

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

ROSA DAMESCENA 'NİN OKSİDATİF STRESE KARŞI
ANTİOKSİDAN VE ANTİTOKSİK ETKİLERİNİN
FİBROBLAST HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
DEĞERLENDİRİLMESİ

ZEYNEP KAHYA

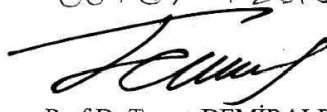
DANIŞMAN
PROF. DR. İLHAN ONARAN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

06/07/2010

Prof. Dr. Tamer DEMİRALP
Müdür

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : TIBBİ BİYOLOJİ
Programın seviyesi : Yüksek Lisans Doktora
Anabilim Dalı : TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Tez Sahibi : ZEYNEP KAHYA
Tez Başlığı : Rosa Damascena'nın Oksidatif Strese Karşı Antioksidan ve Antitoksik Etkilerinin Fibroblast Hücre Kültüründe Değerlendirilmesi.
Sınav Yeri : İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji A.D
Sınav Tarihi : 23 / 06 / 2010

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı	Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)	İmzası
1. Prof. Dr. Turgut ULUTİN	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyoloji A.D
2. Prof. Dr. Gönül Kanığür	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyoloji A.D
3. Prof. Dr. Mehmet GÜRTEKİN	İstanbul Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyoloji A.D
4. Doç. Dr. İlhan ONARAN (Danışman)	Cerrahpaşa Tıp Fak.	Tıbbi Biyoloji A.D
5. Doç. Dr. Ahmet ÖZAYDIN	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyoloji A.D

BEYAN

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

Zeynep KAHYA

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmama verdiği destek ve izinden dolayı, Tıbbi Biyoloji A.B.D. Başkanı Prof. Dr. Turgut Ulutin'e;

Tezimin planlanma ve yürütme aşamalarında bilgi ve tecrübelerini paylaşarak, verdiği bilimsel ve manevi destekten dolayı, tez danışmanım Prof. Dr. İlhan Onaran'a;

Tezimin laboratuvar çalışmasının önemli bir bölümünde verdikleri teknik destek ve laboratuvarlarını çalışmamıza açan İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.B.D. Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ayhan Bilir ve Prof. Dr. Seyhun Çolakođluna;

Tezimin laboratuvar çalışmasının önemli bir bölümünde verdikleri teknik destek ve laboratuvarlarını çalışmamıza açan İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Adli Tıp A.B.D. Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nadir Arıcan'a;

Çalışmamızı başından itibaren destekleyen ve ilgisini esirgemeyen İ.Ü. C.T.F Tıbbi Biyoloji A.B.D. Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gönül Kanıgür'e;

Çalışmamıza bilgi ve deneyimleriyle destek sağlayan İ.Ü. C.T.F. Tıp Tarihi A.B.D. Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ayten Altıntaş'a;

Çalışmamıza bilgi ve deneyimleriyle destek sağlayan İ.Ü. DETAE Deney Hayvanları Bölümü Dr. Aydın Çevik'e

Ayrıca, sıkıntılara ortak olan ve çalışmamızda yardımını ve bilgisini esirgemeyen Dr. Ayla Karimova'ya, Doç. Dr. Handan Akçakaya'ya, Uzm.Dr. Hakan Ulucan'a;

Arkadaşlıklarını ve yardımlarını esirgemeyen Azime Kahya'ya, Biyolog Leyla Öner'e;

Her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen Engin Yeşil'e;

Ve en önemlisi, hayatımın her anında yanımda olan, sevgi ve desteğini esirgemeyen değerli aileme,

teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3794

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Rosa damascena</i>	3
2.2. Rosa Cinsinin Ülkemizdeki ve Dünyadaki Yeri	5
2.3. Rosa Cinsinin Tedavideki Yeri	6
2.4. Oksijen ve Oksijenin Toksik Etkisi.....	7
2.5. Radikal Kavramı ve Reaktif Oksijen Türleri.....	9
2.6. Radikaller Nasıl Oluşur.....	9
2.7. Canlılarda Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları ve Oksidatif Stres	10
2.8. Bazı Reaktif Oksijen Türleri.....	13
2.8.1. Süperoksit (O_2^-).....	13
2.8.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	14
2.8.3. Hidroksil Radikali (OH^\cdot)	15
2.8.4. Singlet Oksijen	17
2.8.5. Nitrik Oksit	18
2.9. SERBEST RADİKALLERİN BİYOLOJİK ETKİLERİ	18
2.9.1. Zar lipidlerine etkileri:.....	18
2.9.2. Proteinlere etkileri:	20
2.9.3. DNA'ya etkileri:.....	20
2.9.4. Karbonhidratlara etkileri:.....	20

2.10. Reaktif Oksijen Türlerinin (Oksidanların) Hastalıklardaki Rolü	22
2.11. Oksidatif stres ve yaşlanma	24
2.12. Antioksidan Savunma Sistemleri	25
2.13. Antioksidanların Kaynakları.....	25
2.13.1. Doğal (Endojen) Antioksidanlar	25
2.13.1.1. Enzimatik olan Doğal Antioksidanlar;	25
2.13.1.2. Enzimatik olmayan Doğal Antioksidanlar	25
2.13.2. Eksojen antioksidanlar	26
2.14. Bazı Antioksidanlar	27
2.14.1. Süperoksit dismutaz (SOD).....	27
2.14.2. Katalaz (CAT).....	27
2.14.3. Glutatyon (GSH)	28
2.14.4. N Asetil Sistein (NAS)	29
2.15. Oksidatif Stres Ajanı Olan Peroksitler	30
2.16. Bağ Dokusu	30
2.16.1. Fibroblast	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. <i>Rosa damascena</i> ekstraktının hazırlanması	33
3.2. Primer fibroblast kültürünün hazırlanması	33
3.2.1. Primer Fibroblast Hücre ve NIH 3T3 Hücre Soyu İçin Besiyer Hazırlama.....	33
3.2.2. Sığından deri dokusunun hazırlanması	34
3.2.3. Primer Fibroblast Kültür	34
3.3. NIH 3T3 fibroblast hücre soyunun uzun süreli kültürü	34
3.4. Primer fibroblast ve 3T3 fibroblast hücrelerinin pasajı.....	35
3.5. İnkübasyon Şartları.....	36
3.5.1. Bütillenmiş hidroperoksit uygulanmış 48 saatlik kültür çalışması	36
3.5.2. <i>Rosa damascena</i> uygulanmış 48 saatlik kültür çalışması.....	36
3.6. Hücre Canlılığının (Viabilite) Değerlendirilmesi:.....	37
3.6.1. Tripkan mavisi boyası canlılık testi.....	37
3.7. ATP Düzeylerinin Belirlenmesi Yöntemi (Bioluminesans):.....	38
3.8. Mitokondri Membran Potansiyeli Ölçümü.....	39
3.9. Luminol bağımlı kemilüminesans şiddet tespiti.....	39
3.10. 2',7'-DCFH-DA ile Hücre İçi Oksidatif Stresin Spektrofluometrik Analizi	40

3.11. Örneklerdeki DNA miktarının spektrofotometrik olarak ölçümü	40
3.12. İstatistiksel Analiz	40
ÇALIŞMADA KULLANILAN ARAÇLAR.....	41
4. BULGULAR	43
4.1. <i>tert</i> -Butil Hidroperoksitin Hücre Sitotoksitesi Üzerine Etkisi.....	43
4.1.1. <i>t</i> -BOOH İle Öldürücü Doz 50'nin (LD_{50}) Elde Edilmesi.....	43
4.1.1.1. NIH-3T3 Fibroblast Hücre Soyunda <i>t</i> -BOOH ile LD_{50} 'nin Hesaplanması.....	43
4.1.1.2. Primer Fibroblast Hücrelerinde <i>t</i> -BOOH ile LD_{50} 'nin Hesaplanması	44
4.2. NIH 3T3 ve Primer Fibroblast Hücrelerinde <i>t</i> -BOOH ile Oluşturulmuş Oksidatif Strese Karşı <i>Rosa damascena</i> Ekstraktının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	45
4.2.1. NIH 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Hücre Canlılığı ve Hücre Ölüm İnhibisyonu	45
4.2.1.1. 2 Saat <i>Rosa damascena</i> Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra <i>t</i> -BOOH Uygulanan 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Hücre Ölüm İnhibisyonu.....	45
4.2.1.2. 24 Saat <i>Rosa damascena</i> Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra <i>t</i> -BOOH Uygulanan 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Hücre Canlılığı ve Hücre Ölüm İnhibisyonu....	46
4.2.1.3. NIH 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Hücre Ölümünü İnhibe Edici Doz (IC_{50})	47
4.2.2. Primer Fibroblast Hücrelerinde Hücre Canlılığı ve Hücre Ölüm İnhibisyonu	47
4.2.2.1. 2 Saat <i>Rosa damascena</i> Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra <i>t</i> -BOOH Uygulanan Primer Fibroblast Hücrelerinde Hücre Canlılığı Ve Hücre Ölüm İnhibisyonu	47
4.2.2.2. 24 Saat <i>Rosa damascena</i> Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve sonra <i>t</i> -BOOH Uygulanan Primer Fibroblast Hücrelerinde Hücre Canlılığı Ve Hücre Ölüm İnhibisyonu	48
4.2.2.3. Primer Fibroblast Hücrelerinde Hücre Ölümünü İnhibe Edici Doz (IC_{50})	49
4.3. NIH 3T3 ve Primer Fibroblast Hücre İçerisinde ATP Düzeyleri	50
4.3.1. NIH 3T3 Fibroblast Hücre Kültürlerinde Hücre İçerisinde ATP Seviyesi.....	50
4.3.1.1. 2 Saat <i>Rosa damascena</i> Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra <i>t</i> -BOOH Uygulanan 3T3 Fibroblast Hücrelerinde ATP Seviyesi	50
4.3.1.2. 24 Saat <i>Rosa damascena</i> Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra <i>t</i> -BOOH Uygulanan 3T3 Fibroblast Hücrelerinde ATP Seviyesi	51
4.3.2. Primer Fibroblast Hücre Kültürlerinde Hücre İçerisinde ATP Seviyesi	53
4.3.2.1. 2 Saat <i>Rosa damascena</i> Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra <i>t</i> -BOOH Uygulanan Primer Fibroblast Hücrelerinde ATP Seviyesi.....	53
4.3.2.2. 24 Saat <i>Rosa damascena</i> Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra <i>t</i> -BOOH Uygulanan Primer Fibroblast Hücrelerinde ATP Seviyesi.....	54

4.4. NIH 3T3 ve Primer Fibroblast Hücrelerinde Mitokondri Membran Potansiyel Düzeyleri	56
4.4.1. NIH 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Mitokondri Membran Potansiyel Seviyeleri	56
4.4.1.1. 2 Saat <i>Rosa damascena</i> Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra <i>t</i> -BOOH Uygulanan 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Mitokondri Membran Potansiyel Seviyeleri..	56
4.4.1.2. 24 Saat <i>Rosa damascena</i> Ekstraktı ile İnkübe Edilen Ve Sonra <i>t</i> -BOOH Uygulanan 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Mitokondri Membran Potansiyel Seviyeleri..	58
4.4.2. Primer Fibroblast Hücrelerinde Mitokondri Membran Potansiyel Seviyeleri	59
4.4.2.1. 2 Saat <i>Rosa damascena</i> Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra <i>t</i> -BOOH Uygulanan Primer Fibroblast Hücrelerinde Mitokondri Membran Potansiyel Seviyeleri	59
4.4.2.2. 24 Saat <i>Rosa damascena</i> Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra <i>t</i> -BOOH Uygulanan Primer Fibroblast Hücrelerinde Mitokondri Membran Potansiyel Seviyeleri	61
4.5. <i>Rosa damascena</i> Ekstraktının NIH 3T3 ve Primer Fibroblast Hücre Kültüründe <i>t</i> -BOOH ile Oluşturulan Oksidatif Stres Üzerine Etkisi	62
4.5.1. NIH 3T3 ve Primer Fibroblast Hücre Kültürlerinde Luminol Bağımlı Kemilüminesans Şiddeti	63
4.5.1.1. NIH 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Luminol Bağımlı Kemilüminesans Şiddeti.	63
4.5.1.1.1. 2 Saat <i>Rosa damascena</i> Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra <i>t</i> -BOOH Uygulanan 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Luminol Bağımlı Kemilüminesans Şiddeti ...	63
4.5.1.1.2. 24 Saat <i>Rosa damascena</i> Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra <i>t</i> -BOOH Uygulanan 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Luminol Bağımlı Kemilüminesans Şiddeti ...	64
4.5.1.2. Primer Fibroblast Hücrelerinde Luminol Bağımlı Kemilüminesans Şiddeti.....	66
4.5.2. NIH 3T3 ve Primer Fibroblast Hücre Kültürlerinde Hücre İçi DCFH-DA Oksidasyonu.....	68
4.5.2.1. NIH 3T3 Fibroblast Hücrelerinde DCF Floresans Şiddeti	68
4.5.2.2. Primer Fibroblast Hücrelerinde DCF Floresans Şiddeti	71
4.6. Hücre Kültürlerinde Gözlemlenen Morfolojik Bulgu	73
5. TARTIŞMA	74
KAYNAKLAR	82
ETİK KURUL KARARI.....	92
ÖZGEÇMİŞ	93

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Radikal özellikli olan ve radikal olmayan reaktif oksijen partikülleri	10
Tablo 2-2: Oksijen ve nitrik oksitten oluşan başlıca reaktif türler	11
Tablo 2-3: Serbest Radikallerin Hücresel Hedefleri.....	21
Tablo 2-4: Bazı Antioksidanlar	26
Tablo 4-1: 3T3 fibroblast hücrelerinde <i>t</i>-BOOH toksitesine karşı <i>Rosa damascena</i> ekstraktının doza bağımlı etkisi	46
Tablo 4-2: Primer fibroblast hücrelerinde <i>t</i>-BOOH toksitesine karşı <i>Rosa damascena</i>..	48
Tablo 4-3: 3T3 fibroblast hücre kültürlerinde <i>t</i>-BOOH sitotoksitesine karşı <i>Rosa damascena</i> ekstraktının uygulanması sonucu ortaya çıkan kemilüminesans şiddeti	64
Tablo 4-4: Primer fibroblast hücre kültürlerinde <i>t</i>-BOOH sitotoksitesine karşı <i>Rosa damascena</i> ekstraktının uygulanması sonucu ortaya çıkan kemilüminesans şiddeti	67
Tablo 4-5: 3T3 fibroblast hücre kültürlerinde <i>t</i>-BOOH sitotoksitesine karşı <i>Rosa damascena</i> ekstraktının uygulanması sonucu meydana gelen fluoresans şiddeti.....	69
Tablo 4-6: Primer fibroblast hücre kültürlerinde <i>t</i>-BOOH sitotoksitesine karşı <i>Rosa damascena</i> ekstraktının uygulanması sonucu meydana gelen fluoresans şiddeti.....	72

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: <i>Rosa damascena</i> Mill.....	3
Şekil 2-2: <i>Rosa damascena</i> Mill.....	4
Şekil 4-1: <i>t</i> -BOOH'in 48 saatlik inkübasyonu sonucu 3T3 fibroblast hücrelerinde doza bağımlı hücre ölümü grafiği ve LD ₅₀ dozu.	43
Şekil 4-2: <i>t</i> -BOOH'in 48 saatlik inkübasyonu sonucu primer fibroblast hücrelerinde doza bağımlı hücre ölümü grafiği ve LD ₅₀ dozu.....	44
Şekil 4-3: 3T3 fibroblast hücre kültürlerinde <i>t</i> -BOOH sitotoksitesine karşı <i>Rosa damascena</i> ekstraktının 24 saat önce verilmesinin hücre ölümü üzerine koruyucu etkileri (IC ₅₀).....	47
Şekil 4-4: Primer fibroblast hücre kültürlerinde <i>t</i> -BOOH sitotoksitesine karşı <i>Rosa damascena</i> ekstraktının 24 saat önce verilmesinin hücre ölümü üzerine koruyucu etkileri (IC ₅₀).....	49
Şekil 4-5: <i>t</i> -BOOH ile oksidatif stres oluşturulmuş 3T3 fibroblast hücrelerine 2 saat önce <i>Rosa damascena</i> ekstraktının verilmesinin ATP seviyeleri üzerine etkisi.....	51
Şekil 4-6: <i>t</i> -BOOH ile oksidatif stres oluşturulmuş 3T3 fibroblast hücrelerine 24 saat önce <i>Rosa damascena</i> ekstraktının verilmesinin ATP seviyeleri üzerine etkisi.....	52
Şekil 4-7: <i>t</i> -BOOH ile oksidatif stres oluşturulmuş primer fibroblast hücrelerine 2 saat önce <i>Rosa damascena</i> ekstraktının verilmesinin ATP seviyeleri üzerine etkisi.....	54
Şekil 4-8: <i>t</i> -BOOH ile oksidatif stres oluşturulmuş primer fibroblast hücrelerine 24 saat önce <i>Rosa damascena</i> ekstraktının verilmesinin ATP seviyeleri üzerine etkisi.....	55
Şekil 4-9: <i>t</i> -BOOH ile oksidatif stres oluşturulmuş 3T3 fibroblast hücrelerine 2 saat önce <i>Rosa damascena</i> ekstraktının verilmesinin mitokondri membran potansiyel seviyeleri üzerine etkisi.	57
Şekil 4-10: <i>t</i> -BOOH ile oksidatif stres oluşturulmuş 3T3 fibroblast hücrelerine 24 saat önce <i>Rosa damascena</i> ekstraktının verilmesinin mitokondri membran potansiyel seviyeleri üzerine etkisi.	59
Şekil 4-11: <i>t</i> -BOOH ile oksidatif stres oluşturulmuş primer fibroblast hücrelerine 2 saat önce <i>Rosa damascena</i> ekstraktının verilmesinin mitokondri membran potansiyel seviyeleri üzerine etkisi.	60

Şekil 4-12: <i>t</i>-BOOH ile oksidatif stres oluşturulmuş primer fibroblast hücrelerine 24 saat önce <i>Rosa damascena</i> ekstraktının verilmesinin mitokondri membran potansiyel seviyeleri üzerine etkisi.	62
Şekil 4-13: 3T3 fibroblast hücre kültürlerinde <i>t</i>-BOOH sitotoksitesine karşı <i>Rosa damascena</i> ekstraktının 24 saat önce verilmesinin kemilüminesans şiddet oluşumu üzerine koruyucu etkileri (IC₅₀).	65
Şekil 4-14 : Primer fibroblast hücre kültürlerinde <i>t</i>-BOOH sitotoksitesine karşı <i>Rosa damascena</i> ekstraktının 24 saat önce verilmesinin kemilüminesans oluşumu üzerine koruyucu etkileri (IC₅₀).	68
Şekil 4-15: 3T3 fibroblast hücre kültürlerinde <i>t</i>-BOOH sitotoksitesine karşı <i>Rosa damascena</i> ekstraktının 24 saat önce verilmesinin DCF floresans şiddeti üzerine koruyucu etkileri (IC₅₀).	70
Şekil 4-16: Primer fibroblast hücre kültürlerinde <i>t</i>-BOOH sitotoksitesine karşı <i>Rosa damascena</i> ekstraktının 24 saat önce verilmesinin DCF floresans şiddeti üzerine koruyucu etkileri (IC₅₀).	73

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

<i>t</i> -BOOH	: <i>tert</i> - bütül hidroperoksit
NIH 3T3	: Fare Embriyonik Fibroblast Hücre Soyusu
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
e^-	: Elektron
ECM	: Ekstrasellüler Matris
UV	: UltraViolet ışın
ETS	: Elektron Taşıma Sistemi
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
H_2O_2	: Hidrojen Peroksit
O_2^-	: Süperoksit Radikali
H_2O_2	: Hidrojen Peroksit
OH^-	: Hidroksil Radikali
SOD	: Süperoksit Dismutaz
NOS	: Nitrik Oksit Sintetaz
CAT	: Katalaz
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
Fe	: Demir
Cu	: Bakır
Zn	: Çinko
Mn	: Manganez
Co	: Kobalt
Mo	: Molibden
N	: Azot

ÖZET

Kahya, Z. (2010). *Rosa damascena*'nin oksidatif strese karşı antioksidan ve antitoksik etkilerinin fibroblast hücre kültüründe değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Son yıllarda yapılan çalışmalar çeşitli gül türlerinin, farmakolojik etkilere sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ülkemizde yetiştirilen ve kozmetik sanayinde birçok kullanım alanı olan *Rosa damascena* türünün, fibroblast hücreleri üzerine antioksidan etkisi ve sitotoksitesine karşı koyma etkinliği ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, 3T3 ve primer fibroblast hücre kültürlerinde, *Rosa damascena* ekstraktının antioksidan, antitoksik etkisi ayrıca bu etkileri sağlayan en uygun konsantrasyonlar araştırıldı. Bu amaçla *Rosa damascena* ekstraktı 2 saat önce ve 24 saat önce çeşitli konsantrasyonlar da (2,5-100 µg/ml) inkübe edildi ve 48 saat LD₅₀'ye yakın *tert*-bütillenmiş hidroperoksite maruz bırakıldı. Ekstraktın kültür şartlarına 24 saat önce verilmesinin incelenen parametreler açısından hücrelerde daha koruyucu olduğu gösterilmiştir. Bu inkübasyon şartında tripan mavisi canlılık testi ile değerlendirilen hücre ölümünü %50 baskılayan *Rosa damascena*'nın IC₅₀ değerleri 3T3 fibroblast hücreleri için 9,6 µg/ml, primer fibroblast hücreleri için ise 6,1 µg/ml olarak bulunmuştur. *Rosa damascena* ekstraktının 2,5-40 µg/ml arasındaki konsantrasyonları, *t*-BOOH inkübasyonu sonucu azalan mitokondri membran potansiyelini ve ATP düzeylerini, sadece *t*-BOOH ile inkübe edilen negatif kontrol hücre grubuna göre, oldukça düzeltmiştir. Luminol bağımlı kemilüminesans ve DCFH oksidasyon çalışması için 3T3 ve primer fibroblast hücrelerinde reaktif oksijen tür ve radikal süpürücü *Rosa damascena*'nın IC₅₀ değerleri yaklaşık olarak sırasıyla 4,2 µg/ml ve 3 µg/ml olarak bulunmuştur. Çalışmamızın sonucu olarak solvent olarak su ile hazırlanmış *Rosa damascena* ekstraktları fibroblast hücre kültürlerinde, hidroperoksitlerin oluşturduğu oksidatif stres ve sitotoksik etkiyi dar bir konsantrasyon aralığında (2,5-40 µg/ml) azalttığı, antioksidan ve antisitotoksik bir aktivite gösterdiği söylenebilir. Ayrıca reaktif oksijen türlerinin en yoğun şekilde meydana geldiği ve etkilediği mitokondri organelini, oksidatif hasara karşı kısmen koruduğunda söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler : Fibroblast hücre kültürü, *Rosa damascena*, Oksidatif stres, Antitoksik, Antioksidan

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3794

ABSTRACT

Kahya, Z. (2010). Evaluation of antitoxic and antioxidant effects of *Rosa damascena* for oxidative stress in cell cultured fibroblasts. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biology. Master Thesis. İstanbul.

Recent studies show that some species of rose have pharmaceutical properties. *Rosa damascena* is widely grown in Turkey and is commonly used in cosmetic industry. Anti-oxidative and anti-cytotoxic effect of its extract on fibroblasts has never been reported. In this study, we investigated the presence of anti-oxidative, anti-toxic effects and also most effective concentrations for these effects in 3T3 and primary fibroblast cell cultures. The extract between concentrations of 2,5 µg/ml and 100 µg/ml was added to the fibroblast culture 2 and 24 hours before 48-hour exposition to the *tert*-buthyl hydroperoxide (*t*-BOOH) in approximately LD₅₀ concentrations. Regarding parameters above, the protective effect on cells was higher in those exposed to the extract 24 hours prior to oxidative agent. Using tripan blue for evaluation of cell death IC₅₀ was 9,6 µg/ml for 3T3 fibroblast and 6,1 µg/ml for primary fibroblasts. These values were the concentrations of *Rosa damascena* to suppress the death of 50% of all cells. Concentrations between 2,5-40 µg/ml remarkably recovered low levels of *t*-BOOH induced membrane potentials and ATP levels in mitochondria, comparing to the negative control cells incubated with only *t*-BOOH. Luminol-dependent chemiluminesance and DCFH oxidation studies showed that, for the 3T3 and primary fibroblasts, IC₅₀ values of *Rosa damascena* were 4,2 µg/ml and 3 µg/ml, respectively. We could conclude that, between short range of concentrations (2,5-40 µg/ml), water-solved *Rosa damascena* extracts reduced oxidative stress and cytotoxic effect, and therefore may have anti-oxidative and anti-cytotoxic activity. We may also conclude that mitochondria, organelles where reactive oxygen species mostly happen, can be partially protected by *Rosa damascena* against oxidative damage.

Key Words: Fibroblast cell culture, *Rosa damascena*, Oxidative stress, Antitoksik, Antioxidant

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 3794

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Oksijen yaşam için temel ihtiyaç olmasına rağmen mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyon gibi normal metabolik olaylarda dahi reaktif oksijen türlerine (ROT) dönüşebilmektedir (Steinman 1982; Elnster 1991; Nordberg ve ark. 2001). Endojen olarak ortaya çıkmasının yanı sıra, eksojen kaynaklı olarak da vücutta artan ROT'nin ve serbest radikallerin inflamasyon, ateroskleroz, iskemi, ilaç toksisitesi, merkezi sinir sistemi, böbrek, gastrointestinal sistem hastalıkları, yaşlanma gibi pek çok fizyolojik ve patolojik olayda yer aldığı bilinmektedir (Carroll 1987; Cros ve ark. 1987; Southorn 1988; Pitkanen ve ark. 1992; Çavdar ve ark. 1997; Klaunig ve Kamendulis 2004; Altan ve ark. 2006). Eksojen kaynaklı ROT oluşturan etkenlere endüstride kullanılan çeşitli bileşikler ve güneş ışığı örnek verilebilir (Sies 1991; Agrawal ve Kale 2001; Berköz ve Yalın 2009). Bu reaktif oksijen türler, hücrenin bileşenlerini oluşturan DNA, protein, karbonhidrat, lipid içerikleriyle kolayca reaksiyona girerek normal hücre fonksiyonlarını bozabilirler (Halliwell 1991; Kelly ve ark. 1998; Agrawell ve Kale 2001).

Derinin bağ dokusunda oldukça fazla miktarda bulunan hücreler olan fibroblastlar, ECM proteinlerinin birçoğunun yapımından sorumlu olup, doku ve organların büyük bölümünde bulunur. Bu hücreler doku hemostazı ve yara iyileşmesinde önemli görevlere sahiptirler (McAnulty ve ark. 2006). Fibroblastlar, güneş ışınlarının taşıdığı UV ile oluşan oksidatif hasardan etkilenmektedir (McAnulty ve ark. 1991).

Oksidatif strese bağlı hasarın çok sayıda hastalık patolojisinden sorumlu olduğunun ortaya çıkması, oksidatif hasarı önlemek için doğal antioksidanları içeren bitkilere olan ilgiyi arttırmıştır. Antioksidanlar ilaç olarak kullanıldığı gibi çeşitli kozmetik ürünlerin içerisinde de bulunur. Kullanılan antioksidanların büyük bir bölümü, etkinliği gösterilmiş N-asetil sistein, E vitamini ve askorbik asit gibi bileşiklerdir (Eriş ve ark. 2009). Bunların yanı sıra bazı bitkisel kaynaklardan elde edilen antioksidan etkinliği bildirilmiş bitkisel ekstraktlar da kullanılabilir (Galati ve ark. 2006; Hevesi ve ark. 2009; Long ve ark. 2009). Bitkisel ekstraktlar günümüzde endüstride yaygın bir kullanım alanı oluşturmaya başlamıştır.

Gittikçe yaygınlaşan bitkisel ürünlerin kullanımı, internette yer alan bazı ticari sitelerde; “zararlı olmaz, yalnızca tedavi eder, sentetikten daha iyidir” gibi başlıklarla teşvik edilmektedir. Bu açıklamalarında etkisi ile genel olarak toplumda, doğal bitkilerden elde edilen ürünlerin güvenilir olduğuna inanılmakta ve farklı sorunların tedavisi için bu ürünlerden yararlanılmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda bu ürünlerin her zaman zararsız olmadığı bulunmuştur. Örneğin; bitkisel ürünlerin fazla tüketilmesi interstisyel nefrite yol açarak, son dönem böbrek yetmezliği gelişimine neden olabilmektedir (Çavdar ve ark. 1997).

Ülkemizde ve bazı çevre ülkelerde yetiştirilen Rosaceae ailesinden olan *Rosa damascena* bitkisinin yağı, suyu ve ekstraktları çok eskilerden beri koku ve güzellik başta olmak üzere birçok amaçla kullanılmıştır (Maleev ve ark. 1972; Wood ve Bache 1839; Huang ve ark. 2009). Son yıllarda yapılan çalışmalar çeşitli gül türlerinin, antibakteriyel, spazm çözücü ve yaşlanma karşıtı etkilerinin olduğunu ortaya çıkarmıştır (Libster 2002; Basim ve Basim 2003; Özkan ve ark. 2004; Boskabady ve ark. 2006). Özellikle Uzakdoğu kaynaklı çalışmalarda farklı gül türlerinin antikanserojen etkilerinin yanı sıra antioksidan etkileri de olduğu gösterilmiştir (Ng ve ark. 2005; Nagai ve ark. 2007; Awale ve ark. 2009). İki çalışmada da *Rosa damascena* türünün de antioksidan etkinliği olduğuna dair bulgular bulunmaktadır (Özkan ve ark. 2004; Kumar ve ark. 2005).

Ülkemizde ekonomik açıdan birçok kullanım alanı olan bu türün antioksidan etkisi ve hücre sitotoksitesine karşı koyma etkinliği ile ilgili yeterli düzeyde çalışma bulunmamaktadır. Bitkisel ürünlerin tıbbi amaçlı kullanımında önemli katkıları olan bilimsel veriler, aynı zamanda bu tür ürünlerin tüketimini de yönlendirebilmektedir. Ülkemizde yetiştirilen bu türün önemli miktarının yurtdışındaki kozmetik firmalar tarafından alındığı hesaba katıldığında, konuyla ilgili çalışmalardan elde edilecek bulguların, bu ürünün tanıtımına katkıda bulunabileceğini beklemekteyiz.

