

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***IN VIVO* KARACİĞER TOKSİKASYONUNDA**
***ROYAL JELLY*'NİN KORUYUCU**
ETKİSİ ve SİALİK ASİT

Fatih AYMELEK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Danışman
Doç. Dr. Mustafa CEMEK

AFYONKARAHİSAR
2009

ONAY SAYFASI

Fatih AYMELEK'in yüksek lisans tezi olarak hazırladığı “***In vivo* Karaciğer Toksikasyonunda Royal Jelly'nin Koruyucu Etkisi ve Sialik Asit**” başlıklı bu çalışma, lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

18/06/2009

Jüri Üyesi: Doç. Dr. Mehmet Emin BÜYÜKOKUROĞLU
(Başkan)

Jüri Üyesi: Doç. Dr. Mustafa CEMEK

Jüri Üyesi: Doç. Dr. İbrahim EROL

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nunGün
ve Sayılı Kararı ile Onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Doç. Dr. Zehra BOZKURT

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	iii
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
TEŞEKKÜR	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
RESİMLER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Karaciğerin Anatomisi.....	3
2.1.1 Karaciğerin Makroskopik Anatomisi	3
2.1.2 Karaciğerin Mikroskopik Anatomisi	4
2.2 Karaciğerin Histolojisi.....	5
2.2.1 Hepatositler.....	5
2.2.2 Endotel Hücreleri.....	6
2.2.3 Kupffer Hücreleri	6
2.2.4 Stellat (İto) Hücreler	6
2.2.5 Safra Kanalı Epitel Hücresi	7
2.3 Karaciğerin Fizyolojisi	7
2.3.1 Karbonhidrat Metabolizması	7
2.3.2 Lipit Metabolizması.....	7
2.3.3 Protein Metabolizması	8
2.3.4 Safra Sentezi ve Salınımı.....	8
2.3.5 Detoksifikasyon Fonksiyonu	8
2.4 Toksik Ajan Olarak Karbon Tetraklorür	9
2.5 Oksidan ve Antioksidan Sistem.....	11
2.5.1 Oksidan Moleküllerin Biyolojik Kaynakları	11
2.5.2 Oksidan Moleküllerin İntraselüler Kaynakları	11
2.6 Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	12

2.6.1	Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	13
2.6.1.1	Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet}$)	14
2.6.1.2	Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	15
2.6.1.3	Hidroksil Radikali ($OH^{\bullet}$)	17
2.6.1.4	Singlet Oksijen (1O_2)	17
2.6.1.5	Nitrik Oksit Radikali ($NO^{\bullet}$)	18
2.6.1.6	Hipokloröz Asit (HOCl)	19
2.6.2	Serbest Radikallerin Etkileri	20
2.6.2.1	Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri	20
2.6.2.2	Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri	21
2.6.2.3	Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri	22
2.6.2.4	Lipit Peroksidasyonu (LPO)	23
2.6.2.5	Malondialdehit (MDA)	26
2.6.3	Antioksidanlar	27
2.6.3.1	Enzimatik Antioksidanlar	28
2.6.3.1.1	Süperoksit Distumaz (SOD, E.C.1.15.1.1)	29
2.6.3.1.2	Katalaz (CAT, E.C.1.11.1.6)	29
2.6.3.1.3	Glutasyon Peroksidaz (GPx, E.C.1.11.1.9)	30
2.6.3.2	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	32
2.6.3.2.1	Glutasyon (GSH)	32
2.6.3.2.2	Vitamin E (α - tokoferol)	34
2.6.3.2.3	Vitamin C (Askorbik Asit)	35
2.7	Arı Sütü (<i>Royal jelly</i>)	36
2.8	Sialik Asit (SA)	39
3.	MATERYAL VE METOT	43
3.1	Materyal	43
3.1.1	Kimyasal materyal	43
3.1.2	Hayvan materyali	43
3.2	Metot	43
3.2.1	Kan örneklerinin alınması	45
3.2.2	Biyokimyasal analizler	45
3.2.2.1	Malondialdehit (MDA) tayini	45

3.2.2.2 Redükte glutatyon (GSH) tayini	45
3.2.2.3 Vitamin C (askorbik asit) tayini	45
3.2.2.4 Sialik asit tayini	46
3.2.3 İstatistiksel analizler	46
4. BULGULAR	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
6. KAYNAKLAR	63
6.1 İnternet Kaynakları	78
ÖZGEÇMİŞ	xvi

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***IN VIVO* KARACİĞER TOKSİKASYONUNDA ROYAL JELLY’NİN KORUYUCU ETKİSİ ve SİALİK ASİT**

Fatih AYMELEK

**Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı**

Danışman: Doç. Dr. Mustafa CEMEK

Karaciğer; salgı, depo, fagositoz, detoksifikasyon ve metabolizma gibi önemli fonksiyonları olan ve yaşamın devamı için birçok kimyasal reaksiyonunun gerçekleştiği bir organdır. Bu önemli fonksiyonları nedeniyle pek çok etken ile hasara uğrayabilmektedir. Karaciğerde toksik etki yapan ajanlardan biri de karbon tetraklorür (CCl₄)’dür. Deneysel çalışmalarda pek çok ajanla karaciğer hasarı oluşturulabilmesine rağmen insandaki siroz gelişim sürecine benzerlik gösterdiği için, en çok tercih edilen ve kullanılan CCl₄’dür. Sunulan çalışmada CCl₄’ün karaciğerde meydana getirdiği toksikasyona karşı *royal jelly*’nin (RJ) koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. *In vivo* deneysel çalışmada ratlar, her grupta 8 adet olmak üzere 6 gruba ayrıldı. Sham ve 100 mg/kg RJ grubu hariç tüm gruplara 20 gün boyunca gün aşırı, 0.4 CCl₄+0.4 ayçiçek yağı verilerek toksikasyon oluşturuldu. Toksikasyon oluşturulan gruplardan CCl₄ grubuna herhangi bir tedavi verilmezken, diğer 3 tedavi grubuna sırasıyla 50, 100, 200 mg/kg RJ verildi. Çalışma sonunda, malondialdehit (MDA) ve redükte glutatyon (GSH) düzeyleri tüm kanda; vitamin C ve sialik asit (SA) düzeyleri ise serumda analiz edildi. Elde edilen sonuçlara göre CCl₄ toksikasyonu, MDA düzeylerinde sham grubuna göre artışa sebep olurken ($p<0.01$), RJ ile tedavi edilen gruplarda bu artışın azaldığı görüldü. GSH düzeyi de yine en fazla CCl₄ grubunda saptandı ($p<0.05$). Ayrıca CCl₄’ün SA konsantrasyonunu arttırdığı belirlendi. CCl₄ toksikasyonu serumda, vitamin C düzeyini azaltırken, RJ ile tedavinin vitamin C konsantrasyonunu arttırdığı tespit edildi ($p<0.01$).

Sonuç olarak, CCl₄ toksik etkisiyle oksidatif strese neden olurken, RJ antioksidan etkinliği ile koruyucu etki göstermiştir. Ayrıca bu etki RJ'nin konsantrasyon artışına bağlı olarak artmıştır. Oksidatif strese karşı antioksidan etki gösteren RJ'nin karaciğer hastalıklarının tedavisinde destekleyici olarak kullanılabileceği düşünölmektedir. Bununla birlikte elde edilen sonuçlar, SA'nın CCl₄ toksikasyonunda önemli bir markır olarak kullanılabileceğini de göstermektedir.

2008, 78 sayfa

Anahtar Kelimeler: CCl₄ toksikasyonu, *Royal jelly*, Sialik asit, Oksidatif stres, Antioksidan sistem

ABSTRACT

Master Thesis

PROTECTIVE EFFECT of *ROYAL JELLY* ON *IN VIVO* LIVER TOXICITY and SIALIC ACID

Fatih AYMELEK

**Afyon Kocatepe University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry**

Supervisor: Associate Prof. Dr. Mustafa CEMEK

Liver is an organ which has important functions such as secretion, storage, phagocytosis, detoxification and metabolism and also materializes many chemical reactions to be alive. It damages many factors because of this important function. One of agents that make toxicity effect on liver is CCl₄. CCl₄ is the most preferable and is use to be similar cirrhosis evolution process although it can make up liver damage with so many agents in experimental studies. In this study it has been aimed that investigation protective effect of *royal jelly* (RJ) against toxicitation of CCl₄ on liver. In in vivo experimental study, rats were divided into 6 groups; each of them includes 8 numbers. All groups by giving 0.4 CCl₄+0.4 liquid oil every other day during 20 days except sham and 100 mg/kg RJ group, toxicity had made. While CCl₄ group that had been made toxicity had not received any treatments, other 3 groups had received respectively 50, 100, 200 mg/kg RJ. At the end of the study, the level of Malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) had been analyzed in the whole blood and the level of vitamin C and sialic acid (SA) in the serum. According to results, while CCl₄ toxicity in the level of MDA in the aspect of sham group caused increase in the groups that had been treated with RJ, this increase had been observed to be reduced ($p<0.01$). Also, the level of GSH had been assigned in CCl₄ group the most ($p<0.05$). Moreover, it had been also observed that the CCl₄ had increased the concentration of SA. It had been observed that while the CCl₄ toxicity had decreased the level of vitamin C in the serum, the treatment with RJ had increased the vitamin C concentration ($p<0.01$).

As a result, by the effect of CCl₄ toxic, causes oxidative stress. The antioxidant activity of RJ was observed to have protective effect. Moreover this effect had reacted increase by the relation of concentration increase of RJ. It had been determined that RJ which had antioxidant effect against oxidative stress can be used in the treatments of liver diseases. At the same time in the results of study, SA is proved to be used as an important marker in the toxicity of CCl₄.

2009, 78 pages

Key Words: CCl₄ toxicity, *Royal jelly*, Sialic acid, Oxidative stress, Antioxidant system

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her aşamasında emek veren, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, desteğini her zaman hissettiğim çok kıymetli Hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa CEMEK'e,

Çalışmamın laboratuvar aşamasında bilgi ve becerilerini esirgemeyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim dalı başkanı Sayın Doç. Dr. Mehmet Emin BÜYÜKOKUROĞLU'na,

Ayrıca laboratuvar çalışmalarımda desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım, Afyon Kocatepe Üniversitesi Çay Meslek Yüksek Okulunda görev yapan Öğr. Gör. Ahmet BÜYÜKBEN'e ve yüksek lisans öğrencisi Fatma YILMAZ'a,

Yoğun çalışmalarımda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman benim yanımda olan, başarılarımı görmeyi en çok hak eden ve sevgisi ile en büyük desteği veren AİLEM'e,

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Fatih AYMELEK

AFYONKARAHİSAR 2009

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
CCl_4	Karbon tetraklorür
$\text{CCl}_3^\bullet$	Trikloro metil radikali
$\text{CCl}_3\text{OO}^\bullet$	Trikloro metil peroksit radikali
CFC	Kloroflorokarbon
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HOCl	Hipokloröz asit
$\text{HO}_2^\bullet$	Hidroperoksit radikali
$\text{LOO}^\bullet$	Lipid peroksit radikali
LOOH	Lipid hidroperoksitleri
$\text{NO}^\bullet$	Nitrik oksit
$\text{NO}_2^\bullet$	Nitrojen dioksit
$^1\text{O}_2$	Singlet oksijen
$\text{O}_2^\bullet$	Süperoksit radikali
$\text{OH}^\bullet$	Hidroksil radikali
ONOO^-	Peroksinitrit
$\text{RO}^\bullet$	Alkoksil radikali
$\text{RO}_2^\bullet$	Peroksil radikali
ROOH	Organik hidroperoksitler

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ATP	Adenozin trifosfat
CAT	Katalaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	Redükte glutasyon
GSH-Rx	Glutasyon redüktaz

GSSG	Okside glutatyon
GST	Glutatyon S-transferaz
IL	İnterlökin
LPO	Lipid peroksidasyonu
LSA	Lipid bağlı sialik asit
MDA	Malondialdehit
NAD ⁺	Yükseltgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NADH + H ⁺	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NANA	N-asetilnörominik asit
PUFA	Doymamış yağ asitleri
RJ	Royal jelly
ROS	Reaktif oksijen türleri
SA	Sialik asit
Se	Selenyum
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiobarbitürik asit
TNF	Tümör nekroz faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekiller</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Karaciğerin Makroskopik Yapısı	3
Şekil 2.2 Karaciğerde Lobül Yapısı	5
Şekil 2.3 L-Arjininden nitrik oksit üretimi	18
Şekil 2.4 Solunum patlaması.....	19
Şekil 2.5 Serbest radikallerin toksik etkileri.....	20
Şekil 2.6 Bazı amino asitlerin reaktif oksijenlerce oksidasyonu	22
Şekil 2.7 Bazı nükleik asit bazlarına reaktif oksijen türlerinin etkileri	23
Şekil 2.8 Lipid peroksidasyonu.....	25
Şekil 2.9 Katalaz enziminin katalitik (1) ve peroksidatik (2) aktiviteleri.....	30
Şekil 2.10 GPx'ın katalitik aktivitesi.....	31
Şekil 2.11 GSH ve GSSG'nin yapısı.....	32
Şekil 2.12 α -Tokoferol.....	34
Şekil 2.13 2.14 Tokoferollerin (TocOH) peroksit radikallerine (ROO) yönelik zincir parçalayıcı aktiviteleri.....	35
Şekil 2.14 Askorbik asit.....	35
Şekil 2.15 Sialik asitin lineer form molekül yapısı.....	40
Şekil 2.16 Sialik asitin piranoz form molekül yapısı.....	40
Şekil 2.17 Sialik Asit Biyosentezi.....	42
Şekil 4.1 MDA (nmol/ml) değerlerinin grafiksel gösterimi	48
Şekil 4.2 GSH (mg/dl) değerlerinin grafiksel gösterimi	49
Şekil 4.3 Sialik Asit (mg/dl) değerlerinin grafiksel gösterimi	50
Şekil 4.5 Vitamin C (mg/dl) değerlerinin grafiksel gösterimi.....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelgeler</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Bazı reaktif oksijen türleri.....	14
Çizelge 2.2 Biyolojik sistemlerdeki antioksidanların sınıflandırılması.....	28
Çizelge 2.3 Arı Sütünün Bileşimi.....	38
Çizelge 4.1 Analizlerden elde edilen MDA ve GSH değerleri.....	47
Çizelge 4.2 Analizlerden elde edilen Vitamin C ve Sialik Asit değerleri.....	47

RESİMLER DİZİNİ

<u>Resimler</u>	<u>Sayfa</u>
Resim 2.1 Arı Sütü (<i>Royal jelly</i>).....	36
Resim 2.2 Arı sütünde yüzen 3 günlük larva, 5 günlük kraliçe larva.....	37

1. GİRİŞ

Karaciğer, karın boşluğunda diyaframın hemen altında bulunan, hem endokrin hem ekzokrin fonksiyon gösteren vücudun çok yönlü bir organıdır. Pek çok önemli fonksiyonu bulunmakla birlikte başlıca görevleri; protein sentezi, safra salgılanması, detoksifikasyon, bazı maddelerin depolanması, metabolizma, glikozun glikojen şeklinde depolanıp insülin denetiminde kana verilmesi, kan pıhtılaşmasında görev alan proteinlerin üretilmesidir. Bilinçsiz ilaç kullanımı, artan sigara ve alkol tüketimi, pestisit ve çevresel toksinlere maruz kalma, viral hastalıklar karaciğerde hasar oluşturan etkenlerin başında gelir. Çeşitli etkenlerle oluşan karaciğer hasarı, başlangıç döneminde tedavi edilmezse hasar ilerler, karaciğer yapısı bozulur ve siroza kadar gidebilecek karaciğer hastalıkları meydana gelir (Wang vd. 2005, MacDonalds-Wicks vd 2003).

Canlı organizmalar için hayati öneme sahip biyokimyasal tepkimeler sırasında oksijen indirgenerek, reaktif oksijen türleri (ROS) denilen ve birçok dokuda oksidatif hasara sebep olan ara metabolitleri meydana getirirler. Oluşturdukları oksidatif yıkımdan dolayı oksidan madde olarak isimlendirildiği gibi çoğunluğu radikalik olduğundan serbest radikal olarak da isimlendirilebilirler (Porter 1998). Canlı organizmada biyokimyasal tepkimelerin devamlı meydana geldiğini göz önüne alırsak, metabolizmada da devamlı bir oksidan madde üretimi olduğunu söyleyebiliriz. Bu sebeple organizmadaki oksidan madde miktarı belirli bir dengede bulunması gerekmektedir. Denge, ancak fazla miktardaki oksidanın, antioksidan adı verilen oksidan temizleyici maddelerce etkisizleştirilmesi ile sağlanır. Oksidan ve antioksidanlar arasındaki denge hücresel ve biyolojik etmenlerce bozulabilmektedir (Dündar vd. 2000, Montgomery 1996). Bu dengenin bozulması, serbest radikallerin artmasına ve hücre hasarına neden olur. Bu duruma oksidatif stres denilmektedir (Sies 1993).

Deneyisel çalışmalarda pek çok etkenle karaciğer hasarı oluşturulabilmesine rağmen insandaki siroz gelişim sürecine benzerlik gösterdiği için, en çok tercih edilen ve kullanılan karbon tetraklorür (CCl₄)'dür (Sun vd. 2001, Geier vd 2002, Onori vd. 2000). CCl₄ lipid peroksidasyonu (LPO) oluşturarak oksidatif hasara yol açmaktadır. Oksidatif

hasarda, karaciğer stellat hücreleri ve fibroblastlar uyarılarak bunların ekstrasellüler matriks ve kollajen sentezini gerçekleştirmeleri sağlanır (Parola vd. 2001, Poli 2000, Lee vd. 1995).

Sialik asit (SA), nöraminik asitten N-asetilizasyon yoluyla türeyen bir bileşik olup, canlıda biyolojik fonksiyonlarda önemli bir role sahiptir. SA glikoprotein ve glikolipidlerin oligosakkarid zincirlerinin indirgenmemiş ucundaki terminal karbonhidrat kalıntısıdır. İnsan dokularında şu ana kadar en önemli olan formu ise N-asetilnörominik asit (NANA)'dır (Waters vd. 1992). SA'nın membran transportu, membran reseptörlerinde bağlayıcı molekül görevi, kan glikoproteinlerinin görev ve yapılarına etkisi, glomerüllerin bazal membranlarında geçirgenliğin düzenlenmesi, konakçı-patojen etkileşimlerinde tanınmayı belirleyici gibi önemli görevleri vardır (Uslu vd 2000). Normal bireyin SA düzeyleri değişiklik göstermez ancak çeşitli hastalıklar özellikle kanser gibi hücre dejenerasyonuna neden olan durumlarda seviyeleri artar. Özellikle SA miktarı ile tümör tipleri arasında direkt bir ilişkinin varlığı belirlenmiş ve SA miktarındaki değişikliklerin takip edilmesinin tümörün erken tanı ve tedavisinde yararlı olabileceği belirtilmiştir (Erbil vd 1985).

Karaciğerde oluşan hasara karşı koymak ve karaciğer hastalıklarını tedavi etmek amacıyla doğa zengin bir kaynak sunmaktadır. Alternatif tedavi yöntemleri, bilimsel tıbbın dışında canlıların sağlığa kavuşmaları için uygulanan birçok metodun tümüne verilen isimdir. Karaciğer toksikasyonunun tedavisinde de fitoterapi ve apiterapi gibi alternatif tedavi yöntemleri kullanılmaktadır (İnt. kyn. 1, Şahinler 2000). Apiterapi ürünlerinden biride arı sütüdür (*royal jelly*). Arı sütü suca zengin, lapa-jel kıvamında homojen bir maddedir. Sarı-beyazımsı renkte, keskin fenolik kokulu ve karakteristik ekşi tada sahiptir. Arı sütünün bağışıklık sistemini güçlendirici, genel vücut fonksiyonlarını düzenleyici, hücre onarıcı ve gençleştirici etkileri bulunmaktadır (Şahinler 2000).

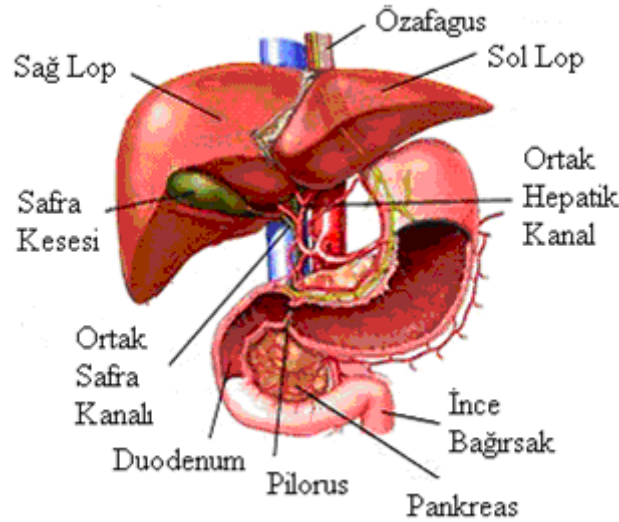
Sunulan çalışmada; CCl₄ ile karaciğer toksikasyonu oluşturulan ratlarda *royal jelly*'nin koruyucu etkisi ve SA düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Karaciğerin Anatomisi

2.1.1 Karaciğerin Makroskopik Anatomisi

Karaciğer, karın boşluğunun sağında ve ön tarafında, diyaframın hemen altında bulunur. Karaciğer, ön yüzünün küçük bir kısmı hariç kaburga kemikleri tarafından tamamen örtülür ve üst kısmı altıncı kaburgaya ulaşır (Wang vd. 2005, MacDonalds-Wicks vd 2003). İnsan vücudunun en büyük organıdır ve yaklaşık ağırlığı yetişkinlerde 1200-1600 g kadardır (Menteş 1983). Kanlanması zengin bir organ olduğu için rengi kırmızı kahverengidir. Pürüzsüz, kaygan yüzeyli ve yumuşak bir dokuya sahiptir. Tanımlamada kolaylık sağlamak için beş yüze bölünür fakat bir bütündür. Bu kısımlar üst, alt, ön, arka ve sağ lateraldir.



Şekil 2.1 Karaciğerin Makroskopik Yapısı (İnt. kyn. 2)

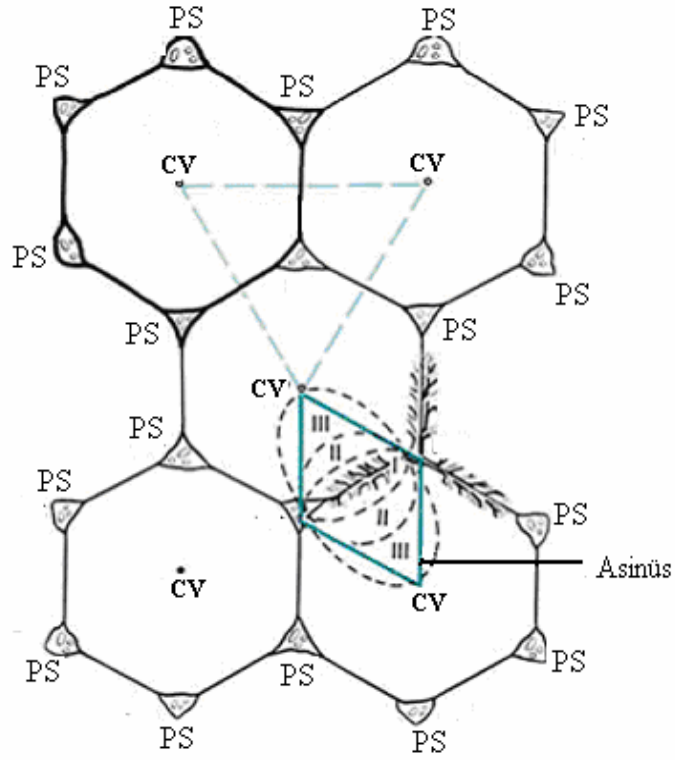
Karaciğer başlıca sağ ve sol olmak üzere iki loptan meydana gelir. Sağ lob, sol lobdan 6 defa daha büyüktür. Büyük olan sağ lobun alt arka yüzünde iki küçük ek lob (caudate ve quadrate) bulunur. Karaciğerin alt yüzünde sağ böbrek, duodenum, kolon ve mide

bulunur. Karaciğer diyaframa, karın duvarına, mide ve duodenuma karaciğer bantları ile yapışır (Dursun 2001).

