksidasyonu, antioksidant enzimler ve nitrik oksit düzeyleri, Tr J Vet Anim Sci. 27: 657-661,2003.
7. Beutler, E., Duran, O., Kelley, B.M.: Improved method for determination of blood glutathione. J Lab Clin Med.28, 882-888, 1963.
8. Beytut, E., Erişir, M., Aksakal, M.,:Beyaz kas hastalıklı kuzuların kalp, iskelet kası ve karaciğerlerinde redükte glutatyon ve malondialdehit düzeyleri ile katalaz enzim aktivitesi, Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg. 7(1):1-5,2001.

9. Bhagwat, S.V., Vijayasathy, C., Raza, H.: Preferential effects of nicotine and 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanonon mitochondrial glutathione S-transferase A4-4 induction and increased oxidative stres in the rat brain. *Biochem Pharmacol.* 56, (7):831-839, 1998.
10. Bilir, N., Doğan, B.G., Yıldız, A.N.: *Assessing Tobacco Control Strategies in Turkey.* Hacettepe Public Health Foundation, Ankara, 2003.
11. Breimer, L.H.: Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Mol Carcinog.*3,188-97,1990 .
12. Brewer, B.G., Roberts, A.M., Rowell, P.P.: Short-term distribution of nicotine in the rat lung. *Drug Alcohol Depend.* 75, 193-198, 2004.
13. Burke, A, Fitzgerald, G.A.: Oxidative stress and smoking-induced vascular injury. *Prog. Cardiovasc. Dis.*46:79–90,2003.
14. Chalmers, A.: Smoking and oxidative stress. *Am. J. Clin. Nutr.*;569:572,1999.
15. Çolakoğlu, N., Ozan, E., Sönmez, M.F.: Sigaranın karaciğerde oluşturduğu yapısal değişiklikler üzerine melatonin ve C vitamininin etkileri. *Fırat Üniv. Tıp Dergi.* 10, (3): 108-112, 2005.
16. Dawson, E.B., Evans, D.R., Haris, W.A.: The effect of ascorbic acid supplementation on the nicotine metabolism of smokers. *Prev Med.* 29, 451-454, 1999.

17. Denizci, A.: *Phaffia rhodozyma* NRRLY-10921 mayası ile astaksantin pigmentinin üretimi ile ilgili bir Araştırma. Ege Üniv. Fen Bili. Ens. Yüksek Lisans Tezi, İzmir.1990.
18. Deleve, L.D., Kaplowitz, N.: Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther.* 52, (3):287-305, 1991.
19. Doll, R., Peto, R., Wheatley, K., Gray, R., Sutherland, I.: Mortality in Relation to Smoking: 40 years' observations on British Doctors, *BMJ.* 309: 901-911,1994.
20. Francis, G.A.: High density lipoprotein oxidation: in vitro susceptibility and potential in vivo consequences. *Biochim Biophys Acta.*1483:217-235,2000.
21. Frei, B.: Cardiovascular disease and nutrient antioxidants: role of low-density lipoprotein oxidation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35, 83–98,1995.
22. Fuhrman, B., Elis, A., Aviram, M.:Hypocholesterolemic effect of lycopene and betacaroteneis related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages.*Biochem Biophys Res Commun.* 28.233(3):658-62, 1997.
23. Gershon, D.:The mitochondrial theory of aging: Is the culprit a faulty disposal system rather than indigenous mitochondrial alterations? *Exp Gerontol.*34:613-619,1999.
24. Gerster, H. Review: Antioxidant protection of the ageing macula. *Age Ageing*;20:60-69,1991 .

25. Gök, V., Kayacier, A, Telli R.: Hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı antioksidanlar. *Gıda teknolojileri dergisi* (2): 35-40, 2006.
26. Halliwell, B.: Drug antioxidant effects. *Drugs*. 42(4): 569 – 605, 1991.
27. Harman, D.: The aging process. *Pnas sci*. 78, 7124-7128, 1981.
28. Haro, R., Drucker-Colín, R.: Effects of long-term administration of nicotine and fluoxetine on sleep in depressed patients. *Archives of Medical Research* 35, (6), 499-506, 2004.
29. Hilmi, Ş., : Oksidanlar ve antioksidanlar. *THTDerg.* 48, 1-2: 44-49, 1994.
30. Hukkanen, J., Jacob, P., Benowitz, N.L.: Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev.* 57: 79-115, 2005.
31. Husain, K., Scott, B.R., Reddy, S.K., Somani, S.M.: Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol* 25, 89-97, 2001.
32. Helen, A., Krishnakumar, K., Vijayammal, P.L., Augusti, K.T.: Antioxidant effect of onion oil (*Allium cepa*. Linn.) on the damages induced by nicotine in rats as compared to alpha-tocopherol. *Toxicol Lett* 116, 61-68, 2000.
33. Helen, A., Vijayammal, P.L.: Vitamin C supplementation on hepatic oxidative stress induced by cigarette smoke. *J Appl Toxicol* 17, (5): 289-295, 1997.
34. Jialal, I., Fuller, C.J.: Effect of vitamin E, vitamin C, and beta-carotene on LDL oxidation and atherosclerosis. *Can J Cardiol.* 11, 97-103, 1995.