Bu bilgilerin ışığında, çalışmamızda *in vitro* olarak 3T3 ve primer fibroblast hücrelerinde oksidatif stres oluşturulmadan 2 saat ve 24 saat önce çeşitli konsantrasyonlarda *Rosa damascena* ekstraktı uygulanarak, ekstraktımızın antioksidan özelliği, antisitotik etkisi ve etkili konsantrasyonları araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Rosa damascena*

Yağ gülü (*Rosa damascena* Mill.), bitkiler aleminin Spermatophyta (tohumlu bitkiler) bölümünün, Angiospermae (kapalı tohumlular) alt bölümünden, Rosales takımı, Rosaceae (gülğiller) familyası, Rosa cinsindedir. Dünyada yaklaşık 1.350 Rosa (gül) türü tanımlanmıştır. Türkiye florasında 24 gül türü kayıtlı olmasına rağmen gül yağı elde etmek amacıyla kullanılan tür, kültürü yapılan *Rosa damascena* Mill'dir. Çok yıllık dikenli çalı ya da tırmanıcı bitki türünün ortak adıdır. *Rosa damascena* bitkileri, 1,5 - 3 m arasında boylanmaktadır (Şekil 2-1).

Damask rose ‘*Rosa damascena*’ aynı zamanda Şam gülü, Isparta gülü ve yağ gülü olarak adlandırılmaktadır. Sistematikte *Rosa gallica* var. *damascena* Voss., *Rosa calendarum* Borkh gibi bazı sinonimleri de bulunmaktadır (Şekil 2-2). Genellikle güzel kokulu gül olarak bilinir. *Rosa damascena*, *Rosa gallica* olarak adlandırılan kırmızı gülden sonra en iyi bilinen ve en iyi tanınan gül türüdür. Damask rose; *Rosa gallica* ile *Rose phoenicia* veya *Rosa moschata*'nın melezidir. İlk melez çiçek birkaç milyon yıl önce Anadolu'da yetişmiştir. Bu bitkinin çiçekleri geniş, gösterişli, katmerli, pembe, yoğun kokuludur. *Rosa damascena*'nın toplam çiçeklenme periodu yılın nisan ve mayıs ayları boyunca sadece 25-30 gün civarındadır (Altıntaş 2009).



Şekil 2-1: *Rosa damascena* Mill.

Rosa damascena yaygın olarak gül ekstraktı ve gül yağı kaynağı olarak kullanılır. *Rosa damascena*'da *Rosa gallica*, *Rosa centifolia*, *Rosa alba* ve *Rosa rugosa* gibi diğer *Rosa* türlerindeki benzer kimyasal bileşenler tanımlanmıştır ve teröpatik amaçla kullanılmaktadırlar (Rangaha 2001, Nagai ve ark. 2007). *Rosa* türlerinde bulunan bileşiklerin büyük bir kısmı polifenoller ve geraniol, sitronellol, nerol gibi gül alkolleridir (Jafari 2008). *Rosa damascena* absolu halinde feniletıl alkol, alfa tokoferol, beta tokoferol ve beta karoten bulunmaktadır (Ulusoy 2009).

Rosa damascena karboksilik asit (Buckle 1997), bitkisel esansların ve reçinelerin başlıca bileşeni olan karbohidrat yapıdaki terpen, mirisin ve vitamin C içermektedir (Libster 2002). Mirisin maddesinin astrenjan etkisi vardır. Astrenjan etki ile, deriye ait yaralanmalarda, söz konusu bölgede proteinlerin çökmesini sağlayarak doku büzücü ve kalınlaştırıcı etki gösterir.



Şekil 2-2: *Rosa damascena* Mill.

Gül yağında üçyüzden fazla bileşik bulunmasına rağmen, ayırt edici kokusunu veren, gül ketonları ailesinin β -damescenone, β -demescone ve β -ionone üyeleridir. Bu bileşiklerin gül yağında bulunma oranı ise %1'den daha azdır ve karotenoid parçalanması sonucu oluşmaktadır (Huang ve ark. 2009).

2.2. Rosa Cinsinin Ülkemizdeki ve Dünyadaki Yeri

Yağ gülü olarak da bilinen *Rosa damascena* Mill. yetiştiriciliği Türkiye’de ilk defa 1890’lı yıllarda yapılmaya başlanmıştır. Aynı yıllarda Isparta’da yağ gülü tarımı geliştirilmiştir. Yurdumuzda yağ gülü üretiminin %82’si Isparta’da, %8’i Burdur, Afyon ve Denizli’de gerçekleştirilmektedir. Dünyada çok az ülkede yapılan gül tarımı, son yıllarda gül yağının özellikle parfüm, kozmetik, gıda ve ilaç sanayi dallarında çok geniş kullanım alanına sahip olmasıyla büyük önem kazanmıştır. Ayrıca güzel görünümü ve kokusu için de dünyanın bir çok yerinde süs bitkisi amaçlı yetiştirilmektedir. Dünyada yağ gülü üretiminde ülkemiz önde gelmektedir, bunu Bulgaristan, Fas, Meksika ve İran izlemektedir. Bu ülkelerin dışında Hindistan, Güney Afrika, Suidi Arabistan ve Mısır’da da gül üretimi yapılmaktadır.

Yurdumuzda üretilen gülyağı, konkreti (katı gül yağı) ve absolunun ihraç edilmesi, bu ürünün ülke ekonomisinde önemli bir döviz kaynağı olduğunu göstermektedir. Distilasyon ile çiçeklerinden % 0,045 oranında esans yağı elde edilir. Gül yağı dünyada ki en pahalı esans yağlardan biridir (Baydar ve Baydar 2005). Ayrıca yağ gülü çiçeklerinden elde edilen gülyağı kalite bakımından üstün özelliklere sahip oluşu nedeniyle dünya piyasasında ilgi görmekte ve ‘‘Türk gülyağı’’ olarak bilinmektedir. Ülkemizde gülyağı, konkret ve gülsuyu üretiminin büyük bir kısmı Isparta’da Gülbirlik ‘‘Isparta Gül, Gülyağı ve Yağlı Tohumlar Tarım Satış Kooperatifleri Birliği’’ tarafından gerçekleştirilmektedir. Bunun dışında çok az olarak da özel firmalar ve şahıslar tarafından da üretimi yapılmaktadır (Zeki ve ark. 1995). Isparta’da 2758 hektarlık alandan yıllık 9940 ton kadar gül çiçeği toplanmakta ve 5’i Gülbirlik olmak üzere toplam 14 uçucu yağ fabrikasında işlenerek ince gül yağı, katı gül yağı (konkret), gül suyu, absolu gibi ürünlere dönüştürülmektedir (Ağaoğlu 2000). Türkiye, yıllık 2-2,5 ton ince gül yağı ve 4,5-5 ton katı gül yağı üretimi ile dünyada sırasıyla % 50 ve % 40’lık bir pay almaktadır.

2.3. Rosa Cinsinin Tedavideki Yeri

Rosa damascena'nın güzel kokusundan dolayı rahatlatıcı etkisi bilinmektedir. Dünyanın bir çok bölgesinde geleneksel olarak depresyon, kaygı, endişe ve stresle ilgili durumlarda tedavi için gül yağı kullanılmaktadır (Boskabady ve ark. 2006). İnsanlarda depresyon ve stres sıkıntısını hafiflettiği gösterilmiştir (Hongratanaworakit 2009). Ayrıca gül suyu halk arasında güzel koku özelliğinden dolayı kullanıldığı gibi sakinleştirici etkisi ve cilt bakımı içinde kullanılmaktadır.

Rosa damascena'nın esansiyel yağının ağrı kesici, uyutucu, kas gevşetici ve anti-inflamasyon etkisi bilinmektedir (Libster 2002; Maleev ve ark. 1972).

Rosa damascena'nın güzel kokusunun etkisinden başka çiçekleri, taç yaprakları, tohumları ve çanak kısmı tıbbi amaçlı kullanılmaktadır. Eski tıp kitaplarında bu bitkinin kozmetik kullanımının yanı sıra kalbi kuvvetlendirdiği, karın ağrısı, göğüs ağrısı, (Wood ve Bache 1839), menstrual kanamaları ve sindirim sistemi rahatsızlıklarını tedavi ettiği ifade edilmektedir (AveSina 1990).

Kuzey Amerika kızılderili kabilesinde *Rosa damascena* bitkisinin kökleri kaynatılıp süzülerek elde edilen sıvı, çocukların öksürüğünü yatıştırmak için, öksürük ilacı olarak kullanılıyordu (Libster 2002). Son zamanlardaki çalışmalar ile bu bitkinin öksürük kesici ve ağrı kesici etkisi kanıtlanmıştır (Hosseini ve ark. 2003; Shafei ve ark. 2003). Ayrıca bu bitkinin anti-HIV, antibakterial ve antioksidan etkisinin olduğu bulunmuştur (Mahmood ve ark. 1996; Basim ve Basim 2003; Özkan ve ark. 2004).

Günümüzde doğal antioksidanlar içeren tıbbi bitkilere, antioksidanların oksidatif hasarı engelleme özelliği olduğu bilindiğinden dolayı ilgi artmaktadır. Çinlilerin tıbbi bitkilerinden biri olan *Rosa rugosa* yaprakları geleneksel tedavide uzun süredir kullanılmaktadır. Bu bitki pek çok ilaç kitabında tanımlanmıştır ve tedavi edici özelliklere sahip olduğu kanıtlanmıştır (Ng ve ark. 2005).

Gül türlerinden biri olan *Rosa rugosa* ekstraktının içerdiği bazı polifenollerin, reaktif oksijen türlerinin meydana getirdiği lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir. CAT ve GPx gibi antioksidan enzimlerinin aktivasyonlarını ve gen ekspresyonlarını arttırdıkları tespit edilmiştir (Cho ve ark. 2003a; Cho ve ark. 2003b). Lipid peroksidasyon düzeyinin düşmesi, gül ekstraksiyonunun yaşlanma karşıtı mekanizmasını gösteren bir sonuçtur (Ng ve ark.2005).

2.4. Oksijen ve Oksijenin Toksik Etkisi

Aerobik canlıların temel yaşam kaynağı olan oksijen, sekiz (8) atoma sahiptir ve doğada dioksijen (O_2) olarak bulunan, kararsız bir elementtir. Bu kararsız konumu, enerji düzeylerinde bulunan elektronların yapısı ile ilgilidir. Moleküler oksijen dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu elektronlar, farklı orbitallerde ve dönüşleri aynı yönde iken minimum enerji seviyesinde bulunurlar. Oksijenin, tepkimeye girebilmesi için, tepkimeye gireceği molekülün de benzer yapıda yani farklı orbitallerde ve dönüşleri aynı yönde elektronlara sahip olması gerekir. Fakat atom ve moleküller, başta organik moleküller olmak üzere, orbitallerinde elektronlarını antiparalel ve eşleşmiş olarak bulundurlar veya paylaşılmamış elektronları kovalent bağlara katılmış olarak bulundurlar. Bundan dolayı, oksijenin diğer moleküllere olan reaktivitesi (tepkiselliği) son derece kısıtlanmıştır. Bu kısıtlamaya “spin (dönüş) kısıtlaması” denir. Canlıların oksijeni kullanabilmesi için, dönüş kısıtlamasını aşmaları gerekir (Aust ve ark. 1985).

Dönüş kısıtlaması nasıl aşılır

1. Oksijene elektron transferi ile; Proteinlere bağlı metal iyonları aracılığıyla oksijene bir veya iki elektron aktarımı katalizlenebilir. Oksijene tek elektron transferi sonucu süperoksit radikali (O_2^-) oluşur. Dönüş kısıtlaması kalktığı için süperoksit, oksijene göre daha reaktiftir. İki elektron transferi ile de peroksi anyonu oluşur.

Elektron aktarım işlemi için canlılar geçiş elementleri olan bazı metal iyonlarından yararlanırlar. Geçiş elementlerinden Fe, Cu, Zn, Mn, Co ve Mo vücudun gereksinim duyduğu başlıca eser elementlerdendir. Bu elementler dış orbitallerinde bir veya daha fazla sayıda paylaşılmamış elektron içerirler. Canlılarda oksijeni kullanan enzimler ya da oksijenle etkileşime giren proteinler, bu elementlerden en az bir tanesini içermek zorundadırlar (Aust ve ark. 1985).

2. Enerji absorpsiyonu ile; Bu mekanizma ile oksijenin iki uyarılmış formu oluşur. Singled oksijen diye adlandırılan oksijenin bu formlarında, dış orbitalde bulunan paylaşılmamış elektronlardan birisinin dönüşü değişmiştir. Zıt dönüşlü elektronlar aynı orbitalde (delta formu) veya ayrı ayrı orbitallerde (sigma formu) bulunabilirler.

Canlılar için vazgeçilmez bir element olan oksijen; hidrojen, karbon, nitrojen ve kükürt ile birlikte organik moleküllerin, temel yapısal atomlarını oluşturur. Ayrıca oksijen, aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle, hayati bir öneme sahiptir.

Bilinen bütün canlı türleri, organik moleküllerin içindeki şekli ile oksijene ihtiyaç duysalar da serbest durumdaki moleküler oksijen her canlı türü için aynı anlamı ifade etmez. Aerobik canlılar yaşamları için mutlaka moleküler oksijene gereksinim duyarken, anaerobik canlılar büyüme ve çoğalmaları için oksijene bağımlı değildirler. Anaerobik canlılarda oksijenin toksik etkisinin nedeni, oksijen kaynaklı bazı reaktif türlerin, biyolojik molekülleri oksitlemeleri ve bu reaktif türlere karşı anaerobik canlılarda savunma sisteminin bulunmamasıdır. Oksijen anaerobik türlerin yanı sıra, yaşamları için mutlaka moleküler oksijene bağımlı olan canlılarda da toksik etkilidir.

Oksijenin toksik etkileri başlıca iki tür mekanizma ile gerçekleşir.

İlk kez 1954 yılında, oksijenin biyolojik sistemlerde görülen toksik etkilerinin, oksijenin bazı reaktif türlerinden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür. Günümüzde, oksijenin canlılardaki toksik etkisinin “oksijen radikalleri” olarak adlandırılan ve oksijenin vücuttaki metabolizması sırasında oluşan reaktif türlerden kaynaklandığı bilinmektedir.

Aerobik canlılarda gözlenen oksijen toksisitesinin başka bir açıklaması, moleküler oksijenin bazı enzimleri inhibe ettiği şeklindedir. Örneğin, nitrojen fiksasyonunu katalizleyen nitrojenaz enzimleri ve CO₂ fiksasyonunu katalizleyen ribüloz bifosfat karboksilaz, oksijen tarafından kompetitif (yarışmalı) olarak inhibe edilirler. Oksijen, glutamat dekarboksilaz enzimini inhibe ederek beyinde GABA (gama-aminobütirik asit adlı a.a.) düzeyini düşürmektedir. Oksijenin enzim inhibisyonu etkisi sınırlı ve çok zayıftır (Uysal 1998).

2.5. Radikal Kavramı ve Reaktif Oksijen Türleri

Atomlar, proton ve nötronlardan oluşan pozitif yüklü bir çekirdek ile çekirdeğin etrafında hareket eden, partikül ve dalga özelliğine sahip negatif yüklü elektronlardan oluşur. Çekirdek etrafındaki yerleri tam olarak tarif edilemeyen elektronların, bulunma olasılığının en yüksek olduğu yer orbital olarak adlandırılır. Elektronlar belirli enerji düzeylerinde, birbirlerine zıt hareketli çiftler halinde bulunma eğilimiyle, çekirdeklerinin etrafında dönerler. En dış yörüngede bulunan elektron çiftinin dengesi, yörüngeye bir elektron girmesi veya çıkması ile bozulursa, hareketin dengesini bozan bu tek elektron, ortama yada moleküle yüksek bir aktiflik kazandırır. En dış yörüngede eşleşmemiş bir elektronu bulunan molekül gruplarına radikal adı verilir. Molekülün kimyasal simgesinin, sağ üst köşesine konulan nokta veya çizgi ile ifade edilir (R^\bullet veya R^-) Radikaller negatif yüklü, pozitif yüklü veya yüksüz olarak bulunabilirler (Halliwell ve Gutteridge 1984; Southorn ve Powis 1988). Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar seviyesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir (Cheeseman ve Slater, 1993).

2.6. Radikaller Nasıl Oluşur

Radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşur:

1. Kovalent bağların homolitik kırılması ile; Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık (500-600 °C) kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır.

2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile; Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Örneğin askorbik asit, glutatyon ve tokoferoller (E vitamini) gibi hücrel antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur.

3. Normal bir moleküle elektron transferi ile; Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin moleküler oksijenin tek

elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksidin oluşumuna neden olur. Süperoksit radikalının yapımındaki artış da, oksijenin diğer radikal türlerinin ve diğer atom merkezli radikallerin oluşumu için tetik fonksiyonu görür (Akkuş 1995).

Oluşan radikaller eşleşmemiş bir elektrona sahip oldukları için çok kararsızdırlar ve hızla ortamdaki kaybolurlar. Radikaller ortamdaki kaybolurken sahip oldukları tek elektronu ya bir başka moleküle vererek (oksidasyon oluşturarak) yada başka bir molekülden elektron alarak (redüksiyon oluşturarak), elektronları çift olarak bulundurma eğilimine yönelirler. Bu eğilim sonucunda etkiledikleri nonradikal durumdaki yapı, radikal yapıya dönüşür. Bu özellikleri nedeni ile reaktif oksijen molekülleri, radikaller ve radikal olmayanlar olarak iki grupta incelenebilir (Tablo 2-1) (Halliwell ve Gutteridge 1984; Halliwell 1991).

Tablo 2-1: Radikal özellikli olan ve radikal olmayan reaktif oksijen partikülleri

I.Radikaller		II.Radikal olmayanlar	
Süperoksit radikal	O_2^{\bullet}	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil radikal	OH^{\bullet}	Lipid hidroperoksit	LOOH
Peroksil radikal	ROO^{\bullet}	Singlet oksijen	O_2
Alkoksil radikal	RO^{\bullet}	Ozon	O_3
Semikinon radikal	HQ^{\bullet}	Azot dioksit	N_2O_3

2.7. Canlılarda Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları ve Oksidatif Stres

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal oluşumu vardır. Hücrelerdeki metabolik olaylar sırasında farklı tür ve miktarlarda radikaller oluşmaktadır. Hücrelerde oluşabilen oksijen radikalleri ile oksijen içeren reaktif türlerin önemli olanları Tablo 2-2’de görülmektedir.

Tablo 2-2: Oksijen ve nitrik oksitten oluşan başlıca reaktif türler

Tür adı		Tür adı	
Singlet oksijen	O_2	Hidroperoksil radikali	HO_2
Süperoksit	O_2^-	Nitrik oksit	NO^*
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Azot dioksit	NO_2
Hidroksil radikali	OH^*	Nitril katyonu	NO_2^+
Peroksil radikali	ROO^*	Peroksinitrit anyonu	$ONOO^-$
Hidroperoksit	$ROOOH$	Peroksinitrit radikali	$ONOO^*$
Alkoksik radikali	RO^*	Diazot trioksit	N_2O_3

Oksijen radikalleri dış kaynaklı (ekzojen) ve iç kaynaklı (endojen) olarak oluşmaktadır.

Endojen olarak serbest radikal üretim kaynaklarına; mitokondriyal elektron taşıma sistemi reaksiyonları, oksijenaz enzimlerinin reaksiyonları, antimikrobiyal aktivite sırasında oluşan solunum patlaması, fagositer sistemin elemanları olan nötrofil, monosit, makrofaj ve eozinofillerin yaptıkları fagositoz sonucu, otooksidasyon reaksiyonları gibi normal metabolik olaylar sırasında ara ürün olarak oluşan serbest radikaller örnek verilebilir (Sies, 1991; Cheeseman ve Slater, 1993). Ayrıca hücre içinde gerçekleşen küçük moleküllerin (katekolamin, flavinler) oksidasyonunda, ksantin oksidaz gibi çözünebilir enzim ve proteinler, peroksizomlar, endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron taşıma sistemi ile de serbest radikaller oluşur (Berköz ve Yalın 2009).

Eksojen kaynaklı serbest radikal üretim kaynaklarına; radyoaktivite, ultrason ve ksenobiyotikler (yabancı kimyasallar) (Sies 1991; Agrawal ve Kale 2001; Kurt 2008), bir takım kemoterapötiklerin ve antibiyotiklerin kullanımı, iyonize ve non-iyonize radyasyona maruz kalma, sıcak ve soğuga maruziyet, travma, sigara kullanımı, fizyolojik yaşlanma, hava kirliliği, çeşitli çözücüler, anestezi uygulamaları ve aromatik hidrokarbon içeren yiyeceklerin tüketilmesi, herbisit ve pestisitler, petrokimya ürünleri,

güneş ışınları, X-ışınları gibi etkenler örnek verilebilir (Güneş 2006; Berköz ve Yalın 2009).

Bu radikaller belirli seviyenin üzerine çıktığı zaman canlı için ciddi tehlikeler oluşturmaktadır. Ancak tamamen istenmeyen yapılar değildirler ve bazı süreçlerde bunların varlığı gerekmektedir.

Vücudumuzda oluşabilen radikallerin sayısı yüzlerce farklı tür şeklinde ifade edilebilirse de, bu radikaller arasında süperoksit, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve hidroksil radikalının özel yerleri vardır (Kenneth ve Bruce 1998). Hatta bu radikaller içinde süperoksit ve nitrik oksit temel radikaller sayılabilir. Çünkü süperoksit ve nitrik oksit enzimatik mekanizmalarla, devamlı olarak ve önemli miktarlarda üretilen radikallerdir. Ayrıca bu iki radikal, biyolojik sistemlerde tanıdığımız diğer bütün önemli radikaller ile radikal yapıda olmayan reaktif türlerin oluşumunu başlatabilecek özelliktedirler. Normal biyokimyasal tepkimeler sırasında oluşan oksijen radikalleri ile çeşitli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrik oksidin derişimleri genellikle çok düşüktür. Düşük derişimdeki reaktif türler, hücrelerin antioksidan sistemleri tarafından inaktive edildiklerinden önemli toksik etkilere neden olmazlar. Ancak bu radikallerin yapımları çeşitli patolojik durumlarda artabilir, çoğunlukla da her iki radikal bileşik grubunun oluşumu birbiri ile paralel seyrederek. Örneğin inflamasyon durumlarında aktive olan lökositler aynı anda hem oksijen radikallerini hem de nitrik oksidi yüksek derişimlerde sentezlerler. Nitrik oksit, oksijen radikalleri ile tepkimeye girerek veya oksijenli ortamlarda oksitlenerek, kendisinden çok daha reaktif türlerin oluşumuna neden olur. Oksijen radikallerinin fazla yapımının neden olduğu etkilerin toplamı “oksidatif stres“ diye adlandırılır. Oksidan stresi, nitrik oksidin reaktif türlerinden kaynaklanan toksik etkilerden ayırmak mümkün olmadığından, “nitrozatif stres”den ayırmak imkansızdır. Bu bakımdan, oksidatif hasar, süperoksitten kaynaklanan radikaller ile nitrik oksidin reaktif türlerinin neden olduğu hasarların bir toplamıdır (Liev ve ark. 1990).

Serbest radikaller kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasarlara neden olur. Bilim adamları 1954’lerden beri serbest radikallerin yaşlanma ve dejeneratif hastalıklara neden olduğunu bilmektedirler (Halliwell 1992; Güneş 2006).

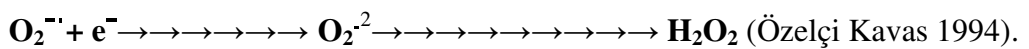
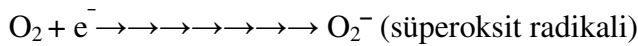
2.8. Bazı Reaktif Oksijen Türleri

2.8.1. Süperoksit (O_2^-)

Süperoksit radikali (O_2^-) oksijen molekülüne bir fazla elektronun eklenmesi sonucu oluşan bir reaktif oksijen metabolitidir. Canlılarda olduğu ilk gösterilen radikal olan süperoksit, başlıca şu mekanizmalarla üretilmektedir:

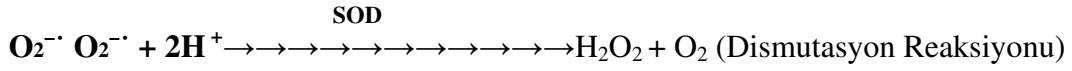
İndirgeyici özellikteki biyomoleküller, oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken, süperoksit radikalini oluştururlar. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotidler gibi yüzlerce biyolojik molekül, aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar. Başta çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali bir ürün olarak oluşabilir. Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin % 1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH-dehidrogenaz ve koenzim-Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçığının olmasıdır. Sitokrom oksidaz, Fe: Cu: Zn: Mg atomlarını 2:2:1:1 oranında içeren bir protein olup, süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz aktivitelerine sahiptir. Bu sayede, sitokrom oksidaz üzerinde süperoksit veya hidrojen peroksit oluşsa bile, içerdiği enzimatik aktivite sayesinde hızla ortamdan temizlenir. Aktive edilen fagositik lökositler bol miktarda süperoksit üreterek fagozom içine ve buldukları ortama verirler. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır. Yani radikal yapımı bazı hücrel fonksiyonlar için gerekli de olabilir (Steinman 1982).

Hücrel koşullarda üretilen süperoksit, oksitleyici veya indirgeyici olarak davranabilir. Aldığı elektronu metal iyonuna, sitokrom c'ye veya bir radikale verirse tekrar oksijene oksitlenir. Oksijenden daha oksitleyici olan süperoksit bir elektron daha alırsa peroksi anyonuna indirgenir.



Bu tepkime biyolojik moleküllerin oksidasyonuna neden olduğundan tercih edilmez. (Chance ve ark. 1979).

Aerobik canlılarda süperoksit radikalinin (O_2^-) ortadan kaldırılması, süperoksit dismutaz enziminin (SOD) katalize ettiği dismutasyon reaksiyonu ile gerçekleşir. Dismutasyon reaksiyonu sırasında, bir süperoksit radikali oksijene yükseltgenirken bir başka süperoksit radikali ise hidrojen peroksite (H_2O_2) indirgenir (Özelçi Kavas 1994).

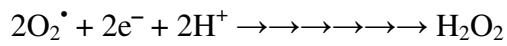


Süperoksit, özellikle hafif asidik koşullarda SOD olmadan kendiliğinden dismutasyonla da H_2O_2 'e çevrilebilir. Yani dismutasyonun hızı, asidik pH değerlerinde hızlanır (Vander ve ark. 1985; Cros ve ark. 1987). SOD enziminin yüksek katalitik etkisi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez. Ancak çeşitli patolojik durumlarda süperoksit yapımının artmasıyla süperoksitde özgü tepkimeler görülmeye başlar. Süperoksit metal iyonlarını indirgeyerek bağlı olduğu proteinlerden salınımına neden olur. Kofaktörlerin oksidasyon düzeylerini bozar ve metal iyonlarının katıldığı hidroksil radikali yapım tepkimelerini hızlandırır.

Süperoksit, hücre zarlarının hidrofobik ortamlarında daha uzun ömürlü ve çözünürlüğü daha fazladır. Zar fosfolipidleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri daha asidiktir ve süperoksit burada daha kolay bir proton alarak hidroperoksit radikalini (HO_2^{\cdot}) oluşturur. Bu radikal de çok reaktif olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilir ve antioksidanları oksitleyebilir.

2.8.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

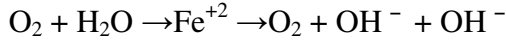
Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik ve non-enzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşan endojen kaynaklı bir moleküldür.



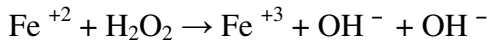
Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir. Hidrojen peroksidin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, Fe, Cu gibi metal iyonlarının varlığında yani enzimatik olmayan reaksiyonlar ile hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır (Eltner 1991). Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki ferril [Fe (IV)] ve perferril [Fe(V)] gibi reaktif demir formlarını oluşturur.

elektron ile indirgenmesi $\cdot\text{OH}$ yapımına neden olur. Bu tür indirgenme Fe, Cu gibi metal iyonları tarafından katalizlenir. Askorbik asit, süperoksit gibi indirgeyici bileşiklerin de bulunduğu ortamda oksitlenen metal iyonu tekrar indirgendiğinden H_2O_2 'den OH^- yapımı sürekli bir duruma gelir.

Haber-Weiss Reaksiyonu :



Fenton Reaksiyonu :



Haber-Weiss tepkimesi ya da fenton tepkimesi olarak adlandırılan bu tepkime ile OH^\cdot oluşacağı vücutta üretilen H_2O_2 derişimi ve serbest metal iyonunun varlığına bağlıdır. Süperoksit hem H_2O_2 'in öncülü hem de metalleri indirgeyici bir tür olduğundan; süperoksit proteinlere bağlı metallerin indirgenip serbest kalmasına da neden olabildiğinden, biyolojik koşullarda süperoksit oluşumunun arttığı ortamda $\cdot\text{OH}$ üretimi kaçınılmazdır. Fenton tepkimesini katalizleyen en aktif metal iyonları demir ve bakırdır. Demir; metabolizmasının her aşamasında mutlaka ya bir proteine bağlı durumda ya da küçük organik moleküllerle (sitrat, ADP, ATP gibi) kompleks oluşturmuş formda bulunur. Metal iyonlarının proteinlere bağlı formda tutulmaları, $\cdot\text{OH}$ yapımını önlemenin en kuvvetli yoludur. Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan OH^\cdot , su dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle tepkimeye girer. Bu nedenle 10^{-9} saniyeden daha kısa bir ömre sahiptir (Kenneth ve Bruce 1998).

Her tür biyolojik molekül OH^\cdot 'in bir hedefi ise de özellikle elektronca zengin bileşikler tercihlili hedeflerdir. Nükleik asitler, proteinler ve lipidlerde başlatılan radikalik tepkimelerde binlerce farklı ara ürünler oluşabilir. DNA ile tepkimesi sonucu baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilir. İleri derecedeki DNA hasarları tamir edilemediğinden hücre ölümüne neden olur .

Proteinler üzerinde oluşan oksidasyonlar yapı değişimine neden olacağından proteinleri proteolitik yıkıma götürür. Hücre zarı su içermediğinden $\cdot\text{OH}$ 'ın başlıca hedefi yağ asididir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp yine hücre ölümüne neden olabilir. Hidroksil radikali ile oluşan en

iyi tanımlanmış biyolojik hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur.

Radikalik tepkimeler zincirleme tepkimelerdir. Bir tek $\cdot\text{OH}$ ile başlatılan tepkime, her seferinde katlanarak yayılma yeteneğine sahiptir. Hücre zarında gerçekleşebilen bu tür tepkimelere lipid peroksidasyonu denir. Bir noktada başlatılan tepkime, ortamda uygun bileşikler varsa yayılmaya devam eder (Boskabady ve ark. 2006).

Doku hasarının birçok modelinde oluşan OH^- radikali olayın final mediatörü olarak rol oynamaktadır.

