NENSİ CAVAK

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL - 2016

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .

↓

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ; Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

SOĞUK VE İMMOBİLİZE STRES MODELİNİN SIÇAN DOKUSU RADİKAL METABOLİZMASINA ETKİSİ VE HİPPOPHAE RHAMNOİDES'İN KORUYUCU ROLÜNÜN İNCELENMESİ

NENSİ CAVAK

DANIŞMAN
PROF. DR. M. KORAY GÜMÜŞTAŞ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI

İSTANBUL - 2016

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Nensi Cavak tarafından hazırlanan Soğuk ve İmmobilize Stres Modelinin Sıçan Dokusu Radikal Metabolizmasına Etkisi ve Hippophae Rhamdoides'in Koruyucu Rolünün İncelenmesi başlıklı Yülsek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

05 / 01 / 2016

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) İmzası

1.Prof. Dr. Dildar Konukoğlu
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

2.Prof. Dr.M.Koray Gümüştaş
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

3.Prof. Dr.Emel Zengin
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

4..Prof. Dr.Hüseyin Sönmez
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

5.Prof. Dr.Ahmet Belce
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Fizyoterapi ve Reh. Böl.

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.

NENSİ CAVAK



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca sabrı ve hoşgörüsü ile desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle daima yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. M. Koray Gümüştaş'a,

Anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Dildar Konukoğlu'na ve eğitimimde emeği olan tüm anabilim dalı hocalarıma,

Analitik yöntemlerin uygulanmasında yoğun çalışmaları arasında yardımlarını esirgemeyen İstanbul Üniversiresi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Sema Demirci Çekiç ve ekibine,

Deney hayvanı laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımcı olan İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Hayvan Araştırma Laboratuvarı'ndan Tıbbi Bio. Çetin Karaca'ya ve Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Murat Mengi'ye,

Tezimin istatistik çalışmalarında destek olan İ.Ü. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu öğretim üyesi Yard. Doç. Dr. Penbe Çağatay'a,

Eğitimim boyunca birçok güzel anıyı paylaştığım ve her koşulda desteklerini hissettiğim bölüm arkadaşlarıma,

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle hep yanımda olan sevgili annem İlda ve babam Vartevar Cavak'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37483

IÇINDEKILER

TEZ ONAYI ..... **İİ**
BEYAN ..... **İİİ**
TEŞEKKÜR ..... **İV**
İÇİNDEKİLER ..... **V**
TABLOLAR LİSTESİ ..... **İX**
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **X**
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... **Xİİ**
ÖZET ..... **XV**
ABSTRACT ..... **XVİ**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. Radikal Metabolizması 3
2.1.1. Serbest Radikaller 3
2.1.2. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS) 4
2.1.2.1. Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$) 5
2.1.2.2. Hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) 6
2.1.2.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2) 6
2.1.2.4. Hipokloröz asit (HOCl) 7
2.1.2.5. Singlet oksijen ($O_2^{\downarrow\uparrow}$) 7
2.1.2.6. Hidroperoksil radikali ($HO_2^{\bullet}$) 7
2.1.2.7. Peoksil radikali ($ROO^{\bullet}$) 7
2.1.2.8. Alkoksil radikali ($RO^{\bullet}$) 8
2.1.3. Nitrik Oksit ve Nitrozatif Stres 8
2.1.4. Reaktif Nitrojen Türleri (RNS) 12
2.1.4.1. Peroksinitrit ($ONOO^-$) 12
2.1.4.2. Nitrotirozin (NT) 13
2.1.5. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri - Lipit Peroksidasyonu 13
2.1.6. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri - Protein Oksidasyonu 15
2.1.7. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere Etkileri – Oksidatif DNA Hasarı 16
2.2. Antioksidan Savunma Sistemleri 16