Karaciğer kan dolaşımı, diğer organlara oranla önemli bir farklılık gösterir. Abdominal organlar içinde çift kan kaynağına sahip tek organdır. Karaciğere iki yönden kan sağlanır: Portal ven'in (kapı toplardamarı) taşıdığı kan karaciğere gelen kanın yaklaşık % 75-80'ini oluşturur. Portal ven bağırsaktan gelen oksijence fakir, bensince zengin kanı karaciğere taşır. Hepatik arter (karaciğer atardamarı) ise karaciğere gelen kanın yaklaşık % 20-25'ini oluşturur ve oksijence zengin kanı karaciğere taşır (Kierszenbaum 2002, Junqueira vd. 2003).

2.1.2 Karaciğerin Mikroskobik Anatomisi

Karaciğer, 'lobül' veya 'asinüs' denilen birimlerden oluşur. Klasik karaciğer lobülü hegzagonaldir ve merkezinde santral ven köşelerinde ise portal alanlar bulunur. Portal lobül, merkezinde portal alan köşelerinde komşu lobullerin santral venlerinin bulunduğu hayali bir üçgendir. Portal lobülün sınırlarını santral venleri birleştiren çizgiler belirler (Şekil 2.2). Asinüs ise bir portal alan ile komşu santral ven arasında kalan üçgen şeklinde bir birimdir. Asinüs karaciğerin en küçük fonksiyonel anatomik birimidir. Kan damarları, asinüsün periferine doğru dağılırlar ve sinuzoidleri oluşturarak santral vene dökülürler. Asinüs üç bölgeye ayrılır. Bu alanların metabolik fonksiyonları birbirlerinden farklıdır. Birinci alan portal alana en yakın olandır ve oksijence zengin kandan en fazla yararlanır. Üçüncü alan ise portal alana en uzaktır ve en az kanlanan alandır. Bundan dolayı karaciğerdeki bozulmalara az dirençli bölgedir (Bissel vd. 1996, Tulunay 2001).



Şekil 2.2 Karaciğerde Lobül Yapısı (Ökten 2001) (PS: Portal Alan; CV: Santral Ven)

Karaciğer dokusu belli işlevleri üstlenmiş belli sınırlarla ayrılan bölümler içermez, her hepatosit karaciğere ait her işlevi yerine getirebilir. Ancak, birinci alandaki hepatositler daha çok glukoneogenez, yağ asidi oksidasyonu, aminoasit parçalanması, kolesterol üretimi ve safra asidi sekresyonu ile ilgili görevler üstlenirken, üçüncü alandaki hepatositler glukoliz, lipogenez, detoksifikasyon gibi görevlere ağırlık verir (Sherlock vd. 1997, Ökten 2001).

2.2 Karaciğerin Histolojisi

2.2.1 Hepatositler

Karaciğerdeki hücrelerin % 65'ini, karaciğer hacminin % 80-88'ini hepatositler oluşturur. Hepatositler, altı veya daha fazla yüzeye sahip, 20-30 µm çapındadır ve karaciğer lobülü içinde santral ven çevresinden periferik doğru dizilmişlerdir. Hepatositler bir veya iki hücre kalınlığında tabakalar oluştururlar. Bu tabakalar arasında

sinüzoid adı verilen endotel hücreleriyle döşeli kan akımının sağlandığı boşluklar bulunur. Hepatositler granüllü ve granülsüz endoplazmik retikulumlar açısından oldukça zengindirler. Elektron mikroskopuyla alınan kesitlerde, granüllü endoplazmik retikulum sisternalarında yerleşmiş çok sayıda poliribozom görülmüştür. Granüllü endoplazmik retikulum üzerindeki poliribozomlarda, hem karaciğerin kendisi hemde plazma lipoproteinleri (albümin, protrombin, fibrinojen ve lipoproteinler) için protein sentezi yapılır (Junqueira vd. 2003, Ross vd. 1995). Hepatositler, organizmada yağ metabolizmasının merkezi konumundadırlar. Sentezledikleri safra tuzları bağırsak lümeninde misel oluşumunu sağlar. Emilen yağ asitleri ya şilomikronlar içerisinde ya da albümine bağlı olarak kan dolaşımında taşınırlar (Şentürk 2004, Burtis vd. 1999).

2.2.2 Endotel Hücreleri

Endotel hücreleri sinüzoidleri disse aralığından ayıran, aralarında geniş porları olan bazal membran ve intersellüler birleşmeler içermeyen hücrelerdir. Endotel hücreleri ince sitoplazmasında çok sayıda por bulunur. Kan ile gelen oksijen ve metabolik maddeler kapillerden disse aralığını geçerek hepatositlere belirgin bir engelle karşılaşmadan kolayca ulaşırlar (Şentürk 2004, Burtis vd. 1999).

2.2.3 Kupffer Hücreleri

Kupffer hücreleri tipik makrofajlardır. Endotel hücrelerinin lümene bakan yüzeyinde belirli aralıklarla bulunurlar. Elektron mikroskobu ile bakıldığında hücre gövdesinde kısa sitoplazmik uzantıları gözlenir. Kupffer hücrelerinin başlıca fonksiyonları; yaşlı eritrositleri metabolize etmek, hemoglobini ve immünolojik olaylarla ilgili proteinleri sindirmektir (Junqueira vd. 2003, Burtis vd. 1999).

2.2.4 Stellat (İto) Hücreler

Disse aralığına yerleşmiş yıldızsı ve yağ depolayıcı hücrelerdir. Bu hücrelere aynı zamanda “İto hücreleri” de denilmektedir. Bu hücrelerin sitoplazmasında çok miktarda yağ damlacıkları bulunmaktadır. Bu hücreler dışarıdan verilen A vitaminini lipid

damlaları içinde retinil esterler halinde biriktirme kapasitesine sahiptirler. Yağda eriyen A vitamini bu hücrelerde birikir (Junqueira vd. 2003, Burtis vd. 1999).

2.2.5 Safra Kanalı Epitel Hücresi

Hepatosit arasındaki safra kanalcığından başlayan safra kanalları, safrayı kanın ters yönünde yani klasik lobülün merkezinden periferine doğru taşırlar. Hepatositlerle çevrili olan safra kanacıklarını, safra kanalı epitelyum hücreleri ile çevrili kanallarla birleştiren yapılara herring kanalı denir. Bu bölge hepatosit kök hücrelerine ev sahipliği yaptığı için stratejik öneme sahiptir (Şentürk 2004, Burtis vd. 1999).

2.3 Karaciğerin Fizyolojisi

Karaciğer, hem endokrin hem de ekzokrin fonksiyon gösteren vücudun çok yönlü bir organıdır. Protein sentezi, safra salgılanması, detoksifikasyon, bazı vitaminlerinin depolanması, A vitamininin üretimi, glikozun glikojen şeklinde depolanıp, insülin denetiminde kana verilmesi, kan pıhtılaşmasında görev alan proteinlerin üretilmesi, lenf yapımında görev almak gibi çok önemli fonksiyonları vardır (Kaplan vd 2003, İliçin vd. 1996).

2.3.1 Karbonhidrat Metabolizması

Karaciğer özellikle kandaki glukoz konsantrasyonunun devamlılığının sağlanmasında önemli rol oynar. Kan glukoz konsantrasyonu düştüğünde glikojeni glukozla dönüştürür. Glikojenin tükenmesi durumunda glukoneogenez yoluyla laktat, gliserol veya amino asitlerden glukoz sentezlenir ve kan glukoz dengesi korunur. Karaciğer karbonhidrat ve proteinin fazlasını yağ asidi ve trigliseride dönüştürerek depolanmak üzere yağ dokusuna gönderir (İnt. kyn. 3).

2.3.2 Lipit Metabolizması

Karbonhidrat yeterli derecede depolandıktan sonra karaciğer, karbonhidratların ve proteinlerin fazlasını yağa çevirir. Yağ asitleri ya hemen enerji kaynağı olarak kullanılır

veya yağ dokusunda ve karaciğerde depo edilir. Hepatositler yağ asitlerini keton cisimlerine dönüştürebilen hücrelerdir ve uzun süreli açlıktan sonra sinir dokusu keton cisimlerini enerji kaynağı olarak kullanmaya başlar (İnt. kyn. 3).

2.3.3 Protein Metabolizması

Karaciğer hücresi, kendisi için ürettiği proteinlere ek olarak albümin, protrombin, fibrinojen ve lipoproteinler gibi plazma proteinlerini de sentezler. Bu proteinlerin sentezi granüler endoplazmik retikuluma bağlı poliribozomlarda yapılır. Diğer bez hücrelerinin aksine, hepatositler proteinleri sitoplazmada depolamayıp, kan dolaşımına vererek endokrin bir bez özelliği gösterirler. Karaciğer tarafından dışarıya verilen proteinin % 5’lik bir kısmı kupffer hücreleri tarafından üretilmektedir (Kaplan vd. 2003, Guyton 1986).

2.3.4 Safra Sentezi ve Salınımı

Safranın tek sentez yeri karaciğerdir. Safra sıvısı içerisinde; su, elektrolitler, safra asitleri, fosfolipidler, kolesterol, bilirubin bulunur. Bu maddelerin % 90’ı distal intestinal epitelden emilim yoluyla alınır ve hepatositler aracılığıyla kandan safra kanallarına taşınır. Hepatositler tarafından kolesterolden sentezi yapılan safra asitleri, safranın suda erimeyen kısımlarının emülsiyonunu sağlar ve bağırsakta yağların absorpsiyonunu kolaylaştırır. Safra asitleri yağ sindiriminde ve emiliminde önemli oldukları için, yağda çözünen tüm vitaminlerin emilimi safra yardımıyla olur. Safra asitleri oranının anormal olması safra taşlarının oluşmasına (kolelityazis) neden olabilir. Safra taşları safra akımını bloke edebilir ve safra kanaliküllerini çevresindeki sıkı bağlantıların parçalanmasıyla sarılığa (kanda safra pigmentleri bulunması) yol açabilir (İnt. kyn. 3, İliçin vd. 1996).

2.3.5 Detoksifikasyon Fonksiyonu

Karaciğer vücuda dışarıdan giren ilaç, ksenobiyotik ve çeşitli zararlı maddelerin detoksifikasyonundan sorumlu olduğu gibi, vücutta çeşitli metabolitlerin zararsız hale

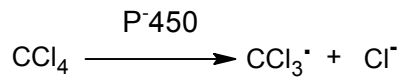
getirilmesinden de sorumludur. Protein yıkımından ortaya çıkan amonyak, hücreler için toksik bir maddedir. Karaciğer, amonyağı mitokondriyel ve sitozolik enzimlerce katalizlenen bir takım reaksiyonlarla üreye dönüştürerek idrarla atılmasını sağlar. Vücutta farklı dokularda sentezlenen hormonları metabolize ederek, atılmaya hazır hale getirir. Hemoglobinin yıkımından sonra açığa çıkan bilirubin de karaciğerde glukronik asitle konjuge edilerek suda erir hale getirildikten sonra safra yolu ile vücut dışına atılır (Kaplan vd 2003, İliçin vd. 1996).

2.4 Toksik Ajan Olarak Karbon Tetraklorür

Karbon tetraklorür (CCl_4) renksiz, yanıcı olmayan, kolayca buharlaşan, yoğun bir sıvıdır. Doğal olarak bulunmamasına rağmen kimyasal olarak üretilmektedir. Güçlü bir kimyasal kararlılığa sahip olduğundan, tahmini yarılanma ömrü 30-100 yıldır. CCl_4 iyi bir kimyasal çözücüdür. Bu özelliğiyle endüstriyel yağlarda, petrol ürünleri, pestisit, reçine ve kauçuk gibi kimyasal ürünlerde organik çözücü olarak kullanılır. Ayrıca soğutucu ekipmanlarının ısı transferinde ve kloroflorokarbonlu (CFCs) bileşiklerin sentezinde kullanılır (Pope 1995).

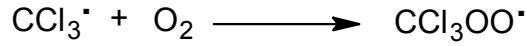
CCl_4 biyoaktivasyonu, serbest radikaller ile indüklenen kimyasal toksisiteye iyi bir model oluşudur. Serbest radikaller metabolizmada normal metabolik yolların gerçekleşmesi esnasında oluşabildiği gibi çeşitli ekzojen toksik ajanların etkisi ile de oluşabilmektedir. Bu toksik ajanlardan biride CCl_4 'dür (İnt. kyn. 4, Timbrell 1982).

Kendi sınıfının en toksik maddesi olan CCl_4 , gastrointestinal sistem ve solunum sisteminde çok kolay absorbe edilebilir ve karaciğer başta olmak üzere beyin, böbrek, kas ve yağ dokusunda yüksek oranlarda toksisiteye neden olur. Yapılan deneysel çalışmalar göstermiştir ki, CCl_4 'ün toksik etkisi, onun serbest radikal olan triklorometil ($\text{CCl}_3^\cdot$) radikaline dönüşümü sonrasında görülür. Karbon-klor bağı kırılır ve karbondan ortaklanmamış bir elektron kalır. Bu organik çözücü Sitokrom P-450 tarafından serbest radikale dönüştürülür (İnt. kyn. 4, Timbrell 1982).



Sitokrom P-450; granülsüz endoplazmik retikulumda yer alan, monooksijenaz gibi her biri belirli bir substrat için özel olan kolesterol, yağ asitleri, steroid biyosentezi ve detoksifikasyon için gerekli hidroksilasyon mekanizmasını gerçekleştiren bir çok enzimin yer aldığı bir elektron taşıma sistemidir. Sitokrom P-450 sistemi akciğer, böbrek ve bağırsaklar gibi organlara nazaran en çok karaciğerde bulunur. Sitokrom P-450 tarafından gerçekleştirilen hidroksilasyon mekanizması yabancı maddeleri ara metabolitleri haline dönüştürerek vücuttan uzaklaştırılmasını sağlayan bir reaksiyondur (Mansour 2000, Özmen 2004).

Karbon tetraklorür, karaciğerde sitokrom P-450 vasıtasıyla metabolize edildikten sonra hızla, reaktif bir ara metabolit olan $\text{CCl}_3^\bullet$ dönüşür. Bu molekülde oksijen varlığında triklorometil peroksit $\text{CCl}_3\text{OO}^\bullet$ radikalini meydana getirir. CCl_4 ün bu reaktif serbest radikal metabolitleri poliansatüre yağ asitleri ile reaksiyona girerek LPO'yu başlatır ya da kovalent olarak yağlara ve proteinlere bağlanarak hücre membranının bozulmasına ve karaciğer hasarına neden olur (Mansour 2000, Özmen 2004).



LPO sonucu karaciğer hücrelerindeki endoplazmik retikulumun yapı ve fonksiyonu bozulur. Endoplazmik retikulum şişer ve ribozomlar ayrılır. Hücreler lipoprotein yapımını gerçekleştiremediği için hücre içi lipit birikimi başlar. Endoplazmik retikulum hasarını takiben mitokondrilerin yapısı bozulur plazma permeabilitesi artar ve hücre ölümü gerçekleşir (Kumar vd. 2005).

Kupffer hücreleri karaciğerin yerleşik makrofajlarıdır. Normal olarak ksenobiyotikleri fagosit ederek karaciğeri ksenobiyotiklerin zararlı etkilerinden korurlar. CCl_4 ile parankimal hücrelerde oluşan hasar, kupffer hücre aktivasyonuna da neden olur ve bu hücrelerde proinflamator sitokinler, $\text{TNF-}\alpha$ ve IL-1h üretimi uyarılır (Muriel vd. 2001, Nakahira vd. 2003).

2.5 Oksidan ve Antioksidan Sistem

Yaşamın devamı için büyük öneme sahip olan kimyasal tepkimelerin bazı basamaklarında oksijen indirgenir ve reaktif oksijen türleri olarak ifade edilen ara metabolitler oluşur. Reaktif karakterli bu tür metabolitlerin oluşumuna yol açan faktörlerin tamamı “oksidan madde” veya daha yaygın ismi ile “serbest radikal” olarak da tanımlanmaktadır (Montgomery 1996). Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Elektron eksiklikleri nedeniyle başka moleküllerle kolayca elektron alışverişi yapabilir veya onlarla birleşebilirler. Bu nedenle serbest radikaller son derece reaktif bileşiklerdir. Oksidanlara karşı koyan ve onların zararlı etkilerini nötralize eden maddelere “antioksidan” denir. Organizmada oksidan ve antioksidan maddeler arasında belirli bir denge olması gerekir. Bu denge hücresel ve biyolojik kaynaklı olarak bozulabilir (Dündar vd. 2000).

2.5.1 Oksidan Moleküllerin Biyolojik Kaynakları

Uyuşturucu ve alkol gibi alışkanlık yapan maddeler, antineoplastik ajanlar (nitrofrontoin, bleomisin, doxorubicin gibi kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar), çevresel ajanlar (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler), toksik kimyasallar, antibiyotikler ve iyonize edici radyasyon başlıca eksojen radikal kaynaklarıdır. Ayrıca stres de en etkin biyolojik kaynaklardan biridir çünkü stres durumunda katekolamin düzeyi artar. Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır. Bu olay stresin hastalıkların patogeneziindeki rolünün serbest radikal üretimiyle ilgili olabileceğini göstermesi bakımından önemlidir. (Onat 2002, Wood vd. 1991).

2.5.2 Oksidan Moleküllerin İntraselüler Kaynakları

Küçük moleküllerin (tioller, katekolaminler, hidrokinonlar, antibiyotikler) otooksidasyonu, enzimler ve proteinler (triptofan dioksijenaz, ksantin oksidaz, hemoglobin), mitokondrial elektron transport zinciri, endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (sitokrom P-450), peroksizomlar (oksidazlar, flavoproteinler), plazma membranı (lipoksijenaz, prostaglandin sentetaz, LPO,

fagositlerde NADPH oksidaz) ve oksidatif stres yapıcı durumlar (iskemi, travma, intoksikasyon) serbest oksijen radikallerinin intraselüler kaynaklarıdır (Özkan 2004).

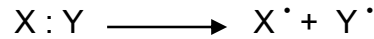
2.6 Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Dış orbitallerinde eşleşmemiş elektron bulunan kısa ömürlü atom ve moleküller “Serbest Radikal” olarak isimlendirilir (Floyd 1993). Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Serbest radikaller bu ortaklanmamış elektronlardan dolayı oldukça reaktif olup çevrelerindeki atom ve moleküllerle reaksiyona girme eğilimindedir. Çünkü bir radikal çiftleşmemiş elektronunu başka bir moleküle vermek veya başka bir molekülden elektron koparmak zorundadır. Bunun sonucu olarak da elektron alışverişi yaptığı molekül bir radikal haline gelir. Bu serbest radikallere özgü bir reaksiyondur ve bir radikal başka bir radikale sebep olur (Halliwell 1991). Kısa ömürlü olmalarına rağmen; bir dizi zincir reaksiyonu başlatıp birçok radikal oluşturmalarından dolayı oldukça tehlikeli olan serbest radikaller, ortaklanmamış elektronun belirtilmesi amacıyla üst kısımlarına yazılan bir nokta (X[•]) ile gösterilirler (Akkuş 1995).

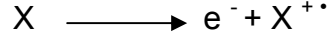
Serbest radikal molekülleri, antioksidan savunma gücü ile dinamik bir denge içinde bulunduğu sürece organizma için yararlıdır. Bu dengenin bozulması, serbest radikallerin artmasına ve hücre hasarı oluşturmalarına yol açar. Bu duruma “oksidatif stres” denilmektedir (Sies 1993).

Serbest radikaller başlıca üç mekanizma ile oluşmaktadır (Sies 1993).

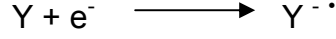
1. Kovalent bağlı molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalacak şekilde homolitik bölünmesi (homolitik ayrılma ile radikal oluşumu)



2. Normal bir molekülden elektron kaybı veya molekülün heterolitik bölünmesi. Molekülün yapısındaki atomlardan birisinin elektron kaybetmesi sonucu reaktif özellik taşıyan yapılar oluşmaktadır.



3. Normal bir moleküle bir elektron eklenmesi ile reaktif özellik taşıyan yapılar oluşmaktadır.



Oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanan oksidatif stres (Sies 1993); diyabet, Alzheimer, böbrek yetmezliği gibi birçok patolojik durumda (Dalle-Donne vd. 2003), yaşlılıkta (Onat vd. 2002) ve pestisitler, uyuşturucu, radyasyon, gibi biyolojik kaynaklı oksidan maddelere yoğun bir şekilde maruz kalma sonucunda da ortaya çıkmaktadır. Serbest radikaller insanlarda elliden fazla hastalığın patolojisi ile ilişkilendirilmektedir (Halliwell 1991).

2.6.1 Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Oksijen atomunun dış yörüngesini oluşturan p orbitalinde iki elektron eksik olmasından ötürü “diradikal” olarak değerlendirilir. Bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. Oksijen metabolizmada en son suya indirgenirken, kısmi olarak indirgenmesi ile de çok sayıda “Reaktif Oksijen Türleri (ROS)” oluşmaktadır. Moleküler oksijenin canlılardaki toksik etkilerinin nedeni oksijen radikalleridir. Bu radikaller oksijene ihtiyaç duyan canlılarda, normal metabolik işlevler sırasında kaçınılmaz bir şekilde üretilmektedir. Bu sebeple reaktif oksijen türleri normal metabolizma faaliyetleri sırasında oksidasyon ve redüksiyon ürünleri olarak meydana gelir (Köse vd. 1992).

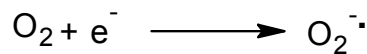
Hücre içinde reaktif oksijen radikallerinin oluşumu en fazla mitokondrilerde gözlenir. Başlıca radikal kaynağı mitokondri membranındaki elektron transport zinciri olsa da nötrofiller, monositler ve makrofajlar, ROS üretimi bakımından yüksek aktiviteye sahip hücrelerdir. ROS’lar radikal ROS’lar ve radikal olmayan ROS’lar olmak üzere ikiye ayrılır (Çizelge 2.1) (Witko vd. 2000).

Çizelge 2.1 Bazı reaktif oksijen türleri

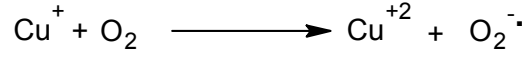
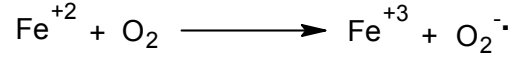
Radikaller		Radikal Olmayanlar	
Süperoksit anyon radikali	($O_2^{\bullet-}$)	Hidrojen peroksit	(H_2O_2)
Hidroksil radikali	($OH^{\bullet}$)	Lipid hidroperoksit	($LOOH$)
Peroksil radikali	($RO_2^{\bullet}$)	Hipohalöz asid	(HOX)
Alkoksil radikali	($RO^{\bullet}$)	N-Halojenli aminler	($R-NH-X$)
Semikinon radikali	($HQ^{\bullet}$)	Singlet oksijen	(1O_2)
Organik radikaller	($R^{\bullet}$)	Ozon	(O_3)
Organik peroksit radikali	($RCOO^{\bullet}$)	Azot dioksit	(NO_2)
Nitrik oksid radikali	($NO^{\bullet}$)	Hipokloröz asid	($HOCl$)
Hemoproteine bağlı radikaller		Peroksinitrit	($ONOO^-$)

2.6.1.1 Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$)

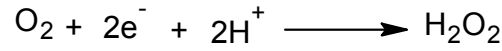
Aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) meydana gelir. Başka moleküllerle kolayca elektron alışverişine girebilir. Hem indirgeyici hemde oksitleyici özelliğe sahip radikaldir. Bu radikalin en önemli kaynağı mitokondri, kloroplast ve endoplazmik retikulum elektron transport zincirinden küçük elektron sızıntılarıdır (Valko vd. 2007).