2.8.4. Singlet Oksijen

Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunda reaktivite çok yüksektir. Aldığı enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde verip yeniden oksijene dönebilir. Başlıca şu mekanizmalarla vücutta oluşabilir:

- a) Pigmentlerin (örneğin flavin içeren nükleotidler, retinal, bilirubin) oksijenli ortamda ışığı absorblamasıyla
- b) Hidroperoksitlerin metaller varlığındaki yıkım tepkimelerinde
- c) Kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında
- d) Sitokrom p450 tepkimeleri enzimlerinin etkileri sırasında

İki tip singlet oksijen üretilir.

Sigma singlet oksijen : Enerjisi daha fazladır ve çok kısa ömürlüdür.
Delta singlet oksijen : Daha uzun ömürlüdür ve gözlenen kimyasal reaksiyonlardan esas sorumlu form olduğu kabul edilmektedir.

Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan tepkimeye girerek peroksi radikalini oluşturur ve OH^- kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir (Nordberg ve Arner, 2001).

2.8.5. Nitrik Oksit

Nitrik oksit, çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrojen merkezli bir radikaldir. Paylaşılmamış elektron aslında nitrojen atomuna ait ise de, bu elektronun hem nitrojen hem de oksijen atomu üzerinde delokalize olması nedeniyle tam radikal özelliği taşımaz. Bunun sonucu, bilinen diğer radikallere göre reaktivitesi baskılandığından oldukça uzun ömürlüdür. Vücudumuzda NO[•] sentezini sağlayan mekanizmalar son derece kısıtlıdır. Vücuda giren nitro bileşiklerinin metabolize edilmesi sırasında oluşan NO[•] bir tarafa bırakılacak olursa, endojen NO[•] oluşturan tek kaynak nitrik oksit sentaz (NOS) enzimidir. Nitrik oksit NOS enzimi yardımı ile yarı esansiyel amino asit olan L-argininden oksidatif deaminasyon sonucunda sentezlenir (Liev 1990; Richard 1994).

Fizyolojik (düşük) derişimde üretilen NO esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO₃⁻) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır (Butler ve ark. 1995). Oksijen radikalindeki durumun aksine, nitrik oksiti ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. Aerobik ortamda NO[•] stabil değildir; derişimin artması ile oksidasyon hızlanır. Bu nedenle ortamdaki derişimi ile kendi ömrü arasında ters bir orantı vardır.

Radikalik tepkimeler;

- Oluşan radikallerin antioksidanlar ile indirgenmesi,
- Radikallerin birbirleri ile tepkimeleri, ya da
- Ortamda tepkimeye girebilecek bileşik kalmaması

durumunda sona ererler. Buna göre hücrel koşullar, oluşan radikalın çok erken safhada indirgenmesi, biyomoleküllerin korunması bakımından hayati öneme sahiptir (Liev 1990).

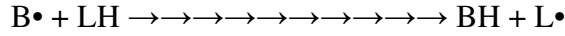
2.9. SERBEST RADİKALLERİN BİYOLOJİK ETKİLERİ

Serbest radikallerin hücrede etkiledikleri kısımları ve etkilerini kısaca özetleyecek olursak;

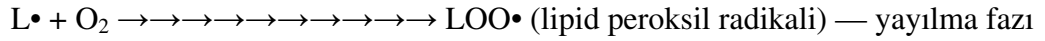
2.9.1. Zar lipidlerine etkileri:

Biyolojik zarların yapısında yer alan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna neden olurlar (Güneş 2006). Reaksiyonlar zincirleme gerçekleşir ve dönüşümsüzdür. Lipid peroksidasyonu Fe ve Cu gibi yüksek değerlikli geçiş metalleri varlığında artar ve bu

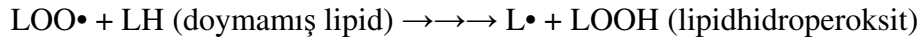
metaller tarafından e^- transferi ile başlatılabilir. Biyolojik membranların yapılarında baskın olarak bulunan fosfolipitlerin, esterleşmiş doymamış yağ asidinin α metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkması peroksidasyonun başlamasına neden olur; böylece yağ asiti zinciri lipid radikali niteliği kazanır. ($B\bullet$ = Başlatıcı radikal, LH = Doymamış lipid, $L\bullet$ = Lipid alkil radikali- C merkezli radikal)



Radikal dayanıksız olup, çift bağların yerini değiştirir ve oksijenle reaksiyonu sonucu lipid peroksil radikaline dönüşür.



Lipid peroksil radikalleri diğer doymamış yağ asitlerine etki ederek yeni radikalleri oluşturur, bir yandan da hidrojen atomları alarak hidroperoksitlere dönüşürler (Halliwell 1996). Bu durumda yayılma fazıda başlamış olur.



Hidroperoksitlerin parçalanmasıyla lipid alkoksi radikalleri açığa çıkar. Lipid hidroperoksit radikaller ve alkoksi radikaller, antioksidan reaksiyonlarla, etilen ve pentan gibi küçük hidrokarbon ve aldehitlere parçalanarak lipid peroksidasyonunu sonlandırırlar ya da devam ederek daha ileriye gider (Mukai ve Goldstein 1976)..

Lipid peroksidasyon ürünleri olarak açığa çıkan lipid peroksitleri, hidroperoksitleri membran yapısına doğrudan, diğer hücre bileşenlerine ise aldehit üreterek dolaylı olarak zarar verir. Bu da pek çok hastalığın ve doku hasarının oluşmasına neden olur (Ansari ve ark. 1989).

Lipid peroksidasyonu sonucu çeşitli lipid peroksitlerin yanında melondialdehitde (MDA) oluşur. Melondialdehit, zar bileşenlerinde çarpaz bağlanmalara ve polimerizasyona yol açar. Bunlar membran fonksiyonunun bozulmasına, membran akışkanlığının azalmasına, membran reseptör ve enzimlerinin inaktivasyonuna, Ca^{+2} gibi iyonlara karşı geçirgenliğin artmasına neden olur (Halliwell ve Gutteridge 1984b; Halliwell 1991). Bunun sonucu; zar yapısında, iyon taşınmasında ve enzim

aktivitelerinde bozulmalar ortaya çıkar. Bu bozukluklarda zamanla hücre ve doku hasarlarına neden olur (Güneş 2006).

2.9.2. Proteinlere etkileri:

Proteinlerin oksidatif strese karşı en duyarlı bölgeleri sülfidril gruplarıdır (Sen ve Packer, 2000). Proteinler ROT'a karşı lipidlere oranla daha az duyarlıdır. Glutasyon ve tiyollerin oksidasyonu, tiyol ve oksijen radikallerinin oluşumuna neden olur. Tiyol radikalleri sülfür taşıyan radikallerdir (R-SH) ve reaksiyona girdiği molekülde disülfid bağı oluşumuna neden olurlar. Proteinlerde yapılarında bulunan aminoasit kompozisyonuna göre serbest radikallerden etkilenirler. Özellikle triptofan, tirozin, fenilalenin, histidin, methionin, sistein gibi çift bağ ve sülfür içeren aminoasitlere sahip proteinlerde kolayca disülfid bağları oluşarak proteinin yapısı dolayısıyla aktivitesi bozulur (Güneş 2006). İmmünoglobulin G ve albümin gibi disülfid bağı fazla olan proteinlerin ise üç boyutlu yapıları bozulmaktadır (Kelly ve ark. 1998).

2.9.3. DNA'ya etkileri:

Bir canlının elektromanyetik, ultraviyole ve X-ışınlarına maruz kalması sonucu oluşan serbest radikaller, özellikle hidroksil radikali, DNA yapısındaki deoksiriboz ve bazlarla reaksiyona girerek çeşitli bozukluklara ve mutasyonlara neden olurlar. Oluşan mutasyonlar, DNA tekrar dizilerinin artışı ve yeniden düzenlenmeler hücre yaşlanmasına neden olan etkenlerdir. Hatta hücre ölümüne yol açarlar (Güneş 2006).

Hidrojen peroksit ise membranlardan kolayca geçip hücre çekirdeğindeki DNA'ya ulaşır ve hücre fonksiyonlarının bozulmasına hatta ölümüne yol açar. Bu nedenlerden dolayı DNA kolay zarar görebilen bir moleküldür (Agrawal ve Kale 2001).

2.9.4. Karbonhidratlara etkileri:

Monosakkaritlerin oksidasyonu sonucu peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanarak, çarpaz bağlar oluşturarak antimitotik etki gösterirler. Bu şekilde hücre çoğalmasını engelleyerek hücre yaşlanmasında önemli rol oynarlar (Ceballos ve ark. 1992; Güneş 2006).

Özetle serbest radikaller hücrenin hedef olarak seçtiği farklı bölgelerinde farklı hasarlara neden olurlar. Serbest radikallerin hücresel hedefleri Tablo 2-3'de gösterilmektedir (Özdaş 2006). Nükleik asit ve bazları hedef aldıklarında sonuç hücre döngüsünde hasar ve çeşitli mutasyonlar olurken, doymamış ve tiol içeren aminoasitler

hedef olduğunda protein denatürasyonu, çarpaz bağların oluşumu, enzim inhibisyonu ve hücre membran geçirgenliğinde değişiklikler meydana gelir. Eğer serbest radikallerin hedefi DNA ise DNA zincir kırıkları ve baz değişiklikleri meydana gelebilmektedir.

Tablo 2-3: Serbest Radikallerin Hücresel Hedefleri

Hücresel Hedef	Hasarın Sonucu
Proteinler	Peptid zincirinde kopma, denatürasyon
Antioksidanlar	E vitamin ve beta karoten ile katalaz ve SOD enzimlerinin inhibisyonu, GSH Px aktivitesinde değişiklik
DNA	Zincir kopması ve baz değişiklikleri
Hyaluronik asit	Sinovyal sıvı akışkanlığında değişiklik
Doymamış ve tiol içeren aminoasitler	Protein denatürasyonu, çarpaz bağların oluşumu, enzim inhibisyonu ve buna bağlı hücre membran geçirgenliğinde değişiklik
Nükleik asit bazları	Hücre döngüsünde bozulma, mutasyon
Karbonhidratlar	Hücre membran reseptör duyarlılığında bozulma
Kofaktörler	Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerin miktarında ve aktivitesinde azalma
Nörotransmitterler	Serotonin ve epinefrin gibi nörotransmitterlerin miktarında ve aktivitesinde azalma

2.10. Reaktif Oksijen Türlerinin (Oksidanların) Hastalıklardaki Rolü

Reaktif oksijen metabolitlerinin aşırı miktarlarda üretimi, hücre harabiyeti oluşturabilir. Bunlardan hidrojen peroksit, hızla çevre hücrelere geçerek hem glikolitik hem de oksidatif fosforilasyon yollarını etkilerken adenzintrifosfat (ATP) sentezinin inhibisyonuna da neden olmaktadır. Glikolitik yolda hidrojen peroksitin, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GADPH) üzerine etkisi ve indirekt olarak da GADPH'ın kofaktörü olan nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) konsantrasyonunda azalma oluşturması sonucu ATP sentezi bozulmaktadır. Hidrojen peroksitin NAD konsantrasyonunu azaltma etkisinin, DNA onarımında rol oynayan poliadenozin difosfat riboz polimeraz enziminin aktivasyonu sonucu geliştiği bildirilmektedir (Schraufstatter ve ark. 1986). Aktifleşen ADP-riboz-polimeraz enzimi, substratı olan NAD'i bol miktarda kullanarak konsantrasyonunu azaltır. NAD konsantrasyonunda azalma, pH azalması ile birleşince glikolitik yolun inhibisyonuna neden olur.

Hidrojen peroksitin düşük konsantrasyonların da bile birçok hücrede DNA harabiyeti gelişir, bunun sonucunda bir geçiş metalinin de varlığı ile hidroksil radikali açığa çıkar. DNA'da gelişen bu şekildeki harabiyet malign transformasyonlara da yol açabilir. DNA harabiyetinden sadece hidrojen peroksit değil ama ayrıca süperoksit radikali ve hidroksil radikali de sorumlu olabilir. Oksidanlara maruz kalan hücrelerde, çok kısa zaman birimi içinde DNA harabiyetinin geliştiği ileri sürülmektedir (Schraufstatter ve ark. 1986).

Oksijen radikalleri, hem DNA dizilerinde hem de gen ekspresyonunda değişime neden olabilmelerinden dolayı karsinogenezi de oldukça önemlidirler. O_2^- ve H_2O_2 , DNA kırılması ve onkogen aktivasyonuna neden olarak kanser oluşumunda tetikleyici rol üstlenebilirler (Marx 1987; Kılçksız ve Demirel 2008)

Reaktif oksijen metabolitlerinin hücre harabiyeti oluşturucu başlıca etkileri DNA harabiyeti ile yakın ilişkidir. Nitekim, bu metabolitlerin hücre membranında başlattıkları lipid peroksidasyonunun ürünleri de yine DNA harabiyetine yol açmaktadır. Lipid peroksidasyonu sırasında poliansatüre yağ asitleri hidrojenini kaybeder ve moleküler oksijenle reaksiyona girer. Hücre membranında bol miktarda bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, reaktif oksijen metabolitleri ile reaksiyona girerek peroksidasyon oluştururlar. Açığa çıkan lipid peroksitler de reaktif oksijen metabolitlerine benzer şekilde hücresel komponentler üzerinde toksik etkiler gösterirler (Özelçi-Kavas 1989). Lipid peroksidasyon ürünlerinden malondialdehit,

membran komponentlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona yol açarak esneklik, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey determinantlarının agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirme yeteneğine sahip olması yanında DNA'nın nitrojen bazları ile de reaksiyona girebilir, amino grupları arasında çapraz bağlanmalara yol açabilir, bu özellikleri ile malondialdehit mutajenik, kültür hücreleri için genotoksik ve karsinojeniktir (Mukai ve Goldstein 1976).

Antioksidan dengenin serbest radikal tarafına kaymasıyla hücre organelleri ve membrandaki lipid ve protein yapısı bozulur, hücre içi enzimler inaktiflesir, DNA hasarı oluşur, mitokondrilerdeki aerobik solunum bozulur, litik enzimler aktive olur, hücreden potasyum (K) kaybı artar, damar geçirgenliği bozulur, ekstraselüler kollajen doku komponentleri yıkılır, trombosit agregasyonu ve dokulara fagositlerin göçü artar (Berköz ve Yalın 2009). Son yıllarda yapılan çalışmalar, artmış serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun, birçok hastalığın patogeneğinde rol aldığını göstermektedir (Carroll 1987; Southorn 1988; Çavdar ve ark. 1997).

Oksidatif stresin kanser ve ateroskleroz başta olmak üzere pek çok hastalığa yol açmasının yanında pek çok hastalık ve fizyolojik durum da oksidatif strese yol açabilir (Marx 1987; Robbins 1989; Kenneth ve Bruce 1998; Klauning ve Kamendulis 2004; Berköz ve Yalın 2009).

- Hipertansiyon
- Miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik hastalıklar,
- Nörolojik hastalıklar,
- Astım,
- Diabetes mellitus,
- Romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar,
- Osteoporoz ve
- Yaşlanma dahil birçok hastalığın oksidatif stres ile ilişkisi gösterilmiştir (Engin ve Altan 2000; Yardım-Akaydın ve ark. 2004; Altan ve ark. 2006).

Diabetes mellitus, günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı tüm dünyada hızla yayılan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diabet oluşturulan sıçanlarda ve diabetik hastalarda serbest oksijen

radikallerinin ve lipid peroksidasyonun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diabet etiolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (Pitkanen ve ark. 1992). Glukozu da içeren bazı şekerlerin proteinlerle etkileşime girmeleri ile de reaktif oksijen radikalleri meydana gelir. Dokuların, belli bir sürenin üzerindeki süreçlerde yüksek konsantrasyonda kan glukozuna maruz kalmaları yani hiperglisemi sebebinden dolayı oksidatif stres oluşabilmektedir. Nitekim, bu durumun özellikle Diabetes Mellitus'lu hastada hiperglisemianın yan etkilerini arttırabileceği ileri sürülmektedir (Wolff ve Dean 1987); çünkü proteinlerin glikasyonu, şekerle doğrudan reaksiyonun yanı sıra serbest radikal reaksiyonlarını da içermektedir.

Sonuç olarak, pek çok hastalığın patogenezinde artan reaktif oksijen türlerinin rolünden söz edilmektedir. Yine aynı şekilde önemli olan bir başka nokta ise hemen hemen hastalıkların çoğunluğunda reaktif oksijen türlerinin oluşumundaki artışın bir epiphenomenon olduğu yani sonuç yaratmada başlı başına etkisi olmadığı, hastalığın ilerlemesinde önemli katkısı olduğu halde bunun çok belirgin olmadığıdır. İşte bu noktanın her bir hastalık bakımından değerlendirmesinin çok iyi yapılması gereklidir. Çünkü gelecekte, hastalıkların tedavisinde, antioksidan tedavinin önemli bir yer tutacağına inanılmaktadır. Bu tedavinin başarılı bir şekilde uygulanabilmesi için ise reaktif oksijen türlerinin herbir hastalıktaki kesin rolünün çok iyi belirlenmiş olması gerekmektedir (Özelçi-Kavas 1994).

2.11. Oksidatif stres ve yaşlanma

Reaktif oksijen metabolitlerinin önemli rolü olduğu bildirilen durumlardan biri ise yaşlanmadır. Vücudumuzun yapıtaşları olan hücreler zamanla yaşlanır, görev yapma ve çoğalma yeteneklerini kaybeder, zamana bağlı olarak oluşan çeşitli bozukluklar ve şartlar nedeniyle de ölürlür. Hücrelerin yaşlanması, organizmanın da yaşlanmasına, bunun sonucu olarak oluşan çeşitli hastalıklar nedeniyle ölümüne yol açar. Oksidatif stres sonucu oluşan hasar, hücre yaşlanmasına neden olan etkenlerden sadece biridir (Niwa ve ark. 1993). Yaşlanan organizmanın hücrelerinde reaktif oksijen metabolit üretiminde artış olur, bu ise artan lipid peroksidasyonu, lipofuskin yapımı ve membran harabiyeti ile sonuçlanır. Yaşlanma ile organizmada lipid peroksidasyonunda görülen artışın aşağıdaki faktörlerin herhangi biri sonucunda gelişebileceği ileri sürülmektedir: (Freeman ve Crapo 1982; Robbins ve ark. 1989; Kenneth ve Bruce 1998).

- 1 — Çevresel ajanlar etkisiyle reaktif oksijen metabolit yapımının sürekli artışı.
- 2 — Bilinmeyen nedenlerden ötürü antioksidan maddelerin azalması.
- 3 — Toksik oksijen radikallerinin inaktivasyonunu katalize eden bazı bileşiklerin ya da enzimlerin, örneğin süperoksit dismutaz gibi, aktivitelerinde azalma.

2.12. Antioksidan Savunma Sistemleri

ROT'lerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlara 'antioksidan savunma sistemleri' denir. Bu mekanizmada kullanılan moleküllere ise antioksidanlar denilmektedir (Berköz ve Yalın 2009). Belirli bir düzeye kadar olabilen oksidan molekül artışı yine vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Kısaca sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge içindedir. Oksidanlar belirli düzeyin üzerine çıkar veya antioksidanlar yetersiz olursa yani denge bozulursa söz konusu oksidan moleküller organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbohidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimlerini bozarak zararlı etkilere yol açarlar (Özelçi-Kavas 1994; Halliwell 1995; Hevesi ve ark. 2009).

2.13. Antioksidanların Kaynakları

Doğal (Endojen) ve Eksojen kaynaklı olabilirler.

2.13.1. Doğal (Endojen) Antioksidanlar

Doğal antioksidanlar enzimatik veya enzimatik olmayan kaynağa sahip olabilirler.

2.13.1.1. Enzimatik olan Doğal Antioksidanlar;

Süperoksitdismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-S-Transferazlar (GST), mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, hidroperoksidaz gibi enzimatik antioksidanlardır.

2.13.1.2. Enzimatik olmayan Doğal Antioksidanlar

Melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, laktoferrin, albumin, askorbik asit, ürat, alfa tokoferol ve beta karotendir.

2.13.2. Eksojen antioksidanlar ise

Trolox-c, mannitol, barbitüratlar, demir şelatörleri, bütillenmiş hidroksi toluen, folik asit, NADPH oksidaz inhibitörleri ve sitokinler gibi bazı antioksidanlardır.

Antioksidanlar organizmada etkilerini;

- 1-Oksidanları tutarak (temizleme), toparlayıcı etki,
- 2- Bir hidrojen atarak ve pasifize ederek (baskılama) veya
- 3- Serbest radikallerin oluşturdukları hasarı onararak gösterirler.

Ayrıca antioksidanlar, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler (Nordberg ve Arner 2001).

- Hücre dışı savunma; albümin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli antioksidan molekülleri içermektedir.
- Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (Halliwell 1995; Altan ve ark. 2006).

Tablo 2-4: Bazı Antioksidanlar

Scavenger (süpürücü) antioksidanlar	Preventif (koruyucu) antioksidanlar	Enzimatik antioksidanlar	Sentetik antioksidanlar
Askorbik asit	Transferrin	Glutatyon peroksidaz	N-Asetil Sistein
Alfa- tokoferol	Albumin	Katalaz	Allopurinol
Tiyoller	Seruloplasmin	Paraoksanaz	Probakol
Beta- karoten	Ferritin	Süperoksit dismutaz(SOD)	Penisilamin
Ürik asit			Deferoksanin
Flavonoidler			Enzimatik Butil
Ko-enzim Q			Hidroksitoluen

bağlı tiollerde de GSH ile birleşik disülfid şekilleri oluşur. Bu değişikliklere sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunun artışı eşlik ederek oksidan baskı ile ilişkili hücre yaralanmasına yol açar (Nordberg ve Arner 2001).

GSH'nun proteinlerdeki sülfhidril gruplarını koruma, koenzim olarak enzim yapısına katılma, peroksit, serbest radikaller ve reaktif toksik maddelerin zehirsizleştirilmesi gibi önemli işlevleri bulunmaktadır.

Antioksidan savunmanın oluşturulmasında süperoksit dismutazın dışındaki iki enzimden glutatyon peroksidazın önemi, katalazın öneminden daha büyük olabilir, çünkü bu enzim de süperoksit dismutaz gibi, aynı subsellüler kompartımanlarda, yani sitozol ve mitokondriada yer almaktadır (Özelçi 1989).

2.14.4. N Asetil Sistein (NAS)

Asetil sistein doğal bir aminoasit olan L-Sistein'in N-Asetillenmiş türevidir. Yapısında bulunan sülfhidril grubu ile glikoprotein içerisindeki disülfid bağlarını koparma özelliği vardır. Ekzojen kaynaklı sentetik bir antioksidan olan N asetil sistein (NAS) güçlü serbest oksijen radikalleri toplayıcısı yani temizleyicisi olup azalmış vücut glutatyon depolarını destekler ve oksidatif strese serbest radikal oluşumunu durdurmada yararlı olabilir (Eriş ve ark. 2009).

NAS, GSH'nın başlıca kaynağı olarak sisteini artırır ve ayrıca proteinlerde disülfid bağları azaltarak serbest radikalleri ve bağlanan metalleri uzaklaştırır. Çalışmalar NAS'nin ROT kaynaklı apoptotik süreci ve redoks potansiyel dengesizliğini baskıladığını göstermektedir. Bu aktivitesi yapısında bulunan tiyolün antioksidan ve nükleofilik özelliklerine bağlanmaktadır. Radyosyona bağlı DNA hasarını azaltabildiği ve kanserden korunmada yeri olduğu gösterilmiştir. Ayrıca NAS'in radyosyona bağlı genotoksisiteyi azalttığı söylenebilir ve lipid peroksidasyonunu, protein oksidasyonunu önleyerek hücre bütünlüğünün devamına yardım eder (Kılçksız ve Demirel 2008).

N- Asetil Sistein, deneysel ve klinik çalışmalarda, iskemi periyodunu izleyen yeniden kanlanma döneminde doku ya da organlarda meydana gelen hasar olarak tanımlanan reperfüzyon hasarını ve oksidatif stresin etkilerini azaltmak amacıyla kullanılan antioksidan özellikli ilaçlardan birisi olarak kabul edilmektedir (Akkoç 2008).

2.15. Oksidatif Stres Ajanı Olan Peroksitler

Peroksit; peroksi grubunu (-O-O-) içeren bileşikler, her biri birbirine ve bir radikal yada bir elemente bağlanan iki oksijen atomundan oluşan, zincir şeklinde bir yapıya sahiptir. Hidrojen peroksit güçlü bir oksidan ajandır. Oksidasyon, hidroksilasyon ve redüksiyon işlemlerinde kullanılır. Okside edici özelliği nedeniyle tekstil maddelerinin, saçların ve kağıt malzemelerin renk açımında kullanılır. Ayrıca tıpta antiseptik olarak kullanılır. Uygulaması; organik ya da inorganik altbirimlerin, bir yada birkaç hidrojenin yerini aldığı organik preoksitlerin yanında perhidrat gibi kimyasalların oluşumunu içerir. Beyazlatıcı, deodorizan ve tarımda kontamine toprak ve gölleri temizlemek amacıyla oksijen serbestleştirici kaynak olarak kullanılır. Plastik sektöründe polimerizasyon aşamasında başlatıcı, katalizör ve çapraz reaksiyon oluşturucu ajan, kimyasal beyazlatıcı ajan, kurutucu ve temizleyici olarak yaygın kullanıma sahiptir. Organik peroksitler; peroksidikarbonatlar, peroksiketaller, peroksiesterler, keton peroksitler, hidroperoksitler, dialkil peroksitler, diacil peroksitler olarak sınıflandırılır.

Demir ve bakır iyonları, lipit hidroperoksitler, tersiyer bütül hidroperoksit ve kümen hidroperoksit gibi yapay lipit peroksitler hiçbir enzimatik aktiviteye gerek duymadan peroksidasyon reaksiyonlarını başlatabilmektedirler (Vander-Zee 1985; Kanupriya-Prasad ve ark. 2007; Rosa ve ark. 2008).

2.16. Bağ Dokusu

Canlıda en bol bulunan doku tipidir. Bağ dokusu organizmadaki çeşitli doku ve organları birbirine bağlayan, şekil ve direnç kazandıran, doku onarımında, vücudun savunmasında ve epitel gibi kan damarı içermeyen dokuların beslenmesinde görev alan mezoderm kökenli bir dokudur. Hücreler, hücreler arası madde ve liflerden meydana gelir. Hücreler arası madde ve lifler, ekstrasellüler matriksi (ECM) oluşturmaktadır. Bol miktarda kan damarı ve sinirler içerir. Hücreler arası madde, renksiz, akışkan olmayan jel halinde olup, proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar içerir ve difüzyona elverişlidir. Yapısında fibroblastlar, fagositoz yapan makrofajlar, antikor üreten plazma hücreleri, lipositler, heparin ve histamin salgılayan mast hücreleri ve melanositler bulunur. Bağ dokusunun esas hücreleri fibroblastlardır.

2.16.1. Fibroblast

Fibroblastlar bağ dokusunun sayıca fazla olan ana hücreleridir. Fibroblastlar iğ şeklinde, yassı ve uzun hücrelerdir, ekstrasellüler matriks (ECM) molekülleri ile birlikte vücudun organ ve dokularının büyük kısmında bulunurlar. Gövde kısmında düzensiz dallanmalar yapan sitoplazmik uzantıları, ökromatik fakat nispeten yoğun kromatinli ve oval şekilli çekirdeği, protein sentezi yapan hücrelere özgü gelişmiş granüllü endoplazmik retikulumu ve geniş golgi kompleksi ile bazofilik sitoplazması bu hücrelerin tipik özellikleridir.

Fibroblastların önemli fonksiyonlarından biri, doku ve organlardaki ECM'in sentezi ve hemostatik dengesidir. Fibroblastlar kollojen, proteoglikan, fibronektin, tenaskin, laminin ve fibronektin gibi ECM bileşenlerinin çoğunu sentezleyen ve salgılayan metabolik olarak oldukça aktif hücrelerdir. Bağ dokusunda fibroblastlar tarafından sürekli sentezlenen üç tip lif vardır. Bunlar kollojen proteininden meydana gelen, oldukça dayanıklı ve sağlam, uzun, düz ve beyaz renkli kollojen lifler, elastin adlı proteinden meydana gelen ince, elastik ve sarı renkli elastik lifler ve ağsı yapı oluşturan retiküler liflerdir. Fibroblast hücrelerinin her biri günde yaklaşık 3,5 milyon prokollojen sentezlerler (McAnulty ve ark. 1991).

Fibroblastlar, hücreler arası sıvı hacmi ve basıncında, ekstrasellüler matriksin (ECM) düzenlenmesinde ve yara iyileşmesinde kritik rol oynayan metabolik olarak aktif hücrelerdir. Fibroblastlar aktif oldukları zaman hem kollojen, proteoglikan ve fibronektinler gibi ECM moleküllerinin salınımı ve sentezini sağlayan çok sayıda golgi, endoplazmik retikulum organellerini hem de ECM'in parçalanmasını sağlayan proteazları içerirler. Hücre yüzey integrinleri ile birlikte sitoiskelet proteinleri ve ECM, doku hemostazında ve yara iyileşmesinde önemli olan kasılma kuvvetlerinin oluşumunu sağlar ve hücre hareketini kolaylaştırır (McAnulty 2006).

Fibroblastların aktif olmayan yani lif ve ara madde sentezlemeyen inaktif şekillerine ise fibrosit denmektedir. Fibrositler de uzantılı fakat fibroblastta göre çok az sitoplazmalı hücrelerdir. Bu nedenle mikroskopta sadece çekirdekten ibaretmiş gibi görülürler. Her iki hücrenin de şekli fuziform olup birbirlerine dönüşebilirler.

Mitotik yetenekleri sınırlı olmakla beraber, doku yaralanmalarında fibroblastta gereksinim arttığından bölünerek çoğalabilirler. Böylece doku kaybının tamiri, ara madde ve lif senteziyle sağlanır. Aynı şekilde normalde fagositoz yeteneği olmamakla beraber, sürekli uyarılar sonucu gerektiğinde fagositoz yapabilmektedirler. Fibroblastlar

ihtiyaç halinde osteositler gibi diğer hücreler haline dönüşebilirler. Son yıllarda gerektiğinde intrastoplazmik kontraktıl elemanlar ve hücre membranında bağlantı kompleksleri kazanarak myofibroblast olarak adlandırılan hücrelere dönüştükleri gösterilmiştir (Abe ve ark. 2000; McAnulty 2006).