2.2.1. Enzimatik Antioksidanlar 18
2.2.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) 18
2.2.1.2. Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6).....19
2.2.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GPx; EC 1.11.1.9) 19
2.2.1.4. Glutatyon Redüktaz (GR; EC 1.8.1.7) 20
2.2.1.5. Glutatyon S-Transferaz (GST; EC 2.5.1.18).....21
2.2.1.6. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PDH; EC 1.1.1.49) 21
2.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....21
2.2.2.1. İndirgenmiş Glutatyon (GSH).....21
2.2.2.2. Vitamin C (Askorbik Asit).....23
2.2.2.3. Vitamin E (α-tokoferol) 25
2.2.2.4. Karotenoidler ve β-karoten 28
2.3. *Hippophae Rhamnoides* L.....29
2.3.1. Tarihçe 30
2.3.2. Taksonomi ve Tür Özellikleri.....31
2.3.3. İçerik 32
2.3.4. Preklinik Çalışmalar.....34
2.3.5. Güvenlik ve Toksisite Çalışmaları.....34
2.4. Stres.....36
2.4.1. Stres ve Deneysel Hayvan Modelleri.....38
2.4.2. Stres ve Gastrik Mukozal Hasar.....41
2.4.3. Fitokimyasallar ve Anti-ülserojenik Etkileri.....42
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....43
3.1. Kullanılan Aletler ve Kimyasal Maddeler 43
3.1.1. Aletler ve Cam Malzemeler 43
3.1.2. Kimyasal Malzemeler 43
3.2. Deney Hayvanlarına Uygulanan İşlemler 45
3.2.1. Deney Hayvanlarının Genel Özellikleri ve Deney Modeli 45
3.2.2. Doku Homojenizasyonu.....47
3.3. Yöntemler 48
3.3.1. 3-Nitrotirozin Miktar Tayini 48
3.3.1.1. Prensip.....48
3.3.1.2. Kullanılan Çözeltiler 48

3.3.1.3. 3-NT Standart Serisinin Hazırlanması 49
3.3.1.4. Yöntem 49
3.3.2. Nitrit-Nitrat Tayini 50
3.3.2.1. Prensip 50
3.3.2.2. Kullanılan Çözeltiler 50
3.3.2.3. Yöntem 51
3.3.2.4. Hesaplamalar 51
3.3.3. Total Glutatyon Miktar Tayini 52
3.3.3.1. Prensip 52
3.3.3.2. Deproteinasyon Ön İşlemi 52
3.3.3.3. Kullanılan Çözeltiler 53
3.3.3.4. GSH Standart Serisinin Hazırlanması 53
3.3.3.5. Yöntem 54
3.3.4. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi Tayini 55
3.3.4.1. Prensip 55
3.3.4.2. Kullanılan Çözeltiler 55
3.3.4.3. Yöntem 56
3.3.4.4. Hesaplama 56
3.3.5. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayini 57
3.3.5.1. Prensip 57
3.3.5.2. Kullanılan Çözeltiler 57
3.3.5.3. Yöntem 58
3.3.5.4. Hesaplama 58
3.3.6. Total Antioksidan Kapasite Tayini 59
3.3.6.1. Prensip 59
3.3.6.2. Kullanılan Çözeltiler 59
3.3.6.3. Yöntem 60
3.3.7. Total Tiyol Tayini 61
3.3.7.1. Prensip 61
3.3.7.2. Kullanılan Çözeltiler 61
3.3.7.3. Yöntem 62
3.3.8. Total Protein Tayini 63
3.3.8.1. Prensip 63

3.3.8.2. Kullanılan Çözeltiler 63
3.3.8.3. Yöntem 63
3.3.8.4. Hesaplama 64
3.3.9. İstatistiksel Analiz 64
4. BULGULAR 65
4.1. 3-Nitrotirozin Düzeyleri 67
4.2. Total Nitrit + Nitrat Düzeyleri 69
4.3. Total Glutatyon Düzeyleri 71
4.4. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi 73
4.5. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi 75
4.6. Total Antioksidan Kapasite Düzeyleri 77
4.7. Total Tiyol Düzeyleri 79
4.8. GSH/GSSG Düzeyleri 81
5. TARTIŞMA 83
KAYNAKLAR 88
ETİK KURUL KARARI 96
ÖZGEÇMİŞ 97