Süperoksit radikali, organizmaya direkt olarak zarar vermemesine rağmen bir hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağıdır ve geçiş metal iyonlarının otooksidasyonu nedeniyle meydana gelebilir. Bu reaksiyonlar redoks reaksiyonu olduğu için ters yönde de gerçekleşebilir (Valko vd. 2007).



Membran fosfolipidleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri sitoplazmaya göre daha asidiktir ve süperoksit burada daha kolayca bir proton alarak hidrojen peroksit radikalini oluşturabilmektedir. Bu radikal çok reaktif bir tür olup, hücre membranlarında LPO'yu başlatabilmekte ve antioksidanları oksitleyebilmektedir (Kılınç vd. 2002, Jensen 2003).



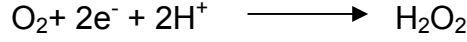
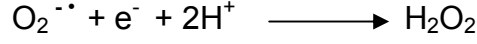
Süperoksit radikali ayrıca nitrik oksit ile reaksiyona girerek reaktif bir oksijen türü olan peroksinitriti ($\text{ONOO}^{\cdot-}$) oluşturmaktadır. Böylece $\text{NO}^{\cdot}$ 'nin etkisi inhibe edilir. Peroksinitritlerin proteinler üzerine direkt zararlı etkileri de vardır, ayrıca daha başka reaktif ve toksik ürünlere azot dioksit ($\text{NO}_2^{\cdot}$), hidroksil radikali ($\text{OH}^{\cdot}$) ve nitronyum iyonuna dönüşebilirler (Akkuş 1995).

Süperoksit radikali kendiliğinden dismutasyon tepkimesi ile veya bir metalloenzim olan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenerek H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşür (Akkuş 1995).

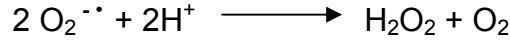


2.6.1.2 Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

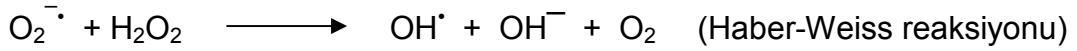
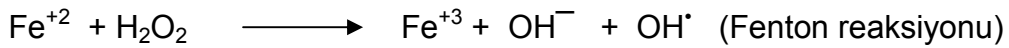
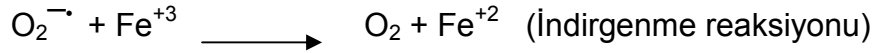
Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 elektron alması veya $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek H_2O_2 'yi meydana getirir (Valko vd. 2004).



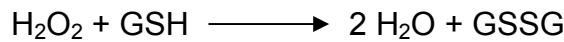
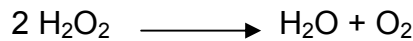
Ancak, biyolojik sistemlerde H_2O_2 'in asıl üretimi $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyonu ile olmaktadır. Bu dismutasyon spontan olarak veya SOD enzimi aracılığıyla katalizle olabilir.



Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri arasına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek (Haber-Weiss reaksiyonu) en reaktif oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir. Haber-Weiss reaksiyonu katalizör varlığında da yokluğunda da oluşabilmektedir. Ancak, katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci reaksiyon ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{+3}) süperoksit tarafından ferro demire (Fe^{+2}) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak “Fenton reaksiyonu” ile hidrojen peroksitten $\cdot\text{OH}$ ve OH^- üretilir. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki şekildedir (Valko vd. 2007).

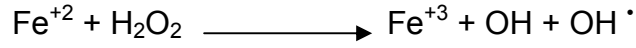


SOD aktivitesi sonucu ortaya çıkan H_2O_2 , katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleri ile su ve oksijene dönüştürülür (Halliwell 1994).

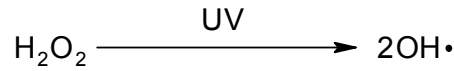


2.6.1.3 Hidroksil Radikali (OH[•])

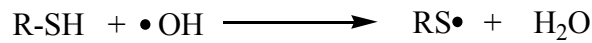
Hidrojen peroksit, demirin ferro iyonu (Fe⁺²) varlığında fenton reaksiyonuna girerek bir hidroksil iyonu (OH) ve kararlı yapıların çoğuna hücum edebilecek, en güçlü oksitleyici madde olan bir hidroksil radikaline (OH[•]) ayrıştır (Ames vd. 1993).



Bu hidroksil radikalleri, çok hızlı olarak komşu moleküllerle reaksiyona girerler, yarı ömürleri çok kısadır. Bunun sonucunda stabil, yarı ömürleri daha uzun ve daha az reaktif radikaller oluşur. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize radyasyona maruz kalmasıyla ve hidrojen oksijen kovalent bağının parçalanmasıyla hidroksil radikali oluşur (Ames vd. 1993).



OH[•] radikali hücresel DNA hasarının oluşumundan ve iyonize radyasyonun membranlara etkisinden sorumludur. Tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşmasına da sebep olmaktadır. Ayrıca LPO'yu başlatmaktadır (Kılınç vd. 2002).



2.6.1.4 Singlet Oksijen (¹O₂)

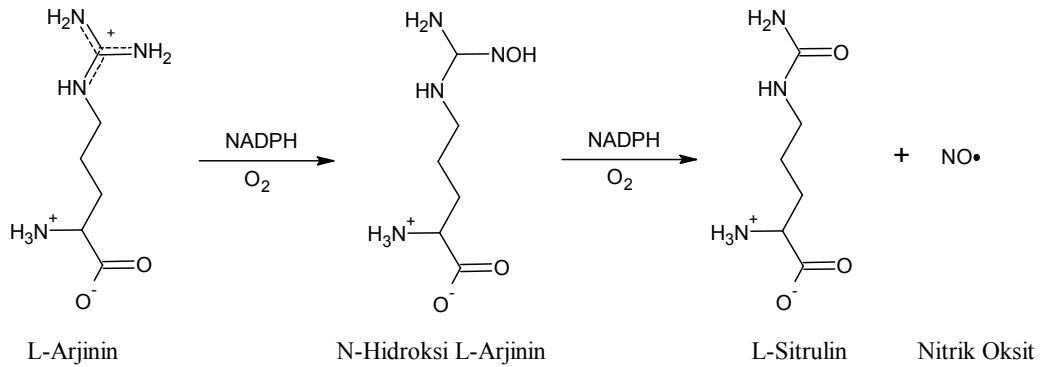
Oksijenin eşleşmemiş elektronlarından birinin verilen enerji sonucu bulunduğu orbitalden başka bir orbitale veya kendi spininin ters yönüne yer değiştirmesi ile oluşur (Cross vd. 1987, Ames vd 1993). Singlet oksijenin delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır (Akkuş 1995). Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunda spin kısıtlamasının kaldırılmış olması sebebiyle reaktivite çok yüksektir. Aldığı enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde verip oksijene geri dönebilir. Diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder ya da kovalent tepkimelere girer.

Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Singlet oksijen *in vivo* ortamda sitokrom P-450, endoperoksit sentetaz ve myelo peroksidaz reaksiyonları ile oluştuğu gibi iyonize radyasyonla da oluşabilir. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur (Kılınç vd. 2002).

2.6.1.5 Nitrik Oksit Radikali (NO•)

Nitrik oksit yüksek yapılı canlılarda amaçlı olarak ve çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrojen merkezli bir radikaldır. Paylaşılmamış elektron aslında nitrojen atomuna ait ise de, bu elektronun hem nitrojen hem de oksijen atomu üzerinde delokalize olması nedeni ile tam radikal özelliği taşımaz. Bunun sonucu, bilinen diğer radikallere göre reaktivitesi baskılandığında oldukça uzun ömürlüdür (Kılınç vd. 2002).

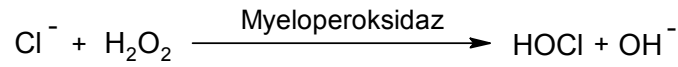
Bu lipofilik serbest radikal, damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz enzimi aracılığı ile L-arjininden sentezlenir (Şekil 2.3). Kolayca düz kasa geçerek guanilat siklaz enziminin hem demirine bağlanır ve cGMP sentezini uyarıp damar gevşemesini uyarır. NO, aynı zamanda tiyol gruplarını S-nitrozilasyona uğratarak protein ve reseptör fonksiyonlarını da değiştirir. NO, oluşmuş olan ROS'lar ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOOH) oluşturmakta ve bunun da ileri dekompozisyonu ile •OH radikali oluşumuna yol açmaktadır (Southorn vd. 1988, Cochrane 1991).



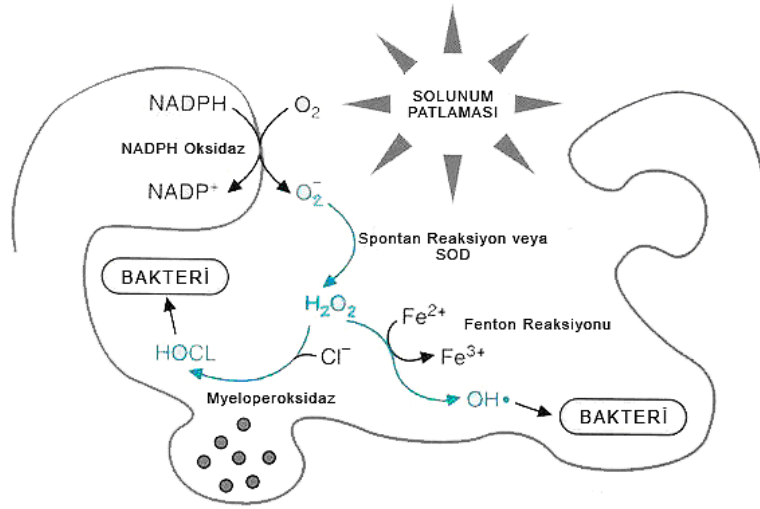
Şekil 2.3 L-Arjininden nitrik oksit üretimi

2.6.1.6 Hipokloröz Asit (HOCl)

Enzimatik olarak nötrofiller tarafından üretilir, güçlü bir oksidandır. Fagositik hücrelerce bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynar. Aktive olan nötrofiller, makrofajlar ve eozinofiller süperoksit üretirler. Özellikle nötrofiller, içerdikleri myeloperoksidaz enzimi aracılığı ile süperoksitin dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksiti, klorür iyonu ile birleştirilerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan hipokloröz asit (HOCl)'e dönüştürür (Southorn vd. 1988).



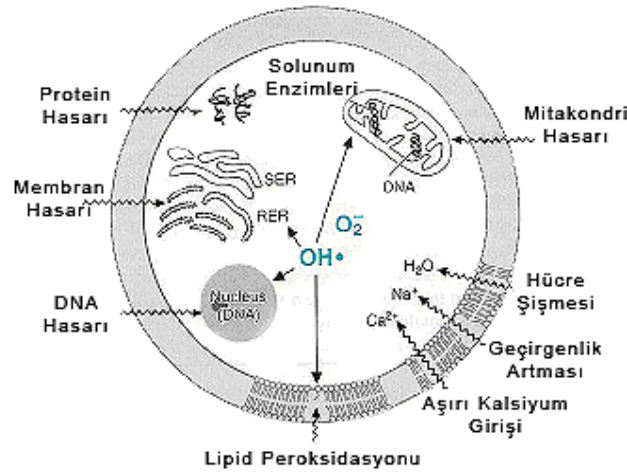
Solunum patlaması, vücuda giren bakterilerin makrofaj, nötrofil ve eozinofil gibi hücreler tarafından fagosit edilmeleri ve bu hücrelerce üretilen ROS'lar tarafından yok edilmesi olayıdır (Şekil 2.4). Solunum patlaması sırasında görev alan ROS'lardan biri de hipokloröz asitir (Akkuş 1995).



Şekil 2.4 Solunum patlaması

2.6.2 Serbest Radikallerin Etkileri

Çeşitli patolojik durumlarda normalden fazla miktarda serbest oksijen radikali oluşmasıyla veya organizmanın antioksidan sisteminin yetersiz kalmasıyla artan serbest radikaller, makromoleküllerle etkileşerek hücrede yapısal ve fonksiyonel bozukluğa neden olmaktadır. Serbest radikaller biyomolekülleri oksitler böylece genetik bilginin (DNA) değişmesine, protein yapısının bozulmasına, enzim aktivitesinin engellenmesine ve hücresel membranların zedelenmesine neden olur ve LPO'yu başlatır. Poliansature yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olan LPO serbest radikallerin uyardığı hücre yıkımında önemli bir mekanizmadır. Birçok hastalıkta doku yıkımı, serbest radikaller ve LPO sonucu oluşur (Şekil 2.5) (Şimşek 1999).



Şekil 2.5 Serbest radikallerin toksik etkileri

2.6.2.1 Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

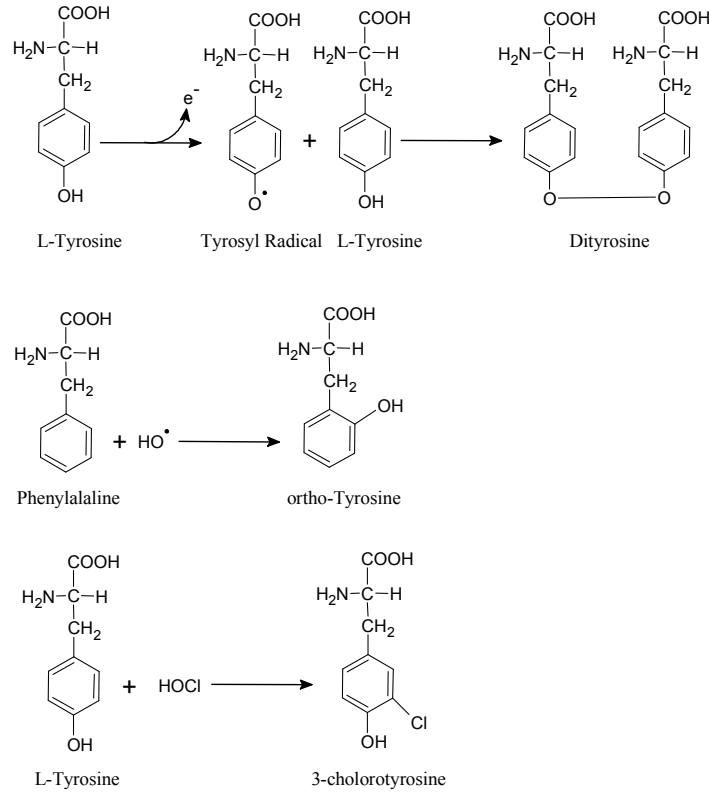
Glukoz otooksidasyonu, taşıyıcı metallerin katalizlediği reaksiyonlar sonucunda glukozun kısmen radikal olan anyonları oluşturması ile meydana gelir. Bu radikaller, daha sonra O₂'i indirgeyerek O₂^{•-} anyonunu meydana getirirler. Bu da diğer ROS'ların oluşumunu tetikler. Proteinlerin glikolizasyonu, glukozun proteinlerin amino grubuna bağlanmasıyla başlar. Bunun ardından bir seri kimyasal modifikasyon geçirerek, daha kararlı bir yapı olan protein-glukoz kompleksine dönüşür. Biyokimyasal reaksiyonlar

sonucunda oluşan glikolize proteinler ise, Cu ve Fe varlığında, O₂'e elektron vererek ROS'ların oluşmasına neden olurlar (Akkuş 1995).

Ayrıca sinoviyal sıvının viskozitesinde önemli role sahip aminoglikan yapıdaki hyalüronik asid, serbest radikallerle etkileşerek bağ dokusunun stabilitesinin bozulmasına ve sıvının viskozitesinin kaybına neden olur (Baykal vd. 2000).

2.6.2.2 Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Proteinler serbest radikallere karşı lipitlerden daha az hassastır. Etkilenme dereceleri içerdikleri amino asit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren amino asitlerden (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir. Bu karbon merkezli radikallerden karbonillerin ölçülmesi ile proteinlerin oksidatif hasarı ölçülebilir. Serbest radikallerin meydana getirdiği hasar sonucunda proteinlerde fragmentasyon, çapraz bağlanmalar ve proteinlerin agregasyonu meydana gelir. Yapıları bozulan proteinler normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Enzimler protein yapısında olduklarından enzim aktivitelerinde değişiklikler meydana gelir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Bazı amino asitlerin reaktif oksijenlerce oksidasyonu (Cemek vd. 2008)

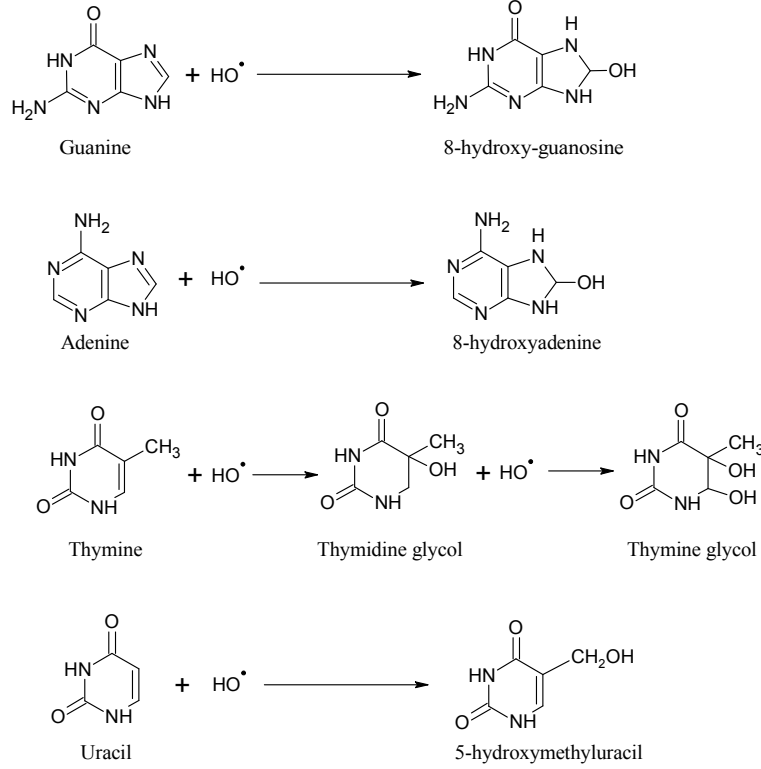
Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin $\text{O}_2^\bullet$ veya H_2O_2 ile reaksiyona girerek methemoglobin oluşur (Bast vd. 1989, Richardson 1991).

2.6.2.3 Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri

Serbest radikallerin DNA'ya etkisi sonucu, DNA'da tek ve çift dal kırıkları, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir bütün bu hasarlar hücrenin canlılığını tehdit eder. Ayrıca oksidatif hasara bağlı olarak DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir (Mathers 2004).

Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Eğer hidroksil radikali DNA'nın yakınında meydana gelirse pürin ve pirimidin bazlarına atak yapar ve mutasyonlara neden olabilir. Hidroksil radikali, nükleik asitlerde doymuş karbon atomlarından hidrojen çıkarır veya çift bağlara katma tepkimeleri ile

sonuçlanan tepkimelere girer (Şekil 2.7). Singlet oksijenin nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha sınırlıdır. Süperoksit radikali güçlü bir oksitleyici olduğundan, guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay tepkimeye girer. Hidrojen peroksit ise membranlardan kolayca geçerek hücre çekirdeğine ulaşır ve DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (Gutteridge 1995).



Şekil 2.7 Bazı nükleik asit bazlarına reaktif oksijen türlerinin etkileri (Cemek vd. 2008)

2.6.2.4 Lipit Peroksidasyonu (LPO)

Tüm biyomoleküller serbest radikal atağına maruz kalır ancak bunların içinde lipitler en hassas olanıdır. Hücre membranının temel bileşeni çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) serbest radikaller ve peroksidasyon için potansiyel bir hedeftir. Lipit peroksidasyonu (LPO), serbest oksijen radikalleri tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren geri dönüşümsüz, kimyasal bir zincir reaksiyonudur. Lipit peroksitlerinin aldehit türevleri, hidrokarbon radikalleri ve uçucu bazı ürünlere çevrilmesi şeklinde sonlanır. LPO'nun oluşumu başlama, yayılma ve

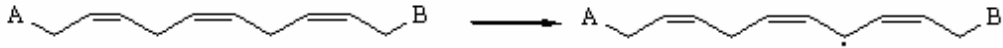
sonlanma şeklinde üç aşamada gerçekleşir (Şekil 2.8). (Gutteridge 1995, Murray vd 1996, Niki vd 1991, Tekkeş 2006).

Başlama; redoks katalisti olarak görev yapan Fe^{+3} veya Cu^{+2} gibi geçiş metal iyonlarının varlığında, serbest radikallerin hepsi, LPO'yu başlatabilir. Peroksidasyon, serbest radikallerin, poliansature yağ asidinin metilenik yan zincirinden bir hidrojen atomu çıkarmak için yaptıkları atakla başlar. Böylece, yağ asidi zinciri üzerinde karbon merkezli bir lipit radikali oluşur. Radikal oluşumunu takiben yağ asidi zincirindeki çift bağlar, konjuge dien şeklinde yeniden düzenlendikten sonra, O_2 ile reaksiyona girerek peroksi radikalini oluşturlar (Burton 1989).

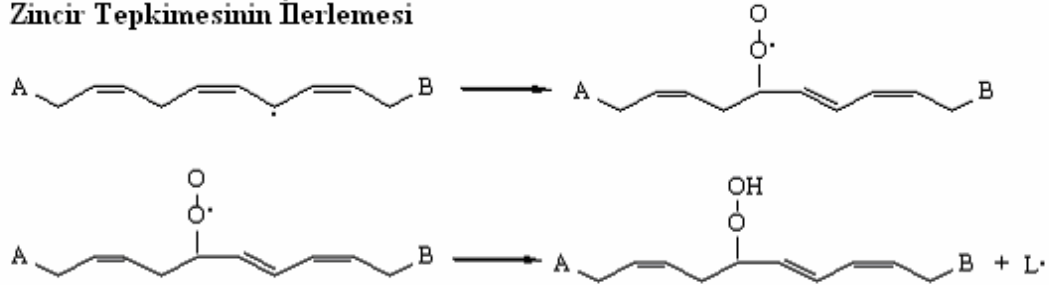
İlerleme; peroksi radikali diğer bir peroksi radikaliyle birleşebilir ya da membran proteinleriyle etkileşebilir. Fakat en önemlisi, bu radikallerin kendilerine komşu yağ asidi zincirlerinden hidrojen atomlarını çıkartabilmeleri ve peroksidatif zincir reaksiyonunu yaymalarıdır. Peroksidasyon bir kere başladıktan sonra oto katalitik olarak yayılabilmekte ve yüzlerce yağ asidi zinciri, lipit hidroperoksitlerine çevrilebilmektedir (Burton 1989).

Sonlanma; lipit hidroperoksitleri, hem proteinleri veya bazı metal kompleksleri varlığında, siklik peroksitler ya da endoperoksitler üzerinden çeşitli ürünlere yıkılmaktadır. Çoğu, biyolojik olarak aktif olan bu ürünler -OH, -OOH, -COOH veya -CHO grupları içeren kısa zincirli yağ asitleri ile etan ve pentan gibi gazlardır (Burton 1989).