Deri'nin dermis tabakasında sıkı bağ dokunun düzensiz yapısı görülmektedir. Deri esneme ve genişleme özelliği olan bir doku olduğundan kollojen ve elastik fibriller bakımından zengindir. Fibriller değişik yönlerde sıralanmış halde bulunup, hasır örgüsü görünümündedirler.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda *in vitro* koşullarda hücre kültürü yöntemleri kullanılarak, *Wistar albino* sıçandan elde edilen primer fibroblast hücreleri ve 3T3 fibroblast hücre soyunda, *Rosa damascena* olarak adlandırılan Isparta gülünden elde edilen ekstraktın antioksidan ve antisitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen 3T3 fibroblast ve primer fibroblast kültürleri; luminol bağımlı kemilüminesans yöntemleri ve hücre kültürü yöntemleri İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Protein ve Moleküler Genetik Laboratuvarında; spektrofotometrik yöntemler İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Adli Tıp Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. *Rosa damascena* ekstraktının hazırlanması

Çalışmamızda kullandığımız güller, Isparta'da yetişmiştir ve güllerin çiçek açma mevsimi olan bahar aylarından mayıs ayında toplanarak, taze olarak distilasyonu yapılmıştır. Rodeiro ve arkadaşlarının (2007) yöntemine uygun olarak, taze olan gül çiçeklerinin yapraklarının 5 gramı, 100 ml. distile suda olacak şekilde 24 saat boyunca bekletildi. Sonra 4 saat süreyle (refluks ekstraksiyon cihazı) kaynayan heterojen karışımın buharını yoğunlaştırmaya yarayan cihazda kaynatıldı. Yoğunlaşan su buharı soğumaya bırakıldı ve ekstraktımız filtre kağıdı kullanılarak filtreden geçirildi. En son aşama olarak, elde edilen filtrelenmiş ekstraktımız liyofilizatör cihazında suyu uçurularak liyofilize edildi. Ekstraktımız kuru toz halinde kullanılmak üzere +4 °C'de stoklandı. Çalışmada kullanılmadan önce, ekstrakt 1 mg/ml olacak şekilde besiyeri ile sulandırılarak stok solüsyon hazırlandı ve 0,22 µm membran filtreden geçirildi.

3.2. Primer fibroblast kültürünün hazırlanması

3.2.1. Primer Fibroblast Hücresi ve NIH 3T3 Hücre Soyu İçin Besiyer Hazırlama

Fibroblast hücrelerinin *in vitro* ortamda, *in vivo* ortamda ki gibi çoğalma, büyüme ve farklılaşmalarını sağlamak amacıyla, uygun besiyeri ortamı hazırlandı. Bu amaçla; 100 ml Dulbecco Minimal Eagle's Medium F-12(HAM) (DMEM) besiyerine (Biochrom), % 10 olacak şekilde ısıyla inaktive edilmiş fetal sıgır serum (FCS), %1 olacak şekilde L-glutamin amino asiti, %1 olacak şekilde penisilin-streptomisin antibiyotiği eklendi (Rosa ve ark. 2008).

3.2.2. Sıçandan deri dokusunun hazırlanması

Çalışmamızda primer fibroblast kültüründe kullanılmak üzere deri dokusu elde etmek için, İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırmalar Enstitüsü Deneysel Hayvanları bölümünden temin edilen, 170 gr. ağırlığında, 7 haftalık, dişi *Wistar albino* türünde sıçan kullanıldı. Sıçan ketamin hidroklorid (50 mg/kg) kullanılarak uyuşturuldu. Sıçanın sırt bölgesindeki kıllar dikkatlice traş edildikten sonra bu alan %70 etanolle steril edildi. % 100 etonelle steril edilmiş ve ateşten geçirilmiş pens yardımıyla sıçan derisi kaldırıldı ve 12 numara bistüri kullanılarak deriden bir parça kesildi. Sonra sıçanımız 4/0 polipropilen suture ile suture edildi (Abe ve ark. 2000).

3.2.3. Primer Fibroblast Kültür

Sıçandan alınan deri parçası 35 mm plastik petri kabında, bistüri kullanılarak 2-3 mm çapında parçalara ayrıldı ve 25 cm²'lik flaska koyuldu. Sonra flaska, sadece tabanı kaplayacak kadar %10 fetal calf serum ile zenginleştirilmiş DMEM eklendi. Hücrelerimiz 37 °C'de %95 nem, %5 CO₂ içeren inkübatörde, flask kapağı gevşek olacak şekilde kültüre edildi ve 1 hafta boyunca besiyeri tazelenmedi. Bu süre sonunda flasttaki besiyeri uzaklaştırıldı, 4 ml besiyeri eklendi ve bu aşamadan sonra besiyeri iki gün ara ile tazelendi. Deri parçacıkları öncelikle tabana tutundu ve 15 – 21 gün sonra fibroblast hücreleri yayılmaya başladı. Hücre yoğunluğu invert (ters) mikroskopta takip edildi ve yaklaşık %95 yoğunluğa ulaştığı zaman %25'lik tripsin/EDTA solüsyonu (Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen) kullanılarak pasajı yapıldı. İlk pasajda flask tabanındaki deri doku parçacıkları ve tutunamayan hücreler uzaklaştırıldı ve tutunan fibroblast hücreleri kullanılmak amacıyla çoğaltılmaya devam edildi (Abe ve ark. 2000).

3.3. NIH 3T3 fibroblast hücre soyunun uzun süreli kültürü

Çalışmamızda kullandığımız 3T3 fibroblast hücre soyu İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.B.D. öğretim üyesi Prof. Dr. Ayhan Bilir'den temin edildi. Laboratuvarımıza kısa süre içinde, ağzı sıkıca kapalı flasklar içerisinde getirilen 3T3 NIH fibroblast hücrelerinin besiyeri, hemen taze besiyeri ile değiştirildi ve flaskların ağzı hafifce gevşetilerek nemli ve %5 CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatöre kaldırıldı. Belirli aralıklarda flasklar invert mikroskopta incelendi ve hücre yoğunluğu %90'a ulaştığı zaman hücrelerden pasaj alındı.

3.4. Primer fibroblast ve 3T3 fibroblast hücrelerinin pasajı

PBS Solüsyonu

- 8,1 gr. NaCl
- 0,2 gr. KCl
- 1,15 gr. Na₂HPO₄
- 0,2 gr. KH₂PO₄

hassas terazide tartılarak 100 ml distile suda çözüldü. pH 7.2 ye (bazik çıkınca HCl ile, asidik çıkınca NaOH ile) ayarlandı. Enjektör kullanılarak çekilen PBS solüsyonu, enjektörün ucuna takılan 0,22 µM gözenekleri olan filtreden geçirilerek steril edildi. +4 °C' de muhafaza edildi.

Tripsin/EDTA solüsyonu (Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen)

100 ml PBS içerisine 0,25 gr tripsin ve 0,2 gr EDTA eklenerek hazırlanan %25 lik tripsin/EDTA solüsyonu kullanıldı. pH 7.2 olacak şekilde (bazik çıkınca HCL ile, asidik çıkınca NaOH ile) ayarlandı. Enjektör kullanılarak çekilen tripsin/EDTA solüsyonu, enjektörün ucuna takılan 0,22 µM gözenekleri olan filtreden geçirilerek steril edildi ve -20 °C' de muhafaza edildi.

Hücre pasajı çalışmasının her aşaması, laminar akım kabini içinde yapıldı. Flaska pasaj yapmak için, yeterli hücre yoğunluğuna sahip mi invert mikroskopta bakıldıktan sonra flask içindeki eski besiyeri uzaklaştırıldı. Flask yüzeyine tutunma özelliğine sahip, fibroblast hücrelerini yıkamak ve tripsin etkisini yok eden kalan besiyeri serumunu uzaklaştırmak amacıyla 25 cm² lik flask için 3 ml, 75 cm² lik flask için 6 ml PBS solüsyonu flaska koyuldu ve uzaklaştırıldı. Sonra aynı miktarlarda % 25'lik tripsin/EDTA solüsyonu koyuldu ve 37 °C inkübatörde ara sıra hafifçe sallayarak 10 dakika bekletildi. Hücrelerin birbirlerinden ve tutunma yüzeyinden ayrıldığı invert mikroskopta kontrol edildi. Hücreler yüzeyden kaldırıldıktan sonra, flaska aynı miktarlarda tripsinin etkisini yok etmek amacıyla, taze serumlu besiyer eklendi. Flasktaki hücreler ve medyum steril dereceli pipet ile toplanarak, 14 ml'lik ucu konik steril falkon tüpüne alındı. 200 xg'de 5 dakika döndürülerek çökmeleri sağlandı ve üstsıvı atıldı. Tripsini iyice uzaklaştırmak için 5 ml besiyer eklenip, pipetaj yapılarak santrifüj işlemi 3 defa tekrarlandı. Santrifüj işlemi sonunda, santrifüj tüpüne 1 ml besiyeri eklendi ve hücre süspansiyonu elde edildi. Bu hücre süspansiyonundan, hücre

sayısı ve canlılık oranını tespit etmek için 10 µl ayrıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu, hücre sayısına göre her bir yeni pasajda yaklaşık $1-2 \times 10^5$ hücre olacak şekilde yeni flasklara bölündü. 25 cm² flask için 5 ml, 75 cm² flask için 15 ml taze besiyer eklendi. Flask kapağı inkübatör havasının gireceği şekilde aralık bırakılarak, nemli, %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatörde kültüre edildi. Yeni ekimden sonraki her 48. saatte, hücrelerin besiyer içindeki durum ve sayıları invert mikroskop ile kontrol edilerek besiyerleri değiştirildi. 48. saatte yeni pasajlar alınarak hücre koleksiyonu sağlandı.

3.5. İnkübasyon Şartları

3.5.1. Bütillenmiş hidroperoksit uygulanmış 48 saatlik kültür çalışması

3T3 fibroblast hücre soyu ve primer fibroblast hücrelerinde oksidatif stres oluşturan *t*-BOOH dozunu belirlemek amacıyla çeşitli konsantrasyonlarda (150-5000 µM) *t*-BOOH kültüre eklendi, 48 saat inkübe edildi ve hücre sitotoksitesisi üzerine yaptığı etki, tripan mavisi hücre canlılık testiyle değerlendirildi. Doz - ölüm oranı eğrileri kullanılarak *t*-BOOH'in 3T3 ve primer fibroblast hücreleri için ölümcül doz 50 (LD₅₀) değerleri hesaplandı. Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında, kontrol grubu hariç, bütün gruplarımıza DMEM ile seyreltilen, LD₅₀ *t*-BOOH eklendi ve sadece LD₅₀ *t*-BOOH içeren kuyucuk, negatif kontrol olarak kullanıldı.

3.5.2. *Rosa damascena* uygulanmış 48 saatlik kültür çalışması

Yeterli hücre yoğunluğuna ulaşmış olan flasklardan, hücre pasajı yöntemi ile hücreler elde edildikten sonra, 1 ml taze besiyer ile hücreler süspanse edildi. Tripan mavi boyası kullanılarak hücre canlılığı kontrol edildi. 12 kuyucuklu flasklara 1 ml'sinde 8×10^5 hücre olacak şekilde ekimler yapıldı. Her deneyde, sadece besiyeri ve hücre bulunan kuyucuk kontrol grubu olarak kullanıldı, sadece LD₅₀ *t*-BOOH içeren kuyucuk ise negatif kontrol olarak kullanıldı. Ayrıca hücrelerimiz 2 saat ve 24 saat önce *Rosa damascena* ekstraktının 2.5, 5, 10, 20, 40 ve 100 µg/ml konsantrasyonları ile ön inkübasyon yapıldı ve sonra oksidatif stres oluşturan LD₅₀ *t*-BOOH verilerek 48 saat daha inkübasyon yapıldı. Çalışmamızda antioksidan özelliği daha önceki çalışmalarla kanıtlanmış N-asetil sistein DMEM besiyeri ile çözülerek, 50 µg/ml dozu pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her deney için *Rosa damascena* ekstrakt solüsyonu, N-asetil sistein

solüsyonu ve *t*-BOOH solüsyonu taze olarak hazırlandı ve 0,22 µm membran filtre kullanılarak steril edildi.

Hücre inkübasyonunun 48. saati sonunda, her kuyucuğa hücre pasajı yöntemleri uygulanarak elde edilen hücreler 1 ml besiyeri ile resüspanse edildi ve 1,5 ml'lik ependorf tüplere alındı. Hücre canlılık oranı için, tripan mavisıyla boyama yöntemi kullanılarak sayıldıktan sonra bu kültür örnekleri, luminol bağımlı kemilüminesans yöntemi, luminometrik olarak ölçülen ATP düzeyleri, spektrofotometrik olarak ölçülen DCFH-DA oksidasyon ve mitokondri membran potansiyel yöntemleri için kullanıldı.

3.6. Hücre Canlılığının (Viabilite) Değerlendirilmesi:

48 saatlik kültür öncesi ve kültür sonrası hücre canlılığı, Tripan mavisini boyası canlılık testi ile değerlendirildi. Kültür sonrasında, oksidatif stres oluşturulmuş hücrelere uygulanan, değişik konsantrasyonlardaki *Rosa damascena* ekstrakt solüsyonunun hücre canlılığı üzerine etkisine bakıldı.

3.6.1. Tripan mavisini boyası canlılık testi

Hem hücre sayısını hem de canlı ve ölü hücre oranını elde ettiğimiz bu yöntemde, 10 µl hücre süspansiyonu bulunan tüpe, 10 µl %4'lük tripan mavi boyası eklendi. Hafifçe pipetaj yapılarak ve 5 dakika bekletilerek, boyanın hücre süspansiyonu ile karışması sağlandı. Hemositometri yöntemiyle, thoma lamında hücreler sayıldı (Goslin ve ark. 1998).

Hemositometri ile hücre sayımı ve % hücre canlılığı

Hemasitometrinin her iki tarafına aldığı kadar ve eşit miktarda örnek koyuldu. Canlılık için boyayı alan ve almayan hücre sayıları tespit edildi. Canlı hücrelerin membran bütünlükleri ve geçirgenlikleri bozulmadığı için, boyayı içine almaz ve renksiz, parlak olarak görünürler. Ölü hücrelerin membran bütünlüğü bozulduğu için boyayı içine alır ve mavi renkli görünürler. Toplam hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Toplam hücre sayısı} = \text{Hücre Sayısı} \times 10^4/\text{ml} \times \text{Sulandırma Katsayısı} (2)$$

Çalışmamızda her deneyde kontrol grubunun canlı hücre sayısı ile negatif kontrol, pozitif kontrol ve *Rosa damascena* ekstraktının değişik konsantrasyonları uygulanmış bütün grupların canlı hücre sayısı kıyaslanarak hücre canlılığı % olarak hesaplandı.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{Kuyucuktaki toplam canlı hücre sayısı} \times 100}{\text{Kontrol grubunun toplam hücre sayısı}}$$

3.7. ATP Düzeylerinin Belirlenmesi Yöntemi (Bioluminesans):

Kullanılan çözeltiler:

Lusiferaz

ATP

Tris-EDTA (100 mM. Tris / 4 mM EDTA distile suda hazırlandı, pH:7,8)

ATP ölçümü üretici firmanın tavsiye ettiği yonteme uygun olarak bioluminesans deney kiti CLS II (ATP Bioluminescence Assay Kit CLC II) (Roche) ile yapıldı.

Çalışmamızda bulunan bütün gruplara ait fibroblastlarda ATP ölçümü, üretici firmanın tavsiye ettiği yonteme uygun olarak yapıldı. 1 ml.'sinde 10^5 - 10^7 fibroblast hücresi içeren, bütün hücre süspansiyonu gruplarından, 50 µl hacim alındı. Bir hacim fibroblast süspansiyonuna 9 hacim kaynamış tris-EDTA solüsyonu eklenerek +100°C'de 2 dk bekletildi. Örnekler 1000 xg.'de 60 sn santrifüj edildi, süpernatant alındı ve buz içinde kısa süre bekletildi. Örneklerden tüplere 50 µl aktarıldı, sonrasında üzerine 50 µl lusiferaz eklenerek 1-10 sn içerisinde kemilüminesans ölçümü yapıldı. Blank(kör) ölçümü ise ATP veya hücre yokluğunda yapıldı. ATP standartının belirlenmesi maksadı ile 1 pM'den 1 mM'a kadar artan ATP konsantrasyonları kullanıldı. ATP miktarları çizilen eğriden hesaplandı ve sonuçlar nmol/mg protein olarak hesaplandı.

3.8. Mitokondri Membran Potansiyeli Ölçümü

NKC tamponu:

- 34,2 mM NaCl,
- 1,07 mM KCl,
- 1,08 mM CaCl₂

Çalışmamızda her deney için 250 µl hücre süspansiyonu kullanıldı. Hücreler 750µl NKC tamponunda süspense edildi. Membran potansiyeli ölçümü için konsantrasyonu 2,6 mM olan, DMSO içerisinde çözünmüş rhodamin123'den 10µl kullanıldı. 37°C'de 20 dakika inkübasyon sonrasında, 1000 xg.'de 6 dk santrifüj edildi. Üst sıvı atılarak hücre pelleti üzerine, hücreleri yıkamak amacıyla 1500 µl NKC eklendi ve yeniden santifüj edildi. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. Pellete 1ml distile su ile hazırlanan %2'lik triton-X 100 eklendi ve vortekslendi. 37°C'de 10 dakika inkübasyon sonrasında, 520 nm. eksitasyon ve 590 nm. emisyon dalga boyları, bant aralıkları 5 nm. kullanılmak suretiyle fluoressans tayinleri yapılarak membran potansiyeli hesaplandı (Fujihara ve ark. 2007). Veriler Rhd123/hoecht 33258 fluoressans oranları alınmak suretiyle, hücrelerdeki DNA miktarına göre düzeltildi.

3.9. Luminol bağımlı kemilüminesans şiddet tespiti

Hücre kültürü sonrası örnekler, 1/5 oranında PBS ile seyreltilerek polipropilen tüpler içerisine alındı. Son konsantrasyonu 0,1 mM olacak şekilde örnekler DMSO içerisinde çözünmüş luminol eklendi. 37 °C'deki su banyosunda 5 dakika bekletildi. Lüminometrenin kuyucuklarına konulan örneklerde, 10 sn sonunda, lüminesans şiddetlerinin ölçümü yapıldı ve kaydedildi (Faulkner ve Fridovich 1993). Veriler kontrol grubu örneklerine göre normalize edilip, 10⁶ hücre başına düşen nisbi ışık birimi (RLU) cinsinden verildi.

3.10. 2',7'-DCFH-DA ile Hücre İçi Oksidatif Stresin Spektrofluometrik Analizi

Çeşitli radikaller tarafından oksitlenen 2',7'-diklorohidrofluoreskindiasetat (DCFH-DA) hücre örneklerimizde oluşan ROT üretimini ölçmek için kullanıldı. DCFH-DA esterazlar tarafından deasetillenerek fluoresans özelliği olmayan diklorofluoreskin (2',7'-DCFH) ürünü haline dönüşür. DCFH ortamdaki reaktif türler tarafından, güçlü fluoresans ışımaya veren DCF (diklorofluoreskein)'e dönüşen bir probdur. İnkübe edilmiş her deney grubundan 250 µl hücre süspansiyonu, 750 µl PBS ile santrifüj edildi. Hücreler iki kez 1 ml PBS ile yıkandı. Hücre solüsyonuna, son konsantrasyonu 20 µM olacak şekilde, DMSO içerisinde çözülen (2 mM'lık stoktan 10 µl) DCFH-DA eklendi, 37 °C su banyosunda 30 dakika inkübe edildi ve ortaya çıkan fluoresans şiddeti spektrofotometrik olarak tespit edildi (Eksitasyon: 480 nm, Emisyon: 530 nm dalga boylarında, Bant: 5 nm aralığında) (Ohashi ve ark. 2002). Veriler DCFH/hoechst 33258 fluoresans oranları alınmak suretiyle, hücrelerdeki DNA miktarına göre düzeltildi.

3.11. Örneklerdeki DNA miktarının spektrofotometrik olarak ölçümü

Hücre liziz çözeltisi;

- 1mM Tris-EDTA
- 200 mM NaCl
- pH 7,4

Örneklerin DNA içerikleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. 1 ml %2'lik triton X100 ile vortekslenen hücre süspansiyonlarına 10 µg/ml hoechst 33258 içeren hücre liziz çözeltisinden 200 µl eklendi ve 45 dk 37°C su banyosunda bekletildi. Örneklerin fluoresans şiddetleri 365 nm eksitasyon ve 460 nm emisyon dalga boyunda bant aralıkları 5 nm olacak şekilde spektrofotometride ölçüldü (Kobayashi ve ark. 2009).

3.12. İstatistiksel Analiz

Deney sonuçlarının istatistiksel analizleri için SPSS 17.0 ve GraphPad Prism 5 programı kullanıldı. Gruplar arasındaki istatistiki karşılaştırmalar One-way ANOVA testi ile değerlendirildi. P değerleri 0,05'ten küçük olan karşılaştırmalar için Post- Hoc Tukey testi ile yapıldı. Veriler ortalama değer ± standart sapma olarak açıklandı.

ÇALIŞMADA KULLANILAN ARAÇLAR

Tablo 3.1: Çalışmada Kullanılan Araçlar

Buzdolabı (Arçelik)
İnkübatör (Heraeus HeraCell 240)
35 mm'lik petri kap
Flask (25 cm ² , 75 cm ²)
12 kuyucuklu petri kap
Falkon tüp (50 ml.)
Santrifüj tüpü (14 ml.)
Steril dereceli pipet ucu
Laminar air flow steril kabin (Base Air steril hava kabini)
Otomatik pipet (Gilson)
Kriyotüp
Hemositometre lamı (Neubauer)
Bistüri (12 numara)
Enjektör (10ml- 20 ml) (Roche)
Filtre (0,22 mikrometre)
Soğutmalı Santrifüj (Hettich)
Sonikatör (Sonoreks)
Spektrofluorometre (Shimadzu RF 5000)
Manyetik Karıştırıcı (Janke-Kunkel)
Mini Santrifüj (Hettich)
Hassas Terazı (Chyo tip JL 180)
Vorteks (Jake&Kunkel IKA labor tecnic VF2)
Derin Dondurucu (-20 °C) (Bosch)
Derin Dondurucu (-80 °C) (Heraeus Sepatech)
pH Metre (Microprocessor pH meter pH537WTW tip 50)
Otoklav (Hirayama)
Ultra Saf Su Cihazı (Millipore)
Pipet seti (0,1-1000 mikro litre) (Lab Mate)
Steril pipet ucu (beyaz-sarı-mavi)
Işık mikroskobu (Olympus)

Luminometri (Labsystems)
 Liyafilizatör (Labconco FreeZone 1)
 Sıvı azot tankı (Caryo Diffusion)
 Benmary su banyosu (Kotterman laborotecnic tip 3047)
 Etüv (37°C) (Memmert)

ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Tablo 3.2: Kimyasal Maddeler

t-BOOH (*tert*-butil hidroperoksit) (Merck)
 DMEM/F-12 Ham's (Dulbecco'nun Modifiye edilmiş Eagle Medyumu) (Biochrom)
 DMSO (Dimetilsülfoksit) (Sigma-Aldrich)
 Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich)
 Luminol (Sigma-Aldrich)
 NaCl (Sodyum klorür) (Merck)
 NA₂HPO₄ (Merck)
 NaH₂PO₄ (Merck)
 KCl (Potasyum klorür) (Merck)
 CaCl₂ (Kalsiyum klorür) (Merck)
 N-Asetil Sistein (Sigma-Aldrich)
 Triton X-100 (Merck)
 EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) (Sigma-Aldrich)
 L-glutamin (Biochrom)
 FCS (İnaktif Fetal Calf Serum) (Biochrom)
 Penisilin/Streptomisin (Biochrom)
 DCFH-DA (2', 7'-dichlorohidrofluorescindiasetat) (Sigma-Aldrich)
 Rhd-123 (Rhodamin-123) (Sigma-Aldrich)
 Tripan Mavisi Boyası %4 (Biochrom)
 İzopropil alkol (Merck)
 Luciferaz (Sigma-Aldrich)
 Tripsin/EDTA (Ca⁺², Mg⁺² içermeyen PBS'de %0,25/%0,20) (Biochrom)

4. BULGULAR

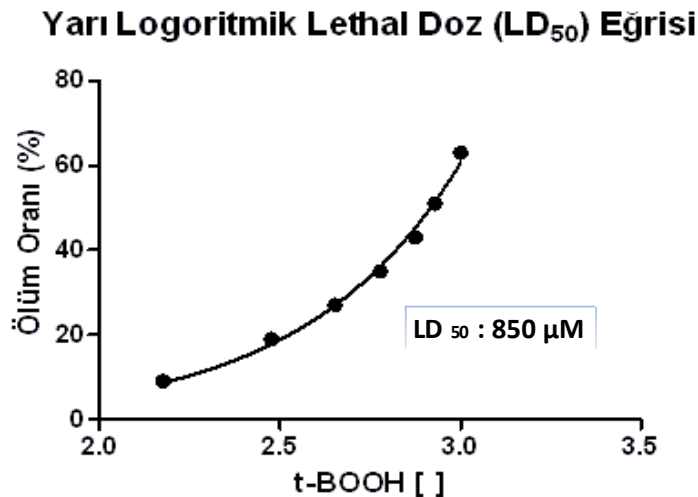
4.1. *tert*-Butil Hidroperoksinin Hücre Sitotoksitesi Üzerine Etkisi

Çalışmamızda 3T3 fibroblast hücre soyu ve sıçandan elde edilen primer fibroblast hücreleri kullanıldı. *t*-BOOH'in ROT oluşumunu tetiklediği ve oksidatif stres meydana getirdiği bilinmektedir. Letal doz, hücrelerin % 50'sinin ölümünü sağlayan stres ajanının dozudur. Hücrelerde oksidatif stres oluşturmak amacıyla kullandığımız *t*-BOOH'in hücre sitotoksitesi üzerine olası etkileri için tripan mavisi hücre canlılığı testi uygulandı ve doz-ölüm oranı grafiklerinden letal doz 50 (LD₅₀) tespit edildi.

4.1.1. *t*-BOOH İle Öldürücü Doz 50'nin (LD₅₀) Elde Edilmesi

4.1.1.1. NIH-3T3 Fibroblast Hücre Soyunda *t*-BOOH ile LD₅₀'nin Hesaplanması

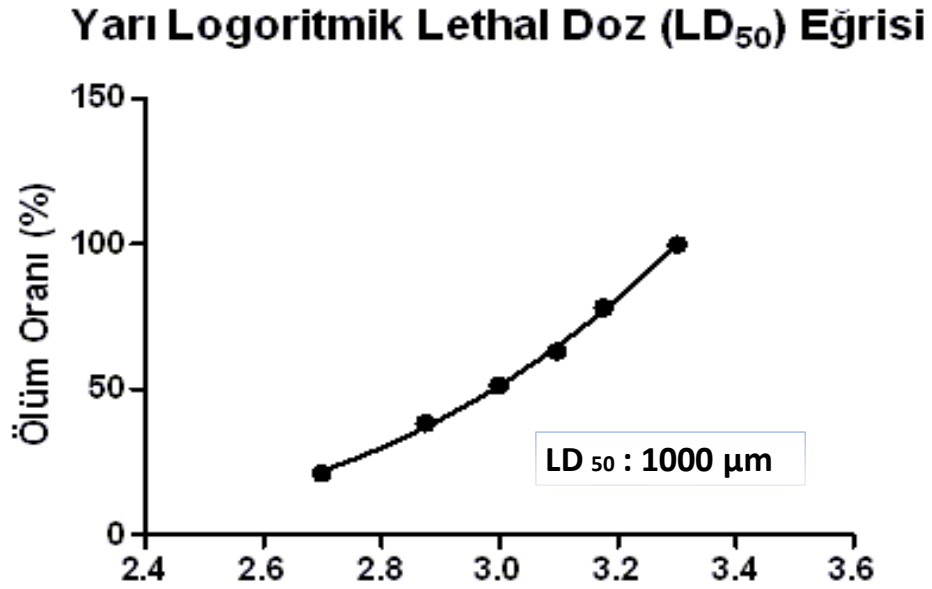
3T3 fibroblast hücre kültürüne 48 saat süreyle uyguladığımız *t*-BOOH'in çeşitli konsantrasyonlarının (150, 300, 450, 600, 750, 850, 1000, 1250, 1500 ve 2000 µM), hücre sitotoksitesi üzerine yaptığı etki, tripan mavisi hücre canlılık testiyle değerlendirildi. İncelenen doz aralıklarında, *t*-BOOH'in 1500 µM üstündeki konsantrasyonlarda hücre canlılığının olmadığı görülmektedir. Yarı logoritmik letal doz eğrilerinden *t*-BOOH'in 3T3 fibroblast hücreleri için ölümcül doz 50(LD₅₀) değeri, 850µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: *t*-BOOH'in 48 saatlik inkübasyonu sonucu 3T3 fibroblast hücrelerinde doza bağlı hücre ölümü grafiği ve LD₅₀ dozu. Sonuçlar birbirinden bağımsız 5 farklı çalışmadan elde edilmiş, ortalama ±SD olarak sunulmuştur.

4.1.1.2. Primer Fibroblast Hücrelerinde *t*-BOOH ile LD₅₀'nin Hesaplanması

Primer fibroblast hücre kültürüne 48 saat süreyle uyguladığımız *t*-BOOH'in çeşitli konsantrasyonlarının (500, 750, 1000, 1250, 1500 ve 2000 μ M), hücre sitotoksitesisi üzerine yaptığı etki, tripan mavisi hücre canlılık testiyle değerlendirildi. İncelenen doz aralıklarında, *t*-BOOH'in 2000 μ M üstündeki konsantrasyonlarında hücre canlılığının olmadığı görülmektedir. Yarı logoritmik lethal doz eğrilerinden *t*-BOOH'in primer fibroblast hücreleri için ölümcül doz 50 (LD₅₀) değeri, 1000 μ M olarak hesaplanmıştır (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: *t*-BOOH'in 48 saatlik inkübasyonu sonucu primer fibroblast hücrelerinde doza bağımlı hücre ölümü grafiği ve LD₅₀ dozu. Sonuçlar birbirinden bağımsız 5 farklı çalışmadan elde edilmiş, ortalama \pm SD olarak sunulmuştur.

4.2. NIH 3T3 ve Primer Fibroblast Hücrelerinde *t*-BOOH ile Oluşturulmuş Oksidatif Strese Karşı *Rosa damascena* Ekstraktının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

3T3 ve primer fibroblast hücrelerinin, 2 saat ve 24 saat *Rosa damascena* ekstraktları ile ön inkübasyonu ve ardından oksidatif stres oluşturan LD₅₀ *t*-BOOH ile 48 saat inkübasyonunun, hücre canlılığı üzerine olan koruyucu etkisi tripan mavisi canlılık testi ile değerlendirildi. Oksidatif strese karşı, *Rosa damascena* ekstraktı çeşitli konsantrasyonlarının (2.5, 5, 10, 20, 40, 100 µg/ml) 2 saat ve 24 saat ön inkübasyonu ve sonrasında 48 saat *t*-BOOH inkübasyonu sonucu oluşan hücre canlılığı ve sadece *t*-BOOH ile inkübe edilen negatif kontrol grubu hücrelerinin canlılık seviyeleri, sadece hücre içeren kontrol hücre grubunun hücre canlılığına oranlanarak hesaplandı ve canlılık oranları % olarak değerlendirildi. *Rosa damascena* ekstrakt konsantrasyonlarının hücre ölümünü inhibe etme oranı, sadece *t*-BOOH ile inkübe edilen negatif kontrol hücre grubunun inhibe etme oranıyla kıyaslanarak hesaplandı. Hücre canlılık istatistik hesaplamalarında One-way ANOVA testi kullanıldı ve gruplar arasında ikili karşılaştırmalar Post-hoc Tukey testi ile yapıldı.