TABLOLAR LISTESI

Tablo 2-1: Serbest radikal kaynakları 4
Tablo 2-2: Reaktif oksijen türleri 5
Tablo 2-3: Biyolojik sistemlerde oluşabilecek reaktif nitrojen türleri 12
Tablo 2-4: Antioksidanların sınıflandırılması 17
Tablo 2-5: Askorbik asitin kofaktör olduğu bazı enzimler ve diğer metabolik rolleri ... 25
Tablo 2-6: SBT'nin kullanılan bölümleri ve kullanım alanları 30
Tablo 2-7: SBT'de bulunan major fitokimyasallar ve etkileri 33
Tablo 2-8: SBT'nin farklı bölümlerinin farmakolojik etkileri 35
Tablo 3-1: Ticari olarak temin edilen SBT preparatının 1 doz içeriği 46
Tablo 4-1: Karaciğer dokusu 3-nitrotirozin düzeyleri (pmol/mg protein) 67
Tablo 4-2: Beyin dokusu 3-nitrotirozin düzeyleri (pmol/mg protein) 68
Tablo 4-3: Karaciğer dokusu total nitrit + nitrat düzeyleri (nmol/mg protein) 69
Tablo 4-4: Beyin dokusu total nitrit + nitrat düzeyleri (nmol/mg protein) 70
Tablo 4-5: Karaciğer dokusu total glutatyon düzeyleri (nmol/mg protein) 71
Tablo 4-6: Beyin dokusu total glutatyon düzeyleri (nmol/mg protein) 72
Tablo 4-7: Karaciğer dokusu glutatyon peroksidaz aktivitesi (μmol/dk/mg protein) 73
Tablo 4-8: Beyin dokusu glutatyon peroksidaz aktivitesi (μmol/dk/mg protein) 74
Tablo 4-9: Karaciğer dokusu süperoksit dismutaz aktivitesi (U/mg protein) 75
Tablo 4-10: Beyin dokusu süperoksit dismutaz aktivitesi (U/mg protein) 76
Tablo 4-11: Karaciğer dokusu total antioksidan kapasite düzeyleri
(nmol askorbik asit eşdeğeri/mg protein) 77
Tablo 4-12: Beyin dokusu total antioksidan kapasite düzeyleri
(nmol askorbik asit eşdeğeri/mg protein) 78
Tablo 4-13: Karaciğer dokusu total tiyol düzeyleri (nmol sistein eşdeğeri/mg protein) 79
Tablo 4-14: Beyin dokusu total tiyol düzeyleri (nmol sistein eşdeğeri/mg protein) 80
Tablo 4-15: Karaciğer dokusu GSH/GSSG düzeyleri 81
Tablo 4-16: Beyin dokusu GSH/GSSG düzeyleri 82

ŞEKILLER LISTESI

Şekil 2-1: Peroksinitrit oluşumu ve kimyasal reaktivitesi 9
Şekil 2-2: NO sentezi 10
Şekil 2-3: NOS monomeri 11
Şekil 2-4: Çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu 14
Şekil 2-5: Bazı enzimatik antioksidanlar arasındaki ilişki ve H_2O_2'nin enzimatik detoksifikasyonu 20
Şekil 2-6: Glutatyon yapısı 22
Şekil 2-7: Glutatyonun antioksidan etkileri 23
Şekil 2-8: Askorbik asidin antioksidan savunmadaki rolü 24
Şekil 2-9: Lipit peroksidasyonunda tokoferolün rolü 26
Şekil 2-10: Lipofilik ve hidrofilik antioksidanlar arasındaki ilişki 27
Şekil 2-11: Vitamin E ve vitamin C arasındaki ilişki 27
Şekil 2-12: Bitkisel kaynaklı antioksidanlar 28
Şekil 2-13: SBT genel görünüşü 29
Şekil 2-14: Nehir ve dere kıyılarında yetişen SBT taksonlarına ait genel görünüş (Kastamonu-Tosya) 32
Şekil 3-1: Soğuk ve immobilizasyon stres modeli 46
Şekil 3-2: 3-Nitrotirozin standart eğrisi 49
Şekil 3-3: Nitrat strandart eğrisi 51
Şekil 3-4: GSH döngüsü 52
Şekil 3-5: Total glutatyon standart eğrisi 54
Şekil 3-6: NBT ve SOD aktivitesi 57
Şekil 3-7: Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlar ile reaksiyonu sonucu Cu(I)-Nc kelatının oluşumu 59
Şekil 3-8: Askorbik asit standart eğrisi 60
Şekil 3-9: Ellman reaktifinin tiyol grupları ile etkileşimi 61
Şekil 3-10: Sistein standart eğrisi 62
Şekil 3-11: Albümin standart eğrisi 64
Şekil 4-1: Gruplara ait karaciğer dokusu 3-nitrotirozin düzeylerinin karşılaştırılması 67
Şekil 4-2: Gruplara ait beyin dokusu 3-nitrotirozin düzeylerinin karşılaştırılması 68