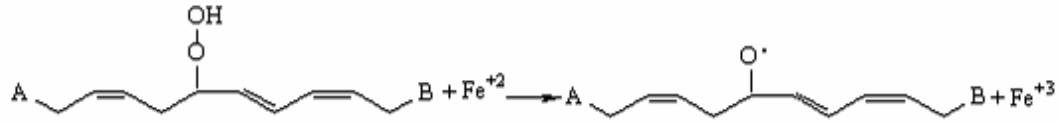
Başlama



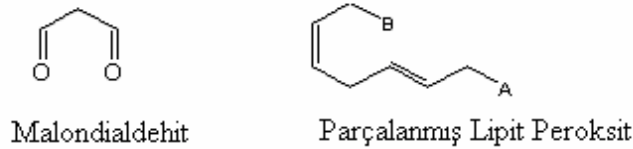
Zincir Tepkimesinin İlerlemesi



Zincir Dallanması



Parçalanma



Malondialdehit

Parçalanmış Lipit Peroksit

Şekil 2.8 Lipit peroksidasyonu

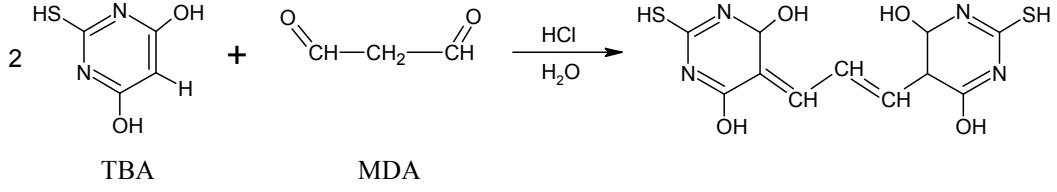
Lipit peroksidasyonu, lipit hidroperoksitlerin aldehit ve diğer karbonil bileşikler ile etan, pentan gibi uçucu gazlara dönüşmesi ile son bulur. Oluşan son ürünlerden birisi de kan plazmasında kolaylıkla teşhis edilebilen ve oksidatif stres ölçümlerinde kullanılan malondialdehit (MDA) molekülüdür. LPO tepkimeleri sonucunda başta aldehitler olmak üzere çok sayıda ürün oluşmaktadır. Peroksidasyon sırasında oluşan peroksi radikalleri, lipit hidroperoksitler ve bunların yıkım ürünleri, biyomembranlar, subsellüler organeller ve enzimler üzerinde toksik etkilerini gösterirler. Oluşan lipit radikalleri ve MDA gibi peroksidasyon ürünleri aracılığıyla LPO, biyolojik membranlarda yaygın hale geldiği zaman hücresel yapı fonksiyon hasarları ortaya çıkmaktadır (Valko vd. 2007).

Yapısal hasarın derecesine göre, plazma membranında akışkanlığın azalması, membran geçirgenliğinin değişmesi, membran potansiyelinin azalması, membrana bağlı enzimlerde (Na^+ ve K^+ ATPaz) aktivite azalması görülür. Çünkü enzimler dahil birçok protein yapısında bulunan serbest tiyol (-SH) gruplarını, disüflitlere (S-S) oksitleyerek, bu bileşiklerin aktivite ya da fonksiyonlarının değişmesine neden olurlar. Lizozomal mitokondriyal membranları ilgilendiren ileri derecede lipid peroksidasyonu ile organel içeriği (mitokondriyal matriks enzimleri, lizozomal enzimler gibi) hücre içine salınır. Normal koşullarda lizozomlar içinde güvenli bir şekilde tutulan lizozomal proteolitik enzimlerin sitoplazmaya salınmaları ile hücre içi proteoliz hızlanır, doku hasarı şiddetlenir. Membran geçirgenliğinin bozulması ile protein sentezi için çok önemli olan K^+ , Mg^{+2} konsantrasyonları değişir ve buna bağlı olarak protein sentezinin inhibisyonu görülür (Yarıktaş vd. 2003).

2.6.2.5 Malondialdehit (MDA)

LPO'nun sonlanma basamağında oluşan en önemli ürün malondialdehittir (MDA). Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan MDA, membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına sebep olur. Ayrıca deformabilite, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzeyindeki determinantların agregasyonu gibi membran özelliklerini değiştirebilir. Bunların dışında MDA, hücre membranından kolayca geçip, DNA'nın azotlu bazları ile tepkimeye girmekte ve DNA ipçiklerinde kopmalar meydana getirmektedir (Akkuş 1995).

MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik yada kantitatif bir indikatörü değildir fakat lipid peroksidasyonunun derecesi ile iyi bir korelasyon gösterir. Bu sebeple organizma da oluşan LPO düzeyini ölçmek için MDA seviyelerinin ölçümü, sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu metot MDA ile tiobarbitürik asitin (TBA) reaksiyonu temeline dayanmaktadır. MDA, tiobarbitürik asit ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve oluşan bu çözeltinin absorban değerlerinden LPO'nun derecesi saptanmaktadır (Yılmaz vd. 2000).



LPO sonucunda meydana gelen lipid peroksi radikalleri, lipid hidroperoksitler, MDA gibi bozunma ürünleri hücre membranları, organaller ve enzimler üzerine yıkıcı etki gösterirler. Hücre membranlarının permabilitesi ve viskozitesi değişir. Bu değişim membranın, Ca^{+2} gibi iyonlara karşı geçirgenliğini artırır. Hücre içi serbest Ca^{+2} artışına bağlı olarak artan fosforilaz aktivitesi fosfolipit kaybının artmasına, membran geçirgenliğinde değişiklik ve potansiyel kaybına bağlı toksik etkide artışa, proteaz aktivasyonu ile proteolitik etkinin şiddetlenmesine, katabolik enzimlerin aktivitesinde artışa ve endonükleaz aktivitesi ile DNA kırılmalarına yol açmaktadır (Onat vd. 2002).

2.6.3 Antioksidanlar

Vücutta reaktif oksijen türlerinin düzeylerini kontrol altında tutmak ve oluşturabilecekleri hasarları engellemek için birçok savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Serbest radikalleri metabolize eden, serbest radikal oluşumunu önleyen veya serbest radikallerin temizlenmesini arttıran bu maddelere “antioksidan” maddeler denilmektedir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ya da reaktif oksijen türlerini toplayarak LPO’yu inhibe etmektedirler. Aerobik hücrelerde pek çok antioksidan sistem bulunmaktadır (Scandalios 2002, Stocker vd. 1987, Jensen 2003).

Antioksidanlar başlıca altı mekanizma ile çalışırlar. Bunlar

1. Oluşan serbest radikalleri toplayıcı ve giderici etkileri ile bağlayarak veya kararlı hale getirerek;
2. Zincir kırıcı etki ile serbest radikal üreten kimyasal reaksiyonları durdurarak
3. Baskılayıcı etki ile reaksiyon hızını azaltarak
4. Onarıcı etki ile lipid, protein ve DNA gibi yapılarda oluşmakta olan biyolojik moleküler hasarı rejenere ederek
5. Hücresel kinaz kayıplarını önleyip oksidasyon reaksiyonlarını durdurarak

6. Organizmadaki SOD gibi antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini artırarak etkilerini gösterirler.

Antioksidanlar yapılarına göre enzimatik yapıda olanlar (SOD, GPx, CAT, GST) ve enzimatik yapıda olmayanlar (GSH, vitamin E, vitamin C, vitamin A, melatonin) şeklinde gruplandırılabilirdiği gibi (Çizelge 2.2) hücre lokalizasyonlarına göre de intrasellüler antioksidanlar (SOD, CAT, GPx), ekstrasellüler antioksidanlar (albümin, vitamin C, ürat) ve membran antioksidanları (vitamin E, vitamin A) olarak gruplandırılabilir (Gutteridge 1995).

Çizelge 2.2 Biyolojik sistemlerdeki antioksidanların sınıflandırılması

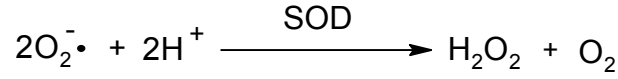
Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon (GSH)	Melatonin
Katalaz (CAT)	α -Tokoferol (Vit. E)	Seruloplazmin
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Askorbat (Vit. C)	Transferin
Fosfalipit hidroperoksit glutasyon	β -Karoten (Vit. A)	Ferritin
Peroksidaz (PLGPx)	Flonoidler	Laktoferrin
Glutasyon-S-transferaz (GST)	Ürat	Albumin
Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	Biluribin	Lipoik asid

2.6.3.1 Enzimatik Antioksidanlar

Aerobik organizmalar oksijen toksisitesinden başlıca üç enzim yardımıyla korunur. Bunlar; süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz ve katalazdır (Bhagavan 2002).

2.6.3.1.1 Süperoksit Dismutaz (SOD, E.C.1.15.1.1)

Antioksidan savunmanın ilk basamağı süperoksitin H_2O_2 'e dismutasyonunu katalizleyen süperoksit dismutaz enzimidir.



Bu dismutasyon reaksiyonu süperoksit radikalının anyon ve kation formlarının eşit oranda bulunduğu pH 4.8 de spontan olarak gerçekleşir. Ancak fizyolojik şartlarda yani pH değeri 7.35-7.45 arasında iken bu reaksiyon çok daha yavaş oluşacaktır. SOD enzimi varlığında ve pH en az 7.4 olduğu koşullarda süperoksitin dismutasyonu 4 kat daha hızlı meydana gelmektedir (Cherubini vd. 2005).

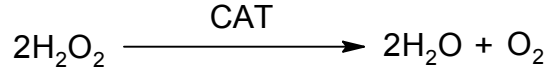
İnsanda SOD enziminin üç tipi bulunmaktadır. Bunlardan ikisi sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn içeren izomer (Cu/Zn-SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik, Mn içeren izomerdir (Mn-SOD). Üçüncü tip ise ekstraselüler SOD'dur. SOD enziminin ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür. Genel olarak, hücrede en bol bulunan izomer, sitozolik Cu/Zn-SOD'dur (Onat vd. 2002).

2.6.3.1.2 Katalaz (CAT, E.C.1.11.1.6)

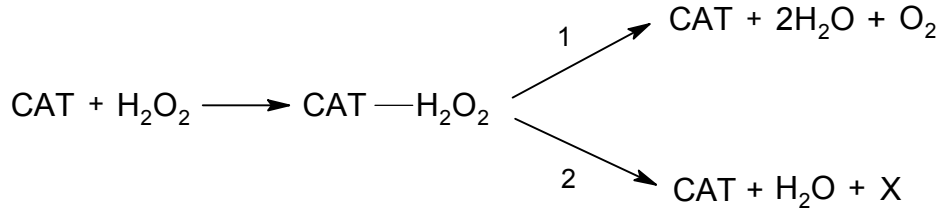
Sumer ve Dounce tarafından 1937'de kristalize edilen katalaz (CAT), her biri bir prostetik grup olan ve yapısında Fe^{+3} bulunduran 4 hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir. Enzimin molekül ağırlığı 240000 daltondur ve çoğunlukla peroksizomlarda lokalizedir (Young vd. 2001).

CAT, SOD enziminin etkisiyle ortamda oluşan hidrojen peroksitin suya çevrilmesini gerçekleştirir. Hidrojen peroksit konsantrasyonunun yüksek olduğu durumlarda CAT enzimi detoksifikasyonu sağlarken hidrojen peroksit konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda ise glutatyon peroksidaz (GPx) enzimi görev alır. Ayrıca CAT

peroksizomlarda daha etkin iken, GPx sitozol ve mitokondri de etkindir (Yılmaz vd. 2003).



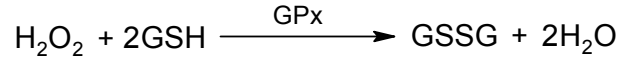
Katalazın peroksidatik ve katalitik olmak üzere iki fonksiyonu vardır (Şekil 2.9). CAT'ın temel fonksiyonu H_2O_2 'in enzimatik parçalanmasının yanında (katalitik aktivite); H_2O_2 konsantrasyonunda, metil veya etil hidroperoksitler, metanol, etanol, fenol gibi küçük moleküllü elektron vericilerini indirgeyebilme özellikleri de (peroksidatik aktivite) bilinmektedir. Fakat katalaz, lipid peroksitleri gibi büyük molekülleri indirgeyememektedir. Enzim bir molekül H_2O_2 'den elektron alarak onu oksitlerken kendisi redüklenir, bir diğer molekül H_2O_2 'e elektron vererek onu indirgerken kendisi oksitlenerek başlangıçtaki durumuna dönmektedir (Karabulut 2001).



Şekil 2.9 Katalaz enziminin katalitik (1) ve peroksidatik (2) aktiviteleri

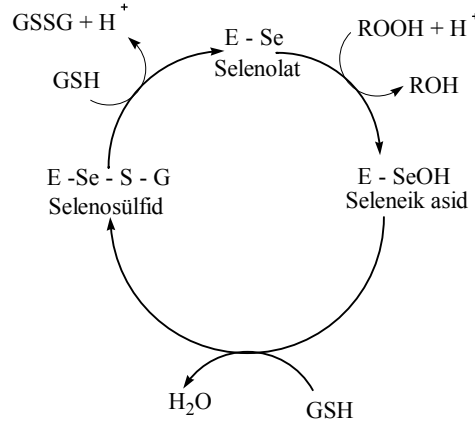
2.6.3.1.3 Glutasyon Peroksidaz (GPx, E.C.1.11.1.9)

Glutasyon peroksidaz enzimi ilk kez 1957 yılında Mills tarafından hayvan dokusunda keşfedilmiştir. Genellikle yüksek bitkilerde ve bakterilerde bulunmamasına karşın bazı alglerde ve mantarlarda bulunduğu bildirilmiştir. GPx'ler selenyum-bağımlı GPx'ler ve selenyum-bağımsız GPx'ler olarak iki gruba ayrılabilir. Birincisi, aktif bölgesinde selenosistein formunda kovalent bağlı selenyum içeren selenyum-bağımlı GPx'dir. Selenyum-bağımlı GPx'ler, H_2O_2 ve organik hidroperoksitleri indirgeyebilir. H_2O_2 dahil çeşitli hidroperoksitlerin yıkımını GSH'ın oksidasyonu yoluyla katalizler. Okside glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz (GR) enzimi aracılığıyla tekrar GSH'a indirgenir (Halliwell vd. 1999, Mills 1957).



Enzimin diğ er tipi ise, katalizleme iş lemleri için selenyuma bağı lı olmayan proteinlerden oluş ur ve H_2O_2 e karşı ihmal edilebilir bir aktivite gösterir. Bu grup enzimler glutatyon S-transferaz (GST) olarak adlandırılır ve elektrofilik bileş ikler ile GSH'ın konjugasyonunu katalize eden proteinler olarak tanımlanır (Halliwell vd. 1999).

Selenyum-GPx, her ünite aktif bölgesinde bir atom selenyum elementi içeren dört protein alt ünitesinden oluş ur. Molekül ağı rlığı yaklaşık 85000'dir. Sitozol ve mitokondride bulunur. Se elementi selenosistein şeklinde olup, normal sisteindeki sülfür yerine Se bulunur (R-SH yerine R-SeH). GSH, enzim iç erisindeki selenyumı indirger ve indirgenmiş enzim H_2O_2 ile reaksiyon verir. Selenyum-GPx enziminin katalitik dö ngüsü Ş ekil 2.10'de gösterilmiştir. Selenyum-GPx'in selenolat formu (E-Se⁻) peroksit substratını (ROOH) alkole indirgerken, kendisi okside aside dö nüşür (E-Se-OH). GSH bu devrede reaksiyona katılarak selenosülfidi oluş turur (E-Se-S-G). İkinci bir GSH'ın selenosülfide bağ lanması ile enzim aktif formu olan selenolat formuna dö nerken GSH da GSSG'a okside olur (Halliwell vd. 1999, Mannervik 1985).



Ş ekil 2.10 GPx'in katalitik aktivitesi

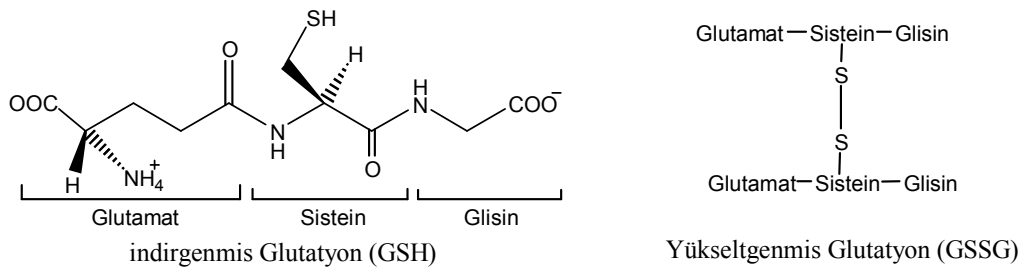
2.6.3.2 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Glutasyon (GSH), vitamin E (α -tokoferol), vitamin C (Askorbik asit), vitamin A(β -karoten) ve melatonin gibi enzimatik olmayan ancak antioksidan özelliğe sahip moleküller, reaktif oksijen türlerinin meydana getirdiği oksidatif strese karşı bazen tek tek bazen de enzimatik antioksidanlarla birlikte direnç gösterirler (Wood vd. 1991).

Melatonin ve GSH gibi bazı enzimatik olmayan antioksidanlar insan bünyesi tarafından üretilirken, α -tokoferol, askorbik asit ve β -karoten ise eksojen olarak vücuda temin edilir (Wood vd. 1991).

2.6.3.2.1 Glutasyon (GSH)

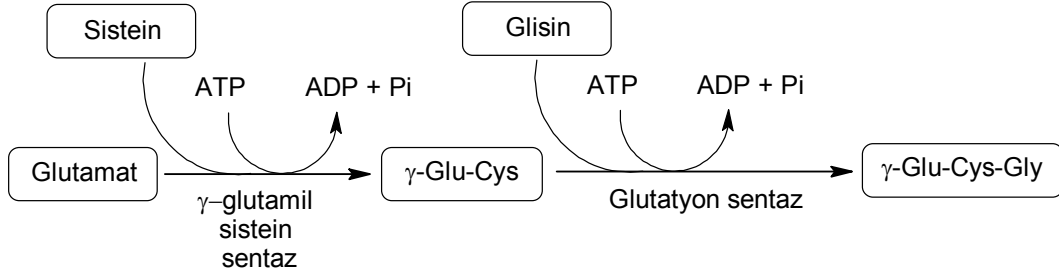
Redükte glutasyon (GSH) (γ -glutamilsisteinilglisin); glutamat (γ -Glu), sistein (Cys) ve glisin (Cys) içeren bir tripeptit olup, aktif bir sülfidril (-SH) grubuna sahiptir (Şekil 2.11). Hemen hemen bütün hayvan hücrelerinde ve bazı bakterilerde bulunur. GSH'nin hücresel antioksidan savunmada birçok rolü vardır. En önemli antioksidan görevi H_2O_2 ve organik peroksitleri (lipit peroksit gibi) selenyum bağımlı enzim GPx ile katalizleyip yok ederek sırasıyla su veya alkole dönüşmesidir. Bir çift hidrojen iyonu vererek GSSH'a yükseltgenir, GSSH ise glutasyon redüktaz tarafından katalizlenir. Bu reaksiyon GPx ile oluşur, böylece GSH'nin meydana gelebilmesi için bir redoks döngüsü sağlanmış olur (Flohe 1985).



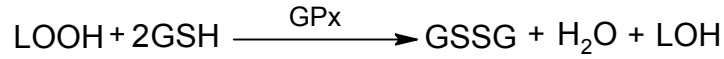
Şekil 2.11 GSH ve GSSG'nin yapısı

Glutasyonun vücuttaki sentezi iki basamakla meydana gelir. İlk basamakta glutamat ve sisteinden, γ -glutamil sistein sentaz enzimi ve ATP aracılığı ile bir ara ürün meydana

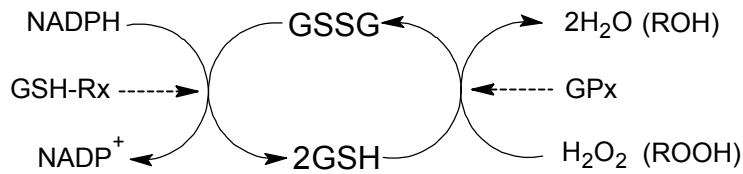
gelir. İkinci basamakta ise ara ürüne glutatyon sentaz katalizörlüğünde glisin eklenir ve glutatyon oluşur (Nelson vd. 2004).



GSH, aerobik koşullar altında normal büyümenin ve metabolizmanın sonucunda oluşan hidrojen peroksit ve diğer peroksitlerin uzaklaştırılmasında GPx antioksidan enzimi ile birlikte görev alır. GSH ve GPx, peroksitleri suya indirgeyerek detoksifikasyonu gerçekleştirirler (Ahmad 1995).



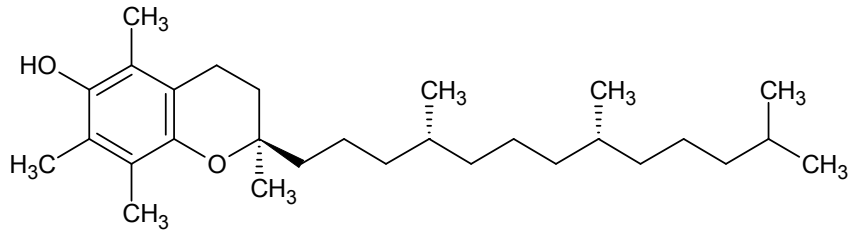
Tepkime sırasında glutatyon yükseltgenerek, yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) formuna dönüşür. GSSG, NADPH'ın indirgenmesinde kullanılan glutatyon redüktaz (GSH-Rx) tarafından yeniden oluşturulur (Akkuş 1995).



Detoksifikasyon görevi dışında GSH, hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller (Nelson vd. 2004).

2.6.3.2.2 Vitamin E (α -tokoferol)

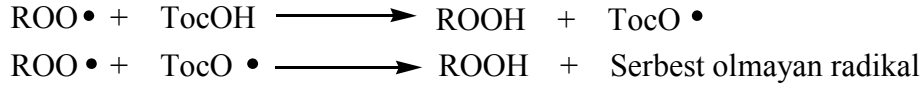
Vitamin E (α -tokoferol) ise karaciğer, plazma ve yağ dokularında yüksek oranda bulunan ve antioksidan etkisi ile membran içinde bulunan doymamış yağ asitlerinin oksitlenmesini önleyen bir vitamindir (Şekil 2.12). Böylelikle vitamin E, membranlarda meydana gelebilecek hasarı önlemektedir. Membranda bulunan fosfolipitlerin doymamış yağ asitleri bölümü, flavoprotein oksidaz tarafından oluşturulan hidrojen peroksit üretimiyle oksitlenir. Oksidasyon esnasında ortaya çıkan süperoksit, diğer radikaller ve peroksit, membran enzimleri sitokrom P-450 oksidaz ve ksantin oksidaz tarafından katalizlenerek proteinlerle serbest radikalleri oluşturular. Bu serbest radikaller daha sonra mitokondriyel, mikrozomal ve hücre membranları fosfolipitlerinin doymamış yağ asitlerini okside ederek bozuklukların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Kalaycıoğlu vd. 2000).



Şekil 2.12 α -tokoferol

E vitaminin önemli bir özeliği antioksidan etkinliğinin olması nedeniyle peroksitleri ve oksijen radikallerini nötralize etmesidir (El-Demerdash vd. 2004). Yani oksijeni bağlayarak, oksijen etkisi ile oluşabilecek istenmeyen etkilerin önüne geçer. Hücrelerde doymamış yağ asitleri (lineoleik asit ve araşinodik asit gibi) kendiliğinden ya da oksidan metabolitlerinin etkisi sonucu kolayca oksitlenebilirler. Böylece lipid peroksidasyonuna veya protein ve yağlara kovalent bağlanarak membran hasarına neden olurlar. Serbest oksijen radikalleri oluşmasının eşlik ettiği bu olay zincirini membranda önleyen ve oluştuğunda nötralize eden antioksidan E vitaminidir (Kayaalp 2002, Frank 2005).