4.2.1. NIH 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Hücre Canlılığı ve Hücre Ölüm İnhibisyonu

4.2.1.1. 2 Saat *Rosa damascena* Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra *t*-BOOH Uygulanan 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Hücre Ölüm İnhibisyonu

Tablo 4.1'de görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2.5, 5, 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 2 saat ön inkübasyonu sonucu % hücre ölümünü, negatif kontrol hücre grubunun % hücre ölümüne göre sırasıyla %14, %20, %35 ve %9 oranlarında inhibe ettiği, 40 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının inhibe edici özelliğinin bulunmadığı gözlemlenmiştir.

Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan N-asetil sisteinin 50 µg/ml konsantrasyonunun, *t*-BOOH verilmeden 2 saat ön inkübasyonu sonucu hücre ölümünü, negatif kontrol grubunun hücre ölümüne göre %23 oranında inhibe ettiği gözlemlenmiştir.

4.2.1.2. 24 Saat *Rosa damascena* Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra *t*-BOOH Uygulanan 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Hücre Canlılığı ve Hücre Ölüm İnhibisyonu

Tablo 4.1’de görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 5, 10, 20 ve 40 µg/ml konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 24 saat ön inkübasyonu sonucu % hücre ölümünü, negatif kontrol grubunun % hücre ölümüne göre sırasıyla %23, %51, %30 ve %20 oranlarında inhibe ettiği, 2,5 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının inhibe edici özelliğinin bulunmadığı gözlemlenmiştir.

Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan N-asetil sisteinin 50 µg/ml konsantrasyonunun, *t*-BOOH uygulanmadan 24 saat ön inkübasyonu sonucu hücre ölümünü, negatif kontrol grubunun hücre ölümüne göre %29 oranında inhibe ettiği gözlemlenmiştir.

Tablo 4-1: 3T3 fibroblast hücrelerinde *t*-BOOH toksitesine karşı *Rosa damascena* ekstraktının doza bağımlı etkisi

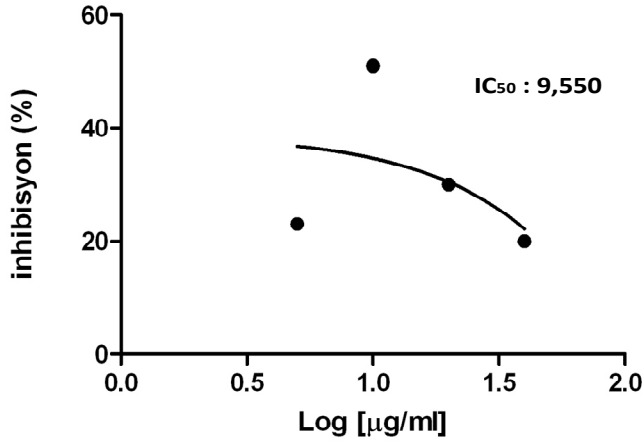
3T3 fibroblast hücresi	Konsantrasyon	2 saat önce <i>Rosa damascena</i> ekstrakt inkübasyonu		24 saat önce <i>Rosa damascena</i> ekstrakt inkübasyonu	
		^(a) Canlılık (%)	^(b) İnhibisyon (%)	^(a) Canlılık (%)	^(b) İnhibisyon (%)
<i>t</i> -BOOH	1 mM	49±7		49±7	
	2,5 µg/ml	57±5	14	43±5	0
<i>Rosa damascena</i>	5 µg/ml	61±6	20	64±6	23
	10 µg/ml	76±6	35	101±13	51
+	20 µg/ml	54±6	9	70±5	30
<i>t</i> -BOOH	40 µg/ml	40±5	0	61±5	20
	100 µg/ml	32±5	0	29±2	0
NAS + <i>t</i> -BOOH	50 µg/ml	64±7	23	69±9	29

Veriler *Rosa damascena* ekstraktının *t*-BOOH verilmeden 2 saat ve 24 saat ön inkübasyonunun sonuçları olup, ^(a)kontrol hücre grubuna göre % canlılık oranları ve ^(b)hücre ölümünün % inhibisyon değerleridir. Sonuçlar birbirinden bağımsız 5 farklı çalışmadan elde edilmiş olup, değerler ortalama ± SD olarak sunulmuştur.

4.2.1.3. NIH 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Hücre Ölümünü İnhibe Edici Doz (IC₅₀)

Rosa damascena ekstraktının, *t*-BOOH'in indüklediği hücre ölümünü inhibe edici oranları kullanılarak yarı logoritmik inhibisyon konsantrasyon eğrileri çizildi. Ortamdaki ölen hücrelerin yarısını inhibe eden ekstrakt konsantrasyonu olarak IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. 5-40 µg/ml arasındaki konsantrasyonlar dikkate alınarak hesaplanan inhibe edici konsantrasyon (IC₅₀), 24 saat *Rosa damascena* ekstraktı uygulanan, sonra oksidatif hasar meydana getiren *t*-BOOH'la inkübe edilen 3T3 fibroblast hücreleri için 9,55 µg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4-3).

Yarı Logoritmik İnhibisyon Konsantrasyon (IC) Eğrisi



Şekil 4-3: 3T3 fibroblast hücre kültürlerinde *t*-BOOH sitotoksitesine karşı *Rosa damascena* ekstraktının 24 saat önce verilmesinin hücre ölümü üzerine koruyucu etkileri (IC₅₀).

Sonuçlar birbirinden bağımsız 5 farklı tripan mavisi canlılık testi çalışmasından elde edilmiş olup, değerler ortalama ± SD olarak sunulmuştur.

4.2.2. Primer Fibroblast Hücrelerinde Hücre Canlılığı ve Hücre Ölüm İnhibisyonu

4.2.2.1. 2 Saat *Rosa damascena* Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra *t*-BOOH Uygulanan Primer Fibroblast Hücrelerinde Hücre Canlılığı Ve Hücre Ölüm İnhibisyonu

Tablo 4.2'de görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2,5 µg/ml konsantrasyonunun, *t*-BOOH uygulanmadan 2 saat ön inkübasyonu sonucu hücre ölümünü, negatif kontrol grubunun hücre ölümüne göre, sırasıyla %22 oranında inhibe ettiği, 5, 10, 20, 40 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının inhibe edici özelliğinin bulunmadığı gözlemlenmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan NAS'in 50 µg/ml konsantrasyonunun, *t*-BOOH uygulanmadan 2 saat ön inkübasyonu sonucu hücre

ölümünü, negatif kontrol grubunun hücre ölümüne göre %26 oranında inhibe ettiği gözlemlenmiştir.

4.2.2.2. 24 Saat *Rosa damascena* Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve sonra *t*-BOOH Uygulanan Primer Fibroblast Hücrelerinde Hücre Canlılığı Ve Hücre Ölüm İnhibisyonu

Tablo 4.2’de görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2.5, 5, 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 24 saat ön inkübasyonu sonucu hücre ölümünü, negatif kontrol grubunun hücre ölümüne göre sırasıyla %46, %57, %53 ve %21 oranlarında inhibe ettiği, 40 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının inhibe edici özelliğinin bulunmadığı gözlemlenmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan NAS’in 50 µg/ml konsantrasyonun, *t*-BOOH uygulanmadan 24 saat ön inkübasyonu sonucu hücre ölümünü, negatif kontrol grubunun hücre ölümüne göre %50 oranında inhibe ettiği gözlemlenmiştir.

Tablo 4-2: Primer fibroblast hücrelerinde *t*-BOOH toksitesine karşı *Rosa damascena* ekstraktının doza bağımlı etkisi

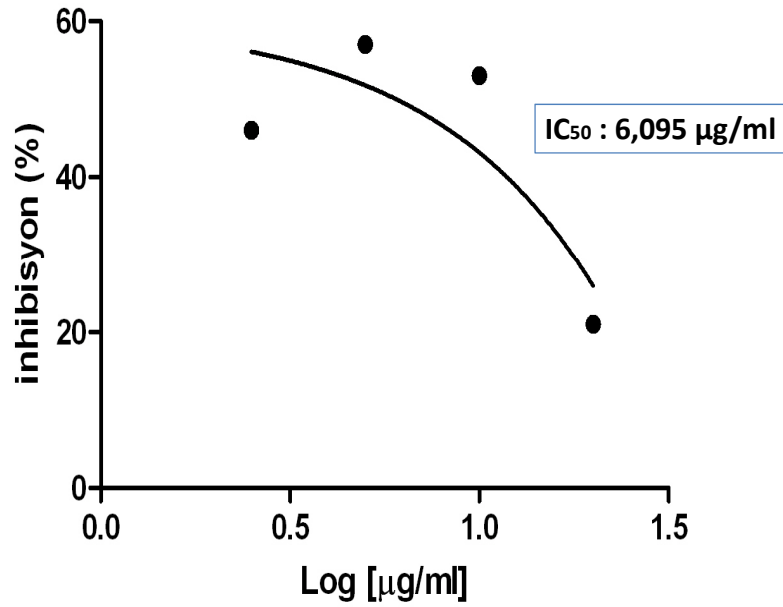
Primer fibroblast h.	Konsantrasyon	2 saat önce <i>Rosa damascena</i> ekstrakt inkübasyonu		24 saat önce <i>Rosa damascena</i> ekstrakt inkübasyonu	
		^(a) Canlılık(%)	^(b) İnhibisyon(%)	^(a) Canlılık(%)	^(b) İnhibisyon(%)
<i>t</i> -BOOH	1 mM	50±5		50±5	
	2,5 µg/ml	64±7	22	92±6	46
<i>Rosa damascena</i>	5 µg/ml	48±3	0	116±8	57
	10 µg/ml	47±5	0	107±8	53
+	20 µg/ml	44±4	0	63±4	21
<i>t</i> -BOOH	40 µg/ml	50±5	0	44±4	0
	100 µg/ml	23±2	0	43±4	0
NAS + <i>t</i> -BOOH	50 µg/ml	68±7	26	101±7	50

Veriler *Rosa damascena* ekstraktının *t*-BOOH verilmeden 2 saat ve 24 saat ön inkübasyonunun sonuçları olup, ^(a)kontrol hücre grubuna göre % canlılık oranları ve ^(b)hücre ölümünün inhibisyon değerleridir. Sonuçlar birbirinden bağımsız 5 farklı çalışmadan elde edilmiş olup, değerler ortalama ± SD olarak sunulmuştur.

4.2.2.3. Primer Fibroblast Hücrelerinde Hücre Ölümünü İnhibe Edici Doz (IC₅₀)

Rosa damascena ekstraktının, *t*-BOOH'in indüklediği hücre ölümünü inhibe edici oranları kullanılarak yarı logoritmik inhibisyon konsantrasyon eğrileri çizildi. Ortamdaki ölen hücrelerin yarısını inhibe eden ekstrakt konsantrasyonu olarak IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. 2,5-20 µg/ml arasındaki konsantrasyonlar dikkate alınarak hesaplanan inhibe edici konsantrasyon (IC₅₀), 24 saat önce *Rosa damascena* ekstraktı uygulanan, sonra oksidatif hasar meydana getiren *t*-BOOH'la inkübe edilen primer fibroblast hücreleri için 6,095 µg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4-4).

Yarı Logoritmik İnhibisyon Konsantrasyon (IC) Eğrisi



Şekil 4-4: Primer fibroblast hücre kültürlerinde *t*-BOOH sitotoksitesine karşı *Rosa damascena* ekstraktının 24 saat önce verilmesinin hücre ölümü üzerine koruyucu etkileri (IC₅₀). Sonuçlar birbirinden bağımsız 5 farklı tripan mavisi canlılık testi çalışmasından elde edilmiş olup, değerler ortalama ± SD olarak sunulmuştur.

4.3. NIH 3T3 ve Primer Fibroblast Hücre İçi ATP Düzeyleri

NIH 3T3 ve primer fibroblast hücrelerimizin 48 saat inkübasyon sonucundaki ATP düzeyleri kit kullanılmak suretiyle luminometrik olarak ölçüldü.

4.3.1. NIH 3T3 Fibroblast Hücre Kültürlerinde Hücre İçi ATP Seviyesi

4.3.1.1. 2 Saat *Rosa damascena* Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra *t*-BOOH Uygulanan 3T3 Fibroblast Hücrelerinde ATP Seviyesi

Şekil 4.5’de görüldüğü gibi 3T3 fibroblast hücrelerine *t*-BOOH verildikten 48 saat sonra ölçülen ATP seviyeleri kontrol hücrelere göre %54 azalmıştır. *Rosa damascena* ekstraktı çeşitli konsantrasyonlarının (2,5–100 µg/ml) 2 saat ön inkübasyonu ve sonra 48 saat *t*-BOOH inkübasyonu sonucu hücre içi ATP seviyeleri, sadece *t*-BOOH ile inkübe edilen negatif kontrol grubu hücrelerinin ATP seviyelerine göre ve ekstrakt ve kimyasal içermeyen kontrol hücre grubunun ATP seviyelerine göre değerlendirildi. İstatistik hesaplamalarında One-way ANOVA testi kullanıldı ve gruplar arasında ikili karşılaştırmalar Post-hoc Tukey testi ile yapıldı.

Kontrol hücre grubunun ATP seviyesine göre;

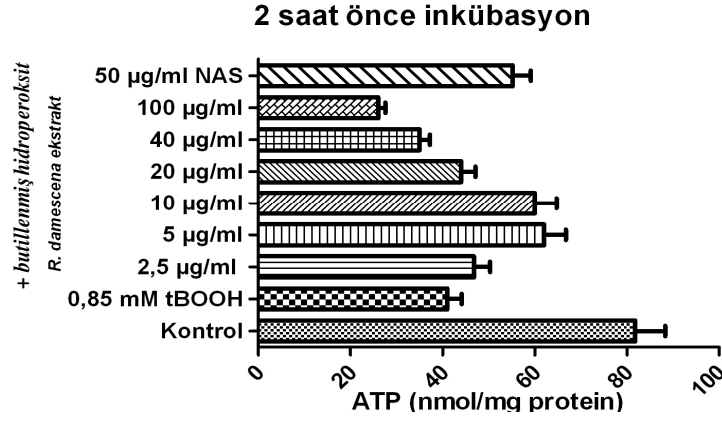
Şekil 4.5’de görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2.5-100 µg/ml konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 2 saat ön inkübasyonu ATP seviyeleri, kontrol hücrelerin ATP seviyesine göre düşüktür. Gruplar arasındaki hücre içi ATP seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

NAS’in 50 µg/ml konsantrasyonun, *t*-BOOH verilmeden 2 saat ön inkübasyonu ATP seviyesi %33 azalmıştır. Kontrol grubu ile arasındaki hücre içi ATP seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

Sadece *t*-BOOH ile inkübe edilen hücre grubunun ATP seviyelerine göre;

Şekil 4.5’de görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2.5, 5, 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 2 saat ön inkübasyonunun sonucu ATP seviyeleri artmıştır ancak 40 ve 100 µg/ml *Rosa damascena* ekstraktı verildiği zaman ATP seviyeleri azalmıştır. Gruplar arasındaki hücre içi ATP seviyesindeki farklılık 2.5, 20 ve 40 µg/ml konsantrasyonu hariç ($p > 0,05$) istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA). Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan NAS’in 50 µg/ml konsantrasyonun, *t*-BOOH verilmeden 2 saat ön inkübasyonu sonucu ATP seviyesi %34 artmıştır. Negatif

kontrol grubu ile arasındaki hücre içi ATP seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).



Şekil 4-5: *t*-BOOH ile oksidatif stres oluşturulmuş 3T3 fibroblast hücrelerine 2 saat önce *Rosa damascena* ekstraktının verilmesinin ATP seviyeleri üzerine etkisi. Veriler 5 farklı çalışmanın sonucu olup, ortalama \pm SD değerleridir.

4.3.1.2. 24 Saat *Rosa damascena* Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra *t*-BOOH Uygulanan 3T3 Fibroblast Hücrelerinde ATP Seviyesi

Şekil 4.6'da görüldüğü gibi 3T3 fibroblast hücrelerine *t*-BOOH verildikten 48 saat sonra ölçülen ATP seviyeleri kontrol hücre grubuna göre %51 azalmıştır. *Rosa damascena* ekstraktı çeşitli konsantrasyonlarının (2,5–100 µg/ml) 24 saat ön inkübasyonu ve sonra 48 saat *t*-BOOH inkübasyonunun hücre içi ATP seviyeleri, sadece *t*-BOOH ile inkübe edilen hücre grubunun ATP seviyelerine göre ve kontrol hücre grubunun ATP seviyelerine göre değerlendirildi. İstatistik hesaplamalarında One-way ANOVA testi kullanıldı ve gruplar arasında ikili karşılaştırmalar Post-hoc Tukey testi ile yapıldı.

Kontrol hücre grubunun ATP seviyesine göre;

Şekil 4.6'da görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2,5, 5, 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 24 saat ön inkübasyonu ATP seviyeleri sırasıyla %205, %155, %55 ve %55 arttırmıştır. Ancak 40 ve 100 µg/ml *Rosa damascena* ekstraktı verildiği zaman ATP seviyesi sırasıyla %15 ve %65 azalmıştır.

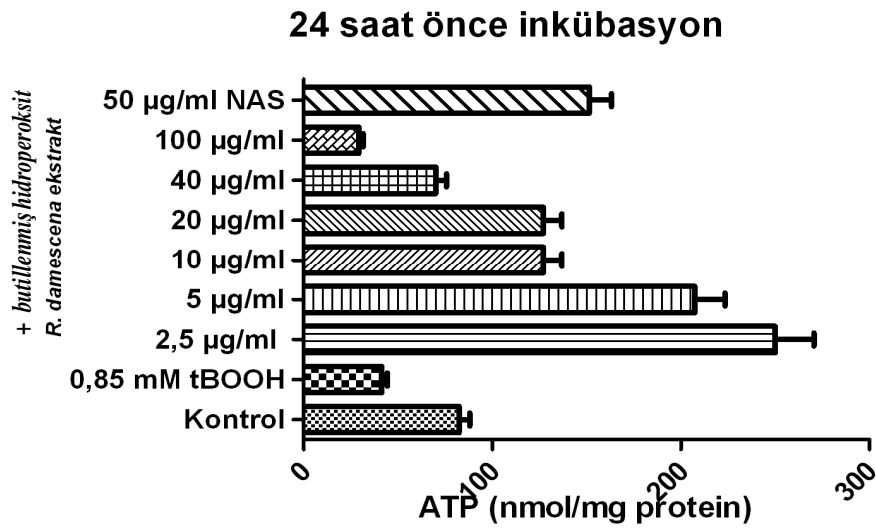
Gruplar arasındaki hücre içi ATP seviyesindeki farklılık 40 µg/ml ekstrakt konsantrasyonu hariç ($p>0,05$) istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$, ANOVA).

Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan NAS'in 50 µg/ml konsantrasyonunun, *t*-BOOH verilmeden 24 saat ön inkübasyonu ATP seviyesi %85 artmıştır. Kontrol grubu ile arasındaki hücre içi ATP seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$, ANOVA).

Sadece *t*-BOOH ile inkübe edilen negatif kontrol hücre grubunun ATP seviyelerine göre:

Şekil 4.6'da görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2.5, 5, 10, 20 ve 40 µg/ml konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 24 saat ön inkübasyonu ATP seviyelerini sırasıyla %510, %410, %210, %210 ve % 71 arttırmıştır. Ancak 100 µg/ml *Rosa damascena* ekstraktı verildiği zaman ATP seviyesi %30 azalmıştır. Gruplar arasındaki hücre içi ATP seviyesindeki farklılık 100 µg/ml ekstrakt konsantrasyonu hariç ($p>0,05$) istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$, ANOVA).

Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan NAS'in 50 µg/ml konsantrasyonunun, *t*-BOOH verilmeden 24 saat ön inkübasyonu ATP seviyesi %271 artmıştır. Negatif kontrol grubu ile arasındaki hücre içi ATP seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$, ANOVA).



Şekil 4-6: *t*-BOOH ile oksidatif stres oluşturulmuş 3T3 fibroblast hücrelerine 24 saat önce *Rosa damascena* ekstraktının verilmesinin ATP seviyeleri üzerine etkisi. Veriler 5 farklı çalışmanın sonucu olup, ortalama \pm SD değerleridir.

4.3.2. Primer Fibroblast Hücre Kültürlerinde Hücre İçi ATP Seviyesi

4.3.2.1. 2 Saat *Rosa damascena* Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra *t*-BOOH Uygulanan Primer Fibroblast Hücrelerinde ATP Seviyesi

Şekil 4.7’de görüldüğü gibi primer fibroblast hücrelerine *t*-BOOH verildikten 48 saat sonra ölçülen ATP seviyeleri kontrol hücre grubuna göre %53 azalmıştır. *Rosa damascena* ekstraktı çeşitli konsantrasyonlarının (2.5–100 µg/ml) 2 saat ön inkübasyonu ve sonra 48 saat *t*-BOOH inkübasyonunun hücre içi ATP seviyeleri, sadece *t*-BOOH ile inkübe edilen negatif kontrol hücre grubunun ATP seviyelerine göre ve kontrol hücre grubunun ATP seviyelerine göre değerlendirildi. İstatistik hesaplamalarında One-way ANOVA testi kullanıldı ve gruplar arasında ikili karşılaştırmalar Post-hoc Tukey testi ile yapıldı.

Kontrol hücre grubunun ATP seviyesine göre;

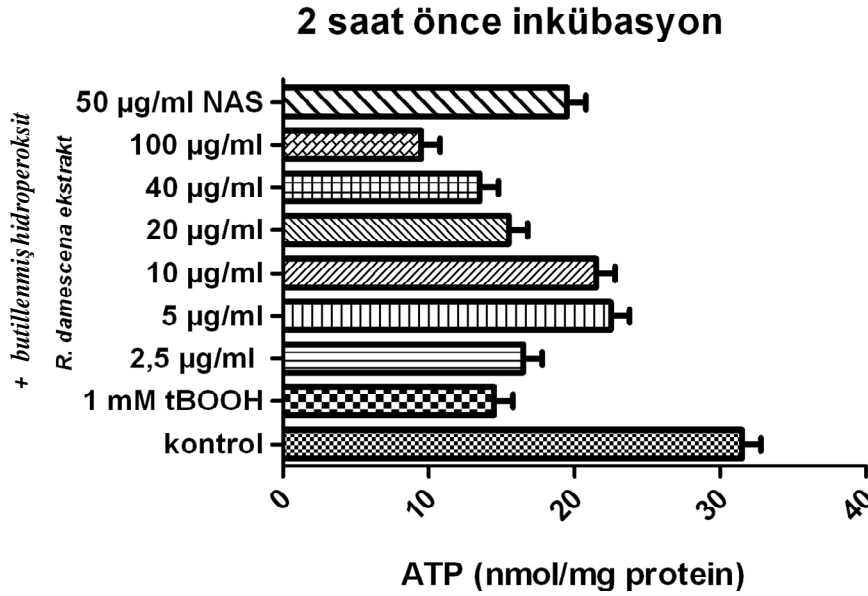
Şekil 4.7’de görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2.5-100 µg/ml konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 2 saat ön inkübasyonu ATP seviyeleri, kontrol hücrelerin ATP seviyesine göre düşüktür. Gruplar arasındaki hücre içi ATP seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

NAS’in 50 µg/ml konsantrasyonun, *t*-BOOH verilmeden 2 saat ön inkübasyonu ATP seviyesi %38 azalmıştır. Kontrol grubu ile arasındaki hücre içi ATP seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

Sadece *t*-BOOH ile inkübe edilen hücre grubunun ATP seviyelerine göre;

Şekil 4.7’de görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2.5, 5, 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 2 saat ön inkübasyonunun sonucu ATP seviyeleri artmıştır. Ancak 40 ve 100 µg/ml *Rosa damascena* ekstraktı verildiği zaman ATP seviyeleri azalmıştır. Gruplar arasındaki hücre içi ATP seviyesindeki farklılık 2.5, 20 ve 40 µg/ml konsantrasyonu hariç ($p > 0,05$) istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan NAS’in 50 µg/ml konsantrasyonun, *t*-BOOH verilmeden 2 saat ön inkübasyonu sonucu ATP seviyesi %34 artmıştır. Negatif kontrol grubu ile arasındaki hücre içi ATP seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).



Şekil 4-7: *t*-BOOH ile oksidatif stres oluşturulmuş primer fibroblast hücrelerine 2 saat önce *Rosa damascena* ekstraktının verilmesinin ATP seviyeleri üzerine etkisi. Veriler 5 farklı çalışmanın sonucu olup, ortalama \pm SD değerleridir.

4.3.2.2. 24 Saat *Rosa damascena* Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra *t*-BOOH Uygulanan Primer Fibroblast Hücrelerinde ATP Seviyesi

Şekil 4.8’de görüldüğü gibi primer fibroblast hücrelerine *t*-BOOH verildikten 48 saat sonra ölçülen ATP seviyeleri, kontrol hücre grubuna göre %50 azalmıştır. *Rosa damascena* ekstraktı çeşitli konsantrasyonlarının (2,5–100 µg/ml) 24 saat ön inkübasyonu ve sonra 48 saat *t*-BOOH inkübasyonunun hücre içi ATP seviyeleri, negatif kontrol hücre grubu ATP seviyelerine göre ve kontrol hücre grubu ATP seviyelerine göre değerlendirildi. İstatistik hesaplamalarında One-way ANOVA testi kullanıldı ve gruplar arasında ikili karşılaştırmalar Post-hoc Tukey testi ile yapıldı.

Kontrol hücre grubunun ATP seviyesine göre;

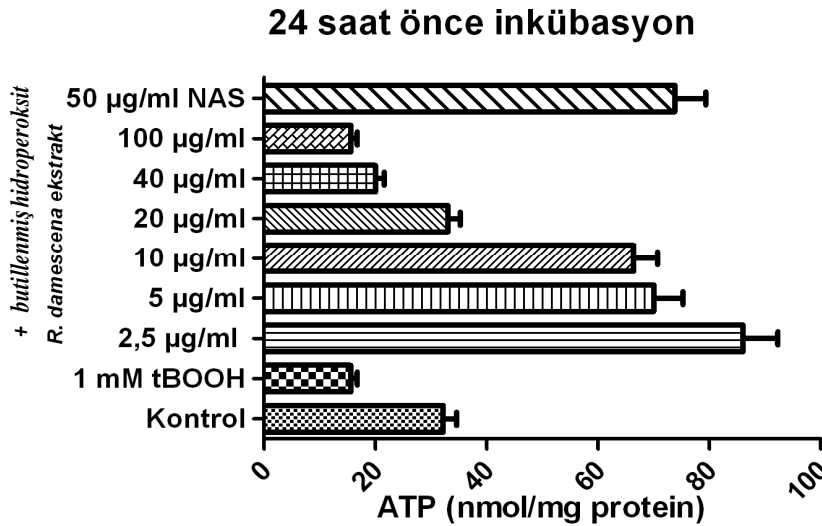
Şekil 4.8’de görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2,5, 5, 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 24 saat ön inkübasyonu sonucu ATP seviyeleri sırasıyla %169, %119, %106 ve %3 artmıştır fakat 40 ve 100 µg/ml *Rosa damascena* ekstraktları verildiği zaman ATP seviyesi sırasıyla %37 ve %50 azalmıştır. Gruplar arasındaki hücre içi ATP seviyesindeki farklılık 20 µg/ml ekstrakt konsantrasyonu hariç ($p > 0,05$) istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

NAS'in 50 µg/ml konsantrasyonunun, *t*-BOOH verilmeden 24 saat ön inkübasyonu sonucu ATP seviyesi %131 artmıştır. Kontrol grubu ile arasındaki hücre içi ATP seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

Sadece *t*-BOOH ile inkübe edilen negatif kontrol hücre grubunun ATP seviyelerine göre;

Şekil 4.8'de görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2.5, 5, 10, 20 ve 40 µg/ml konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 24 saat ön inkübasyonu sonucu ATP seviyeleri sırasıyla %438, %338, %313, %106 ve % 25 gibi yüzde artışı konsantrasyonla birlikte azalarak artmıştır. Fakat 100 µg/ml *Rosa damascena* ekstraktı verildiği zaman ATP seviyesi negatif kontrol hücre grubuna göre değişmemiştir. Gruplar arasındaki hücre içi ATP seviyesindeki farklılık 40 ve 100 µg/ml ekstrakt konsantrasyonları hariç ($p > 0,05$) istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

NAS'in 50 µg/ml konsantrasyonunun, *t*-BOOH verilmeden 24 saat ön inkübasyonu sonucu ATP seviyesi %363 artmıştır. Negatif kontrol grubu ile arasındaki hücre içi ATP seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).



Şekil 4-8: *t*-BOOH ile oksidatif stres oluşturulmuş primer fibroblast hücrelerine 24 saat önce *Rosa damascena* ekstraktının verilmesinin ATP seviyeleri üzerine etkisi. Veriler birbirinden bağımsız 5 farklı çalışmanın sonucu olup, ortalama \pm SD değerleridir.

4.4. NIH 3T3 ve Primer Fibroblast Hücrelerinde Mitokondri Membran Potansiyel Düzeyleri

3T3 fibroblast ve primer fibroblast hücrelerinin kullanıldığı çalışma gruplarımızın mitokondri aktivasyonu, rodamin 123 kullanılmak suretiyle spektrofotometrik olarak ölçüldü. *Rosa damascena* ekstraktı çeşitli konsantrasyonlarının (2.5, 5, 10, 20, 40 ve 100 µg/ml) 2 saat ve 24 saat ön inkübasyonu ve sonra *t*-BOOH ile 48 saat inkübasyonu sonucu hücrelerde ki mitokondri membran potansiyel seviyeleri, ekstrakt ve kimyasal içermeyen kontrol hücre grubunun mitokondri membran potansiyel seviyelerine göre ve sadece *t*-BOOH ile inkübe edilen negatif kontrol grubu hücrelerinin mitokondri membran potansiyel seviyelerine göre değerlendirildi. İstatistik hesaplamalarında One-way ANOVA testi kullanıldı ve gruplar arasında ikili karşılaştırmalar Post-hoc Tukey testi ile yapıldı.