Şekil 4-3: Gruplara ait karaciğer dokusu total nitrit + nitrat düzeylerinin karşılaştırılması 69
Şekil 4-4: Gruplara ait beyin dokusu total nitrit + nitrat düzeylerinin karşılaştırılması . 70
Şekil 4-5: Gruplara ait karaciğer dokusu total glutatyon düzeylerinin karşılaştırılması 71
Şekil 4-6: Gruplara ait beyin dokusu total glutatyon düzeylerinin karşılaştırılması 72
Şekil 4-7: Gruplara ait karaciğer dokusu glutatyon peroksidaz aktivitelerinin karşılaştırılması 73
Şekil 4-8: Gruplara ait beyin dokusu glutatyon peroksidaz aktivitelerinin karşılaştırılması 74
Şekil 4-9: Gruplara ait karaciğer dokusu süperoksit dismutaz aktivitelerinin karşılaştırılması 75
Şekil 4-10: Gruplara ait beyin dokusu süperoksit dismutaz aktivitelerinin karşılaştırılması 76
Şekil 4-11: Gruplara ait karaciğer dokusu total antioksidan kapasite düzeylerinin karşılaştırılması 77
Şekil 4-12: Gruplara ait beyin dokusu total antioksidan düzeylerinin karşılaştırılması . 78
Şekil 4-13: Gruplara ait karaciğer dokusu total tiyol düzeylerinin karşılaştırılması 79
Şekil 4-14: Gruplara ait beyin dokusu total tiyol düzeylerinin karşılaştırılması 80
Şekil 4-15: Gruplara ait karaciğer dokusu GSH/GSSG düzeylerinin karşılaştırılması .. 81
Şekil 4-16: Gruplara ait beyin dokusu GSH/GSSG düzeylerinin karşılaştırılması 82

SEMBOLLER / KISALTMALAR LISTESI

3-NT : 3-Nitrotirozin

8OhdG : 8-hidroksi deoksiguanozin

ACTH : Adrenokortikotropik hormon

ADP : Adenozin difosfat

BH_4 : Tetrahidrobiopterin

CaM : Kalmodulin

CAT : Katalaz

cGMP : Siklik guanozin monofosfat

CRF : Kortikotropin-salgılatıcı faktör

DTNB : 5,5'ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit (Ellman reaktifi)

FAD : Flavin adenin dinükleotit

FMN : Flavin mononükleotit

G6PDH : Glukoz 6-fosfat dehidrojenaz

GPx : Glutatyon peroksidaz

GR : Glutatyon redüktaz

GSH : İndirgenmiş glutatyon

GSSG : Oksitlenmiş glutatyon

GST : Glutatyon S-transferaz

H_2O_2 : Hidrojen peroksit

HCO_3^- : Bikarbonat

$HO_2^\bullet$: Hidroperoksil radikali

HOCl : Hipokloröz asit

HPA : Hipotalamus-hipofiz-adrenal aks

$L^\bullet$: Lipit radikali

LDL **:** Düşük yoğunluklu lipoprotein

$LOO^{\bullet}$ **:** Lipit peroksit radikali

LOOH **:** Lipit hidroperoksit

Medyan (Min-Mak) **:** Medyan (Minimum - Maksimum)

MES **:** 2-(N-morpholino) etanosülfonik asit

MPA **:** Metafosforik asit

MPO **:** Miyeloperoksidaz

N_2O **:** Nitröz oksit

N_2O_2 **:** Dinitrojen dioksit

N_2O_3 **:** Dinitrojen trioksit

N_2O_4 **:** Dinitrojen tetraoksit

N_2O_5 **:** Dinitrojen pentaoksit

NADPH **:** İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

NBT **:** Nitroblue tetrazolium

Nc **:** Neokuprin

NO **:** Nitrik oksit

NO^{-} **:** Nitroksil anyonu

NO^{+} **:** Nitrozil katyonu

NO_2^{-} **:** Nitrit

NO_2^{+} **:** Nitril katyonu

$NO_2^{\bullet}$ **:** Nitrojen dioksit radikali

NO_3^{-} **:** Nitrat

NOS **:** Nitrik oksit sentaz

NT **:** Nitrotirozin

N^{ω} **:** Guanido azot

$O_2^{\downarrow\uparrow}$ **:** Singlet oksijen

$O_2^{\bullet-}$ **:** Süperoksit radikali

O_2NOO^- **:** Peroksinitrat

O_3 **:** Ozon

$OH^\bullet$ **:** Hidroksil radikali

$ONOO^-$ **:** Peoksinitrit

Ort + SS **:** Ortalama + Standart Sapma

PCO **:** Protein karbonil

PG **:** Prostaglandin

PUFA **:** Çoklu doymamış yağ asidi

$R^\bullet$ **:** Alkil radikali

RNS **:** Reaktif nitrojen türleri

$RO^\bullet$ **:** Alkoksi radikali

$ROO^\bullet$ **:** Peroksil radikali

ROOH **:** Hidroperoksit

ROS **:** Reaktif oksijen türleri

SBT **:** Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.)