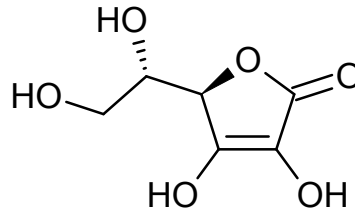
E vitamini, hücre ve organellerin membran lipitleri üzerindeki bu etkisi nedeniyle membranları oksidatif zedelenmeye karşı korur. Böylece genel olarak membran stabilitesini sağlar (Frank 2005). E vitamini lipit peroksil radikallerini etkisiz hale getirmek için, kendinin bir fenolik hidrojen atomunu peroksil radikaline (ROO•) transfer etmek suretiyle antioksidan etkisini aşağıdaki şekilde iki basamakta gerçekleştirir



Şekil 2.13 Tokoferollerin (TocOH) peroksit radikallerine (ROO) yönelik zincir parçalayıcı aktiviteleri

2.6.3.2.3 Vitamin C (Askorbik Asit)

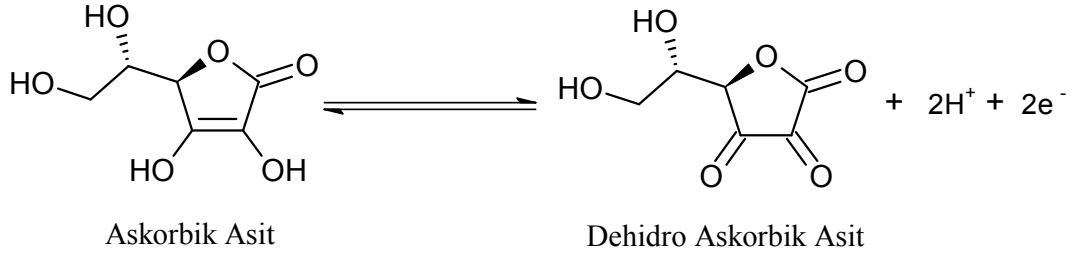
Askorbik asit, altı karbonlu bir laktondur ve pek çok memeli türünde karaciğerde glukozdan sentezlenir. Ancak insanda askorbik asidin sentezlenmesi için esansiyel olan glukolakton oksidaz enzimi bulunmaz ve bu sebeple sentezi gerçekleşemez. Suda çözünen bir vitamindir. Suda çözünebilen vitaminlerin içerisinde en stabil olan askorbik asit, L-gulonik asidin enediol laktonudur (Şekil 2.14) (Kalaycıoğlu vd. 2000).



Şekil 2.14 Askorbik asit

Askorbik asit dokularda bir enzimin katalitik aracılığı olmadan bile kolayca dehidroaskorbik aside oksitlenir. Bu özelliği nedeniyle askorbik asit indirgeyici nitelik gösterir; dehidro şekline dönüşmesi molekül başına iki hidrojen atomunun serbest kalmasına neden olur. Dehidroaskorbik asit ortamda iki hidrojen atomu almak suretiyle kolaylıkla askorbik aside indirgenir. Bu kimyasal özelliklerinden dolayı, askorbik asit

ve dehidroaskorbik asit vücut sıvılarında denge halinde bulunurlar, birbirlerine kolayca dönüşürler ve böylece redoks niteliği gösterirler (Rucker vd. 2001).



C vitamini güçlü indirgeyici aktivitesi nedeniyle aynı zamanda güçlü bir antioksidandır (Kayaalp 2002, Rucker vd. 2001). Hücre dışı sıvıda bulunan en önemli antioksidanlardan biridir. Hücrelerin içinde de antioksidan etkinlik gösterir. Süperoksit anyonunu, hidrojen peroksit, hipoklorit, hidroksil radikali, peroksil radikalleri ve singlet oksijeni güçlü bir şekilde bağlayarak işlevsiz kılar. Plazma lipidleri ile yapılan incelemeler, peroksil radikali oluşmasını teşvik eden maddelerin yaptığı LPO'yu baskılayan en önemli plazma komponentinin askorbik asit olduğunu göstermiştir. Böylece biyomembranları ve DNA'yı peroksidatif zedelenmeden koruyabilir. Ayrıca tokoferol'un antioksidan etkinliğini güçlendirir (Rucker vd. 2001).

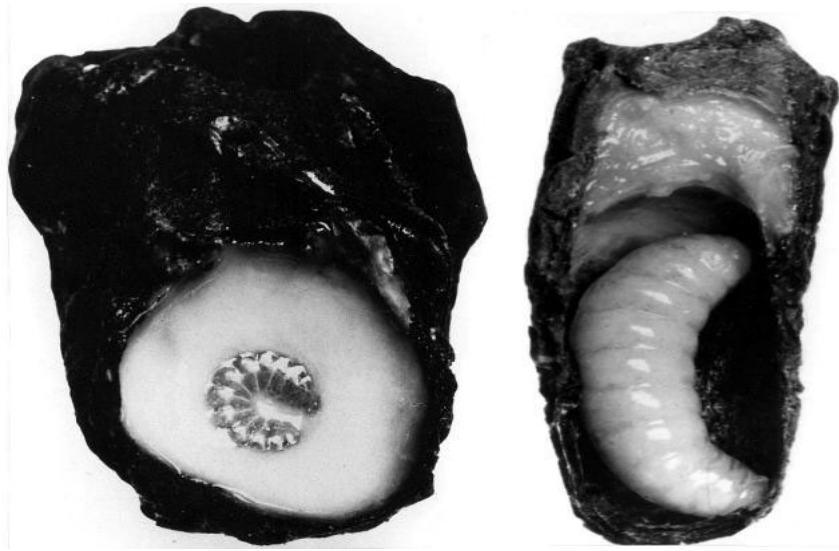
2.7 Arı Sütü (*Royal jelly*)

Arı sütü (RJ) işçi arılarının alt çene (mandibular) ve yutak altı (hypopharyngeal) bezlerinden salgılanan besin değeri ve biyolojik aktivitesi yüksek bir üründür. Beyaz-krem renkte, pelte kıvamda, kendine özgü kokusu ve ekşi-acı bir tadı bulunmaktadır (Genç vd. 1999).



Resim 2.1 Arı Sütü (*Royal jelly*)

Arı sütü, kovan içerisindeki genç larvaların ve kraliçe (ana) arının beslenmesi için temel besin maddesidir. İşçi arılarla kraliçe arı arasında genetik olarak bir fark yoktur. Larvaların beslenmesine bağlı olarak bunlar ya işçi arı veya kraliçe arı olurlar. Tüm larvalar ilk 3 gün arı sütü ile beslenirler. Üçüncü günden sonra eğer larvalar bal ve polen ile beslenirse işçi arı, arı sütü ile beslenirse kraliçe arı olurlar. Arı sütü kraliçe olacak larvalara işçi arılar tarafından doğrudan yedirilir ve kraliçe arı larvalarında bu diyetle başladıktan hemen sonra belirgin bir irilik görülür (İnt. kyn. 1, Oka vd 2001, Genç vd. 1999).



Resim 2.2 Arı sütünde yüzen 3 günlük larva, 5 günlük kraliçe larva
erişkin halinden hemen önce

Arı sütü ile beslenen kraliçe larvaları gelişimini erken tamamlayarak 16 günde ergin hale gelirken; üçüncü günden sonra bal ve polenle beslenen işçi arılar ise gelişimini 21 günde tamamlarlar (Genç vd. 1999).

Arı sütü suca zengin, lapa-jel kıvamında homojen bir maddedir. Sarı-beyazımsı renkte, keskin fenolik kokulu ve karakteristik ekşi tada sahiptir. Yoğunluğu 1.1 g/cm^3 dür. Suda çözünür. Viskozitesi su içeriğine göre değişir. Oda sıcaklığında veya buzdolabında 5°C 'de depolandığında yavaş olarak daha viskoz hale gelir. Depolanmış arı sütünde komponentlerin çökmesine bağlı olarak küçük granüller oluşur. Arı sütünün pH değeri

3.5 civarındadır. Arı sütünün yapısı üretim yapılan bölgenin koşullarına, mevsime ve üretim yöntemine göre değişmektedir (İnt. kyn. 1).

Arı sütünün bileşimi Çizelge 2.3 verilmiştir. Azotlu maddelerin ortalama % 73.9'u proteinlerdir. Azotlu maddelerin % 2.3'ü serbest amino asit ve % 0.16'sı peptidlerden oluşmuştur. Amino asitlerden aspartik asit ve glutamik asit en fazla bulunur. Serbest amino asitler içinde prolin ve lizin en yüksek miktarda bulunur. Arı sütünde ayrıca kollajen ve γ globulin (bağışıklık sisteminin anahtar elemanı) glukoz oksidaz, fosfataz ve kolin estera z gibi pek çok sayıda enzim bulunur. Tüm şekerlerin % 90'ını fruktoz ve glukoz oluşturur. Maltoz, trehaloz, melibioz, riboz da bulunur. Lipit fraksiyonunun % 80-90'ını serbest yağ asitleri oluşturur. Çoğu kısa zincirli (8-10 C atomlu) hidroksi yağ asitleri veya dikarboksilik asitlerdir. Bu yağ asitleri arı sütünün biyolojik özelliklerinden sorumludur. Başlıca bulunan asit, 10-hidroksi-2-dekanoik asittir (10-HDA). Yapısında, kanda kolesterol seviyesini düşüren (özellikle ω -3) esansiyel yağ asitleri bulunur (İnt. Kyn. 1, Feng Xue vd 2009).

Çizelge 2.3 Arı Sütünün Bileşimi

Madde	Minimum	Maksimum
Su	% 57	% 70
Proteinler	Kuru ağırlığın % 17'si	Kuru ağırlığın % 45'i
Şekerler	Kuru ağırlığın % 18'i	Kuru ağırlığın % 52'si
Lipidler	Kuru ağırlığın % 3.5'i	Kuru ağırlığın % 19'u
Mineraller	Kuru ağırlığın % 2'si	Kuru ağırlığın % 3'ü

Temel mineral tuzları K, Ca, Na, Zn, Fe, Cu ve Mn'dır. Arı sütü vitaminlerce zengindir. Taze ağırlığının gram başına niasin 48-88 μ g, tiamin 1.44-6.7 μ g, riboflavin 5-24 μ g, pridoksin 1-48 μ g, folik asit 0.13-0.53 μ g, inozitol 80-350 μ g bulunmaktadır (İnt. kyn. 1, Stocker vd 2005).

Arı sütü; kandaki kolesterol, toplam lipit, fosfolipit, trigliserid, β -lipoprotein seviyelerini düşürmekte ve damar genişletici aktivitesi bulunmakta, insülin benzeri peptidleri içermesi nedeniyle hipoglisemik (kan şekerini düşürücü) etkisi bulunmaktadır. Ayrıca bağışıklık sistemini güçlendirici ve genel vücut fonksiyonlarını düzenleyici etkisi bulunmaktadır. Bunların yanında cilt ve saç hastalıklarındaki tedavi edici, cinsel fonksiyonları düzenleyici, hücre onarıcı ve gençleştirici etkileri de bulunmaktadır (Meydanoğlu 1985).

2.8 Sialik Asit (SA)

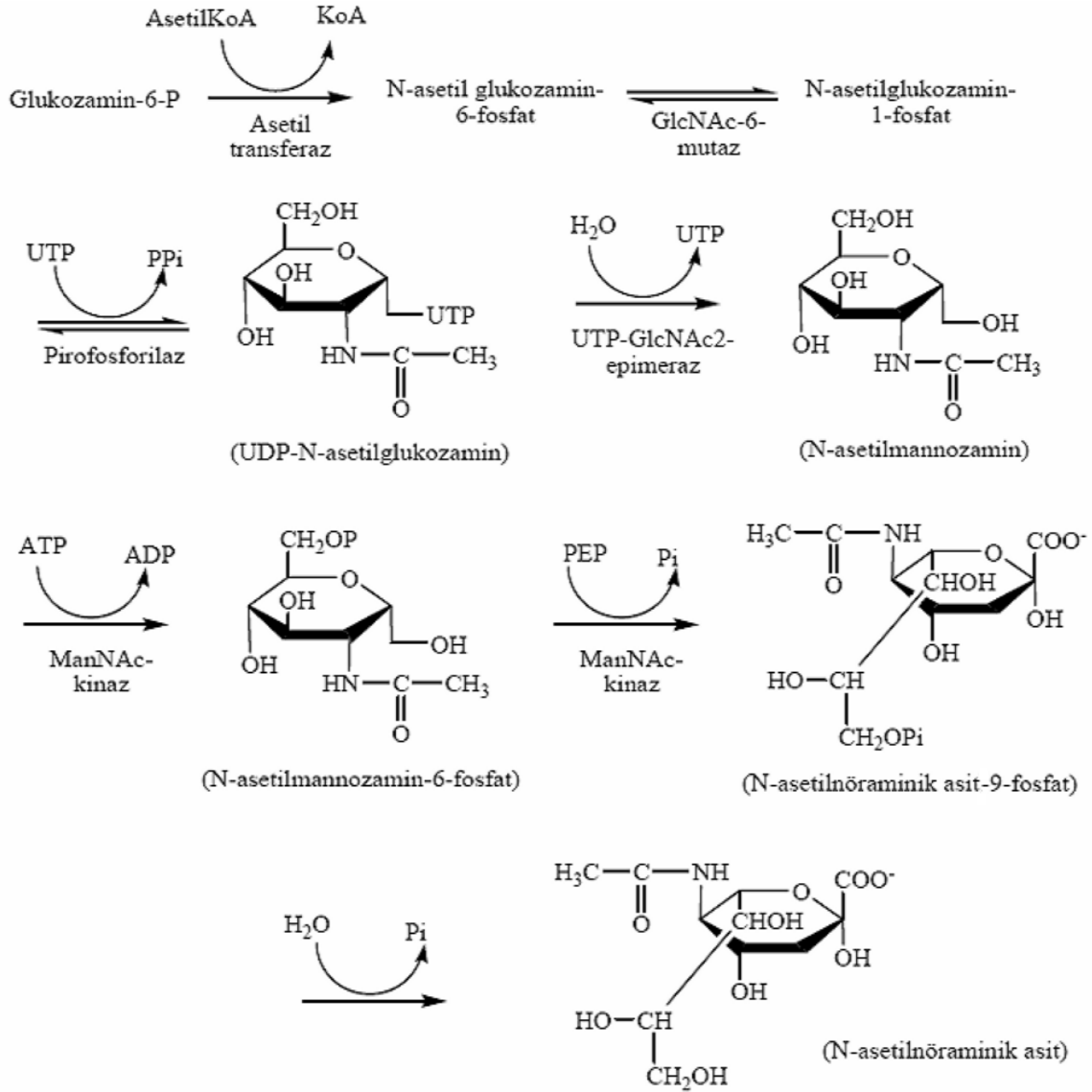
Karbohidratlar son zamanlara kadar sadece hücrenin enerji metabolizmasında yer alan moleküller olarak düşünülmüştür. Ancak son 20 yıl içindeki gelişmeler karbonhidratların görevlerinin enerji metabolizmasıyla sınırlı kalmadığını göstermektedir. Karbonhidratlar protein ve lipitlere bağlanarak glikokonjugatları oluştururlar. Glikokonjugatlar glikoproteinler, proteoglikanlar, ve glikolipitler olarak sınıflandırılabilir. Glikoproteinleri oluşturan karbonhidratlar proteinlere iki şekilde bağlanırlar. N- üzerinden bağlananlara N-glikanlar; O- üzerinden bağlananlara da O-glikanlar denir (Fukuda vd. 1994, Varki vd. 1999, Tsuboi vd. 2001, Taylor vd. 2003). Glikolipitler ise oligosakkaritlerin seramit üzerinden lipitlere bağlanması ile meydana gelir (Varki vd. 1999, Maccioni vd. 2002).

Sialik asit (SA), nöraminik asitten N-asetilizasyon yoluyla türeyen bir bileşik olup, canlıda biyolojik fonksiyonlarda önemli bir role sahiptir. SA glikoprotein ve glikolipitlerin oligosakkarid zincirlerinin indirgenmemiş ucundaki terminal karbonhidrat kalıntısıdır. İnsan dokularında şu ana kadar en önemli olan formu ise N-asetilnörominik asitdir (NANA). Diğer SA'lar pek çok farklı komponentler içermektedirler (Waters vd. 1992).

SA hücre membranlarında önemli görevleri olan glikoprotein ve glikolipidlerin oligosakkarit zincirlerinin son bölgelerindeki şeker zincirleridir. N-terminal pozisyonu üzerinde SA içeren oligosakkarit zincirler hücre yüzeyinde bulunur. Bundan dolayı gliko bileşiklerin konfigürasyonunda ve hücre yüzeyinde önemli rolleri vardır. Örneğin, hücre-hücre haberleşmesinde ve kendine ait olan ve olmayanın ayrımında tanıma görevi, membran proteolizinden kaçınmak ve hormonlar tarafından reseptör aktivasyonunun sağlanması için gerekli arabulucu olmak. SA fizyolojik pH'ta tamamen iyonlaşabilen ve pKa değeri 2.6 olan nispeten kuvvetli bir asit olup, bu özellik moleküle elektronegatif bir yük kazandırır. Bu elektronegatiflik hücrelerin birbirine agregasyonunu önlerken diğer yandan hücre membranının gerginliğini de sağlar (Uslu vd 2000). Ayrıca membran transportu, membran reseptörlerinde bağlayıcı molekül görevi, kan glikoproteinlerinin görev ve yapılarına etkisi, glomerüllerin bazal membranlarında geçirgenliğin düzenlenmesi, konakçı-patojen etkileşimlerinde tanınmayı belirleyici etkisi gibi görevleri vardır (Waters vd. 1992).

SA sentezi sitoplazmada temel olarak glukozdan başlar. N-asetilglukozamin, N-asetilgalaktozamin ile amino şekerler grubunda yer alan SA'nın öncül maddesi olan fruktoz-6-fosfatı (F-6-P) meydana getirirler. Amino grubu vericisi olarak glutaminin kullanılmasıyla F-6-P'dan glikozamin-6-fosfat oluşur. Bu reaksiyonu F-6-P aminotransferaz enzimi katalize etmektedir. Asetil grubu vericisi AsCoA'dır. Glikozamin-6-P üç basamaklı bir enzimatik reaksiyon sonucu UDP-Nasetil glikozamine çevrilir. Daha sonra UDP-N-asetilglikozaminin epimerizasyonu gerçekleşir. N-asetilmannozamin, N-asetilmannozamin kinaz ile N-asetilmannozamin-6-fosfat meydana getirir. N-asetilmannozamin-6-fosfat, aldol kondenzasyonu ile fosfoenol piruvat ile reaksiyona girerek N-asetilnöraminik asit-9-fosfatı meydana getirir. Oluşan N-asetilnöraminik asit-9-fosfat'dan fosfat grubunun uzaklaştırılmasıyla N-asetilnöraminik asit meydana gelir. N-asetilnöraminik asit molekülü tüm SA'ların öncül maddesini teşkil eder (Menteş vd. 1993, Schauer vd. 1997, Schwarzkopf vd. 2002).

Şekil 2.17 Sialik Asit Biyosentezi



Birçok hastalık grubunda serum SA miktarlarında meydana gelen değişiklikler ilgi ile izlenmekte ve hastalığın tanı ve prognozunda klinik olarak yararlanma yolları aranmaktadır. Normal bireyin SA düzeyleri değişiklik göstermez ancak çeşitli hastalıklar özellikle kanser gibi hücre dejenerasyonuna neden olan durumlarda seviyeleri artar. Özellikle SA miktarı ile tümör tipleri arasında direkt bir ilişkinin varlığı belirlenmiş ve SA miktarındaki değişikliklerin takip edilmesinin tümörün erken tanı ve tedavisinde yararlı olabileceği belirtilmiştir (Erbil vd. 1985, Sillanauke vd. 1999).

3. MATERİYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Kimyasal materyal

Karaciğer toksikasyonunu oluşturmak amacıyla kullanılan CCl_4 , Merck, tedavi gruplarına uygulanan *royal jelly*, doğal bal üretimi yapan üreticiden (Mersin, Türkiye) temin edildi. Oksidan ve antioksidan parametrelerin belirlenmesi için yapılan analizlerde kullanılan kimyasallar da, Merck marka olup analitik saflık düzeyine sahiplerdi.

3.1.2 Hayvan materyali

Araştırmaya başlamadan önce Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kuruluna başvurularak etik kurulu onayı alınmıştır. Çalışmada kullanılan 180-200 g ağırlığındaki 48 adet albino Sprague-Dawley cinsi rat, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edildi. Ratların bakımı, Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinde, 12 saatlik ideal aydınlık ortamında, uygun sıcaklıkta, rat bakımı için tasarlanmış polipropilen 17x30x42 cm boyutlarındaki özel kafeslerde yapıldı. Ratların altlarına serilen kaba talaş her gün değiştirilerek, kafeslerde kuru bir ortam oluşması sağlandı. Ratlar musluk suyu ve Afyon Yem Fabrikasından temin edilen standart pellet yem ile beslendi. Ratların bulundukları ortama uyum sağlamaları ile deneysel aşamaya geçildi.

3.2 Metot

Ratlar çalışma boyunca Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinde bir hafta standart laboratuvar yiyeceği ile beslenerek gözlem altında tutuldular. Rastgele örnekleme metodu ile her biri sekiz rattan oluşmak üzere toplam altı grup oluşturuldu.

Grup 1: Sham grubu olarak düzenlendi ve deneyler süresince herhangi bir madde enjeksiyonu yapılmadı. Grup 20 gün boyunca düzenli bir şekilde beslendi. Çalışmanın sonunda tüm ratlar sakrifiye edilerek, kan örnekleri alındı.

Grup 2: CCl₄ grubu olarak düzenlendi. Tüm ratlara 20 gün boyunca gün aşırı subkütan yoldan 0.4 ml/kg CCl₄, 0.4 ml/kg sıvı yağ içinde çözülerek verildi. Grup 20 gün boyunca düzenli bir şekilde beslendi. Çalışmanın sonunda tüm ratlar sakrifiye edilerek, kan örnekleri alındı.

Grup 3: 100 mg/kg *royal jelly* grubu olarak düzenlendi. Tüm ratlara 20 gün boyunca gün aşırı 100 mg/kg *royal jelly* distile suda çözülerek gavajla verildi. Grup 20 gün boyunca düzenli bir şekilde beslendi. Çalışmanın sonunda tüm ratlar sakrifiye edilerek, kan örnekleri alındı.

Grup 4: CCl₄+50 mg/kg *royal jelly* grubu olarak düzenlendi. Tüm ratlara 20 gün boyunca gün aşırı subkütan yoldan 0.4 ml/kg CCl₄, 0.4 ml/kg sıvı yağ içinde çözülerek ve 50 mg/kg *royal jelly* distile suda çözülerek gavajla verildi. Grup 20 gün boyunca düzenli bir şekilde beslendi. Çalışmanın sonunda tüm ratlar sakrifiye edilerek, kan örnekleri alındı.

Grup 5: CCl₄+100 mg/kg *royal jelly* grubu olarak düzenlendi. Tüm ratlara 20 gün boyunca gün aşırı subkütan yoldan 0.4 ml/kg CCl₄, 0.4 ml/kg sıvı yağ içinde çözülerek ve 100 mg/kg *royal jelly* distile suda çözülerek gavajla verildi. Grup 20 gün boyunca düzenli bir şekilde beslendi. Çalışmanın sonunda tüm ratlar sakrifiye edilerek, kan örnekleri alındı.