4.4.1. NIH 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Mitokondri Membran Potansiyel Seviyeleri

4.4.1.1. 2 Saat *Rosa damascena* Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra *t*-BOOH Uygulanan 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Mitokondri Membran Potansiyel Seviyeleri

Kontrol hücre grubunun mitokondri membran potansiyel seviyesine göre;

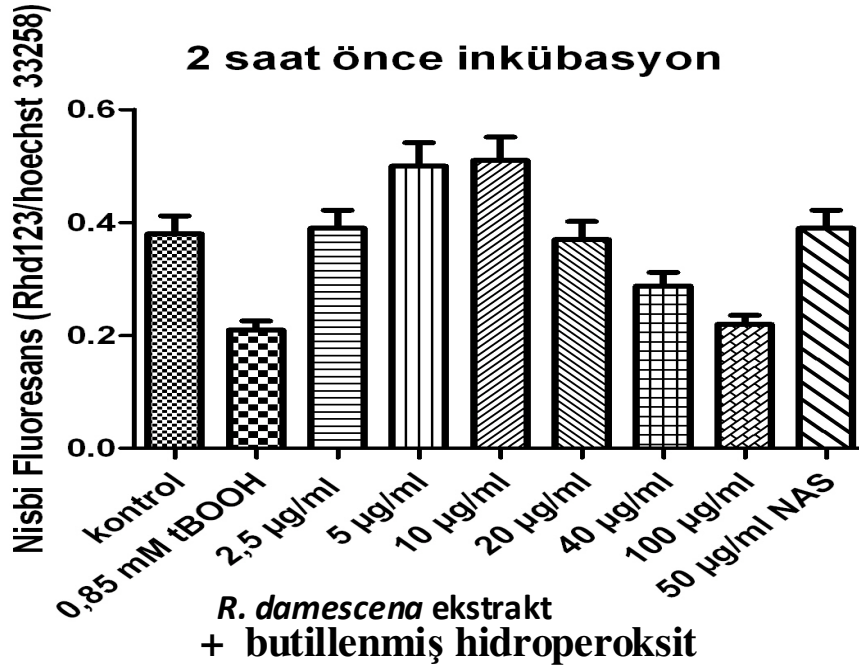
Şekil 4.9'da görüldüğü gibi 3T3 fibroblast hücrelerine sadece *t*-BOOH verildikten 48 saat sonra ölçülen mitokondri membran potansiyel seviyeleri kontrol hücrelere göre %45 azalmıştır. *Rosa damascena* ekstraktı 2.5, 5 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 2 saat ön inkübasyonu sonucu, hücrelerin mitokondri membran potansiyel seviyeleri sırasıyla %3, %32 ve %34 artmıştır fakat 20, 40 ve 100 µg/ml *Rosa damascena* ekstraktı verildiği zaman mitokondri membran potansiyelleri sırasıyla %3, %24 ve %42 azalmıştır. Gruplar arasında, hücrelerin mitokondri membran potansiyel seviyesindeki farklılık 2,5 ve 20 µg/ml ekstrakt konsantrasyonları hariç ($p > 0,05$) istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

NAS'in 50 µg/ml konsantrasyonunun, *t*-BOOH verilmeden 2 saat ön inkübasyonu sonucu 3T3 fibroblast hücrelerindeki mitokondri membran potansiyel seviyesi % 3 artmıştır. Kontrol grubu ile arasındaki mitokondri membran potansiyel seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$, ANOVA).

Sadece *t*-BOOH ile inkübe edilen negatif kontrol hücre grubunun mitokondri membran potansiyel seviyelerine göre;

Şekil 4.9’da görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2.5, 5, 10, 20, 40 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 2 saat ön inkübasyonu sonucu hücrelerin mitokondri membran potansiyel seviyeleri sırasıyla %86, %138, %142, %76, %38 ve %5 artmıştır. Gruplar arasında, hücrelerin mitokondri membran potansiyel seviyesindeki farklılık 100 µg/ml konsantrasyonu hariç ($p > 0,05$) istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan N-asetil sisteinin 50 µg/ml konsantrasyonunun, *t*-BOOH verilmeden 2 saat ön inkübasyonu sonucu hücrelerin mitokondri membran potansiyeli %86 artmıştır. Negatif kontrol grubu ile arasındaki hücre içi mitokondri membran potansiyel seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).



Şekil 4-9: *t*-BOOH ile oksidatif stres oluşturulmuş 3T3 fibroblast hücrelerine 2 saat önce *Rosa damascena* ekstraktının verilmesinin mitokondri membran potansiyel seviyeleri üzerine etkisi. Veriler 3 farklı çalışmanın sonucu olup, ortalama \pm SD değerleridir.

4.4.1.2. 24 Saat *Rosa damascena* Ekstraktı ile İnkübe Edilen Ve Sonra *t*-BOOH Uygulanan 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Mitokondri Membran Potansiyel Seviyeleri

Kontrol hücre grubunun mitokondri membran potansiyel seviyesine göre;

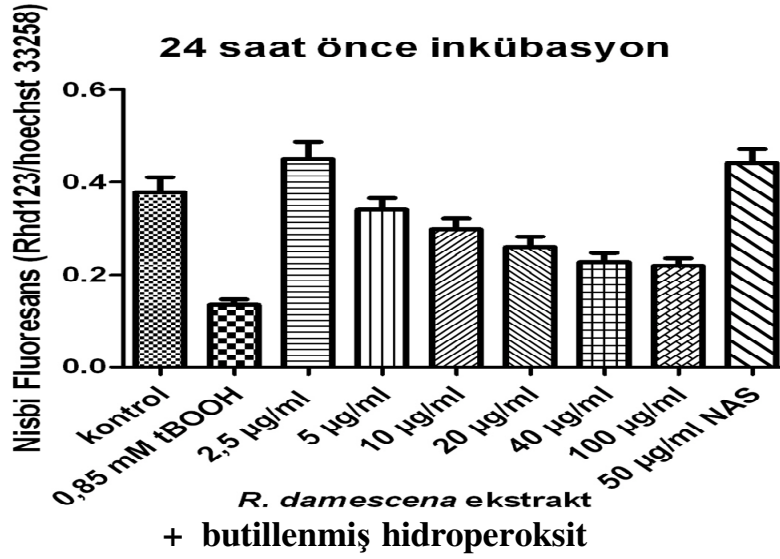
Şekil 4.10'da görüldüğü gibi 3T3 fibroblast hücrelerine sadece *t*-BOOH verildikten 48 saat sonra ölçülen mitokondri membran potansiyel seviyeleri, kontrol hücre grubuna göre %62 oranında düşmüştür. *Rosa damascena* ekstraktının 2.5 µg/ml konsantrasyonu, *t*-BOOH uygulanmadan 24 saat ön inkübasyonu sonucu, hücrelerin mitokondri membran potansiyel seviyesi %22 artmıştır fakat 5, 10, 20, 40 ve 100 µg/ml *Rosa damascena* ekstraktları verildiği zaman mitokondri membran potansiyelleri sırasıyla %8, %19, %30, %38 ve %40 azalmıştır. Gruplar arasında, hücrelerin mitokondri membran potansiyel seviyesindeki farklılık 5 µg/ml ekstrakt konsantrasyonu hariç ($p>0,05$) istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$, ANOVA).

NAS'in 50 µg/ml konsantrasyonun, *t*-BOOH verilmeden 24 saat ön inkübasyonu sonucu 3T3 fibroblast hücrelerindeki mitokondri membran potansiyel seviyesi % 19 artmıştır. Kontrol grubu ile arasındaki mitokondri membran potansiyel seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$, ANOVA).

Sadece *t*-BOOH ile inkübe edilen hücre grubunun mitokondri membran potansiyel seviyelerine göre;

Şekil 4.10'da görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2.5, 5, 10, 20, 40 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 24 saat ön inkübasyonu sonucu hücrelerin mitokondri membran potansiyel seviyeleri sırasıyla %221, %143, %114, %86, %64 ve %57 artmıştır. Gruplar arasında, hücrelerin mitokondri membran potansiyel seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$, ANOVA).

Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan NAS'in 50 µg/ml konsantrasyonun, *t*-BOOH verilmeden 24 saat ön inkübasyonu sonucu hücrelerin mitokondri membran potansiyeli %214 artmıştır. Negatif kontrol grubu ile arasındaki hücre içi mitokondri membran potansiyel seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$, ANOVA).



Şekil 4-10: *t*-BOOH ile oksidatif stres oluşturulmuş 3T3 fibroblast hücrelerine 24 saat önce *Rosa damascena* ekstraktının verilmesinin mitokondri membran potansiyel seviyeleri üzerine etkisi. Veriler 3 farklı çalışmanın sonucu olup, ortalama \pm SD değerleridir.

4.4.2. Primer Fibroblast Hücrelerinde Mitokondri Membran Potansiyel Seviyeleri

4.4.2.1. 2 Saat *Rosa damascena* Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra *t*-BOOH Uygulanan Primer Fibroblast Hücrelerinde Mitokondri Membran Potansiyel Seviyeleri

Kontrol hücre grubunun mitokondri membran potansiyel seviyesine göre;

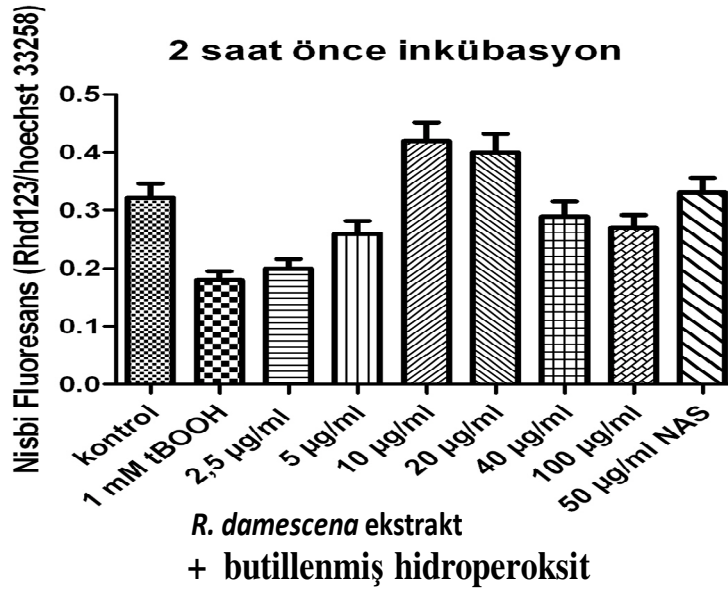
Şekil 4.11’de görüldüğü gibi primer fibroblast hücrelerine sadece *t*-BOOH verildikten 48 saat sonra ölçülen mitokondri membran potansiyel seviyeleri kontrol hücrelere göre %44 azalmıştır. *Rosa damascena* ekstraktı 2,5, 5, 40 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 2 saat ön inkübasyonu sonucu, hücrelerin mitokondri membran potansiyel seviyeleri sırasıyla %38, %19, %9 ve %16 düşmüştür fakat 10 ve 20 µg/ml *Rosa damascena* ekstraktı verildiği zaman mitokondri membran potansiyelleri sırasıyla %31 ve %25 artmıştır. Gruplar arasında, hücrelerin mitokondri membran potansiyel seviyesindeki farklılık 40 µg/ml ekstrakt konsantrasyonu hariç ($p > 0,05$) istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA). NAS’in 50 µg/ml konsantrasyonunun, *t*-BOOH verilmeden 2 saat ön inkübasyonu sonucu primer fibroblast hücrelerindeki mitokondri membran potansiyel seviyesi %3 artmıştır.

Kontrol grubu ile arasındaki mitokondri membran potansiyel seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$, ANOVA).

Sadece *t*-BOOH ile inkübe edilen hücre grubunun mitokondri membran potansiyel seviyelerine göre;

Şekil 4.11’de görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2.5, 5, 10, 20, 40 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 2 saat ön inkübasyonu sonucu hücrelerin mitokondri membran potansiyel seviyeleri sırasıyla %11, %44, %133, %122, %61 ve %50 artmıştır. Gruplar arasında, hücrelerin mitokondri membran potansiyel seviyesindeki farklılık 2.5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonu hariç ($p>0,05$) istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$, ANOVA).

N-asetil sisteinin 50 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunun, *t*-BOOH verilmeden 2 saat ön inkübasyonu sonucu hücrelerin mitokondri membran potansiyeli %83 artmıştır. Negatif kontrol grubu ile arasındaki hücre içi mitokondri membran potansiyel seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$, ANOVA).



Şekil 4-11: *t*-BOOH ile oksidatif stres oluşturulmuş primer fibroblast hücrelerine 2 saat önce *Rosa damascena* ekstraktının verilmesinin mitokondri membran potansiyel seviyeleri üzerine etkisi. Veriler 3 farklı çalışmanın sonucu olup, ortalama \pm SD değerleridir.

4.4.2.2. 24 Saat *Rosa damascena* Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra *t*-BOOH Uygulanan Primer Fibroblast Hücrelerinde Mitokondri Membran Potansiyel Seviyeleri

Kontrol hücre grubunun mitokondri membran potansiyel seviyesine göre;

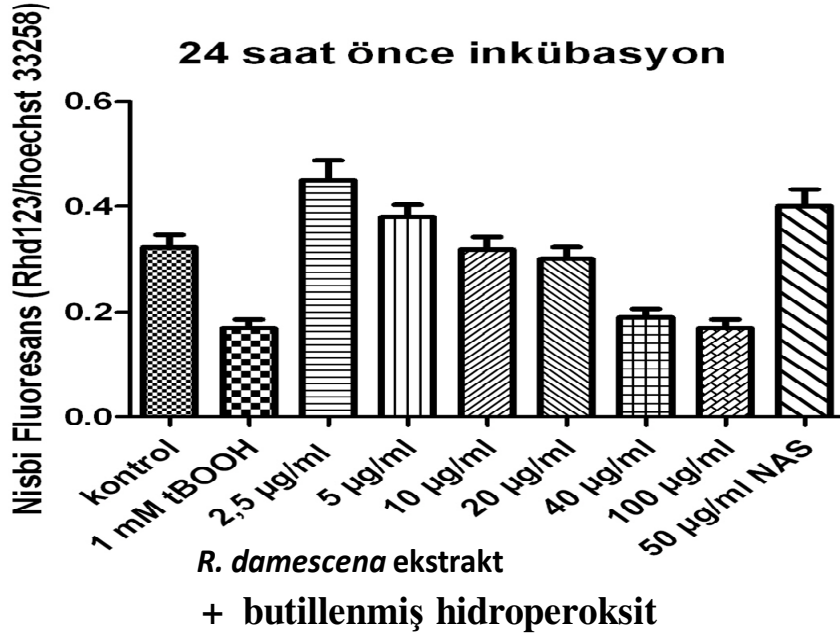
Şekil 4.12’de görüldüğü gibi primer fibroblast hücrelerine sadece *t*-BOOH verildikten 48 saat sonra ölçülen mitokondri membran potansiyel seviyeleri kontrol hücrelere göre %47 oranında düşmüştür. *Rosa damascena* ekstraktının 2.5 ve 5 µg/ml konsantrasyonları, *t*-BOOH uygulanmadan 24 saat ön inkübasyonu sonucu, hücrelerin mitokondri membran potansiyel seviyesi sırasıyla %41 ve %19 artmıştır, 10 µg/ml ekstrakt verildiğinde seviyesi değişmemiş fakat 20, 40 ve 100 µg/ml *Rosa damascena* ekstraktı verildiği zaman mitokondri membran potansiyelleri sırasıyla %6, %41 ve %47 azalmıştır. Gruplar arasında, hücrelerin mitokondri membran potansiyel seviyesindeki farklılık 10 ve 20 µg/ml ekstrakt konsantrasyonları hariç ($p > 0,05$) istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

NAS’in 50 µg/ml konsantrasyonun, *t*-BOOH verilmeden 24 saat ön inkübasyonu sonucu primer fibroblast hücrelerindeki mitokondri membran potansiyel seviyesi %25 artmıştır. Kontrol grubu ile arasındaki mitokondri membran potansiyel seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

Sadece *t*-BOOH ile inkübe edilen hücre grubunun mitokondri membran potansiyel seviyelerine göre;

Şekil 4.12’de görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2.5, 5, 10, 20 ve 40 µg/ml konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 24 saat ön inkübasyonu sonucu hücrelerin mitokondri membran potansiyel seviyeleri sırasıyla %165, %124, %88, %76 ve %12 artmıştır fakat 100 µg/ml ekstrakt verildiğinde hücrelerin mitokondri membran potansiyel seviyesi değişmemiştir. Gruplar arasında, hücrelerin mitokondri membran potansiyel seviyesindeki farklılık 40 ve 100 µg/ml ekstrakt konsantrasyonları hariç ($p > 0,05$) istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan N-asetil sisteinin 50 µg/ml konsantrasyonunun, *t*-BOOH verilmeden 24 saat ön inkübasyonu sonucu hücrelerin mitokondri membran potansiyeli %135 artmıştır. Negatif kontrol grubu ile arasındaki hücre içi mitokondri membran potansiyel seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).



Şekil 4-12: *t*-BOOH ile oksidatif stres oluşturulmuş primer fibroblast hücrelerine 24 saat önce *Rosa damascena* ekstraktının verilmesinin mitokondri membran potansiyel seviyeleri üzerine etkisi. Veriler 3 farklı çalışmanın sonucu olup, ortalama \pm SD değerleridir.

4.5. *Rosa damascena* Ekstraktının NIH 3T3 ve Primer Fibroblast Hücre Kültüründe *t*-BOOH ile Oluşturulan Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

Rosa damascena ekstraktı çeşitli konsantrasyonlarının (2.5, 5, 10, 20, 40, 100 µg/ml) 2 saat ve 24 saat ön inkübasyonu ve sonra *t*-BOOH ile 48 saat inkübasyonu sonucu hücrelerde ki luminol bağımlı kemilüminesans şiddeti ve DCF floresans şiddeti, ekstrakt ve kimyasal içermeyen kontrol grubu hücrelerinin luminol bağımlı kemilüminesans şiddetine ve DCF floresans şiddetine göre hesaplanarak elde edildi. *Rosa damascena* ekstraktları uygulanmış hücre gruplarının sonuçları, sadece *t*-BOOH ile inkübe edilen negatif kontrol hücre grubunun luminol bağımlı kemilüminesans şiddetine ve DCF floresans şiddetine göre oranlanarak, hücre ölümünü inhibe etme yüzdeleri bulundu. İstatistik hesaplamalarında One-way ANOVA testi kullanıldı ve gruplar arasında ikili karşılaştırmalar Post-hoc Tukey testi ile yapıldı.

4.5.1. NIH 3T3 ve Primer Fibroblast Hücre Kültürlerinde Luminol Bağımlı Kemilüminesans Şiddeti

Çeşitli konsantrasyonlardaki *Rosa damascena* ekstraktı (2.5–100 µg/ml) ile 2 saat ve 24 saat inkübe edilen 3T3 ve primer fibroblast hücrelerine, daha sonra oksidatif stres oluşturmak için lethal doz *t*-BOOH uygulandı ve 48 saat inkübasyon sonunda, oksidatif stres göstergesi, luminol varlığında oksidan oluşumunu gösteren kemilüminesans şiddetindeki değişikliklerle incelendi. Luminol eklenmiş örneklerin 10. saniyede kemilüminesans şiddeti analiz edildiğinde;

4.5.1.1. NIH 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Luminol Bağımlı Kemilüminesans Şiddeti

4.5.1.1.1. 2 Saat *Rosa damascena* Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra *t*-BOOH Uygulanan 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Luminol Bağımlı Kemilüminesans Şiddeti

Tablo 4.3’de görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2.5, 5, 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarının, *t*-BOOH verilmeden 2 saat ön inkübasyonu sonucu luminol bağımlı kemilüminesans şiddetini, sadece *t*-BOOH ile inkübe edilen negatif kontrol hücre grubunun luminol bağımlı kemilüminesans şiddetine göre sırasıyla % 23, %19, %13 ve %5 oranlarında inhibe ettiği, 40 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının inhibe edici özelliğinin bulunmadığı gözlemlendi. Gruplar arasında, kemilüminesans şiddeti inhibisyon seviyesindeki farklılık 2,5, 5 ve 10 µg/ml ekstrakt konsantrasyonu hariç ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$, ANOVA).

Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan NAS’in 50 µg/ml konsantrasyonunun, *t*-BOOH uygulanmadan 2 saat önceki inkübasyonu sonucu luminol bağımlı kemilüminesans şiddetini, negatif kontrol hücre grubunun luminol bağımlı kemilüminesans şiddetine göre %22 oranında inhibe ettiği gözlemlendi. Gruplar arasındaki % inhibisyon seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

4.5.1.1.2. 24 Saat *Rosa damascena* Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra *t*-BOOH Uygulanan 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Luminol Bağımlı Kemilüminesans Şiddeti

Tablo 4.3’de görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2.5–100 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 24 saat ön inkübasyonu sonucu oluşan luminol bağımlı kemilüminesans şiddetinin, negatif kontrol hücre grubunun luminol bağımlı kemilüminesans şiddetine göre sırasıyla %32, %43, %82, %99, %94 ve %92 oranlarında inhibe ettiği gözlemlendi. Gruplar arasındaki % inhibisyon seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan NAS’in 50 µg/ml konsantrasyonunun, *t*-BOOH uygulanmadan 24 saat ön inkübasyonu sonucu oluşan luminol bağımlı kemilüminesans şiddetini, negatif kontrol hücre grubunun luminol bağımlı kemilüminesans şiddetine göre %53 oranında inhibe ettiği gözlemlendi. Gruplar arasındaki % inhibisyon seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

Tablo 4-3: 3T3 fibroblast hücre kültürlerinde *t*-BOOH sitotoksitesine karşı *Rosa damascena* ekstraktının uygulanması sonucu ortaya çıkan kemilüminesans şiddeti

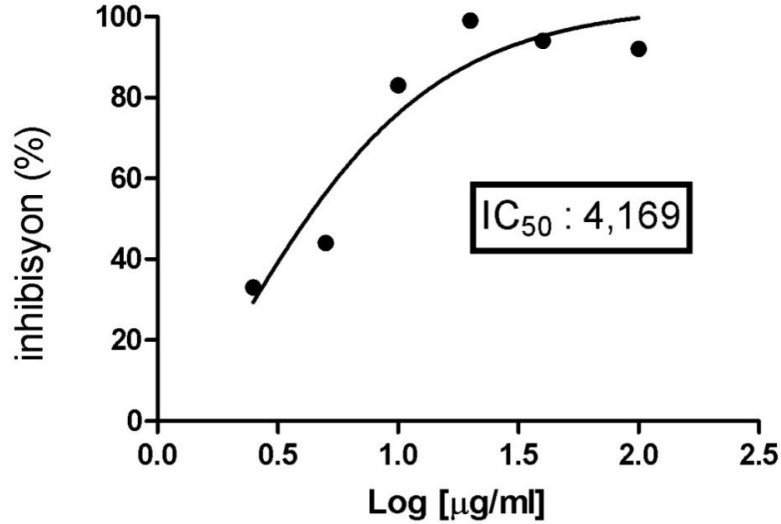
3T3 fibroblast h.	2 saat önce gül ekimi			24 saat önce gül ekimi	
	Konsantrasyon	Kemilüminesans şiddeti	İnhibisyon(%)	Kemilüminesans şiddeti	İnhibisyon(%)
<i>t</i> -BOOH	850 µM	717 ± 61		1091 ± 86	
	2,5 µg/ml	554 ± 44	23	738 ± 61	32
Rosa	5 µg/ml	582 ± 51	19	617 ± 49	43
<i>damsescena</i>	10 µg/ml	626 ± 44	13	191 ± 15	82
+	20 µg/ml	680 ± 49	5	5 ± 1	99
<i>t</i> -BOOH	40 µg/ml	1236 ± 90	0	66 ± 12	94
	100 µg/ml	2540 ± 183	0	82 ± 7	92
50 µg/ml NAS + <i>t</i> -BOOH	50 µg/ml	562 ± 47	22	513 ± 48	53

Sonuçlar birbirinden bağımsız 4 farklı çalışmadan elde edilmiş değerlerin, 10^6 hücre başına, kontrol hücrelere göre nisbi kemilüminesans şiddet değerlerinin (RLU) ortalama ± SD’leridir.

4.5.1.1.2.1. 3T3 Fibroblast Hücrelerinde Kemilüminesans Şiddetini İnhibe Edici Doz (IC₅₀)

Rosa damascena ekstraktının, *t*-BOOH'in indüklediği kemilüminesans şiddetini inhibe edici oranları kullanılarak yarı logaritmik inhibisyon konsantrasyon eğrileri çizildi. Ortamdaki serbest radikal konsantrasyonunun yarısını inhibe eden ekstrakt konsantrasyonu olan IC₅₀ değeri hesaplandı. 2,5-100 µg/ml arasındaki konsantrasyonlar dikkate alınarak hesaplanan inhibe edici konsantrasyon (IC₅₀), 24 saat *Rosa damascena* ekstraktı ile ön inkübasyon yapılan ve sonra oksidatif hasar meydana getiren *t*-BOOH'la 48 saat inkübe edilen 3T3 fibroblast hücreleri için 4,169 µg/ml olarak bulundu (Şekil 4.13).

Yarı Logaritmik inhibisyon Konsantrasyon (IC) Eğrisi



Şekil 4-13: 3T3 fibroblast hücre kültürlerinde *t*-BOOH sitotoksitesine karşı *Rosa damascena* ekstraktının 24 saat önce verilmesinin kemilüminesans şiddet oluşumu üzerine koruyucu etkileri (IC₅₀). Sonuçlar birbirinden bağımsız 5 farklı çalışmadan elde edilmiş olup, değerler ortalama ± SD olarak sunulmuştur.

4.5.1.2. Primer Fibroblast Hücrelerinde Luminol Bağımlı Kemilüminesans Şiddeti

4.5.1.2.1. 2 Saat *Rosa damascena* Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra *t*-BOOH Uygulanan Primer Fibroblast Hücrelerinde Luminol Bağımlı Kemilüminesans Şiddeti

Tablo 4.4'de görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2,5 µg/ml konsantrasyonu, *t*-BOOH uygulanmadan 2 saat ön inkübasyonu sonucu luminol bağımlı kemilüminesans şiddetini, negatif kontrol hücre grubunun luminol bağımlı kemilüminesans şiddetine göre %12 inhibe ettiği, 5, 10, 20, 40 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının inhibe edici özelliğinin bulunmadığı gözlemlendi. Gruplar arasında, kemilüminesans şiddeti inhibisyon seviyesindeki farklılık 2,5 µg/ml ekstrakt konsantrasyonu hariç ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$, ANOVA).

NAS'in 50 µg/ml konsantrasyonunun, *t*-BOOH uygulanmadan 2 saat önceki inkübasyonu sonucu luminol bağımlı kemilüminesans şiddetini, negatif kontrol hücre grubunun luminol bağımlı kemilüminesans şiddetine göre %18 oranında inhibe ettiği gözlemlendi. Gruplar arasındaki % inhibisyon seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

4.5.1.2.2. 24 Saat *Rosa damascena* Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra *t*-BOOH Uygulanan Primer Fibroblast Hücrelerinde Luminol Bağımlı Kemilüminesans Şiddeti

Tablo 4.4'de görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2,5, 5, 10 ve 20 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 24 saat ön inkübasyonu sonucu luminol bağımlı kemilüminesans şiddetini, negatif kontrol hücre grubunun luminol bağımlı kemilüminesans şiddetine göre sırasıyla %41, %74, %98 ve %10 oranında inhibe ettiği, 40 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının inhibe edici özelliğinin bulunmadığı gözlemlendi. Gruplar arasında, kemilüminesans şiddeti inhibisyon seviyesindeki farklılık 40 ve 100 µg/ml ekstrakt konsantrasyonları hariç ($p > 0,05$) istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

NAS'in 50 µg/ml konsantrasyonunun, *t*-BOOH uygulanmadan 24 saat ön inkübasyonu sonucu luminol bağımlı kemilüminesans şiddetini, negatif kontrol hücre grubunun luminol bağımlı kemilüminesans şiddetine göre %48 oranında inhibe ettiği gözlemlendi. Gruplar arasındaki % inhibisyon seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

Tablo 4-4: Primer fibroblast hücre kültürlerinde *t*-BOOH sitotoksitesine karşı *Rosa damascena* ekstraktının uygulanması sonucu ortaya çıkan kemilüminesans şiddeti

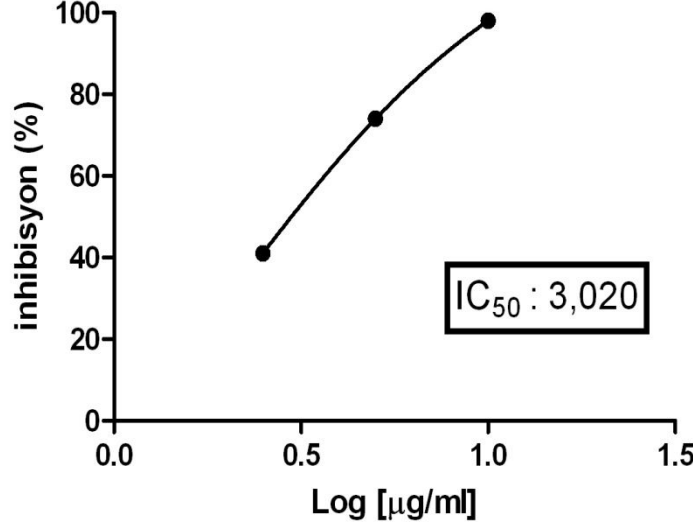
Primer fibroblast	2 saat önce gül ekimi			24 saat önce gül ekimi	
	Konsantrasyon	Kemilüminesans şiddeti	İnhibisyon(%)	Kemilüminesans şiddeti	İnhibisyon(%)
<i>t</i> -BOOH	850 µM	604 ± 66		976 ± 99	
	2,5 µg/ml	533 ± 43	12	577 ± 68	41
<i>Rosa</i>	5 µg/ml	757 ± 60	0	258 ± 32	74
<i>dame-scena</i>	10 µg/ml	757 ± 70	0	17 ± 4	98
+	20 µg/ml	609 ± 48	0	877 ± 63	10
<i>t</i> -BOOH	40 µg/ml	731 ± 61	0	1147 ± 105	0
	100 µg/ml	764 ± 46	0	1172 ± 96	0
50 µg/ml NAS + <i>t</i> -BOOH	50 µg/ml	496 ± 45	18	508 ± 52	48

Sonuçlar birbirinden bağımsız 4 farklı çalışmadan elde edilmiş değerlerin, 10⁶ hücre başına, kontrol hücrelere göre nisbi kemilüminesans şiddet değerlerinin (RLU) ortalama ± SD'leridir.