SDS **:** Sodyum dodesil sülfat

-SH **:** Tiyol grubu

SOD **:** Süperoksit dismutaz

TEAM **:** Trietanolamin

TNB **:** 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit

TrxR **:** Tiyoredoksin redüktaz

$Tyr^\bullet$ **:** Tirozil radikali

UDP **:** Üridin difosfat

ÖZET

Cavak N. Soğuk ve İmmobilize Stres Modelinin Sıçan Dokusu Radikal Metabolizmasına Etkisi ve Hippophae rhamnoides'in Koruyucu Rolünün İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2016.

Soğuk ve immobilizasyon stresi, oksidan-antioksidan dengede meydana gelen değişimlerin incelenmesinde yaygın olarak kullanılan bir modeldir. Hippophae rhamnoides L. (Seabuckthorn:SBT), son zamanlarda ağırlıklı olarak tıbbi ve besinsel potansiyeli nedeniyle dünya çapında ilgi gören ve biyoyararlılığı olan bir bitkidir. Bu çalışmada soğuk ve immobilizasyon stresi ile indüklenen oksidatif ve nitrozatif streste, yüksek antioksidan içerikli doğal bitkisel bir ürün olan SBT'nin sıçan karaciğer ve beyin dokularındaki koruyucu rolünün incelenmesi amaçlanmıştır. 32 adet Wistar-albino soyu erkek sıçan rastgele 4 gruba ayrılarak, Kontrol (i.p.fizyolojik salin), SBT (i.p.200 mg/kg/48saat SBT), Stres (i.p.fizyolojik salin; 6saat soğuk+immobilizasyon stresi) ve SBT+Stres (i.p.200 mg/kg/48saat SBT; 6saat soğuk+immobilizasyon stresi) grupları oluşturulmuştur. Karaciğer ve beyin dokularında deney parametrelerinden 3-nitrotirozin ELISA yöntemi ile, total antioksidan kapasite, total tiyol, total glutatyon, nitrit-nitrat düzeyleri ile süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri ise kolorimetrik yöntemlerle ölçülmüştür. Karaciğer ve beyin dokularında Stres grubu ile karşılaştırıldığında SBT+Stres grubunda nitrit+nitrat (sırasıyla,p=0,0001,p=0,002), total glutatyon düzeyleri (sırasıyla,p=0,0001,p=0,0001) ve glutatyon peroksidaz (sırasıyla,p=0,0001,p=0,005) aktiviteleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Süperoksit dismutaz aktivitesinin ise hem karaciğer hem beyin dokularında Stres grubu ile karşılaştırıldığında SBT+Stres grubunda anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır (sırasıyla,p=0,007,p=0,007). Total tiyol ve total antioksidan kapasite düzeylerinde ise karaciğer ve beyin dokularında Stres grubu ile karşılaştırıldığında Stres+SBT grubunda anlamlı bir fark saptanmamıştır. Oksidatif ve nitrozatif stres göstergesi olan 3-nitrotirozin düzeyleri ise her iki dokuda da Kontrol grubuna göre Stres+SBT grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuş (sırasıyla,p=0,002,p=0,0001), ancak Stres grubu ile Stres+SBT grubu karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Tüm bu sonuçlar soğuk ve immobilizasyon ile indüklenen oksidatif ve nitrozatif streste SBT'nin antioksidan özelliğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Hippophae rhamnoides L, Oksidatif ve nitrozatif stres, Karaciğer, Beyin, Antioksidan

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37483

ABSTRACT

Cavak N. The Effect of Rat Tissue Radical Metabolism and the Protective Role of Hippophae rhamnoides on Cold and Immobilization Stress Model. Istanbul University, The Institute of Health Sciences, Department of Medical Biochemistry, Graduate Thesis. Istanbul. 2016.