Grup 6: CCl₄+200 mg/kg *royal jelly* grubu olarak düzenlendi. Tüm ratlara 20 gün boyunca gün aşırı subkütan yoldan 0.4 ml/kg CCl₄, 0.4 ml/kg sıvı yağ içinde çözülerek ve 200 mg/kg *royal jelly* distile suda çözülerek gavajla verildi. Grup 20 gün boyunca düzenli bir şekilde beslendi. Çalışmanın sonunda tüm ratlar sakrifiye edilerek, kan örnekleri alındı.

3.2.1 Kan örneklerinin alınması

Çalışma sonunda, ratlar intraperitoneal yolla 100 mg/kg ketamin ile uyutuldu ve grupların hepsinden kan örnekleri alındı. Malondialdehit (MDA) ve redükte glutatyon (GSH) analizleri için heparinli cam tüpler kullanıldı. Heparinli cam tüplere kan örnekleri alındıktan sonra, aynı gün içinde laboratuvarında çalışıldı. Normal tüplere alınan kan örnekleri oda sıcaklığında bekletildikten sonra santrifüj edilerek tüpün üzerinde toplanan berrak serum numunesinde vitamin C ve SA analizleri yapıldı.

3.2.2 Biyokimyasal analizler

3.2.2.1 Malondialdehit (MDA) tayini

Serbest radikallerin, doymamış yağ asitlerini peroksidasyona uğratarak oluşturdukları son ürünlerden biri MDA'dır. MDA, tiobarbitürik asit ile reaksiyona girerek renkli formda bir bileşik meydana getirir. Oluşan bu renkli bileşiğin 532 ve 600 nm dalga boylarındaki spektrofotometrik (Shimadzu UV-1700) ölçümüne göre lipid peroksidasyonu tayini yapıldı (Jain vd. 1989).

3.2.2.2 Redükte glutatyon (GSH) tayini

Tüm kandan distile su ilavesi ile hazırlanan hemolizatın içindeki SH (sülfidril) taşıyan bütün proteinler, presipitasyon (çöktürücü) çözeltisi ile çöktürülüp, süzülerek ayrıldı. GSH, elde edilen berrak sıvıda SH gruplarının DTNB (5,5'-2-dithiobis nitrobenzoik asit) ile tepkime sonucu oluşan sarı rengin 412 nm dalga boyunda absorbansı ile ölçüldü (Buetler vd. 1963).

3.2.2.3 Vitamin C (askorbik asit) tayini

Serum, % 6'lık perklorik asit ile ekstrakte edildikten sonra oluşan ekstrakt reaksiyon solüsyonu [dinitro fenil hidrazin (DNPH), % 0.6'lık bakır sülfat (CuSO₄) ve % 5'lik

tiyoüre] ile muamele edildi. Oluşan sarı renkli kompleksin spektrofotometrede 520 nm’de absorbansı ölçülerek vitamin C analizi yapıldı (Omaye vd. 1979).

3.2.2.4 Sialik asit tayini

Ölçüm için alınan serum üzerine % 5’lik perklorik asit ilave edildi ve ısıtılarak inkübasyona tabi tutuldu. Hemen ardından soğutuldu ve 2500 rpm de 4 dakika santrifüj edildi. Temiz süpernatant alınarak üzerine ehrlich ayırıcı ilave edildi ardından 100°C 15 dakika ısıtıldı. Soğutulan tüplere 1 ml distile su ilave edildi ve 525 nm de absorbans ölçülerek SA tayini yapıldı (Sydow 1980).

3.2.3 İstatistiksel analizler

Elde edilen bulguların (MDA, GSH, vitamin C ve SA) istatistik hesaplamaları, SPSS 10.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Çalışmada elde edilen veriler "ortalama $\pm$ standart sapma" olarak ifade edildi ($X \pm SD$). Gruplarda varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post testi uygulanarak istatistiksel ilişki belirlendi. İstatistik anlamlılık için $p < 0.05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma sonunda ratlardan alınan kan örneklerinde malondialdehit, redükte glutatyon, vitamin C ve SA düzeyleri belirlendi. Bu değerler yardımıyla her grup için hesaplamalar yapılarak standart sapmaları bulundu. Çalışma gruplarına ait bulgular Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2 de görülmektedir.

Çizelge 4.1 Analizlerden elde edilen MDA ve GSH değerleri

Gruplar	MDA (nmol/ml)	GSH (mg/dl)
Sham	1.598 ± 0.24 ^b	68.907 ± 4.84 ^a
CCl ₄	2.292 ± 0.44	79.408 ± 3.28
100 mg/kg <i>royal jelly</i>	1.373 ± 0.15 ^c	67.264 ± 2.94 ^a
CCl ₄ + 50 mg/kg <i>royal jelly</i>	1.770 ± 0.37 ^a	72.320 ± 8.01
CCl ₄ + 100 mg/kg <i>royal jelly</i>	1.489 ± 0.16 ^b	69.760 ± 5.23
CCl ₄ + 200 mg/kg <i>royal jelly</i>	1.414 ± 0.18 ^c	68.747 ± 5.78 ^a

MDA: Malondialdehit; GSH: Redükte glutatyon

^a: CCl₄'den farklıdır ($p<0.05$)

^b: CCl₄'den farklıdır ($p<0.01$)

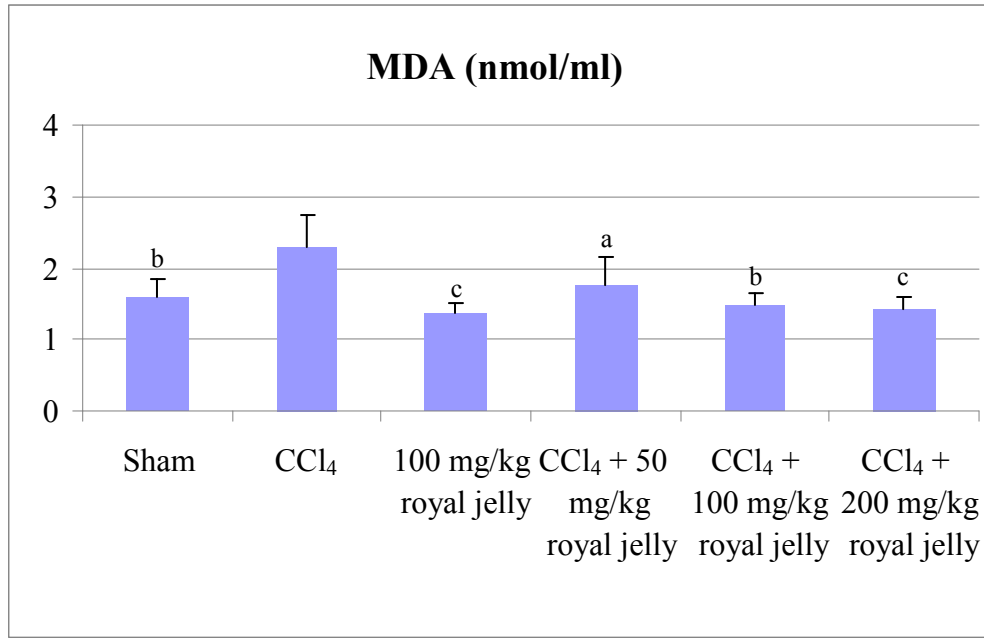
^c: CCl₄'den farklıdır ($p<0.001$)

Çizelge 4.2 Analizlerden elde edilen vitamin C ve sialik asit değerleri

Gruplar	Sialik Asit (mg/dl)	Vitamin C (mg/dl)
Sham	63.185 ± 2.02 ^b	1.906 ± 0.18
CCl ₄	74.454 ± 4.86	1.695 ± 0.38
100 mg/kg <i>royal jelly</i>	66.140 ± 4.24 ^a	2.017 ± 0.12
CCl ₄ + 50 mg/kg <i>royal jelly</i>	73.389 ± 5.01	2.672 ± 0.34 ^b
CCl ₄ + 100 mg/kg <i>royal jelly</i>	62.548 ± 2.21 ^b	2.648 ± 0.23 ^b
CCl ₄ + 200 mg/kg <i>royal jelly</i>	64.917 ± 4.52 ^a	2.622 ± 0.48 ^b

^a: CCl₄'den farklıdır ($p<0.05$)

^b: CCl₄'den farklıdır ($p<0.01$)

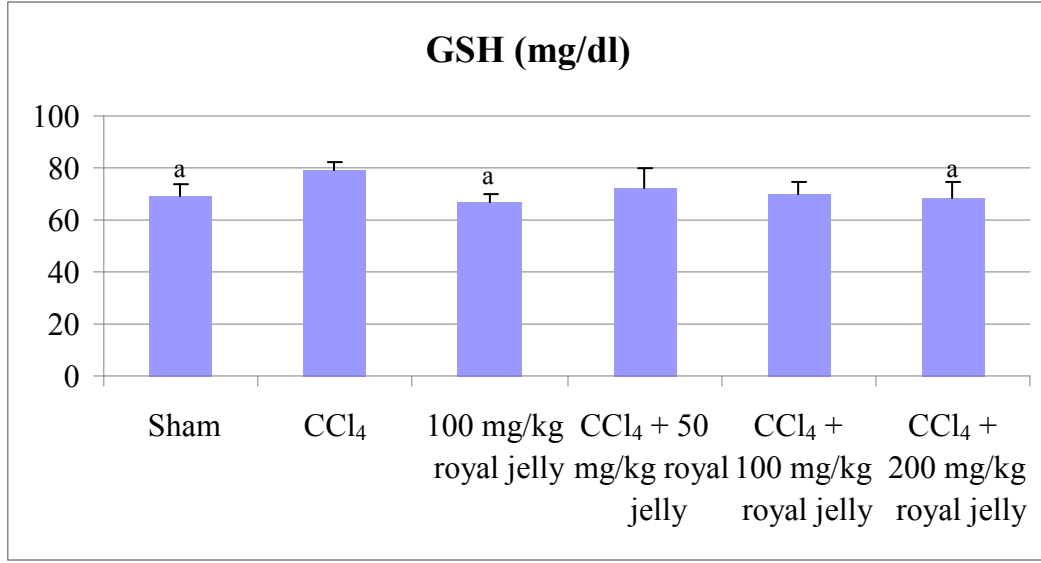


^a: CCl₄'den farklıdır ($p < 0.05$), ^b: CCl₄'den farklıdır ($p < 0.01$), ^c: CCl₄'den farklıdır ($p < 0.001$)

Şekil 4.1 MDA (nmol/ml) değerlerinin grafiksel gösterimi

Çalışmaya ait MDA değerleri sham, CCl₄, 100 mg/kg *royal jelly*, CCl₄+50 mg/kg *royal jelly*, CCl₄+100 mg/kg *royal jelly*, CCl₄+200 mg/kg *royal jelly* grupları için sırasıyla 1.598 ± 0.24 , 2.292 ± 0.44 , 1.373 ± 0.15 , 1.770 ± 0.37 , 1.489 ± 0.16 ve 1.414 ± 0.18 nmol/ml olarak bulundu.

Bu verilere göre sham grubu, CCl₄ grubundan istatistiksel anlamda $p < 0.01$ oranında farklı bulunmuştur. Yine 100 mg/kg *royal jelly* grubu, CCl₄ grubundan istatistiksel anlamda $p < 0.001$ düzeyinde farklıdır. Bununla birlikte CCl₄+50 mg/kg *royal jelly* grubunun CCl₄ grubundan istatistiksel anlamda $p < 0.05$ oranında farklı olduğu görülmüştür. Ayrıca CCl₄+100 mg/kg *royal jelly* grubu, CCl₄ grubundan istatistiksel anlamda $p < 0.01$ oranında farklı olduğu saptanmıştır. CCl₄+200 mg/kg *royal jelly* grubunda CCl₄ grubundan istatistiksel anlamda $p < 0.001$ oranında farklıdır.

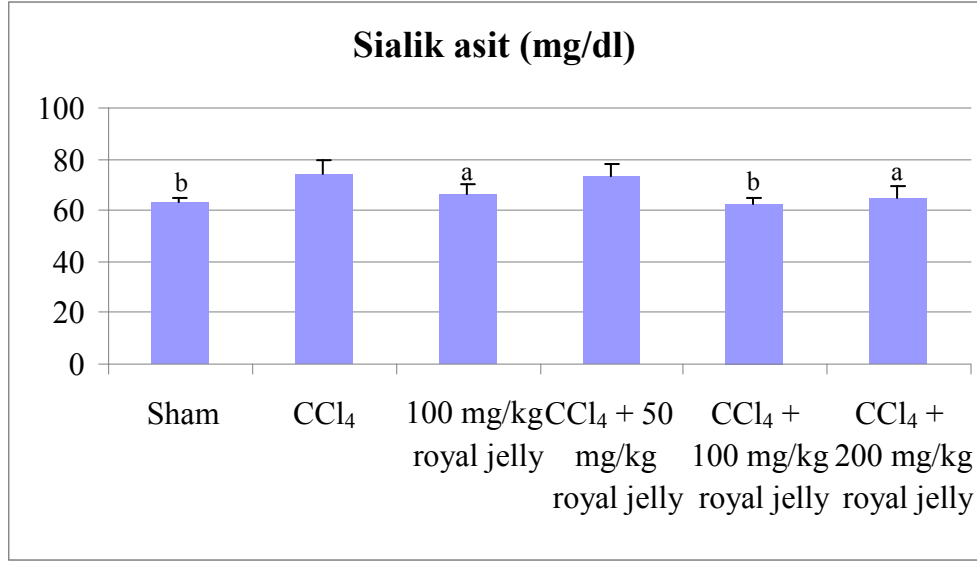


^a: CCl₄'den farklıdır ($p<0.05$)

Şekil 4.2 GSH (mg/dl) değerlerinin grafiksel gösterimi

Çalışmaya ait GSH değerleri sham, CCl₄, 100 mg/kg *royal jelly*, CCl₄+50 mg/kg *royal jelly*, CCl₄+100 mg/kg *royal jelly*, CCl₄+200 mg/kg *royal jelly* grupları için sırasıyla 68.907 ± 4.84 , 79.408 ± 3.28 , 67.264 ± 2.94 , 72.320 ± 8.01 , 69.760 ± 5.23 , 68.747 ± 5.78 olarak bulundu.

Bu verilere göre sham grubu, CCl₄ grubundan istatistiksel anlamda $p<0.05$ oranında farklı olduğu saptanmıştır. Yine 100 mg/kg *royal jelly* grubunun CCl₄ grubundan istatistiksel anlamda $p<0.05$ oranında farklı olduğu görülmüştür. Ayrıca CCl₄+200 mg/kg *royal jelly* grubunda CCl₄ grubundan istatistiksel anlamda $p<0.05$ oranında farklıdır.

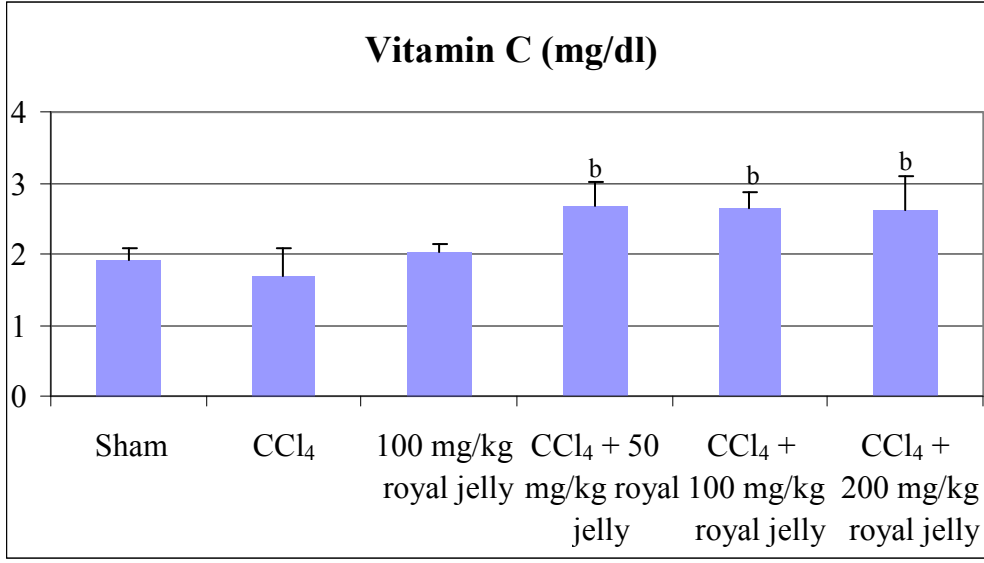


^a: CCl₄'den farklıdır ($p<0.05$), ^b: CCl₄'den farklıdır ($p<0.01$)

Şekil 4.3 Sialik Asit (mg/dl) değerlerinin grafiksel gösterimi

Çalışmaya ait SA değerleri sham, CCl₄, 100 mg/kg *royal jelly*, CCl₄+50 mg/kg *royal jelly*, CCl₄+100 mg/kg *royal jelly*, CCl₄+200 mg/kg *royal jelly* grupları için sırasıyla 63.185 ± 2.02 , 74.454 ± 4.86 , 66.140 ± 4.24 , 73.389 ± 5.01 , 62.548 ± 2.21 , 64.917 ± 4.52 olarak bulundu.

Bu verilere göre sham grubunun, CCl₄ grubundan istatistiksel anlamda $p<0.01$ oranında farklı olduğu tespit edilmiştir. Yine 100 mg/kg *royal jelly* grubu, CCl₄ grubundan istatistiksel anlamda $p<0.05$ oranında farklı olduğu bulunmuştur. CCl₄+100 mg/kg *royal jelly* grubu ile CCl₄ grubu istatistiksel olarak $p<0.01$ oranında farklıdır. Ayrıca CCl₄+200 mg/kg *royal jelly* grubunun, CCl₄ grubundan istatistiksel olarak $p<0.05$ oranında farklı olduğu saptanmıştır.



^b: CCl₄'den farklıdır ($p < 0.01$)

Şekil 4.4 Vitamin C (mg/dl) değerlerinin grafiksel gösterimi

Çalışmaya ait vitamin C değerleri sham, CCl₄, 100 mg/kg *royal jelly*, CCl₄+50 mg/kg *royal jelly*, CCl₄+100 mg/kg *royal jelly*, CCl₄+200 mg/kg *royal jelly* grupları için sırasıyla 1.906 ± 0.18 , 1.695 ± 0.38 , 2.017 ± 0.12 , 2.672 ± 0.34 , 2.648 ± 0.23 , 2.622 ± 0.48 olarak bulundu.

Bu verilere göre CCl₄+50 mg/kg *royal jelly* grubunun CCl₄ grubundan istatistiksel anlamda $p < 0.01$ oranında farklı olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte CCl₄+100 mg/kg *royal jelly* grubunun CCl₄ grubundan istatistiksel anlamda $p < 0.01$ oranında farklı olduğu bulunmuştur. Yine CCl₄+200 mg/kg *royal jelly* grubu ile CCl₄ grubu arasında istatistiksel anlamda $p < 0.01$ fark görülmüştür.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Karaciğer karın boşluğunda, diyaframın altında yer alan vücudun en büyük organlarından biridir. Pek çok önemli fonksiyonu ve konumu itibariyle hasara en açık organdır. Meydana gelen hasarlanma etkin bir rejenerasyon ve onarımla cevaplanmazsa normal karaciğer yapısı bozulur. Bundan dolayı siroza kadar gidebilecek karaciğer hasarlarının başlangıç döneminde engellenmesi önem kazanmaktadır (Wang vd. 2005, MacDonalds-Wicks vd 2003).

Karaciğerde siroza; toksik maddeler (CCl_4 , alkol, fosfor, kloroform, manganez, arsenik, kömür katranı v.s.) enfeksiyonlar, karaciğerde alyuvar yıkımı sonucunda aşırı düzeyde hemosiderin birikimi gibi faktörler neden olmaktadır (Masaiki 1988, Ariosto 1989). Deneysel siroz oluşumunda çoğunlukla CCl_4 kullanılma sebebi, oluşan karaciğer hasarının ratlarda ve insanlarda, birbirlerine uygunluk göstermesinden dolayıdır. CCl_4 , akut hasar oluşturmalarının yanı sıra uzun süreli kullanımı ile kronik hasarlar oluşturarak siroza kadar uzanan sonuçlar vermektedir (Sun vd. 2001, Geier vd 2002, Onori vd. 2000).

Karbon tetraklorür, karaciğerde sitokrom P-450 tarafından metabolize edildikten sonra hızla, reaktif bir ara metabolit olan $\text{CCl}_3^{\bullet}$ dönüşür. Bu ara metabolitte oksijen ile reaksiyona girerek triklormetil peroksit $\text{CCl}_3\text{OO}^{\bullet}$ radikalini meydana getirir. CCl_4 'den oluşan bu reaktif metabolitler poliansatüre yağ asitleri ile reaksiyona girerek LPO'yu başlatır ya da kovalent olarak yağlara ve proteinlere bağlanarak hücre membranının bozulmasına ve karaciğer hasarına neden olur (Mansour 2000, Özmen 2004, Şahin vd. 2003, Felix vd. 2002).

Şahin ve arkadaşlarının (2003) karaciğer histolojisini değerlendirdikleri çalışmada, onbeş gün boyunca sıçanlara 1.5 ml/kg CCl_4 uygulanmış, çalışma sonunda karaciğer portal bölgelerde hidropik dejenerasyon, koagülasyon nekrozu ve fibrozis ile çoğunluğu mononükleer daha az nötrofil lökositlerden oluşan hücrel eksudasyon saptandığı bildirilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada Felix ve arkadaşları (2002) CCl₄ kullanarak oluşturdukları karaciğer toksikasyonunda, dokuda nekrotik bölgeler, hücre infiltrasyonu, sitoplazmik şişme ve karakterize olan hepatosit dejenerasyonu görmüşlerdir.

CCl₄ verilerek karaciğer sirozu oluşturulan başka bir çalışmada Kanter ve arkadaşları (2003) ratların ağırlıklarına göre subkütan yoldan 0.8 ml/kg CCl₄ kullanarak toksikasyon oluşturduklarını ve CCl₄'ün LPO'yu arttırdığını belirtmişlerdir.

Deneyssel toksik ajan olarak CCl₄ kullanılan, Hwang ve arkadaşlarının (2009) yaptığı diğer bir çalışmada; kontrol ve sham grupları karşılaştırıldığında, kullanılan CCl₄'ün karaciğer enzim düzeylerini arttırdığını ve bu sonucun karaciğer hasarının bir göstergesi olduğu tespit edilmiştir.

Saponinin koruyucu etkisini belirlemek için Lee ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada *in vivo* karaciğer toksikasyonu oluşturulmuş, biyokimyasal ve histopatolojik analizler yapılmıştır. Elde edilen veriler, CCl₄ ile oluşturulan toksikasyonun karaciğer enzimlerini ve oksidatif stresi arttırdığını göstermiştir.

Sunulan çalışmada ise, *in vivo* karaciğer tahribatı oluşturmak için toksik ajan olarak CCl₄ kullanıldı. Çizelge 4.1 ve 4.2'de CCl₄'ün, kontrol ve sham grupları karşılaştırıldığında, serbest radikal artışına sebep olduğu, LPO'yu başlattığı ve oksidatif stresi arttırdığı tespit edilmiştir.

Organizmadaki serbest radikal oluşumunun artışına veya antioksidan savunma sisteminin yetersizliğine bağlı olarak oksidan-antioksidan dengesinin radikaller lehine bozulması sonucunda, biyomoleküller ile serbest radikaller kolaylıkla reaksiyon verebilir ve zincirleme reaksiyonları başlatarak yeni serbest radikal oluşumuna neden olurlar. Oluşan serbest radikallerin, çeşitli patolojik durumlara yol açtığı ve biyolojik sistemlerde çok önemli fizyolojik roller oynadığı gözlenmektedir. Bu radikaller; proteinler, lipitler, karbohidratlar ve nükleik asitleri yıkıma uğratabilir. Poliansature yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olan lipit peroksidasyonu, serbest radikallerin uyardığı hücre yıkımında önemli bir mekanizmadır. MDA, membran lipitlerindeki doymamış yağ

asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan son üründür. Oksidatif stres parametreleri ile antioksidan sistem ve aralarındaki korelasyon son yıllarda giderek ilgi odağı olmuş, oksidatif stresin göstergesi MDA düzeyleri ve antioksidanlar biyokimyasal markır olarak bir çok hastalıkta araştırılmıştır (Şimşek 1999, Kanter vd. 2003, Lee vd. 2008, Zeashan vd. 2008).