4.5.1.2.2.1. Primer Fibroblast Hücrelerinde Kemilüminesans Şiddetini İnhibe Edici Doz (IC₅₀)

Rosa damascena ekstraktının, *t*-BOOH'in indüklediği luminol bağımlı kemilüminesans şiddetini inhibe edici oranları kullanılarak yarı logoritmik inhibisyon konsantrasyon eğrileri çizildi. Ortamdaki serbest radikallerin konsantrasyonunun yarısını inhibe eden ekstrakt konsantrasyonu olan IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. 2.5-10 µg/ml arasındaki konsantrasyonlar dikkate alınarak hesaplanan inhibe edici konsantrasyon (IC₅₀), 24 saat *Rosa damascena* ekstraktı uygulanan, sonra oksidatif hasar meydana getiren LD₅₀ *t*-BOOH'la inkübe edilen primer fibroblast hücreleri için 3,020 µg/ml olarak bulundu (Şekil 4-14).

Yarı Logoritmik İnhibisyon Konsantrasyon (IC) Eğrisi



Şekil 4-14 : Primer fibroblast hücre kültürlerinde *t*-BOOH sitotoksitesine karşı *Rosa damascena* ekstraktının 24 saat önce verilmesinin kemilüminesans oluşumu üzerine koruyucu etkileri (IC₅₀). Sonuçlar birbirinden bağımsız 5 farklı çalışmadan elde edilmiş olup, değerler ortalama ±SD olarak sunulan IC₅₀ değerleridir.

4.5.2. NIH 3T3 ve Primer Fibroblast Hücre Kültürlerinde Hücre İçi DCFH-DA Oksidasyonu

4.5.2.1. NIH 3T3 Fibroblast Hücrelerinde DCF Floresans Şiddeti

4.5.2.1.1. 2 saat *Rosa damascena* Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra *t*-BOOH Uygulanan 3T3 Fibroblast Hücrelerinde DCF Floresans Şiddeti

Tablo 4.5'de görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2.5, 5 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 2 saat ön inkübasyonu sonucu DCF floresans şiddetini, negatif kontrol hücre grubunun DCF floresans şiddetine göre sırasıyla %33, %19 ve %13 oranlarında inhibe ettiği, 20, 40 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının inhibe edici özelliğinin bulunmadığı gözlemlendi. Gruplar arasında, kemilüminesans şiddeti inhibisyon seviyesindeki farklılık 20, 40 ve 100 µg/ml ekstrakt konsantrasyonları hariç (p>0,05) istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05, ANOVA).NAS'in 50 µg/ml konsantrasyonun, *t*-BOOH uygulanmadan 2 saat ön inkübasyonu sonucu DCF floresans şiddetini, negatif kontrol hücre grubunun

fluoresans şiddetine göre %22 oranında inhibe ettiği gözlemlendi. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

4.5.2.1.2. 24 Saat *Rosa damascena* Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra *t*-BOOH Uygulanan 3T3 Fibroblast Hücrelerinde DCF Fluoresans Şiddeti

Tablo 4.5’de görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2.5–100 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 24 saat ön inkübasyonu sonucu DCF fluoresans şiddetini, negatif kontrol hücre grubunun DCF fluoresans şiddetine göre sırasıyla %32, %43, %82, %99, %100 ve %93 oranlarında inhibe ettiği gözlemlendi. Gruplar arasındaki % inhibisyon seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA). NAS’in 50 µg/ml konsantrasyonunun, *t*-BOOH uygulanmadan 24 saat ön inkübasyonu sonucu DCF fluoresans şiddetini, negatif kontrol hücre grubunun DCF fluoresans şiddetine göre %53 oranında inhibe ettiği gözlemlendi. Gruplar arasındaki % inhibisyon seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

Tablo 4-5: 3T3 fibroblast hücre kültürlerinde *t*-BOOH sitotoksitesine karşı *Rosa damascena* ekstraktının uygulanması sonucu meydana gelen fluoresans şiddeti

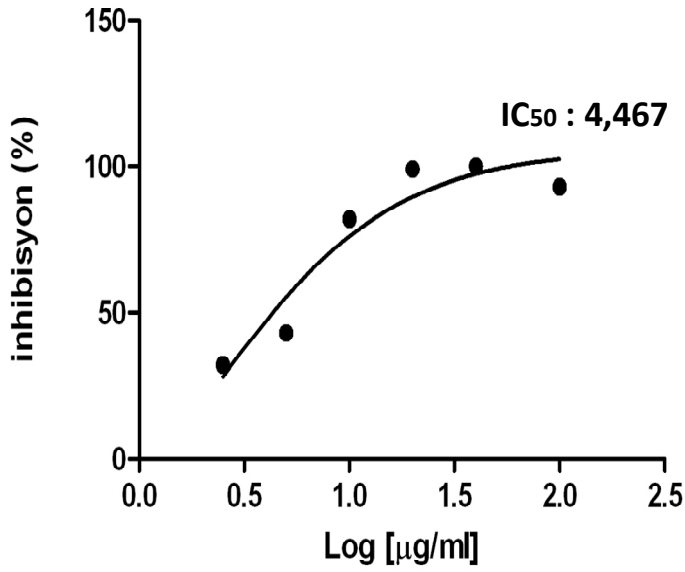
3T3 fibroblast h.	2 saat önce gül ekimi			24 saat önce gül ekimi	
	Konsantrasyon	DCF Fluoresans şiddeti	İnhibisyon(%)	DCF Fluoresans şiddeti	İnhibisyon(%)
<i>t</i> -BOOH	850 µM	22,6 ± 2,1		28 ± 2,2	
	2,5 µg/ml	17,4 ± 1	33	19,1 ± 1,6	32
<i>Rosa damascena</i>	5 µg/ml	18,4 ± 1	19	15,9 ± 1,2	43
	10 µg/ml	19,7 ± 1,2	13	4,9 ± 0,5	82
+	20 µg/ml	23,7 ± 2	0	0,13 ± 0	99,5
<i>t</i> -BOOH	40 µg/ml	39 ± 3,1	0	1,7 ± 0,2	100
	100 µg/ml	80,7 ± 6,4	0	2,1 ± 0,2	93
NAS + <i>t</i> -BOOH	50 µg/ml	17,7 ± 1,3	22	13,2 ± 1,17	53

Veriler DCFH/hoecht 33258 fluoresans oranları alınmak suretiyle, hücrelerdeki DNA miktarına göre nisbi fluoresans şiddeti (RFU) ve yüzde inhibisyon değerleri olup, birbirinden bağımsız 4 farklı çalışmadan elde edilmiş ortalama ± SD’leridir.

4.5.2.1.2.1. 3T3 Fibroblast Hücrelerinde DCF Floresans Şiddetini İnhibe Edici Doz (IC₅₀)

Rosa damascena ekstraktının, *t*-BOOH'in indüklediği DCF floresans şiddetini inhibe edici oranları kullanılarak yarı logoritmik inhibisyon konsantrasyon eğrileri çizildi. Ortamdaki serbest radikal konsantrasyonunun yarısını inhibe eden ekstrakt konsantrasyonu olan IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. 2.5-100 µg/ml arasındaki konsantrasyonlar dikkate alınarak hesaplanan inhibe edici konsantrasyon (IC₅₀), 24 saat *Rosa damascena* ekstraktı uygulanan, sonra oksidatif hasar meydana getiren *t*-BOOH ile inkübe edilen 3T3 fibroblast hücreleri için 4,467 µg/ml olarak bulundu (Şekil 4.15).

Yarı Logoritmik İnhibisyon Konsantrasyon (IC) Eğrisi



Şekil 4-15: 3T3 fibroblast hücre kültürlerinde *t*-BOOH sitotoksitesine karşı *Rosa damascena* ekstraktının 24 saat önce verilmesinin DCF floresans şiddeti üzerine koruyucu etkileri (IC₅₀). Sonuçlar birbirinden bağımsız 5 farklı çalışmadan elde edilmiş olup, değerler ortalama ±SD olarak sunulan IC₅₀ değerleridir.

4.5.2.2. Primer Fibroblast Hücrelerinde DCF Floresans Şiddeti

4.5.2.2.1. 2 Saat *Rosa damascena* Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra *t*-BOOH Uygulanan Primer Fibroblast Hücrelerinde DCF Floresans Şiddeti

Tablo 4.6'da görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2.5 ve 5 µg/ml konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 2 saat önceki inkübasyonu sonucu DCF floresans şiddetini, negatif kontrol hücre grubunun DCF floresans şiddetine göre sırasıyla %8 ve %3 oranlarında inhibe ettiği, 10, 20, 40 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının inhibe edici özelliğinin bulunmadığı gözlemlendi. Gruplar arasında, kemilüminesans şiddeti inhibisyon seviyesindeki farklılık 2.5 µg/ml ekstrakt konsantrasyonu hariç ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$, ANOVA).

Pozitif kontrol grubunun *t*-BOOH uygulanmadan 2 saat ön inkübasyonu sonucu DCF floresans şiddetini, negatif kontrol hücre grubunun DCF floresans şiddetine göre %23 oranında inhibe ettiği gözlemlendi. Gruplar arasındaki %inhibisyon seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

4.5.2.2.2. 24 Saat *Rosa damascena* Ekstraktı ile İnkübe Edilen ve Sonra *t*-BOOH Uygulanan Primer Fibroblast Hücrelerinde DCF Floresans Şiddeti

Tablo 4.6'da görüldüğü gibi *Rosa damascena* ekstraktı 2.5, 5, 10 ve 20 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının, *t*-BOOH uygulanmadan 24 saat ön inkübasyonu sonucu DCF floresans şiddetini, negatif kontrol hücre grubunun DCF floresans şiddetine göre sırasıyla %46, %70, %94 ve %20 oranlarında inhibe ettiği, 40 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının inhibe edici özelliğinin bulunmadığı gözlemlendi. Gruplar arasında, kemilüminesans şiddeti inhibisyon seviyesindeki farklılık 40 ve 100 µg/ml ekstrakt konsantrasyonları hariç ($p > 0,05$) istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

NAS'in 50 µg/ml konsantrasyonunun, *t*-BOOH uygulanmadan 24 saat ön inkübasyonu sonucu DCF floresans şiddetini, negatif kontrol hücre grubunun DCF floresans şiddetine göre %53 oranında inhibe ettiği gözlemlendi. Gruplar arasındaki % inhibisyon seviyesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, ANOVA).

Tablo 4-6: Primer fibroblast hücre kültürlerinde *t*-BOOH sitotoksitesine karşı *Rosa damascena* ekstraktının uygulanması sonucu meydana gelen fluoresans şiddeti

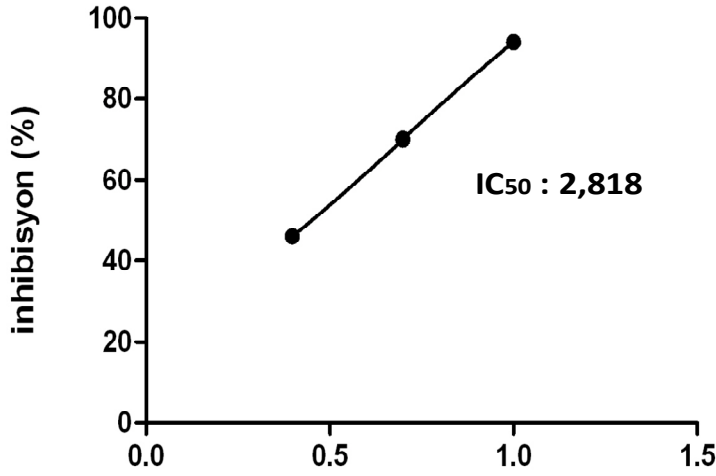
Primer fibroblast h.	2 saat önce gül ekimi			24 saat önce gül ekimi	
	Konsantrasyon	DCF Fluoresans şiddeti	İnhibisyon(%)	DCF Fluoresans şiddeti	İnhibisyon(%)
<i>t</i> -BOOH	850 µM	25,16 ± 3,2		30,23 ± 3,6	
	2,5 µg/ml	23,10 ± 2,6	8	16,32 ± 1,6	46
<i>Rosa damascena</i>	5 µg/ml	24,36 ± 2,5	3	9,07 ± 1,2	70
	10 µg/ml	25,41 ± 1,7	0	1,81 ± 1,5	94
+	20 µg/ml	25,57 ± 2,7	0	24,2 ± 3	20
<i>t</i> -BOOH	40 µg/ml	30,50 ± 3	0	35,52 ± 3,2	0
	100 µg/ml	31,82 ± 3,4	0	37,1 ± 4,2	0
NAS + <i>t</i> -BOOH	50 µg/ml	19,4 ± 2	23	14,21 ± 1,9	53

Veriler DCFH/hoecht 33258 fluoresans oranları alınmak suretiyle, hücrelerdeki DNA miktarına göre nisbi fluoresans şiddeti (RFU) ve yüzde inhibisyon değerleri olup, birbirinden bağımsız 4 farklı çalışmadan elde edilmiş ortalama ± SD'leridir.

4.5.2.2.2.1. Primer Fibroblast Hücrelerinde IC₅₀

Rosa damascena ekstraktının, *t*-BOOH'in indüklediği DCF fluoresans şiddetini inhibe edici oranları kullanılarak yarı logoritmik inhibisyon konsantrasyon eğrileri çizildi. Ortamdaki serbest radikal konsantrasyonunun yarısını inhibe eden ekstrakt konsantrasyonu olan IC₅₀ değeri hesaplanmıştır. 2.5-10 µg/ml arasındaki konsantrasyonlar dikkate alınarak hesaplanan inhibe edici konsantrasyon (IC₅₀), 24 saat önce *Rosa damascena* ekstraktı uygulanan, sonra oksidatif hasar meydana getiren *t*-BOOH'la inkübe edilen primer fibroblast hücreleri için 2,818 µg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4-16).

Yarı Logoritmik İnhibisyon Konsantrasyon (IC) Eğrisi



Şekil 4-16: Primer fibroblast hücre kültürlerinde *t*-BOOH sitotoksitesine karşı *Rosa damascena* ekstraktının 24 saat önce verilmesinin DCF floresans şiddeti üzerine koruyucu etkileri (IC_{50}). Sonuçlar birbirinden bağımsız 5 farklı çalışmadan elde edilmiş olup, değerler ortalama \pm SD olarak sunulan IC_{50} değerleridir.

4.6. Hücre Kültürlerinde Gözlemlenen Morfolojik Bulgu

Çalışmamızda sadece *t*-BOOH ile inkübe edilen negatif kontrol grubu kuyucuklarında, normalde iğ şekilli yapıya sahip olan fibroblast hücrelerinin bu özelliğini kaybedip yuvarlak, elips gibi özel bir yapısı olmayan hücre şekline dönüştükleri invert mikroskop kullanılarak gözlemlendi. Ayrıca kuyucuklar görsel olarak izlendiğinde hücrelerin normalde tabana yayılarak oluşturduğu homojen görüntünün bozulduğu, hücrelerin tutunma özelliğini kaybedip kümeleşme eğilimine girdikleri ve kümelenmiş hücre topluluğu oluşturduğu gözlemlenmiştir. Fakat çeşitli konsantrasyonlardaki *Rosa damascena* ekstraktının 2 saat ve 24 saat ön inkübasyonu ve sonradan *t*-BOOH verilmesi sonucunda ise bu durumu artan dar etki aralık konsantrasyonlarıyla orantılı bir şekilde kısmen engellediği, fibroblastların iğ şeklini ve homojen görüntüsünü kısmen koruduğu gözlemlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Ülkemizde *Rosa damascena*, ihraç edildiği gibi çeşitli ülkelerin kozmetik firmaları ham ürünü belli bir aşamaya kadar ülkemizde işleyerek, kendi ülkelerinde çeşitli ürünler haline döndürdükleri, endüstriyel önemi olan bir bitkidir. Günümüzde bilimsel araştırmalardan elde edilen bulgular, bu tür endüstriyel bitkilerin tüketimini oldukça fazla yönlendirebilmektedir. Rosaceae cinsine ait diğer türlerin içerdikleri maddeler, ekstraktlarının biyolojik özellikleri ile ilgili olarak özellikle Uzakdoğu kaynaklı çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. Bu çalışmaların çoğu Rosaceae cinsine ait türlerin antioksidan, antitümoral, yaşlanma karşıtı (anti aging) ve antibakteriyel etkileri üzerine yoğunlaşmıştır (Ng ve ark. 2005; Nagai ve ark. 2007; Altın ve Kılıçgün 2008; Awale ve ark. 2009). Ülkemiz ile birlikte birkaç komşu ülkede üretilen *Rosa damascena* türü ile ilgili Pubmed veri tabanı kullanılarak, 2009 Nisan ayı itibari ile yaptığımız literatür incelemelerine göre 46 makale göze çarpmaktadır. Bu çalışmalarda, özellikle *Rosa damascena*'nın yağı ve ekstraktlarının içeriklerinin ne olduğuna yönelik bulgular yer almaktadır (Basim ve Basim 2003; Ulusoy ve ark. 2009). *Rosa damascena* çok sayıda bileşik içermekle birlikte, bunların içerisinde antioksidan özelliği iyi bilinen vitamin C'nin de (askorbik asit) bulunması bu bitkinin, antioksidan özelliğe sahip bitkilerden biri olma olasılığını güçlendirmektedir (Nagai ve ark. 2007; Ulusoy ve ark. 2009). Her ne kadar *in vitro* çalışmalarda ethanol, etil asetat ve eter kullanılarak hazırlanan gül ekstraktlarının antisolar etkisi (Tabrizi ve ark. 2003), gül yağının antibakteriyel etkisi (Basim ve Basim 2003) ile ilgili bulgular bildirilmişse de, sadece iki çalışmada methanol solventi ile hazırlanmış *Rosa damascena* ekstraktının farklı teknikler kullanılarak serbest radikal tutucu özelliğine sahip olduğu bildirilmiştir (Özkan 2004; Kumar 2005). Üstelik literatür incelemesinin bu dönemine kadar *Rosa damascena*'nın hücreler üzerine etkilerini araştıran ve hücrelerin oksidan etkiden korunmasında bu türün etkilerini araştıran bir çalışma göze çarpmamaktadır. Bununla birlikte antioksidan özellikteki bileşiklerin konsantrasyonları ve bunların beraber buldukları bileşimlerin içerikleri, biyolojik moleküller üzerinde çok farklı etkiler gösterebilmektedir. Örneğin antioksidan olarak tanımlanan bir bileşik, belli bir konsantrasyonda veya konsantrasyondan sonra oksidan etki ortaya çıkarabilmektedir (Roomi ve ark. 2005) Örneğin 400 IU/gün E vitamini kullanılmasının yaşlı diyabetlilerde ölüm riskini arttırdığı bilinmektedir (Levy ve ark. 2004). Bununla birlikte antioksidan özellikteki bir bileşiğin beraber bulunduğu başka bir

bileşik tarafından etkisinin arttırılması ya da ortadan kaldırılmasının söz konusu olduğunu bildiren çeşitli çalışmalar mevcuttur (Farah ve Begum 2003; Hermann ve ark. 2007). Sözü edilen bu son bilgiler, bir bileşiğin antioksidan ajan olarak kullanılmak istenildiğinde kullanılacak dozun çok titizlikle seçilmesi gerektiğinin önemini ortaya koymaktadır.

Periferal insan lenfositleriyle daha önce yaptığımız *in vitro* çalışmalarda bir hidroperoksit olan kümen hidroperoksitlere karşı, belirli dozlarda *Rosa damascena* ekstraktının koruyucu özelliğinin olduğunu ortaya çıkarmıştık (Kanıgür ve ark. 2009). Ancak gül türlerinden elde edilen yağ, gül suyu ve ekstraktlar gibi ürünlerin daha çok kozmetik ürünler olarak ciltte kullanılması nedeniyle, çalışmamızda *in vitro* olarak fibroblast hücrelerinde, oluşturulan oksidatif strese karşı *Rosa damascena* ekstraktının anti-oksidan ve antisitotoksik etkilerini, bu gül ekstraktının etkili konsantrasyonlarını araştırmak istedik. Neden fibroblast hücrelerini seçtik? Fibroblastlar ekstrasellüler matriks proteinlerinin yapımından sorumlu olan hücrelerdir ve ECM ile desteklenmiş çeşitli doku ve organların büyük bölümünde bulunur. Derinin bağ dokusunda en fazla miktarda bulunan hücreler olan fibroblastların doku homeostazı ve yara iyileşmesinde önemli rolleri vardır (McAnulty 2006). Güneş ışınlarının taşıdığı ultraviyole (UV) ışınlarının oluşturduğu oksidatif hasar, güneşe direkt maruz kalan derinin fibroblast hücrelerini etkilemektedir (Pacheco-Palencia ve ark. 2008). Çalışmamızda hem sıçan deri bağ dokusundan elde ettiğimiz primer fibroblast hücresi hemde fare embriyonik fibroblast hücre soyu olan NIH 3T3 fibroblast hücresi kullanılarak *Rosa damascena*'nın öngördüğümüz olası etkilerini araştırmak istedik.

Günümüz dünyasında saç ve duvar boyaları gibi önemli endüstriyel ürünlerin bir kısmında hidroperoksitler kullanılmaktadır. Hidroperoksitlerin reaktif özellikleri ile canlı organizmalarda oksidatif stres ve buna bağlı hasar oluşturduğuna dair çok sayıda bulgu bulunmaktadır (Rosa ve ark. 2008). Peroksitlerin hasarlayıcı etkileri ve bunla ilgili mekanizmaları açıklamak için çeşitli hidroperoksitler model olarak kullanılmaktadır. Bunlar arasında *tert*-buthyl hidroperoksit, hücre membranından geçebilmesi ve katalaz tarafından yıkılamaması özelliğinden dolayı tercih edilen bir kimyasal bileşiktir (Vander-Zee ve ark. 1985; Kanupriya-Prasad ve ark. 2007; Rosa ve ark. 2008). Bu bileşiğin ROT oluşumunu tetiklediği ve oksidatif stres meydana getirdiği bilinmektedir (Rodeiro ve ark. 2007). Bu bileşik aynı zamanda endüstride bir

radikal polimerizasyonu başlatıcısı olarak kullanılır. Bu nedenle çalışmamızda model oksidatif stres etkeni olarak bu bileşik tercih edildi.

Çalışmamızda *t*-BOOH'ın oluşturduğu sitotoksik etki, hücre canlılığı tripan mavisi testi ile değerlendirilirken, antioksidan özelliği luminol bağımlı kemilüminesans yöntemi ve 2',7'-DCFH-DA oksidasyon yöntemi ile değerlendirildi. Luminol aralarında O_2^- , H_2O_2 , singlet oksijen gibi çeşitli reaktif oksijen türlerinin bulunduğu ortamlarda oksitlendiklerinde lüminesans çıkaran bileşiklerdir. Öte yandan 2',7' DCFH-DA oksidasyonuna neden olan çeşitli reaktif oksijen türleri bildirilmiştir. Bunlar arasında OH^- spesifik olmakla birlikte $ONOO^-$, O_2^- , ROO^- , NO^- radikalleri bulunmaktadır (Halliwell ve Whiteman 2004). DCFH molekülü peroksil, alkoksil, NO_2 , karbonat (CO_3^-) gibi reaktif türlere duyarlı bir fluorometrik bir probdur (Lebel ve ark. 1992; Ohashi ve ark. 2002). Günümüzde bu bileşik oksidatif stresin etkilerini araştırmak için hem spektrofotometri hem de akış sitometrisi yöntemlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Antioksidanların hücreler üzerine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmaların bir kısmında, hücre dışı ortamda kalım süresi, hücre içine giriş oranı, burda kalış süresi ve metabolizmasına bağlı olarak etkilerinin kısa sürede ortaya çıkmasının yanında, uzun sürede de ortaya çıkabildiği gösterilmiştir (Song ve ark. 2008). Çalışmamızda bu bulgular dikkate alınarak, ekstraktımız primer ve NIH 3T3 fibroblast hücrelerinde oksidatif stres oluşturulmadan 2 saat önce ve 24 saat önce inkübe edilecek şekilde iki farklı tarzda uygulanmıştır. Çalışmamızda ilk önce *tert*-bütillenmiş hidroperoksitin, hücrelerde %50 ölüme neden olan öldürücü dozu belirlendi ve *Rosa damascena* ekstraktının antioksidan etkisinin araştırıldığı ilerleyen bölümünde bu doz kullanıldı. Çalışmalarımızın bulguları, *t*-BOOH'in 48 saat inkübasyonu sonucu, LD_{50} konsantrasyonunun 3T3 fibroblastlar için 0,85 mM, primer fibroblast için 1 mM olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Rosa damascena ve lenfositlerle yaptığımız çalışmaların tecrübelerinden yararlanarak, çalışılacak *Rosa damascena* konsantrasyonlarını belirli bir sınır aralığında (2,5-100 μ g/ml) çalıştık (Kanıgür ve ark. 2009).

Çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullanılan ve antioksidan özelliğiyle ilaç sektöründe önemli bir yeri olan N-asetil sisteinin, lenfositlerle yapılan önceki çalışmamız dikkate alınarak, 50 μ g/ml'lik konsantrasyonu kullanıldı (Kanıgür ve ark. 2009).

Kemilüminesans ölçümü ve DCFH oksidasyon sonuçlarımız birlikte değerlendirildiğinde, *Rosa damascena*'nın çeşitli konsantrasyonlarının *t*-BOOH uygulanmadan 2 saat önce verilmesinin, oluşan oksidatif stres üzerine düşük konsantrasyonlar hariç önemli bir etkisi olmadığı görülmektedir. Aynı deney sistemi içerisinde N-asetil sisteinin 50 µg/ml'lik konsantrasyonu 3T3 ve primer fibroblast hücrelerine uygulandığında oksidatif stresin yaklaşık %22 düştüğü gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, *Rosa damascena*'nın su ile hazırlanmış ekstraktının oksidatif stres tehdidinden 24 saat önce hücre besiyerine eklenmesinin µg seviyesi baz alındığında dar bir aralıkta hem kemilüminesans oluşumunu hem de DCFH oksidasyonunu düşürdüğü gözlemlenmiştir. Aynı deney sistemi içerisinde N-asetil sisteinin 50 µg/ml'lik konsantrasyonu, 3T3 ve primer fibroblast hücrelerine uygulandığında oksidatif stresin yaklaşık %53 düştüğü gözlemlenmiştir. Bu çalışmalarımızdan elde edilen bulgularımız ile *t*-BOOH'ın oluşturduğu kemilüminesans şiddeti ve DCFH floresans değerlerini yarıya düşüren *Rosa damascena* konsantrasyonu hesaplanmıştır. Bunu ifade eden IC₅₀ değeri, bu tür bileşiklerin etki değerini karşılaştırmak için önemli bir parametre olarak kullanılmaktadır. 3T3 fibroblast hücrelerinde ve primer fibroblast hücrelerinde luminol bağımlı kemilüminesans çalışmamız için *Rosa damascena*'nın IC₅₀ değerleri sırasıyla 4,169 µg/ml ve 3,020 µg/ml olarak bulunmuştur. DCFH floresans çalışması içinde µg/ml seviyesinde yakın IC₅₀ değerleri bulunmuştur. Daha önce belirttiğimiz gibi literatürde bizim kullandığımız tarzda *in vitro* hücre kültürü sisteminde *Rosa damascena*'nın antioksidan etkinliğini araştıran bir çalışma olmadığından bulunan IC₅₀ değerlerini karşılaştırmak mümkün olmamıştır. Kumar ve arkadaşları (2009), DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazyl) yöntemini kullanarak, methanolle hazırlanmış *Rosa damascena* ekstraktlarının etkili radikal süpürücü konsantrasyonunun 100 µg/ml olduğunu bulmuşlardır. Bununla birlikte Özkan ve arkadaşları (2004), yine methanolda hazırlanmış *Rosa damascena* ekstraktlarının etkili radikal süpürücü konsantrasyonunun aynı yöntemle 100 ppm (100 µg/µl) olduğunu bulmuşlardır. Bununla birlikte yetişkin *Drosophila*larla yapılan bir *in vivo* çalışmada 1 mg/ml'lik dozun mortalite hızını azalttığını göstermişlerdir (Jafari 2008). Hızlı yaşlanan farelerde yapılan bir çalışmada *Rosa* çiçek ekstraktlarının 80 mg/kg dozu oksidatif hasar ürünü olan lipid peroksidasyonunu azalttığı ve çeşitli antioksidan enzim düzeylerinin seviyelerini arttırdığını göstermiştir (Ng 2005).

Daha önce belirttiğimiz gibi luminol bağımlı kemilüminesans ve DCF fluoresans şiddet oluşumunun çeşitli reaktif oksijen türler ve radikaller tarafından etkilendiği bilindiğinden, *Rosa damascena*'nın hangi radikallere ve hangi mekanizma ile etkili olduğu sorusu akla gelebilir. Ancak bizim çalışma protokolümüzde *Rosa damascena*'nın hangi reaktif oksijen türlerini ve serbest radikal oluşumunu etkilediğini söylemek mümkün değildir.

Her ne kadar oksidatif strese bağlı hasarların hemen hemen tüm hücrel komponentlerin ve organellerin üzerinde etkileri olduğu bilinmekle birlikte, mitokondri üzerine olan etkisinin ayrı bir önemi bulunmaktadır. Çeşitli çalışmalar oksidatif stresin mitokondri membranına ait olan proteinleri ve mitokondri DNA'sını etkilemek suretiyle, ATP üretimini etkilediğini göstermiştir (Klauning ve Kamendulis 2004). Mitokondride ATP üretimi sırasında devamlı olarak reaktif oksijen türleri üretilmekte, aynı zamanda mitokondrinin kompleks 1 ve kompleks 3'te yer alan antioksidan savunma sistemleri tarafından yok edilmektedir (Birch-Machin 2006). Ancak antioksidan savunma sisteminin yetersiz olduğu durumlarda, mitokondri hasarlarıyla birlikte ATP üretimi düşebilmektedir (Mandavilli ve ark. 2002). Çalışmalarda aralarında farklı bitkilerden elde edilmiş ekstraktlarında bulunduğu, çeşitli özellikteki bileşiklerin verilmesi ile oksidatif stresin oluşturduğu hasarlayıcı etkileri azalttığı hatta önleyebildiği bilinmektedir (Long ve ark. 2009). Bu nedenle çalışmamızda *Rosa damascena*'nın mitokondri üzerindeki olası koruyucu etkilerini de araştırmak istedik. Bu amaçla çalışmamızda mitokondri üzerindeki etkiler, membran potansiyeli ve ATP seviyeleri ile değerlendirildi. Mitokondri membran potansiyeli için Rodamin 123 probu, ATP seviyeleri ise luminometrik olarak tespit edildi. Çalışmamızın sonuçlarını incelediğimizde, 3T3 ve primer fibroblast hücrelerinde oksidatif stres oluşturmadan 2 saat önce *Rosa damascena* ekstraktları verildiğinde ATP seviyeleri, negatif kontrolün ATP seviyesine göre, 3T3 fibroblast ve primer fibroblast hücrelerinde ise dar bir alanda maksimum artış göstermiştir. *Rosa damascena* ekstraktlarımızın oksidatif stres oluşturulmadan 24 saat önce verilmesi ile ATP seviyeleri, negatif kontrolün ATP seviyesine göre, belli bir konsantrasyona kadar konsantrasyonun artmasıyla birlikte artış göstermiş fakat yüksek konsantrasyonlarda azalmıştır. Membran potansiyeli bulguları da ATP seviyeleri ile genel olarak uyum içerisindedir. Pubmed veri bulgularına göre herhangi bir Rosa cinsine ait ekstrakt veya ürünün, mitokondri üzerindeki koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışma göze çarpmamaktadır.