Cold and immobilization stress is a widely used model for study the changes that occur on oxidant-antioxidant balance. Hippophae rhamnoides L.(Seabuckthorn:SBT) a unique and valuable plant has recently gained worldwide attention, mainly for its medicinal and nutritional potential. This study was aimed to investigate the protective role of SBT which is a natural herbal product with high antioxidant content on oxidative and nitrosative stress induced by cold and immobilization stress in rats. 32 Wistar albino rats were divided into 4 groups randomly. Control (i.p.physiological saline), SBT (i.p.200mg/kg/48h SBT), Stres (i.p.physiological saline;6h cold+immobilization stress) and SBT+Stres (i.p.200mg/kg/48h SBT;6h cold+immobilization stress) groups were formed. Liver and brain tissue 3-nitrotyrosine levels were determined by ELISA whereas total antioxidant capacity, total thiol, total glutathione, nitrite-nitrate levels and superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities were measured by colorimetric methods. SBT+Stress group liver and brain tissue nitrite-nitrat (p=0,0001,p=0,002,respectively), total glutathione (p=0,0001,p=0,0001,respectively) levels and glutathione peroxidase activities (p=0,0001,p=0,005,respectively) were found to be significantly higher whereas superoxide dismutase activities were found to be lower (p=0,007,p=0,007,respectively) when compared to Stress group. There was no significant differences between Stress group total thiol and total antioxidant capacity levels compared with Stress+SBT group in liver and brain tissues. Stress+SBT group liver and brain tissue oxidative and nitrosative stress marker 3-nitrotyrosine levels were found to be significantly higher when compared with Control group (p=0,002,p=0,0001,respectively) whereas there was no significant differences between Stress and Stress+SBT groups. All this data show that SBT has antioxidant properties on cold and immobilization induced oxidative and nitrosative stress.

Key Words: Hippophae rhamnoides L, Oxidative and nitrosative stress, Liver, Brain, Antioxidant

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 37483

1. GIRIŞ VE AMAÇ

Stres, organizmada homeostazı bozma eğiliminde olan fiziksel, mental, duygusal, internal veya eksternal tüm olumsuz uyarılara karşı oluşan biyolojik reaksiyonların toplamı olarak tanımlanmaktadır (65). Stres durumunda NO ve ROS üretimi arttığı, GPx, CAT ve SOD gibi çeşitli serbest radikal detoksifiye edici enzim aktivitelerinin azaldığı gösterilmiştir. Beyin dokusu yüksek miktarda PUFA içerdiğinden, oksidatif stresin yol açtığı lipit peroksidasyonundan etkilenmekte ve bu reaksiyonlar beyin dokusu hücre membranında yapısal ve fonksiyonel hasara yol açmaktadır (66). Strese maruziyet için farklı hayvan modelleri geliştirilmiş, doğal ve sentetik kökenli bileşiklerin anti-stres aktivitelerini değerlendirmek amacıyla bu yöntemler sıkça kullanılmıştır. Birçok fiziksel stres modelinin temeli, vücut ısısındaki değişimlere dayanmaktadır. Tek bir etkene kıyasla, farklı stres etkenlerinin kombinasyonunun daha iyi uyaran olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle biz de çalışmamızda hem soğuk hem de hareketsizlik ortamı yaratarak stres oluşturmayı planladık (67).

Hippophae rhamnoides L.'nin (Seabuckthorn: SBT), stresin yarattığı oksidatif değişikliklere karşı antioksidan etkileri bulunmaktadır (40, 41). SBT'nin önemi, içeriğinin besinsel değerinden kaynaklanmaktadır. SBT'nin tüm bölümleri, vitaminler, karotenoidler, fitosteroller, organik asitler, PUFA ve bazı esansiyel aminoasitler gibi çok sayıda biyoaktif madde kaynağı olarak değerlendirilmektedir (34-36). SBT ile ilişkili yapılan çeşitli preklinik çalışmalarda SBT'nin antioksidan, immünomodülatör, anti-kanser, anti-bakteriyel ve anti-viral etkilere sahip olduğu, karaciğer koruyucu, anti-stres, adaptojenik, kardiyoprotektif ve anti-aterojenik aktivite gösterdiği, radyasyona karşı koruyucu, akut ve kronik yaralarda iyileştirici etki gösterdiği saptanmıştır (40-62). Yapılan literatür araştırmalarında stres etkenine karşı SBT'nin koruyucu rolünün beyin dokusundaki etkilerine ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu bilgiler ışığında, çalışmanın amacı SBT'nin hem karaciğer hem de beyin dokusunda bu deney modelinin yarattığı oksidatif ve nitrozatif stresten korumada yüksek antioksidan içeriğinin ne ölçüde etki gösterebileceğini incelemektir. Bir başka deyişle amacımız, elde edilen sonuçların yüksek antioksidan içerikli doğal bitkisel bir ürünün, süplementasyon olarak kullanılmasının canlı organizmada oksidatif ve