Yılmaz ve arkadaşlarının (2000) yaptığı çalışmada ratlarda karaciğer sirozu oluşturulmuş ve oluşturulan toksikasyonda oksidatif stresin ve LPO'nun en önemli göstergesi olan MDA'nın CCl₄ grubunda kontrol grubuna oranla önemli derecede arttığı tespit edilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada Liu ve arkadaşları, (2009) yine toksikasyon oluşturmak için CCl₄ kullanmış ve CCl₄ grubundaki MDA düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, MDA düzeylerinin tedavi gruplarında düşüş gösterdiği kaydedilmiştir.

Nigella Sativa'nın koruyucu etkisinin araştırıldığı İlhan ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan çalışmada, ratlarda karaciğer hasarı oluşturulmuş ve yapılan analizler sonucu oksidatif stresin önemli bir markırı olan MDA'nın tedavi gruplarında azaldığı GPx konsantrasyonunun ise arttığı belirlenmiştir.

Zeashan ve arkadaşları (2008) tarafından *in vivo* karaciğer toksikasyonu oluşturulan başka bir çalışmada kontrol ve sham grupları karşılaştırıldığında toksikasyon grubunda MDA'nın istatistiksel anlamda önemli oranda arttığı görülmüştür.

Ayrıca Lee ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturulmuştur. Yapılan analizler sonucu karaciğer enzimlerinin ve oksidatif stres markırı olan MDA düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla tedavi gruplarında düştüğü belirlenmiştir.

Karaciğer toksikasyonu oluşturulan Kurt ve arkadaşlarının (2005) yaptığı çalışmada CCl_4 toksikasyonuna karşı likopenin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Antioksidan enzimler olan CAT ve GPx düzeylerinin toksikasyon grubunda azaldığı, tedavi gruplarında ise arttığı belirtilmiştir. Ayrıca MDA düzeyinde toksikasyon grubunda önemli oranda arttığı kaydedilmiştir.

Murugesan ve arkadaşlarının (2009) yaptığı başka bir çalışmada toksikasyon oluşturulan ratlarda kombucha çayının koruyucu etkisi araştırılmıştır. Karaciğer dokusunda ve plazmada incelenen MDA düzeyleri kontrol grubuna kıyasla önemli oranda farklılık göstermiştir. Ayrıca karaciğer enzimlerinde toksikasyon grubunda önemli oranda arttığı belirlenmiştir.

Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1’de belirtildiği gibi sham ve CCl_4 grubu karşılaştırıldığında MDA düzeyinin kontrol grubunda önemli oranda farklı olduğu görülmüştür ($p<0.01$). Bu, CCl_4 ’ün radikal üretimini indüklemesi sonucu LPO’ya neden olduğu şeklinde açıklanabilir. Ayrıca hücrel antioksidan savunma sistemini olumsuz etkileyerek radikallerin ortadan kaldırılma mekanizmasını yavaşlatmış ve doymamış yağ asitlerine atak yaparak LPO’yu hızlandırmış olabileceği düşünülmektedir.

Karaciğerde sentezlenen glutatyon (GSH), glutamat, sistein ve glisinden meydana gelen bir tripeptiddir. Başta karaciğer olmak üzere pek çok dokuda yüksek düzeyde bulunur. GSH hücre içindeki önemli antioksidan moleküllerden biridir. Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreyi oksidan hasara karşı korur. GSH, disülfid’e (GSSG) okside olarak bir antioksidan gibi davranır ve GSH/GSSG oranı dokuda oksidatif stresi tanımlamak için kullanılır. Hücrel GSH konsantrasyonu antioksidan sistem üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Oksidatif şartlar altında GSH konsantrasyonu, oksidatif stresten etkilenen hücrelerden GSSG ve glutatyon konjugatlarının salınımı ile önemli oranda azalabilmektedir. GSH, süperoksit ve hidroksil radikalleri ile reaksiyona girebilir ve böylece direkt olarak serbest radikal süpürücü fonksiyonu gösterir. Ayrıca bazı enzimlerin substratı veya kofaktörü olarak da görev yapmaktadır. GPx ve GST gibi enzimlerin fonksiyonu için gereklidir. Hücrenin protein yapısındaki sülfidril (-SH)

gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu engeller (Thomas 1999, Yalçın 1998).

Hsu ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada *Dunaliella salina*'nın, karaciğer hasarında koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Toksikasyon grubunda GSH düzeyinde azalma görülürken, MDA düzeyinde ise artış görülmüştür. Ayrıca SOD, CAT ve GPx düzeyleri de kontrol grubunda azalırken tedavi gruplarında artmıştır. Bununla birlikte karaciğer enzim düzeyleri toksikasyon grubunda artmış, tedavi gruplarında ise azalmıştır.

In vivo karaciğer toksikasyonu oluşturulan çalışmada Chandan ve arkadaşları (2008) CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturmuş ve oluşturulan toksikasyon sonucu sham grubuna kıyasla toksikasyon grubunda GSH düzeyinin azaldığı, buna karşın bir hasar göstergesi olan MDA düzeyinin ise arttığı tespit edilmiştir.

Hwang ve arkadaşlarının (2009) yaptığı başka bir çalışmada toksikasyon grubunda GSH düzeyi azalırken tedavi gruplarında bu miktarın arttığı gözlenmiştir. Ayrıca MDA düzeyinin toksikasyon grubunda arttığı, tedavi gruplarında ise azaldığı belirtilmiştir.

Cytisus scoparius bitkisinin antioksidan etkisinin incelendiği Raja ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan çalışmada, ratlarda CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturulmuş ve biyokimyasal parametreler analiz edilmiştir. Analizler sonucu sham grubuna göre toksikasyon grubunda, GSH düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca toksikasyon sonucu antioksidan enzimler SOD, GPx ve CAT düzeyleri de toksikasyon grubunda azaldığı ve tedavi gruplarında arttığı belirlenmiştir.

Hepatoprotektif etkinin incelendiği başka bir çalışmada (Lodhi vd. 2009) CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarında GSH konsantrasyonunun, sham grubuna kıyasla CCl₄ grubunda önemli oranda azaldığı tespit edilmiştir. Yine antioksidan enzim düzeyleride toksikasyon grubunda azalırken, tedavi gruplarında artış göstermiştir.

Sunulan çalışmada ise, CCl₄ verilen kontrol grubundaki GSH düzeyinde sham grubuna göre istatistiksel anlamda bir fark görülmüştür ($p<0.05$). Ayrıca 100 mg/kg *royal jelly*, CCl₄+200 mg/kg *royal jelly* grupları da kontrol grubuna göre ($p<0.05$) oranında farklıdır. Bu sonuç meydana gelen toksikasyona karşı metabolizmanın GSH üreterek toksikasyona karşı koyduğunu göstermiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2).

Askorbik asit suda çözünen en güçlü antioksidan moleküllerden biridir. İnsanlarda sentez edilemediği için diyet yoluyla alınması gerekir. Vitamin C yapıcı heksozlara benzemekte ve organizmada kolayca dehidroaskorbik aside oksitlenmektedir. Süperoksit radikali, hidroksil radikali ve singlet oksijen ile kolayca reaksiyona girerek onları etkisizleştirmektedir. Sulu fazda bulunmasına karşın lipit peroksidasyonunu başlatıcı radikalleri temizleyerek lipitleri ve membranları da oksidatif hasara karşı korumaktadır. Tokoferoksil radikalının α -tokoferole indirgenmesini sağlayarak E vitamininin rejenere edilmesinde görev alır. Kollajen sentezinde lizin ve prolin hidroksilasyonu için gereklidir (Rucker vd. 2001, Valko vd. 2007).

Dhanasekaran ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan CCl₄ ile *in vivo* karaciğer toksikasyonu oluşturulan çalışmada; sham grubuna kıyasla toksikasyon grubunda vitamin C konsantrasyonu azalırken tedavi gruplarında ise vitamin C konsantrasyonu artmıştır. Ayrıca MDA düzeyide toksikasyon grubunda önemli oranda artmış, antioksidan enzimler ise toksikasyon grubunda azalmıştır.

Kanter ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan *Nigella Sativa*'nın koruyucu etkisinin incelendiği başka bir çalışmada ratlarda karaciğer sirozu oluşturulmuş ve biyokimyasal parametreler analiz edilmiştir. Elde edilen verilerden, vitamin C düzeyinin tedavi gruplarına kıyasla toksikasyon grubunda önemli oranda farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte vitamin A, vitamin E ve β -karoten düzeylerinin de tedavi gruplarında arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca MDA düzeyinde toksikasyon grubunda istatistiksel anlamda tedavi gruplarına oranla azaldığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda yapılan analizler sonucu elde edilen verilerden, (Çizelge 4.2, Şekil 4.4) CCl₄ verilen kontrol grubundaki vitamin C konsantrasyonu sham grubuna oranla azalmasına rağmen istatistiksel bir fark bulunamamıştır. Vitamin C'nin tüm tedavi gruplarındaki konsantrasyonunun kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir şekilde artması ($p<0.01$), RJ'nin koruyucu etkisinin vitamin C aktivitesini arttırdığını göstermiştir.

Hücre yüzey bileşenleri olan glikoprotein ve glikolipitler kanser ve çeşitli hastalıklarda (karaciğer sirozu, nefrotik sendrom vb.) tanı ve tedavi için oldukça önemlidir. Çünkü normal hücrelerde bulunan glikoprotein ve glikolipit düzeyleri, deforme olmuş hücrelerde bulunanlara göre farklılık arz etmektedir. Sialik asit (SA) hücre membranlarında önemli görevleri olan glikoprotein ve glikolipitlerin oligosakkarit zincirlerinin son bölgelerindeki şeker zincirleridir. Kanser gibi bazı hastalıklarda hücre yüzeyinde meydana gelen anormal değişimler, glikolipit ve glikoproteinlerin dolayısıyla SA'nın değişmesine sebep olmaktadır. SA'nın direkt olarak ölçülmesi hücrenin davranışları ve hücre hasarı hakkında bilgi vermektedir (Erbil vd. 1985, Schauer vd. 1997).

Tedavide alınacak olumlu sonuçlar hastalığın prognozunun kontrolü ile mümkündür. Hastalığın vücuttaki düzeyi, hastalığın hangi safhasında hangi tedavinin yapılması gerektiğini belli eder. Erken tanıya gidebilmek, hastalığın kapsamı hakkında bilgi edinebilmek ve hastalığın tedaviye verdiği cevabı görebilmek için ölçülebilir değerlere ihtiyaç vardır (Schwarzkopf vd. 2002).

Sillanaukee ve arkadaşlarının (1999) böbrek yetmezliği ve damar sertliği bulunan, kalp krizi geçirmiş hastalar üzerinde yaptığı çalışmada; hasta bireylerin serum SA düzeyleri sağlıklı bireylerle kıyaslandığında istatistiksel anlamda önemli oranda fark olduğu gözlenmiş ve bu hastalıkların seyrinde SA düzeylerindeki farklılıktan yararlanılmıştır.

Naringin ve vitamin C kombinasyonunun tedavi edici olarak kullanıldığı Punithavathi ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada ratlarda streptozotosin ile diabet oluşturulmuş ve biyokimyasal analizler yapılmıştır. Analizler sonucu streptozotosin uygulanan grupta kan glukoz seviyesi artarken, plazma insülin düzeyinde, total

hemoglobinde ve karaciğer glikojende önemli oranda azalma görülmüştür. Ayrıca diabetli ratların plazma, karaciğer ve böbrek dokularında heksoz, heksozamin ve SA düzeylerinde artış önemli oranda artış tespit edilmiştir.

Yine streptozotosin ile diabet oluşturulan ratlarda yapılan başka bir çalışmada *Beta vulgaris var. cicla* bitkisinin etkisi incelenmiştir. Diabetli grupta kan glukoz, total lipit, LPO ve SA düzeylerinin arttığı saptanmıştır. Tedavi gruplarında ise bu parametrelerin azaldığı görülmüştür (Saçan vd. 2004).

Akciğer kanserli hastalarda serum total SA ve LSA düzeylerindeki yükselmenin araştırıldığı İşbilir ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan çalışmada hasta bireyler kontrol grubuna kıyasla SA ve LSA düzeylerinin yüksek bulunduğu belirtilmiş, SA'nın tümör markırlarından biri olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

Akciğer kanserinde çoklu tümör belirleyicilerinin analiz edildiği Karlıkaya ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan 9 tümör belirleyicisinin analiz edildiği çalışmada; lojistik regresyon yöntemiyle aralarında total SA'nda bulunduğu tümör markırları ile akciğer kanserinin % 94.9 doğruluk payı ile saptandığı belirlenmiştir.

Benzo(a)pyrene ile akciğer kanseri oluşturulan farelerde piperinin serum ve dokulardaki glikoprotein düzeylerine olan etkisinin araştırıldığı çalışmada; sham grubuna kıyasla toksikasyon grubunda heksoz, heksozamin ve SA düzeyleri önemli oranda artarken, tedavi gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla azalma görülmüştür (Selvendiran vd. 2006).

Bir kanser ilacı olan adriamycin'in kullanıldığı Deepa ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan çalışmada; plazma, kalp, karaciğer ve böbrek dokularında biyokimyasal parametreler incelenmiştir. Analizlerde, dokuda ve plazmada heksoz, heksozamin ve SA düzeylerinin böbrek hariç toksikasyon grubunda önemli oranda arttığı, tedavi gruplarında bu düzeylerin azaldığı görülmüştür.

Yine Sillanaukee ve arkadaşlarının (1999) yaptığı tip I ve tip II diabet ve behçet hastalığı olan bireylerde serum SA düzeyleri, sağlıklı bireylere oranla artış göstermiş ve belirlenen bu SA düzeyleri hastalığın tanı ve tedavisinde markır olarak kullanılmıştır.

Koroner kalp hastalarında damar tıkanıklığı ile total SA ve LSA düzeyleri arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada; anjiyografi ile damar tıkanıklığı saptanmış 42 koroner kalp hastasında ve damar tıkanıklığı saptanmamış 35 hastada SA ve LSA düzeyleri ölçülmüştür. Damar tıkanıklığı bulunan hastalarda total SA ve LSA düzeyleri diğer gruba oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Gökmen vd. 2002).

Çetinkaya ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmada felç geçirmiş hastalarda birinci günde ve beşinci günde alınan kan örneklerindeki total sialik asit (TSA) düzeyleri karşılaştırılmıştır. Beşinci günde alınan örneklerde TSA düzeyi birinci günde alınan örneklerle kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuş ve artan SA düzeylerinin kötü prognozla ilişkili olabileceğini belirtilmiştir.

Sunulan çalışmada; Çizelge 4.2 ve Şekil 4.3’de görüldüğü gibi CCl₄ verilen kontrol grubundaki SA düzeyinde sham grubuna göre istatistiksel anlamda bir fark görülmüştür ($p<0.01$). Bunula birlikte artan dozdaki RJ ile tedavi edilmiş gruplarda SA konsantrasyonu normal düzeyde saptanmıştır.

RJ işçi arılarının alt çene (mandibular) ve yutak altı (hypophryngeal) bezlerinden salgılanan besin değeri ve biyolojik aktivitesi yüksek bir üründür. Kovan içerisindeki genç larvaların ve kraliçe (ana) arının beslenmesi için temel besin maddesidir. İçeriğini protein, şekerler, lipidler, vitaminler ve mineraller oluşturur (Çizelge 2.3). RJ; kandaki kolesterol, toplam lipit, fosfolipit seviyelerini düşürücü etkisi bulunmakta ve ayrıca bağışıklık sistemini güçlendirici ve genel vücut fonksiyonlarını düzenleyici etkisi bulunmaktadır (Meydanoğlu 1985, Feng Xue vd 2007).

RJ’nin terapötik etkisi kullanılarak serum kolestrol ve trigliserid düzeylerinin belirlenmesi amaçlanan Yıldız ve arkadaşlarının (2000) yaptığı çalışmada; sağlıklı kişilerde RJ’nin dört hafta boyunca ile kullanımından sonra serum kolesterol

düzeylerinde % 10 ve trigliserid seviyelerinde ise % 38 oranında azalma olduğu görülmüştür.

El-Nekeety ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmada fumonisin ile oluşturulan karaciğer ve böbrek toksikasyonuna karşı tedavi edici olarak RJ kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar LPO'nun önemli bir markırı olan MDA düzeylerinin artan dozda verilen tedavi gruplarında önemli oranda azaldığını göstermektedir. Ayrıca antioksidan enzimler olan SOD ve GPx konsantrasyonlarının yine artan dozlardaki tedavi gruplarında önemli oranda arttığı görülmüştür.

Başka bir çalışmada, parasetamol ile oluşturulan karaciğer toksikasyonunda RJ'nin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucu, sham grubuna kıyasla toksikasyon grubunda MDA düzeyi önemli oranda artış gösterirken, antioksidan enzimler SOD, CAT ve GPx düzeyleri ise toksikasyon grubunda azalmıştır. Ayrıca karaciğer enzimleri toksikasyon grubunda artarken, artan dozdaki tedavi gruplarında ise azalmıştır (Kanbur vd. 2009).

Serum total kolesterol düzeyinin belirlenmesi amacıyla Guo ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan başka bir çalışmada 15 gönüllü kişiye 4 hafta boyunca RJ verilmiş ve analizler yapılmıştır. Analizler sonucu RJ alan gönüllülerde total kolesterol ve düşük yoğunluklu liprotein düzeylerinin kontrol grubuna oranla azaldığı belirlenmiştir.

Göğüs kanserli hastalarda RJ'nin terapötik etkisinin incelendiği Nakaya ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan çalışmada; yapılan analizler sonucu RJ'nin kanser hücrelerinin büyümesini engellediği ve bu hücreleri inhibe ettiği saptanmıştır.

Yapılan *in vitro* çalışmalar RJ'nin yapısında bulunan 10-HDA'dan dolayı antibakteriyel özelliğinin bulunduğunu göstermiştir. Bu özelliği ile RJ *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Proteus*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*'un gelişimini engellemektedir (Yatsunami vd. 1985, Yıldız vd. 2000).

Yapılan klinik çalışmalar, kemoterapi ve radyoterapi uygulanan lösemili ocuklarda RJ'nin kilo artışının yanında kandaki lökosit, nötrofil ve lenfosit miktarlarını da arttırdığını göstermiştir (Kaftanoğlu vd 1997).

RJ'nin önemli oranda içerdiği bağışıklık güçlendirici enzimler ve vitaminler sayesinde, yapılan çalışmalarda LPO'yu engellediği ve serbest radikalleri süpürücü etkisi olduğu gözlenmiştir (Nagai vd. 2001, El-Nekeety vd. 2007) .

Sonuç olarak; RJ'nin, CCl₄ toksikasyonunun neden olduğu LPO ve oksidatif strese karşı antioksidan savunmada etkili olduğu görülmüştür. Özellikle oksidatif stres ve LPO'nun en önemli markırı olan MDA düzeylerinin tüm tedavi gruplarında önemli oranda azalmış olması, vitamin C'nin ise tüm tedavi gruplarında önemli oranda artmış olması RJ'nin CCl₄ toksikasyonunda ne denli etkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu koruyucu etkinin artan dozlarda daha etkili olduğu görülmüştür. Antioksidan etki gösteren RJ'nin, oksidatif strese neden olan karaciğer hastalıklarının tedavisinde destekleyici olabileceği dşnlmektedir. Aynı zamanda elde edilen sonuçlar, SA'nın CCl₄ toksikasyonunda önemli bir markır olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

- Ahmad, S., 1995, "Antioxidant mechanisms of enzymes and proteins (S. Ahmad Editor), oxidative stress and antioxidant defences in biology", Chapman & Hall America, 238-265.
- Akkuş, İ., 1995, "Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri". Konya Mimoza Yayınları, (1.Baskı), 1-84.
- Ames, Bn., Shigenaga, Mk., Hagen, Tm., 1993, "Oxidants, Antioxidants and the Degenerative Diseases of Aging", Proc Natl Acad Sci USA, Sep1, 90, (17), 7915-7922.
- Bast, A., Goris, R.J.A., 1989, "Oxidative Stress, Biochemistry AnahumanDisease", Pharma Weekbl., 11(6), 199-206.
- Baykal, Y., Kocabalkan, F., 2000, "Serbest radikaller ve hücre hasarı", Sendrom 9: 31-39.
- Bhagavan, N.V., 2002, "Medical biochemistry", Harcourt Acedemic Press, Kanada.
- Bissel, DM., Maher, JJ., Zakim D, Boyer 1996, "Hepatik Fibrosis and Cirrhosis", TD (Ed.) A Textbook of Liver Disease. Philadelphia, W.B.Sounders Company, 506.
- Buetler E., Dubon O., Kelly B.M., 1963, "Improved method for the determination of blood glutathione", J Lab Clin Med 61: 882-888.
- Burtis C., Ashwood ER., 1999, "Textbook of Clinical Chemistry", W.B. Saunders Company, (3rd Edition), Philadelphia, London, Toronto, 1125-1177.
- Burton, G.W., 1989, "Antioxidant Action of Carotenoids", J Nutr, 119, 109-111. Cell Biol., 4: 257-66.

- Cemek M., Büyükokuroğlu M.E., Bayıroğlu F., Koç M., 2008, "Irradiation, radioprotection and nigella sativa" (Book Chapter). Herbal Radiomodulators: Applications in Medicine, Homeland Defence and Space. Medicinal and Aromatic Plants Laboratory Division of Radiation Biology and Radioprotection Institute of Nuclear Medicine and Allied Sciences (Defence Research and Development Organization).
- Champe, P.C., Harvey, R.A., Tokullugil, A., Dirican, M., Ulukaya, E., 1997, "Glikozaminoglikanlar Lippincott's illustrated reviews" ,serisinden, Biyokimya. İkinci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, s. 147-156.
- Chandan, BK., Saxena, AK., Shukla, S., Sharma, N., Gupta, DK., Singh, K., Suri, J., Bhadauria, M., Qazi, GN. 2008, "Hepatoprotective activity of *Woodfordia fruticosa* Kurz flowers against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity", Journal of Ethnopharmacology, 119: 218-224.
- Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M.C., Mecocci, C., 2005, "Potential markers of oxidative stress in stroke", Free Radical Biology & Medicine 39: 841-852.
- Cochrane, G., 1991, "Cellular injury by oxidants", Am J Med. 30;91(3C):23-30.
- Cross, C., Halliwell, B., Borish, E., 1987, "Oxygen Radicals and Human Disease", Ann Intern Med, Oct,107 (4), 526-545.
- Çetinkaya Y., Özkök E., Gencer M., Aydın M., Tireli H., Kara İ., 2006 "Is total Sialic acid A Marker For Stroke", J Neurol Sci, 23: 14-19.
- Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R., 2003, "Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress", Clinica chimica acta 329: 23-38.