Oksidatif stres ile hücre ölümü arasında ilişkiyi gösteren çok sayıda makale bulunmaktadır (Chance ve ark. 1979; Halliwell ve Gutteridge 1984a; Schraufstatter 1986; Halliwell ve Aruoma 1991; Sies 1991; Feng ve ark. 2010). Antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda çeşitli mekanizmalar hücreyi ölüme götürebilmektedir. Literatürde çok sayıda bitkisel ekstraktın ve bileşiğın, oksidatif strese karşı hücreyi sitotoksik etkiden koruduğuna dair bulgular yer almaktadır (Farah ve Begum, 2003; Hevesi ve ark. 2009; Long ve ark. 2009; Occhiuto ve ark. 2009). Hücre ölümünün çeşitli tetkiklerle değerlendirilmesi, araştırması yapılan bileşiğın daha iyi yorumlanmasına olanak verebilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda *t*-BOOH ile oksidatif stres oluşturulmuş fibroblastlar üzerindeki sitotoksik etkinin, çeşitli *Rosa damascena* ekstraktlarının verilmiş olmasıyla ne kadar engellediğini tripan mavisi canlılık testiyle değerlendirdik. Aynı zamanda çeşitli makalelerde hücre ölüm oranı ATP düzeyiyle değerlendirebildiğinden, bizim ATP bulgularımız bu yönde yorumlanabilir (Galati ve ark. 2006). Bulgularımız *Rosa damascena*'nın 2 saatlik ön inkübasyonu, hücre ölümünün baskılanması yönünde kısmen bir etkisi olduğunu, 24 saatlik ön inkübasyonda ise hücre ölümünü 3T3 fibroblast hücreleri için maksimum %51, primer fibroblast hücreleri için ise maksimum %57 oranında ve dar aralıklı bir konsantrasyonda inhibe ettiğini göstermektedir. Bu veri ekstraktın antisitotoksik etkisinin dar bir konsantrasyon aralığında olduğunu göstermektedir. 3T3 fibroblast çalışmasında bu aralığın 5-40 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda (IC₅₀:9,55), primer fibroblast hücrelerinde ise 2,5-40 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda (IC₅₀:5,623) olduğu görülmektedir. Bu bulgulardan elde edilen IC₅₀ değerlerini, diğer bulgulardan elde edilen IC₅₀ değerleriyle karşılaştırsak oldukça yakınlık taşımaktadır.

Çalışmalarımızın mikroskop aşamasındaki hücre morfolojisi ile ilgili gözlemlerimiz, diğer çalışmalardan elde ettiğimiz bulguları destekler niteliktedir. Sadece *t*-BOOH ile inkübe edilen negatif kontrol grubunda fibroblast hücrelerin iğ şeklini ve homojen görüntüsünü kaybettiği, yüzeye tutunma özelliğini kaybedip kümeleşme eğilimi gösterdikleri fakat *Rosa damascena* ekstraktının öninkübasyonu sonucunda ise ekstrakt konsantrasyonlarının dar etki aralığı ile orantılı bir şekilde, fibroblastların iğ şeklini ve homojen görüntüsünü kısmen koruduğu gözlemlenmiştir.

Rosaceae cinsinin bir türü ile fibroblast hücreleri üzerinde yapılan, ilk çalışma olma özelliği ile elde ettiğimiz bulgularımızı bütünüyle değerlendirirsek; *Rosa damascena*'nın oldukça dar bir konsantrasyon aralığında, bizim incelediğimiz

parametrelerde terapötik etkisini ortaya çıkardığı görülmektedir. Çalışmamızın sonuçları, bizim deney koşullarımız altında oksidatif stres oluşturulmadan 24 saat önce *Rosa damascena* ekstraktı uygulanmasının daha etkili olduğunu da göstermektedir. Bunun için bazı olasılıklardan söz edilebilir. Bunlardan biri; *t*-BOOH aracılı oluşturulan ani oksidatif strese karşı, hücrelerde oluşan radikalleri antioksidan özelliği sayesinde azaltması ve serbest radikal oluşum eşik değerini yükseltmesi olabilir. Ng ve arkadaşlarının (2005) çalışmasında, hızlı yaşlanan farelerde *Rosa rugosa* çiçek ekstraktlarının 80 mg/kg dozu oksidatif hasar ürünü olan lipid peroksidasyonunu azalttığı ve çeşitli antioksidan enzim seviyelerini arttırdığını göstermiştir. Bu bulgular göz önüne alındığında diğer bir olasılık, *Rosa damascena* ekstraktının 24 saat önceki inkübasyonu ile antioksidan enzim düzeylerinin artışı yani antioksidan savunma sisteminin koruyucu gücünün artışı sonucu olabilir.

Bununla birlikte ön çalışmalarımızda ki bulgular, *Rosa damascena*'nın 100 µg/ml üstündeki konsantrasyonlarının fibroblast hücrelerinde, terapötüğün ötesinde bir pro-oksidan gibi davrandığını göstermiştir. *Rosa damascena*'nın 100 µg/ml üstündeki konsantrasyonlarının fibroblastların iç şeklinde olan morfolojik özelliklerini bozduğunu ve kuyucuklardaki homojen görüntünün kaybolduğunu gösteren mikroskopik çalışmalarımız da bu gözlemlerimizi kanıtlar niteliktedir. Çalışmalarımızın bulgularından gül ekstraktlarının neden bir prooksidan özellik ortaya çıkarttığına bir yorum yapmak mümkün değildir. Literatürde bazı bileşiklerin konsantrasyona, bulunduğu çevreye ve şartlara bağlı olarak bazen antioksidan bazen de prooksidan olarak davrandığına dair bulgular bildirilmiştir (Roomi ve ark. 2005; Nagai ve ark. 2007; Rodeiro ve ark. 2007; Hevesi ve ark. 2009) Literatür bulguları ve bizim bulgularımızı beraber yorumlarsak, *Rosa damascena*'nın antioksidan yönden değerlendirilmeleri ile ilgili ileriki çalışmaların planlanmasında, gözlemlenen dar aralıktaki etki konsantrasyonlarının dikkate alınmasının yararlı olacağı kanaatindeyiz.

Çalışmamızın sonuçlarını değerlendirirken, aşağıda belirtilen yönlerinin de dikkate alınması, ileriye dönük çalışmalara yol gösterici olabilir.

1. Çeşitli şekillerde hazırlanmış ekstraktların farklı etki gösterdiği literatürde belirtildiğinden, çalışmamızda kullandığımız *Rosa damascena* çiçeklerinin metanol, etanol, eter, aseton gibi su dışındaki solventler ile hazırlanmış ekstraktlarının, biyolojik etkilerinin incelenmesi,
2. Çalışmanın aynı deney sistemi içerisinde diğer gül çeşitlerinin ekstraktları ile karşılaştırılması,
3. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan N-asetil sisteinin değişik konsantrasyonlarının çalışılması, daha yüksek konsantrasyonlarının olası toksik etkilerinin farklı yöntemlerle ortaya çıkarılması,
4. *t*-bütil hidroperoksitin oluşturduğu radikal hasarıyla diğer oksidatif stres kaynaklarının hasar oluşturma mekanizmaları farklı olabildiğinden çalışmanın, UV gibi diğer oksidatif stres kaynakları ile çalışması,
5. *In vitro* çalışmalarla *in vivo* çalışmalar arasındaki sonuç farklılıkları dikkate alınarak, etkilerin *in vivo* deney hayvanları ile çalışması,

Çalışmalarımızdan elde ettiğimiz tüm bulguların ışığında sonuç olarak;

Solvent olarak su ile hazırlanmış *Rosa damascena* ekstraktları fibroblast hücre kültürlerinde, hidroperoksitlerin oluşturduğu oksidatif stres ve sitotoksik etkiyi dar bir konsantrasyon aralığında azalttığı, antioksidan ve antisitotoksik bir aktivite gösterdiği söylenebilir. Ayrıca reaktif oksijen türlerinin en yoğun şekilde meydana geldiği ve etkilendiği mitokondri organelini, oksidatif hasara karşı kısmen koruduğunu da söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

Abe, R., Shimizu, T., Ohkawara, A., ve Nishihira, J., (2000). Enhancement of Macrophage Migration İnhibitory Factor (MIF) Expression in İnjured Epidermis and Cultured Fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1500,1-9.

Agrawal, A., Kale, R.K., (2001). Radiation Induced Peroxidative Damage Mechanism and Significance. *Indian Journal Experimental Biology Apr*, 39, 291.

Ağaoğlu, Y.S., (2000). Rose oil industry and the production of oil rose (*Rosa damascena* Mill.) in Turkey. *Biotechnol.&Biotechnol.*, 9-15.

Akkoç, H., (2008). Miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı. *Dicle Tıp Dergisi*, 35, 211-215.

Akkuş, İ., (1995). *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*. (1nd ed.) Konya: Mimoza Yayınları.

Altan, N., Sepici-Dinçel, A., Koca, C., (2006). Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi*, 31, 51-56.

Altınar, D., ve Kılıçgün, H., (2008). The Antioxidant Effect of *Rosa rugosa*. *Drug Metabolism Drug Interact.*, 23, 323-327.

Altıntaş, A., (2009). *Gül, gül suyu, tarihte, tedavide ve gelenekteki yeri*. Maestro reklamcılık.

Ansarı, K.A., Kaplan, E., Shoeman, D., (1989). Age Related Changes in Lipid Peroxidation and Protective Enzymes in The Central Nervous System. *Growth Develop Aging*, 53,117.

Aust, S.D., Morehause, L.A., Thomas, C., (1985). *Role of Metals in Oxygen Radical Reactions*. *Free Rad. Biol. Med.*, 1, 3-25.

AveSina, A.A., (1990). *Law in medicine*. Sharafkhandy. A, translator, Tehran; Ministry of Guidance Publication, 129-131.

Awale, S., Tohda, C., Tezuka, Y., Miyazaki, M., Katoda, S., (2009). Protective effects of *Rosa damascena* and its active constituent on A β (25-35)-induced neuritic atrophy. *eCAM*, 1-8.

Basim, E., Basim, H., (2003). Antibacterial activity of *Rosa damascena* essential oil. *Fitoterapia*, 74, 394-396.

Baydar, H., Baydar, N.G., (2005). The effects of harvest date, fermentation duration and Tween 20 treatment on essential oil content and composition of industrial oil rose (*Rosa damascena* Mill.). *Ind. Crop. Prod.* 21, 251-255.

Berköz, M., Yalın, S., (2009). Normal ve preeklampatik gebelerde lipid peroksidasyonu ve antioksidan aktivite. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 10, 52-58.

Birch-Machin, M.A., (2006). The Role of Mitochondria in Aging and Carcinogenesis. *Clin. Exp. Dermatol.*, 31, 548-52.

Boskabady, M.N., Kiani, S., Rakhsbandah, H., (2006). Relaxant effects of *Rosa damascena* on guinea pig tracheal chains and its possible mechanism(s). *Journal Ethnopharmacol*, 106, 377-382.

Buckle, J., (1997). *Clinical Aromatherapy in Nursing*. Arnold copublished by singular, London.

Butler, A.R., Flitney, F.W., Williams, D.L.H., (1995). Nitrosonium Ions, Nitroxide Ions, Nitrosothiols and Iron-Nitrosols in Biology. *A Chemist's Perspective*, 16, 18-22.

Carroll, E. C., (1987). Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med.*, 107, 526-545.

Ceballos, P.I., Trivier, J.M., Nicole, A., (1992). Age- Correlated Modification Of Copper – Zinc Superoxide Dismutase and Glutathione Related Enzyme Activities in Human Erythrocytes. *Clinical Chemistry*, 38-66.

Chance, B., Sies, H., Boveris, A., (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 59, 527.

Cheeseman, K.H., Slater, T.F., (1993). An Introduction to Free Radical Biochemistry. *Br Med Bull*, 49, 481-493.

Cho, E.J., Yokozawa, T., Rhyu, D.Y., Kim, S.L., Shibara, N., Park, J.C., (2003a) Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Phytomedicine.* 10, 544-551.

Cho, E.J., Yokozawa, T., Rhyu, D.Y., Kim, S.L., Shibara, N., Park, J.C., (2003b). The inhibitory effects of 12 medicinal plants and their components on lipid peroxidation. *Am. J. Chin. Med.*, 31, 907-917.

Cros, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., (1987). Oxygen radicals and human disease. *Annals. International Med.*, 107, 526-545.

Çavdar, C., Sifil, A. Ve Çamsarı, T., (1997). Hastalıkların patogenezi ve tedavisinde reaktif oksijen patikülleri ve antioksidanlar. *Türk nefroloji diyaliz ve transplantasyon dergisi*, 3-4, 96-101.

Elstern, E.F., (1991). Oxygen Radicals: Biochemical Basis for Their Efficacy. *Klin Wochenschr*, 69, 949-956.

Engin, A., Altan, N., (2000). Effects of obstructive jaundice on the antioxidative capacity of human red blood cells. *Hematologia*, 30, 91-96.

Eriş, O., Çankaya, İ., Sezer, E., Solak, İ., Demirağ, K., Moral, AR., (2009). Ratlarda Oluşturulan Hemorajik Şok Modelinde N-Asetilsistein'in Oksidatif Stres Üzerine Olan Etkisi. *Türk Anest. Der. Dergisi*, 37, 208-216.

Farah, I.O., ve Begum, R.A., (2003). Effect of *Nigella sativa* (N.Sativa L.) and oxidative stress on the survival pattern of MCF-7 breast cancer cells. *Biomed. Science Instrum*, 39, 359-64.

Faulkner, K., Fridovich, I., (1993). Luminol and lucigenin as detectors for O_2^- . *Free radical biology & Medicine*. 15, 447-51.

Feng, X., Xia, Q., Yuan, L., Yang, X., Wang, K., (2010). Impaired Mitochondrial Function and Oxidative Stress in Rat Cortical Neurons: Implications for Gadolinium-Induced Neurotoxicity. *Journal NeuroToxicology*, 10, 1016.

Freeman, BA., Crapo, JD., (1982). Biology of disease : Free radicals and tissue injury, *Lab Invest*, 47, 412.

Fujihara, T., Nakagawa-Izumi, A. and Ozawa, T. (2007). High-molecular-weight polyphenols from oolong tea and black tea: purification, some properties, and role in increasing mitochondrial membrane potential. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 71, 711-9.

Galati, G., Lin, A., Sultani A.M., ve O'Brien, P.J., (2006). Cellular and *in vivo* Hepatotoxicity Caused by Green Tea Phenolic Acids and Cateins. *Free Radical Biology and Medicine*, 40, 570-580.

Güneş, H.V., (2006). *Moleküler Hücre Biyolojisi*. (2nd ed.) Eskişehir, TR: Kaan Kitabevi.

Goslin, K., Asmussen H., ve Banker, G., (1998). Rat hippocampal neurons in low-density culture. İçinde: Banker, G., Goslin, K., editor. *Culturing nerve cells*. 2 ed. Cambridge: MIT Press, p. 339-71.

Halliwell, B., ve Gutteridge, J.M.C., (1984a). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet*, 23, 1396-97

Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C. (1984b). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metal and disease. *Biochem J.*, 219, 1-14.

Halliwell, B., (1991). Reactive oxygen species in living system source, biochemistry and role in human disease. *American J. Med.*, 91, 145-225.

Halliwell, B., ve Aruoma, O., (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *Febs Lett.*, 281- 9.

Halliwell, B., (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of neurochemistry*, 59, 1609-1623.

Halliwell, B., (1995). Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 49, 1341-1348.

Halliwell, B., (1996). Antioxidants in Human Health and Disease. *Ann Rev Nutr*, 16, 33.

Halliwell, B., ve Whiteman, M., (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the result mean? *British Journal of Pharmacology*, 142, 231-255.

Hermann, M., Grether-Beck, S., Meyer, I., Franke, H., Joppe, H., Krutmann, J., ve Vielhaber, G., (2007). Blackberry leaf extract: a multifunctional anti-aging active. *International Journal Cosmetic Sci.*, 29, 411.

Hevesi, B.T., Houghton, P.J., Habtemariam, S., ve Kery, A. (2009). Antioxidant and Antiinflammatory Effect of *Epilobium parviflorum* Schreb. *Phytotherapy Research*, 23, 719-724.

Hongratanaworakit, T., (2009). Relaxing effects of rose oil on humans. *Natural product communications*, 4, 291-296.

Hosseini, M., Rakhshandah, H., Shafieenic, R., Dolati, K., (2003). Analgesic effects of *Rosa damascena* on mice. *Abstract book of 16th Iranian congress of Physiology and Pharmacology*, 167.

Huang, F.C., Horvath, G., Molnar, P., Turcsi, E., Deli, J., Schrader, J., Sandmann, G., Schmidt, H., Schwab. W., (2009). Substrate promiscuity of RdCCD1, a caretenoid cleavage oxygenase from *Rosa damascena*. *Phytochemistry*, 70, 457-464.

Jafari, M., Zarban, A., Pham, S., ve Wang, T., (2008). *Rosa damascena* decreased mortality in adult drosophila. *Journal of Medicinal Food*, 11, 9-13.

Kanıgür, G., Tezcan, G., Bayram-Gürel, Ç., Onaran, İ., Altıntaş, A., Alpınar, K., (2009). Evaluation Of *In vitro* Antioxidant Activity And Cytotoxicity Of *Rosa damascene* Extract Using By Peripheral Blood Lymphocytes As Model System. *Personal Care* (Europe).

Kanupriya, Prasad, D., Sai, Ram, M., Sawhney, R.C., Ilavazhagan, G., ve Benerjee, P.K., (2007). Mechanism of *tert*-butylhydroperoxide Induced Cytotoxicity in U-937 Macrophages by Alteration of Mitochondrial Function and Generation of ROS. *Toxicology in vitro*, 21, 846-854.

Kelly, S.A., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H., Levin, E.D., (1998). Oxidative stres in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental Health Perspectives*, 106,1-24.

Kenneth, B.B., Bruce, N.A., (1998). The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol Reviews*, 78, 547-581.

Kılçıkısız, S., Demirel, C., (2008). Oksidatif stres, radyosyona bağlı hasar ve koruyucu olarak N-asetil-sistein'in potansiyel rolü. *Türk Onkolojisi Dergisi*, 23, 200-207.

Klaunig, J.E., ve Kamendulis, L.M., (2004). The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacology Toxicol.*, 44, 239-67.

Kobayashi, Y., Sakai, D., Iwashina, T., (2009). Low-intensity pulsed ultrasound stimulates cell proliferation, proteoglycan synthesis and expression of growth factorrelated genes in human nucleus pulposus cell line. *European Cells and Materials*, 17, 15-22.

Kumar, N., Bhandari, P., Singh, B., Bari, S., (2005). Antioxidant activity and ultra-performance LC-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for phenolics-based fingerprinting of Rose species: *Rosa damascena*, *Rosa bourboniana* and *Rosa brunonii*. *Food and chemical toxicology*, 47, 361-367.

Kurt, N., (2008). Yaşa bağlı olarak antioksidan enzimlerinin süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) aktivitelerinin ve malondialdehit (MDA) seviyesinin incelenmesi. Adana, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya A.B.D.

LeBel, C.P., Ischiropoulos, H. and Bondy, S.C., (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stres. *Chem Res Toxicol.*, 5, 227-31.

Levy, A.P., Gerstein, H.C., Miller-Lotan, R., Ratner, R., McQueen, M., Loon, E., Pogue, J., (2004). The effect of vitamin E supplementation on cardiovascular risk in diabetic individuals with different haptoglobin phenotypes. *Diabetes care*, 27, 2267-2271.

Liev, F.Y., Li, Y., Millot, S., (1990). TFN-Alpha Induced Macrophage Leishmanicidal Activity is Mediated By Nitric Oxide From L-Arginine. *Immunology*, 71, 556-59.

Libster, M., (2002). *Delmars integrative herb guide for nurses*. Thomson Learning Alby, Delmar, 360-370.

Long, J., Gao, H., Sun, L., Liu, J. ve Zhao-Wilson X., (2009). Grape extract protects mitochondria from oxidative damage and improves locomotor dysfunction and extends lifespan in a Drosophila Parkinson's disease model. *Rejuvenation Research*, 12, 321-331.

Mahmood, N., Piacenet, S., Pizza, C., Bruke, A., Khan, A., Hay, A., (1996). *The anti-HIV activity and mechanisms of action of pure compounds isolated from Rosa damascena*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 229, 73-79.

Maleev, A., Neshtev, G., Stoianov, N., (1972). The ulcer protective and antiinflammatory effect of Bulgarian rose oil. *Ekperimentalna K.T.L.Sina, I. Morfologi. 11*, 55-60.

Mandavilli, B.S., Santos, J.H., ve Houten, B.V., (2002). Mitochondrial DNA Repair and Aging, *Mutat. Res.*, 509, 127-151.

Marx, J.L., (1987). Oxygen free radicals linked to many disease. *Science*, 235, 529-531.

McAnulty, R.J., Campa, J.S., Cambrey, A.D. & Laurent, G.J., (1991). The effect of transforming growth factor β on rates of procollagen synthesis and degradation *in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1091, 231-235.

McAnulty, R.J., (2006). Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 666-671.

Mukai, F.H., Goldstein, B.D., (1976). Mutagenicity of malondialdehyde : a decomposition product of polyunsaturated fatty acids, *Science* 191, 868.

Nagai, T., Kawashima, T., Suzuki, N., Tanoue, Y., Kai, N., Nagashima, T., (2007). Tea beverages made from Romanas rose (*Rosa rugosa* Thunb.) leaves possess strongly antioxidative activity by high contents of total phenols and vitamin C. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 5, 137-141.

Ng, T.B., Gao, W., Li, L., Niu, S.M., Zhao, L., Liu, J., Shi, L.S., Fu, M., Liu F., (2005). Rose (*Rosa rugosa*)-flower extract increases the activities of antioxidant enzymes and their gene expression and reduces lipid peroxidation. *Biochem. Cell Biol.* 83, 78–85.

Niwa, Y., Lizawa, O., Ishimoto, K., (1993). Age-dependent basal level and induction capacity of copper-zinc and manganese superoxide dismutase and other scavenging enzyme activities in leukocytes from young and elderly adults, *Am J Pathol*, 143, 312.

Nordberg, J., ve Arner, E.S.J., (2001). Reactive Oxygen species, Antioxidants and the Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology & Medicine*, 31, 1287-1312.

Occhiuto, F., Palumbo, D.R., Samperi, S., Zangla, G., Pino, A., De Pasquale, R., ve Circosta, C., (2009). The Isoflavones Mixture from *Trifolium pratense* L. Protects HCN 1-A Neurons from Oxidative Stress. *Phytotherapy Research*, 23, 192-6.

Ohashi, T., Mizutani, A., Murakami, A., Kojo, S., Ishii T, Taketani, S. (2002). Rapid oxidation of dichlorodihydrofluorescein with heme and hemoproteins: formation of the fluorescein is independent of the generation of reactive oxygen species. *FEBS Letters*, 511, 21-27.

Özkan, G., Sagdıç, O., Baydar, N.G., Baydar, H., (2004). Antioxidant and antibacterial activities of *Rosa damascena* flower extract. *Food Science and Technology International*, 10, 277-281.

Özelçi-Kavas, G.,(1989). Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 9, 1.

Özelçi-Kavas, G., (1994). Reaktif oksijen metabolitlerine fizyopatolojik yaklaşım. *Ankara Tıp Mecmuası*, 47, 579-592.

Özdaş, Ş.B., (2005). GSH-S- Konjugat transportu açısından farklı hücre soylarında hücre hasar mekanizmasının incelenmesi. İstanbul, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji A.B.D.

Pacheco-Palencia, L.A., Noratto, G., Hingorani, L., Talcott, S.T., ve Mertens-Talcott, S.U., (2008). Protective Effects of Standardized Pomegranate (*Punica granatum* L.) Polyphenolic extract in Ultraviolet-Irradiated Human skin Fibroblasts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 8434-8441.

Pitkanen, OM., Martin, JM., Hallman, M., Akerblom, HK., Sariola, H., Andersson, SM., (1992). Free radical activity during development of insulin dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Science*, 50, 335-339.

Rangaha, M.N., (2001). Rose- *Rosa damascena* 'Trigintipetala'. *Crop Food Res Broad Sheed*, 29.

Richard, K., (1994). Nitric Oxide Synthases. *The Biochemist*, 16, 3-6.

Robbins, SL., Kumar, V., Cotran, RS., (1989). *Pathologic basis of disease*. (4rd ed.) Philadelphia: Saunders Company, p 9.

Rodeiro, I., Donato, MT., Jiménez, N., Garrido, G., Delgado, R., Gómez-Lechón, MJ., (2007). Effects of *Mangifera indica* L. aqueous extract (Vimang) on primary culture of rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 2506- 2512.

Roomi, MW., Roomi, N., Ivanov, V., Kallinovskiy, T., Niedzwiecki, A., ve Rath, M., (2005). Inhibitory effect of a mixture containing ascorbic acid, lysine, proline and green tea extract on critical parameters in angiogenesis. *Oncology Rep.*, 14, 807-15.

Rosa, A., Atrezi, A., Deiana, M., Melis, M.P., Incani, A., Corona, G., Loru, D., Appendino, G., ve Dessi, M.A., (2008). Protective Effect of Vanilloids Against tert-Buthyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress in Vero Cell Culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3546-3553.

Salmon, AB., Sadighi Akha, AA., Buffenstein, R., Miller RA., (2008). Fibroblasts from Naked Mole-Rats Are Resistant to Multiple Forms of Cell Injury, But Sensitive to Peroxide, UV Light, and ER Stress. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*, 63, 232-241.

Sen, C.K., ve Packer, L., (2000). Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 653-669.

Schraufstatter, IU., Browne, K., Harris, A., (1986). Oxidant injury of cells : DNA strand-breaks activate polyadenosine-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenin dinucleotide, *J Clin Invest*, 77, 1312.

Shafei, M.N., Rakhshandah., H. Boskabady, M.H., (2003). Antitussive effect of *Rosa damascena* in guinea pigs. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 2, 231-234.

Sies, H., (1991). Role of Reactive Oxygen Species in Biological Processes. *Journal oh molecular medicine*, 69, 965-968.

Song, H.S., Park, T.W., Sohn, U.D., Shin, Y.K., Choi, B.C., Kim, C.J., ve Sim, S.S., (2008). The Effect of Caffeic Acid on Wound Healing in Skin-İncised Mice. *Korean Journal Physiology Pharmacology*. 12, 343-347.

Southorn, P. ve Powis, G. (1988) Free radical in medicine. I. Chemical and Biological reactions. *Mayo Clinic Proc.*, 6, 23-30.

Southorn, P., (1988). Free radicals in medicine II. Involment in human disease. *Mayo Clin. Proc.*, 63, 390- 408.

Steinman, H.M., (1982). *Superoxide Dismutases: Protein Chemistry Relationship*. İçinde In L.W, Oberley (ed) Superoxide Dismutase, Vol 1. Boca Ranton, Florida: CRC Press.

Tabrizi, H., Mortazavi, S.A., Kamalinejad, M., (2003). An *in vitro* evaluation of various *Rosa damascena* flower extracts as a natural antisolar agent. *Int. Journal Cosmetic Science*, 25, 259-65.

Vander, Zee, J., Van, Steveninck, J., Koster, J.F. ve ark. (1985). İnhibition of enzyme and oxidative damage of red blood cells induced by t-butylhydroperoxide-derived radicals. *Biochim. Biophys. Acta.*, 980, 175-180.

Ulusoy, S., Boşgelmez-Tınaz, G., Seçilmiş-Canbay, H., (2009). Tocopherol, carotene, phenolic contents and antibacterial properties of Rose essential oil, hydrosol and absolute. *Curr Microbiology*, 59, 554-558.

Uysal, M., (1998). Serbest radikaller; lipid peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik gelişim*, 11, 336-341.

Wolff, SP., Dean, RT., (1987). Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of «autoxidative glycosilation» in diabetes, *Biochem J*, 245, 243.

Wood, G., Bache, F., (1839). *The Dispensatory of United States of Amerika*.(4th ed.), Griggand Elliot, Philadelphia.

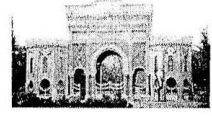
Yardıı-Akaydın, S., Sepici, A., Özkan, Y., Torun, M., Şimşek, B., Sepici, V., (2004). Oxidation of Uric Acid in Rheumatoid Arthritis: Is Allontoin a Marker of Oxidative Stress? *Free Radical Research*, 38, 623-628.

Zeki, H., Örmeci, Ş., Tamer, A., Toros, S., Bozkır, Ç., (1995). Isparta ilinde yağ güllerinde (*Rosa damascaena* Mill.) zarar yapan *Aurigena chiorana* cast. and *Gory* (Coleoptera: Buprestidae)'nın kısa biyolojisi ve mücadelesi üzerinde araştırmalar. *Tübitak Toag Gülar Proje No. 6*, 1-45.

ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



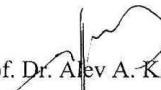
Sayı: 35

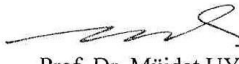
30/03/2009

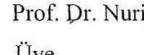
Sn. Doç. Dr. İlhan ONARAN
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaş Tıp Fakültesi


Karar No: 37
Başvuru Tarihi: 14/03/2009


Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Biyolog Zeynep KAHYA'ya ait "*Rosa damascena*'nın oksidatif strese karşı antioksidan ve antitoksik etkilerinin fibroblast hücre kültüründe değerlendirilmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur.

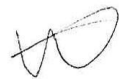

Prof. Dr. Alev A. KAYMAZ
İ.Ü. HADYEK Başkanı



Prof. Dr. Müjdat UYSAL
Üye

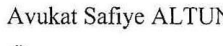

Prof. Dr. Nuriye AKEV
Üye

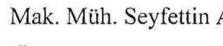

Prof. Dr. Gülderen ŞAHİN
Üye


Doç. Dr. Alper YILMAZ
Üye


Doç. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye


Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye


Avukat Safiye ALTUN
Üye


Mak. Müh. Seyfettin AVCI
Üye

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Zeynep	Soyadı	Kahya
Doğ.Yeri	Beyoğlu/İstanbul	Doğ.Tar.	29/10/1983
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	15107471028
Email	kahyazeynep83@gmail.com	Tel	5384143291

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2007
Lise	Sarıyer İmam Hatip Lisesi	2000

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	orta	iyi	53,50	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	77,322	78,757	80,364
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Windows office	iyi