nitrozatif stresten ne ölçüde koruma sağladığı ve özellikle beyin dokusundaki etkileri ile ilgili yol gösterdiğinin bilimsel kanıtlarını oluşturmaktır. Bu doğrultuda sonuçlar anlamlı bulunduğu takdirde, daha ileri analizler ile birlikte SBT içerikli formülasyonlar, antioksidan artışı sağlamak ve immün sistemi güçlendirmek amacıyla bitkisel ilaç, fonksiyonel besin ve suplement olarak geliştirilmesine katkı sağlamak bir diğer amacımız olacaktır.

2. GENEL BILGILER

2.1. Radikal Metabolizması

2.1.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküllerdir. Serbest radikaler pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Eşleşmemiş elektronları nedeniyle son derece reaktif bir yapıya sahip olabilen serbest radikaller, diğer moleküllerle hızla reaksiyona girerek elektron kaybetmelerine neden olurlar (1).

Serbest radikaller başlıca üç temel mekanizma ile oluşur:

- Radikal özelliği olmayan bir atom veya molekülün, bir elektron kaybetmesi ile,

$$X \rightarrow e^- + X^{\bullet +}$$

- Radikal özelliği olmayan bir atom veya molekül yapısına tek bir elektron transferi ile,

$$Y + e^- \rightarrow Y^{\bullet -}$$

- Kovalent bağın kırılması sonucunda, bağ yapısındaki eşleşmiş elektronlardan her birinin molekülün her bir parçasında kalması ile (homolitifikasyon).

$$X{:}Y \rightarrow X^{\bullet} + Y^{\bullet}$$

Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluşabildiği gibi, dış etkenlerin etkisiyle de oluşur. Çok kısa yaşam süreli, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif yapılı olan serbest radikaller, tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği gösterirler.

Endojen ve eksojen serbest radikal kaynakları Tablo 2-1'de gösterilmiştir. Aerobik organizmalar için serbest radikallerin başlıca kaynağı oksijendir. Normal metabolizmada moleküler oksijenin %98'i ksantin oksidaz yoluyla suya indiregenirken, geri kalanı oksijenaz yoluyla potansiyel olarak toksik reaktif ürünlere dönüşür.

$$\overset{4e^-}{\underset{\downarrow}{\vdash\!\!\!

Tablo 2-1: Serbest radikal kaynakları

Endojen Kaynaklar:	**Eksojen Kaynaklar:**
- Mitokondriyal elektron transport zinciri	- Diyet faktörleri
- Mikrozomal elektron transport zinciri	- Çevresel faktörler
- Karma fonksiyonlu oksidazlar (ksantin oksidaz gibi)	- İlaçlar
- Solunumsal patlama	- Radyasyon
- Prostoglandin sentezi	- Toksik kimyasallar
- Otooksidasyon reaksiyonları	

2.1.2. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Oksidatif stres, oksidan (ROS ve RNS) ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin, oksidan maddelerin lehine kayması olarak tanımlanır (2).

Oksijenli ortamda, çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle oluşan ROS, hücresel protein, karbonhidrat, nükleotit ve lipitler ile reaksiyona girerek yapı ve fonksiyonlarında modifikasyona neden olur. Oluşan zarar verici biyokimyasal reaksiyonlar diabetes mellitus, obezite, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, inflamasyon, iskemi/reperfüzyon hasarı, nörodejeneratif hastalıklar, hipertansiyon ve yaşlanmanın patogenezine yol açan önemli faktörlerdir (3).

Radikal ve non-radikal olarak sınıflandırılan reaktif oksijen türleri Tablo 2-2'de gösterilmiştir.