35. Ji-One, K., Sung-ji, K., Harriet, H.: Regulation of the hepatic antioxidative system by astaxanthin in the rats J. food Sci Nutr. 4 (4):251-254, 1999.
36. Kazanç, M.B.: Antioksidan Vitaminler. Sendrom, Temmuz. 14-22,1997.
37. Kelly, G.: The interaction of cigarette smoking and antioxidants. Part III: Ascorbic acid. Altern Med Rev. 8, (1): 43-54, 2003.
38. Kritchevsky, S.B.: β -Carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease. J Nutr;129:5-8,1999.
39. Kour, H., Perkins, M.J.:The free radical chemistry of food additives, In Ed: Arvoma O.I, Halliwell B. Free radicals and food additives, New York.1991 .
40. Kovacic, P., Cooksy, A.: Iminium metabolite mechanism for nicotine toxicity and addiction: Oxidative stress and electron transfer. Review.Med Hypotheses 64, 104-111, 2005.
41. Kurashig, M., Okimasu, E., Inoue, M., Utsumi, K.: Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. Physiol. Chem. Pys. Med. NMR. 22,27-38,1990.
42. Lakier, J.B.:Smoking and cardiovascular disease. Am J Med.93(1A), 8-12,1992.
43. Marnett, L.J.:Peroxyl free radicals potential mediators of tumor initiation and promotion. Carcinogenesis.8,1365-73,1987.

44. Martin, K.R., Barret, J.C.: Reactive oksijen species as double-edged swords in cellular processes:low-dose cell signaling versus high-dose toxicity. *Hum.,Exp.,Toxicol.*21,71-75,2002.
45. Matos, H.R., Capelozzi, V.L., Gomes, O.F., Mascio, P.D., Medeiros, M.H.: Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitrilotriacetate. *Arch Biochem Biophys.* 15,396(2):171-7, 2001.
46. Matsushita, Y., Suzuki, R., Nara, E., Fokoyama, A., Miyashite, K.:Antioxidant activity of polar carotenoids including astaxanthin- β -glucoside from marine bacterium on PC liposomes. *Fisheries Sci.*66,980-985,2000.
47. Mezzetti, A., Lapenna, D., Pierdomenico, S.D., Cal-afiore, A.M., Constantini, F., Riariosforza, G., Imbastaro, T., Neri, M. and Cuccurullo, F.: Vitamin E, and C and lipit peroxin plasma and arterial tissue of smokers and non- dation. *Methods smokers. Atherosclerosis.*112, 91–99 1995.
48. McCord, J.:Human disease, free radicals and the oxidant / antioxidant balance. *Clin Biochem.* 26, 351 – 357,1993 .
49. McCusker, K.:Mechanisms of respiratory tissue injury from cigarette smoking. *Am J Med.* 93(1A):18-21,1992 .
50. Miki, W., Hosoda, K., Kondo, K., and Itakura, H.:Astaxanthin-containing drink. Patent application number 10155459. Japanese Patent Office. Publication 1998.
51. Moody, C.S., Hassan, H.M.: Mutagenicity of oxygen free radicals. *Proc Natl Acad Sci. USA.*79,2855-2859,1982.