- Deepa, PR., Varalakshmi, P. 2005, "Biochemical evaluation of the inflammatory changes in cardiac, hepatic and renal tissues of adriamycin-administered rats and the modulatory role of exogenous heparin-derivative treatment", *Chemico-Biological Interactions*, 156: 93-100.
- Dhanasekaran, M., Ignacimuthu, S., Agastian, P. 2009, "Potential hepatoprotective activity of ononitol monohydrate isolated from *Cassia tora* L. on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in wistar rats", *Phytomedicine*, in pres.
- Dursun N., 2001, "Veteriner Anatomi II", Medisan Yayınevi, Ankara, (7.Baskı), 63-70.
- Dündar, Y., Aslan, R., 2000, "Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar", Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, Afyon.
- El-Demerdash, FM., Yousef, MI., Kedwany, FS., 2004, "Cadmium-Induced Changes in Lipid Peroxidation, Blood Hematology, Biochemical Parameters And Semen Quality of Male Rats", *Protective Role of Vitamin E and Carotene*, Food and Chemical Toxicology. 42, 1562-1571.
- El-Nekeety A., El-Kholy W., Abbas NF., Ebaid A., Amra HA., Abdel-Wahhab MA., 2007, "Efficacy of royal jelly against the oxidative stres of fumonisin in rats" *Toxicon*, 50: 256-269.
- Erbil K. M, Jones JD, Klee GG., 1985 "Use and limitations of serum total and lipid bound sialic acid concentration as markers for colorectal cancer", *Cancer* 55, 404-409.
- Feng Xue X., Zhou JH., Wu LM., Fu LH., Zhao J., 2009, "HPLC determination of adenosine in royal jelly" *Food chemistry*, 115 :715-719.
- Felix-Sotelo JL., Martinez-fong D., Muriel P., Santillan RL., Castillo D., Yahuaca P. 2002, "Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in

the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat”,
Journal of Ethnopharmacology, 81: 145-154.

Fırat, S., 1997, “Kobaylarda Radyasyonla Olusan Akciğer Hasarında Doku Glutasyon,
Glutasyon Peroksidaz, Glutasyon- S-Transferaz Düzeyleri Ve Nasetil Sistein’in
Bu Sistem Üzerindeki Etkisi”, Gazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya A.B.Dalı
Uzm.Tezi, Ankara, 95.

Flohe, L., Giertz, H., Beckmann, R., 1985, “Free radical scavengers as anti
inflammatory drugs In Handbook of Inflammation”, Vol 5: The Pharmacology
of Inflammation. IL Bonta, Ma Bray, MJ Parnham (eds). Amsterdam, Elsevier,
pp.255-281.

Floyd, R.A., 1993, “Basic Free Radical Chemistry, Free Radicals in Aging”, Edited By
B.P.Yu Boca Raton, F.L: Crc P. 39-55.

Frank J., 2005, “Vitamin E Supplementation an Alternative Strategy to Improve
Vitamin E Status”, Journal of Plant Physiology, 162, 834-843.

Fukuda, M. and Hindsgaul, O., 1994, “Molecular Glycobiology”, Oxford: IRL. Press,
261 sayfa.

Genç, M., Aslan, A., 1999, “Determination of trans-10hydroxy-2-decenoic acid content
in pure royal jelly and royal jelly products by column liquid chromatography”, J.
Chromatog., 839: 265-268.

Geier A., Kim S.K., Gerloff T., et al., 2002, “Hepatobiliary Organic Anion Transporters
Are Differently Regulated in Acute Toxic Liver Injury Induced by Carbon
Tetrachloride” Journal of Hepatology 37, 198-205.

Gökmen, S., Kılıçlı, G., Özçelik, F., Birsin, A., Gülen, Ş. 2002, “Koroner Kalp
Hastalarında Damar Tıkanıklığı ile Serum Total ve Lipide Bağlı Sialik Asit

Düzeyleri Arasındaki ilişki”, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 19: 24-29.

Guo, H., Saiga, A., Sato, M., Miyazawa, I., Shibata, M., Takahata, Y., Morimatsu, F. 2007, “Royal Supplementation Improves Lipoprotein Metabolism in Humans”, J Nutr Sci Vitaminol, 53: 345-348.

Gutteridge, J.M.C., 1995, “Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage”, Clin Chem 41(12): 1819-1828.

Guyton, A.C., 1986, “Tıbbi Fizyoloji”, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 1203-1211.

Halliwell B., 1991, “Drug antioxidant effects.A basis for drug selection”, Drugs 42(4):569-605.

Halliwell, B., 1994, “Free Radicals, Antioxidants and Human Disease”, Curiosity, Cause or Consequence. Lancet. Sep 10; 344 (8924), 721-724.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999, “Free radicals in biology and medicine” Oxford University Press Inc., New York, 936.

Hsu, YW., Tsai, CF., Chang, WH., Ho, YC., Chen, WK., Lu FJ. 2008, “Protective effects of *Dunaliella salina* - A carotenoids-rich alga, against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice”, Food and Chemical Toxicology, 46: 3311-3317.

Hwang, YP., Choi, JH., Jeong, HG. 2009, “Protective effect of the *Aralia continentalis* root extract against carbontetrachloride-induced hepatotoxicity in mice”. Food and Chemical toxicology, 47: 75-81.

İlhan N., Seçkin D., 2005, “Protective effect of *Nigella sativa* seeds on CCl₄-induced hepatotoxicity”, F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi, 19(3), 175-179.

- İliçin, G., Ünal, S., Biberoglu., 1996, “Temel İç Hastalıkları”, Cilt I, Güneş Kitapevi, Ankara, 1077-1167.
- İşbilir, Ş., Gökmen, S., Çağlar, T., Hatipoğlu, ON., Gülen, Ş. 2002, “Akciğer Kanseriinde Serum Total ve Lipide Bağlı Sialik Asit Düzeylerinde Yükselme ve Bunun Metastaz ile İlişkisi”, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 19: 75-79.
- Jain S.K., McVie R., Duett J., Herbst J.J., 1989, “Erythrocyte membrane lipid peroxidase and glycolylated hemoglobin in diabetes”, Diabetes 38: 1539-1543.
- Jensen, SJK., 2003, “Oxidative stress and free radicals”, Journal of Molecular Structure (Theochem), 666-667: 387-392.
- Junqueira, LC., Carneiro, J. 2003, “Basic histology”, 10 ed lange USA.
- Kaftanoğlu, O., Tanyeli, A., 1997, “The Use of Royal Jelly Durig Treatment of Childhood Malignancies” International Coference on: Bee Product: Properties, Applications and Apitherapy P: 51. Israel.
- Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlıoğlu, M., Başpınar, N., Tiftik, A.M., 2000, “Biyokimya”, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- Kanbur, M., Eraslan, G., Beyaz, L., Silici, S., Liman, BC., Altınordulu, Ş., Atasever, A. 2009, “The effect of royal jelly on liver damage induced by paracetamol in mice”, Experimental and Toxicologic Pathology, 61: 123-132.
- Kanter, M., Meral, I., Dede, S., Cemek, M., Özbek, H., Uygan, I., Gündüz, H. 2003 Effect of Nigella sativa L. and Urtica dioica L. on Lipid peroxidation, Antioxidant Enzyme Systems and Some Liver Enzymes in CCl₄- Treated Rats. J Vet Med, 50, 264-268.

- Kaplan, L.A., Pesce, J.A., Kazmierce, S.C., 2003, "Clinical Chemistry, Theory, Analysis, Correlation, Mosby, Vincinatti", 493-497.
- Karabulut, A.B., 2001, "Hepatit B'li hastalarda eritrosit ve lenfosit antioksidan, nitrik oksit düzeyleri ve plazma stokinleri", doktora tezi, İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Malatya.
- Karlıkaya, C., Erdoğan, S., Akkoçlu, A., Oktay, G., Güner, G., Uçan, E.S., Çımrın, A.H. 2003, "Akciğer Kanseriinde Çoklu Tümör Belirleyicisi Analizi", Toraks Dergisi, 4: 248-259.
- Kayaalp, S.O., 2002, "Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji", (10th Edition), Hacettepe Tas Kitabevi, 1728.
- Kılınç, K., Kılınç, A., 2002, "Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen Radikalleri", Hacettepe Tıp dergisi, 33:110-118.
- Kierszenbaum, A.L., 2002, "Histology and Cell biology", 1. ed mosby USA.
- Köse, K., Doğan, P., 1992, "Lipid Peroksidasyonu", Erciyes Üniversitesi Tıp Dergisi, Ek 1, 340-350.
- Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N., 2005, "Pathologic basis of disease", 7 ed. Elsevier saunders, China.
- Kurt, H., Başaran, A., Aral, E. 2005, "Sıçanlarda Karbon Tetraklorit'in Oluşturduğu Oksidatif Stresin Likopen ile Önlenmesi", Türkiye Klinikleri J Med Sci, 25: 167-173.
- Lee, K.S., Buck, M., Houghlum, K., et al., 1995, "Activation of Hepatic Stellate Cells By TGF Alpha and Collagen Type I is Mediated by Oxidative Stres Through Cyb Expression", Journal of Clinical Investigation 96 (5), 2461-2468.

- Lee, KJ., Choi, JH., Kim, HG., Han, EH., Hwang, YP., Lee, YC., Chung, YC., Jeong HG. 2008, "Protective effect of saponins derived from the roots of *Platycodon grandiflorum* against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity". *Food and Chemical toxicology*, 46: 1778- 1785.
- Liu J., Tan H., Sun Y., Zhou S., Cao J., Wang F., 2009, "The preventive effect of heparin-superoxide dismutase on carbın tetrachloride-induced acute liver failure and hepatic fibrosis in mice", *Mol Cell Biochem*, DOI, 009-0060-2.
- Lodhi, G., Singh, HK., Pant, KK., Zeashan, H. 2009, "Hepatoprotective effects of *Calotropis gigantea* extract against carbon tetrachloride induced liver injury in rats", *Acta Pharm*, 59: 89-96.
- MacDonalds-Wicks LK., Garg ML., 2003, "Vitamin E Supplementation in The Mitigation of Carbon Tetrachloride İnduced Oxidative Stress on Rats", *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14, 211-218.
- Maccioni, HJF., Giraudo, CG., and Daniotti, JL., 2002, "Understanding the Stepwise Synthesis of Glycolipids", *Neurochemical Research*, 27, (7/8): 629-636.
- Mannervik, B., 1985, "Glutathione Peroxidase. *Method Enzymology*", 113, 490-495.
- Mansour, MA., 2000, "Protective effects of Thymoquinone and Desferrioxamine against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in mice", *Life science*, Vol. 66 No: 26 2583-2591.
- Mathers, J., Fraser, J., McMahon, M., Saunders, R., Hayes, J., McLellan, L., 2004, "Antioxidant and cytoprotective responses to redox stres", *Biochem Soc Symp.*”(71):157-76.
- Menteş N.K., 1983, "Klinik Gastroenteroloji", *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları*, Cilt 2, (4. Baskı), 485-835.

- Menteş, G., Ersöz, B., Murray, RK Mayes, PA., Granner, DK., Rodwell, V.W., 1993, “Harper’in Biyokimyası”, (Eds). 22 Baskı, İstanbul.
- Meydanoğlu, F., 1985, “Arı Sütünün Bilesimi, Dietik, Terapatik Özellikleri”, TÜBİTAK Marmara Araştırma Enstitüsü. Beslenme ve Gıda Teknolojisi Ünitesi, Gebze/Kocaeli.
- Mills, GC., 1957, “Hemoglobin Catabolism, Glutathione Peroxidase, An Erythrocyte Enzyme Which Protects Hemoglobin from Oxidative Breakdown”, J Biol Chem 229, 189.
- Montgomery, R., 1996, “Biochemistry A case-oriented Approach 6th edition”, Mosby-Year book, 5: 203-204.
- Muriel, P., Alba, N., Perez-Alvarez, VM., Shibayama, M., Tsutsumi, VK., 2001, “Kupffer cells inhibition prevents hepatic lipid peroxidation and damage induced by carbon tetrachloride”, Comparative Biochemistry and Physiology Part 130. 19- 226.
- Murray, R.K., Granner, D. K., Mayes, P. A. and Rodwell, V.W., 1996, “Harper Biochemistry”, 24th Ed.,Connecticut, Appleton and Lange.
- Murugesan, GS., Sathishkumar, M., Jayabalan, R., Binupriya, AR., Swaminathan, K., Yun, SE. 2009, “Hepatoprotective and Curative Properties of Kombucha Tea Against Carbon Tetrachloride-Induced Toxicity”, J Microbiol Biotechnol, 19: 397-402.
- Nagai T., Sakai M., Inoue R., Inoue H., Suzuki N., 2001 “Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly and propolis”, Food chemistry, 75: 237-240.

- Nakahira, K., Takahashi, T., Shimizu, H., Maeshima, K., Uehara, K., Fujii, Nakatsuka., H, Yokoyama. M., Akagi, R., Morita, K., 2003, "Protective role of heme oxygenase-1 induction in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity", *Biochem Pharmacol*, 66,1091-1105.
- Nakaya, M., Onda, H., Sasaki, K., Yukiyoishi, A., Tachibana, H., Yamada, K. 2007, "Effect of Royal Jelly on Bisphenol A-Induced Proliferation of Human Breast Cancer Cells", *Biosci Biotechnol Biochem*, 71: 253-255.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2004, "Lehninger principles of biochemistry", Fourth Edition, W.H. Freeman&Company Faculty of Agriculture, Tamagawa University No.25, 13-22.
- Niki, E., Yamamoto, Y., Komuro, E., Sato, K., 1991, Membran damage due to lipid oxidation. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53: 201.
- Oka, H., Emori, Y., Kobayashi, N., Hayashi, H., Nomoto, K., 2001, "Suppression of allergic reactions by royal jelly in associated with the restoration of macrophage function and the improvoment of Th1/Th2 cell responses", *Int. Immunopharmacol.* 1: 521- 532.
- Omaye, T., Turbul, J., Savberlich, H. 1979, "Ascorbic acid analyses. II. Determination after derivation with 2,2 dinitrophenylhydrazine, selected methods for determination of ascorbic acid in animal cell, tissues and fluids", *Methods Enzymol* 62: 7-8.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., 2002, "İnsan Biyokimyası", Palme Yayıncılık, Ankara.
- Onori P., Morini S., Franchitto A., et al., 2000, "Hepatic Microvascular Features in Experimental Cirrhosis a Structural and Morphometrical Study in CCl4-Treated Rats. *Journal of Hepatology*" 33, 555-563.

- Ökten, A., 2001, “Karacigerin Fonksiyonel Anatomisi”, Gastroenterohepatoloji İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Bilimler DersKitapları, 311-314.
- Özkan, A., Fıskın, K., 2004, “Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidan Enzimler”, Turkish J.Hematoloji., No 1, Vol 14.
- Özmen, Ö., 2004, “Veteriner Genel Patoloji Ders Notları”, Akdeniz Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Ders Notu 7, Burdur, 40-45.
- Parola, M., Robino, G., 2001, “Oxidative Stress-Related Molecules and Liver Fibrosis. Journal of Hepatology” 35 (2), 297-306.
- Pope, A.M., Rall, DP., 1995, Enviromental medicine”, İntegrating a missing element in to medical education, case study & carbon tetrachloride U.S. national acaddey pres pp 249- 266.
- Poli G., 2000, “Pathogenesis of Liver Fibrosis, Role of Oxidative Stres”, Moleculer Aspects of Medicine 21 (3), 49-98.
- Porter, NA., 1998, “Chemistry of lipid peroxidation” Methods Enzymol.105:273-282.
- Punithavathi, VR., Anuthama, R., Prince, PSM. 2008, “Combined treatment with naringin and vitamin C ameliorates streptozotocin-induced diabetes in male Wistar rats”, J Appl Toxicol, 28: 806-813.
- Raja, S., Nazeer, Ahamed KFH., Kumar, V., Mukherjee, K., Bandyopadhyay, A., Mukherjee, PK. 2007, “Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats”, Journal of Ethnopharmacology, 109: 41-47.

- Richardson, JS., 1991, "Oxygen Free Radicals and Brain Dysfuction", *Inter J.Neuroscience*, 57, 1-17.
- Ross, HM., Romrell, LJ., 1995, "KAYE GI Histology", 3 ed lippincott Williams and Wilkins, Newyork.
- Rucker, RB., Suttie, JW., McCormick, DB., Machlin, L.J., 2001, "Handbook of vitamins", Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Saçan, Ö., Bulan, Ö., Bolkent, Ş., Yanardağ, R., Özgey, Y. 2004, "Effects of Chard (Beta vulgaris L. var cicla) on the Liver of the Diabetic Rats: A Morphological and Biochemical Study", *Biosci Biotechnol Biochem*, 68: 1640-1648.
- Scandalios, JG., 2002, "The rise of Ros. Trends in Biochemical Sciences", 27: 483-486.
- Schauer, R., Kamerling, J.P., 1997, "Chemistry, biochemistry and biology of sialic Acids", Elsevier. Sci. 243-402.
- Schwarzkopf, M., Knobloch, K.P., Rohde, E., Hinderlich, S., Wiechens, N., Lucka, L., Horak, Ĭ., Reutter, W., Horstkorte, R., 2002, "Sialylation is essential for early development in mice", *PNAS*. 99(8): 5267-5270.
- Selvendiran, K., Singh, JPV., Sakthisekaran, D. 2006, "In vivo effect of piperine on serum and tissue glycoprotein levels in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice", *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 19: 107-111.
- Sherlock, S., Dooley, J., 1997, "Anatomy and Function, Diseases of the Liver and Biliary System", (10th edition), Oxford, Blackwell Science Ltd, 1-15.89.
- Sies H., 1993, "Strategies of antioxidant defense", *Eur J Biochem* 215: 213-219.

- Sillanauke P., Pönniö M., Jaaskelainen IP., 1999, "Occurrence of sialic acids in healthy humans and different Disorders" European Journal of Clinical Investigation, 29, 413-425
- Southorn, P., Powis, G., 1988, "Free radicals in medicine", I. Chemical nature and biologic reactions. Mayo Clin Proc, 63: 381-389.
- Stocker, R, Yamamoto, Y., McDonagh, AF., 1987, "Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance", Science, 235:4792;1043-6.
- Stocker A., Schramel P., Kettrup A., Bengsch E., 2005, "Trace and mineral elements in rolyal jelly and homepstatic effects" Journal of Trace elements in medicine and Biology, 19: 183-189.
- Sun F., Hamagawa E., Tsutsui C., et al., 2001, "Evalutaion of Oxidative Stres Durinh Apoptosis and Necrosis Caused by Carbon Tetrachloride in Rat Liver", Biochimica at Biophysica Acta, 1535, 186-191.
- Sydow G., 1980, "A simplified Quick method for determination of sialic acid in serum" Biomed, Biochim, Acta, 44, 11/12, 1721-1723
- Şahinler N., 2000, "Arı Ürünleri ve İnsan Sağlığı Açısından Önemi" MKÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 5:139-148.
- Şahin A., Yener Z., Dağoğlu G., 2003, "Karbontetraklorid (CCl₄) İle Deneysel Olarak Karaciğer Nekrozu Oluşturulan Ratlarda Vitamin E+Selenyum ve Nigella sativa (Çörekotu)'nın Karaciğer Yıkımını Engelleyici Etkileri. Türk J Vet. Anim, pp 141-152.
- Şentürk, H., 2004, "Serbest Radikal Hasarının Hepatobilier Sistem Hastalıklarındaki Rolü", Kocatepe Tıp Dergisi 5, 1-8.

- Şimşek, F., 1999, “Serbest Oksijen Radikalleri, Antioksidanlar ve Lipit Peroksidasyonu”, Türkiye Klinikleri J Pediatr, Cilt:8, Sayı:1, Sayfa: 42-47.
- Taylor, ME. and Drickamer, K., 2003, “Introduction to Glicobiology”, Oxford University Pres. 207 sayfa.
- Tekkeş, Y., 2006, “Streptozotisin ile diabe oluşturulmuş farelerde aspirin ve e-vitamininin dokularda lipitperoksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması”,Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, 66s.
- Thomas JA., 1999, “Oxidative stres and oxidant defense”, Modern Nutrition in health an disease (9th.) Baltimore:Williams&Wilkins pp 751-760
- Timbrell, JA., 1982, “Principles of Biochemical Toxicology”, pp 48-53, 126-133ü 140, 146, 174- 175, 184-188. Taylor and Francis Ltd. London.
- Tsuboi, S. and Fukuda, M., 2001, “Roles of O-linked Oligosaccharides in Immune Responses”, Bioessays., 23(1): 46-53.
- Tulunay, Ö., 2001, “Kronik Viral Hepatit Patolojisi”, Kılıçturgay K, (Eds.) Viral Hepatit,İstanbul, 317.
- Uslu, E., Belce E, S Eymen P, Kökoğlu E., 2000, “Kolonorektal kanserde metastazın serum total siyalik asit düzeyleri üzerine etkisi”, Cerrahpaşa J Med 31; 231,234.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M., Mazur M., Telser J., 2007, “Free radical and antioxidants in normal physiological functions and human disease”, The international Journal of Bichemistry& Cell Biology, 39: 44-84.

- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes CJ., Telser J., 2004, "Role of oxygen radical in DNA damage and cancer incidence", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266: 37-56.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J., 1999, "Essentials of Glycobiology", Cold Spring Harbor Laboratory Pres., 653 sayfa.
- Waters, Paula J; Lewry, E., Pennock CA. 1992, "Measurement of sialic acid in serum and urine: Clinical applications and limitations", *Ann Clin biochem*, 29: 625-637.
- Wang H., Weit W., Wang NP., 2005, "Melatonin Ameliorates Carbon Tetrachloride induced Hepatic Fibrogenesis in Rats via inhibition of Oxidative Stress", *Life Science* 77, 1902-1915.
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L., 2000, "Neutrophils: molecules, fonction and pathophysiological aspects", *Laboratory Investigation*, Vol.80, No:5,pp.617-653.
- Wood, E.S., Simith, C.A., 1991, "Molecular and cell biochemistry", Chapman & Hall, Hong Kong.
- Yalçın AS., 1998, "Antioksidanlar", *Klinik Gelişim*; 11: 342-346.
- Yarıktaş, M., Fehmi, D., Doğru, H., 2003, "Baş-boyun Malign Tümörlerinde Malondialdehit Düzeyleri ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri", 10, 65-67.
- Yatsunami, K., and Echigo, T., 1985, "Antibacterial activity of royal jelly", *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Tamagawa University*, 13-22.
- Yıldız L., Umudum Z., 2000, "Arı sütünün serum kolestrerol ve trigliserdi seviyeleri üzerine etkisi" *T klin tıp bilimleri*, 20: 261- 263.

- Yılmaz, S., Bahçecioğlu, H.I., 2000, “Karbontetraklorür ile Siroz Oluşturulmuş Ratlarda Lipid Peroksidasyonu, Antioksidant Enzim ve Pirüvat Kinaz Aktiviteleri”, Türk J. Vet. Anim. Sci 24, 25–28.
- Yılmaz, S., Temizer, O., 2003, “Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve bazı enzim aktiviteleri arasındaki ilişki”, Türk Biyokimya Dergisi 28: 252-256.
- Young, I.S., Woodside, J.V., 2001, “Antioxidants in health and disease”, J Clin Pathol 54:176-186.
- Zeashan, H., Amresh, G., Singh, S., Rao, CV. 2008, “Hepatoprotective activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals”. Food and Chemical Toxicology, 46: 3417-3421.

6.1 İnternet Kaynakları

1. <http://www.fao.org/docrep/w0076E/w0076E00.htm>
2. <http://www.eastroy.k12.wi.us/hs/dept/science/bottum/Adv%20Biology/digestive/danatomy/dahome.htm>
3. <http://medicorium.com/doktorlara-oezel/75-temel-cerrahi-bilgiler/474-karaciğer-anatomisi.htm>,
4. <http://www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg108.htm>

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fatih AYMELEK

Doğum Yeri : Bursa

Doğum Tarihi : 04.05.1984

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

İlköğretim : Zübeyde Hanım İlköğretim Okulu-1998

Lise : Bursa Yıldırım Beyazıt Lisesi-2002

Lisans : Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi-2007