52. Newman, M.B., Arendash, G.W., Shytle, R.D.: Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. *Life Sci.* 71, 2807-2820, 2002.
53. Olaizola, M., Huntley, M.E.: Recent Advances in commercial production of Astaxanthin from microalgae. In: Fingerman M, Nagabhushanam R, eds. *Biomaterials and Bioprocessing*. Enfield, NH: Science Publishers. 2002.
54. Oscarson, M., McLellan, R.A., Gullsten, H.: Identification and characterisation of novel polymorphisms in the CYP2A6 locus: implications for nicotine metabolism. *FEBS Letters.* 460, 321-327, 1999.
55. Peto, R, Lopez, A.D, Boreham, J, Thun, M., Heath, C., Doll, R.: Mortality from Smoking Worldwide, *Brit. Med. Bulletin.* 52, 12-21, 1996 .
56. Saareks, V., Mucha, I., Sievi, E., Vapaatalo, H.: Nicotine stereoisomers and cotinine stimulate prostaglandin E2 but inhibit tromboxane B2 and leukotriene E4 synthesis in whole blood. *Eur J Pharmacol.* 353, 87-92, 1998.
57. Bilir, N., Paksoy, N.: *Sağlıklı ve Başarılı Yaşlanma*, Hacettepe Üniv. Tıp Fak. Halksağlığı Bili. Araşt. Merk. Yay. Ankara. 2008.
58. Shin, V.Y., Wu, W.K., Ye, Y.N.: Nicotine promotes gastric tumor growth and neovascularization by activating extracellular signal-regulated kinase and cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis.* 25, 2487-2495, 2004.
59. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., Witztum, J.L.: Beyond cholesterol. Modifications of lowdensity lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 320, 915-924, 1989.

60. Şener, G., Şehirli, A.Ö., Çetinel, S.: Taurine treatment protects against chronic nicotine-induced oxidative changes. *Clin Pharmacol.*19, 155-164, 2005.
61. Tinkler, J. H., Böhm, F., Schalch, W., and Truscott, T.G.:Dietary carotenoids protect human cells from damage. *J.,Photochem. Photobiol. B.* 26,283-285,1994.
- 62.Torrissen, O.J.,Christiansen, R.:Requirements for carotenoids in fish diets.11,225-230,1995.
63. Torissen, O.J., Hardy, R.W., Shearer, K.:Pigmentation of salmonids – carotenoid deposition and metabolism. *CRC Cr Rev Aq Sci.* 1,209-25,1989.
64. Torzillo, G., Göksan, T., Faraloni, C., Kopecky, J. and Masojídek, J.:Interplay between photochemical activities and pigment composition in an outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* during the shift from the green to red stage, *Applied 1 AppPhycol.* 15,127-136,2003.
65. Yıldız, D., Ercal, N., Armstrong, D.W.: Nicotine enantiomers and oxidative stres. *Toxicology.* 130, 155-165, 1998.
66. Yoshiko, T., Kawada, K., Shimada, T.: Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am J. Obstet Gynecol.*135, 372-376,1979.

67. Yüce, A., Aksakal, M.: Ratlarda homosisteinin oksidan-antioksidan sistem ve koroner damarlarda oluşturduğu değişiklikler üzerine melatoninin etkisi.F.Ü. Sağlık Bil. Derg. 20(1): 51-59 2006.
68. Zevin, S., Gourlay, S.G., Benowitz, N.L.: Clinical pharmacology of nicotine. Clin Dermatol. 16, 557-564,1998.
69. Zevin, S., Jacob, P.: Cotinine effects on nicotine metabolism. Clin Pharmacol Ther.61, (6):649-54, 1997.
70. Wang, M.: Nicotine the masked killer.Iowa-University Pres. 1-9, 2001.
71. Wang, X., Willen, R., Torkel, W.: Astaxanthin-rich algal meal and vitamin C inhibit helicobacter pylori infection in BALB/cA Mice.44,(9):2452-2457,2000.
72. Wei, Y.H., Pang, C.Y.:The role of mitochondria in human aging process. Biotech. International. 17, 8-13,2005.

8.ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Kars merkezde doğdu. İlk ve orta öğrenimi karsta tamamladı. 2000 yılında girdiği Kafkas üniversite Kars Meslek Yüksek Okulu Laboratuvar bölümünden 2002 yılında mezun oldu. Akabilinde DGS sınavı ile Kafkas Üniversitesi Kars Sağlık Yüksek okulu Sağlık Memurluğu bölümüne dikey geçiş yaptı ve 2006 yılında mezun oldu. 2006 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen Sağlık Bakanlığına bağlı merkez Dr. Kırtunç S.O. sağlık memuru olarak çalışmaktadır. Evli ve Sevgilinur isimli bir kız çocuğu babasıdır...

9.TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başlamamda emeği geçen Prof. Dr. Şaban MARAŞLI ve Doç Dr. Ayla ÖZCAN'a, eğitimim sırasında benden yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç.Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN'a, deney hayvanları konusunda yardımını esirgemeyen Doç.Dr. Mehmet ÇİTİL'e, deney hayvanlarından kan alımında yardımlarını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. Dinç EŞSİZ'e, çevirilerimde yardımcı olan Arş.Gör.Dr. Metin ÖĞÜN'e, Arş.Gör. Oğuz MERHAN'a ve maddi manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.