Tablo 2-2: Reaktif oksijen türleri

Radikaller	**Non-Radikaller**
- Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$)	- Hidrojen peroksit (H_2O_2)
- Hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$)	- Hipokloröz asit (HOCl)
- Alkoksi radikali ($RO^{\bullet}$)	- Ozon (O_3)
- Peoksil radikali ($ROO^{\bullet}$)	- Singlet oksijen ($O_2^{\downarrow\uparrow}$)
- Hidroperoksil radikali ($HO_2^{\bullet}$)	

2.1.2.1. Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$)

Süperoksit radikali aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur.

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$$

Süperoksit radikalinin aerobik canlı organizmalarda en önemli kaynağı mitokondriyal elektron transport sistemidir. $O_2^{\bullet-}$, ksantin oksidaz veya flavoenzimler tarafından da endojen olarak üretilir. $O_2^{\bullet-}$ üreten diğer enzimler ise lipoksijenaz ve siklooksijenazdır. Aktive olan fagositik hücrelerde membrana bağlı enzim kompleksi olan NADPH-oksidaz ile de yüksek düzeylerde $O_2^{\bullet-}$ üretimi gerçekleşir. $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 oluşumu için de öncü molekül olarak görev alır. NO ile reaksiyona girerek, $ONOO^-$ oluşumunda da rol oynar (4).

2.1.2.2. Hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$)

Yarılanma ömrü kısa ve bilinen en reaktif oksijen radikali olan $OH^{\bullet}$ çeşitli mekanizmalarla oluşabilir (4).

a. Fenton reaksiyonu ile;

H_2O_2, Fe^{2+} ve diğer geçiş elementleri (Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenerek $OH^{\bullet}$'ı oluşturur.

$$Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$
$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$$

b. Haber-Weiss reaksiyonu ile;

H_2O_2, $O_2^{\bullet-}$ ile reaksiyona girerek $OH^{\bullet}$'ı oluşturur. Bu reaksiyon bakır ve demir iyonları tarafından katalizlenir.

$$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{\bullet} + OH^-$$

c. H_2O_2'in oksijen bağlarının ultraviyole etkisiyle homolitik yarılması sonucu $OH^{\bullet}$ oluşabilir.

$$H_2O_2 \rightarrow 2\ OH^{\bullet}$$

d. $OH^{\bullet}$ ayrıca suyun yüksek enerjili iyonizasyonu (X veya γ ışını) sonucu da oluşabilir.

$$H_2O \rightarrow H^{\bullet} + OH^{\bullet}$$

2.1.2.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

H_2O_2, yapısında eşleşmemiş elektron içermediğinden radikal değildir. Yüksüz bir molekül olduğundan hücre içine kolaylıkla girebilir. H_2O_2, oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesi sonucunda ya da $O_2^{\bullet-}$'nin enzimatik veya non-enzimatik dismutasyon tepkimeleri sonucunda oluşur. Biyolojik önemi, geçiş metalleri ile reaksiyona girerek $OH^{\bullet}$ için kaynak oluşturmasıdır. Fe^{2+} ile H_2O_2 reaksiyona girerek $OH^{\bullet}$'ı oluşturur (Fenton reaksiyonu) (2, 4).

$$O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$
$$O_2^{\bullet-} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$
$$2\ O_2^{\bullet-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

2.1.2.4. Hipokloröz asit (HOCl)

HOCl de radikal olmayan ROS'lar arasında yer alır. Aktive olmuş nötrofillerde miyeloperoksidaz (MPO) isimli enzim tarafından üretilir. Aktive olan nötrofiller, monosit ve makrofajlar, eozinofiller $O_2^{\bullet-}$ üretirler. Radikal üretimi fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde büyük önem taşır. Özellikle nötrofiller, yapısında hem içeren ve sitoplazmik bir enzim olan MPO aracılığı ile $O_2^{\bullet-}$'nin dismutasyonu ile oluşan H_2O_2'yi klorür iyonu ile birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'ye dönüştürür (4).

$$H^+ + Cl^- + H_2O_2 \xrightarrow{MPO} HOCl + H_2O$$

2.1.2.5. Singlet oksijen ($O_2^{\downarrow\uparrow}$)

Yapısında ortaklanmamış elektron bulundurmaması nedeniyle serbest oksijen radikali olmayıp, ROS grubunda yer alan bir moleküldür. $O_2^{\downarrow\uparrow}$ oluşumu fotokimyasal reaksiyonlarda oldukça önemlidir. Delta ve sigma olmak üzere iki tipi mevcuttur. Delta tipi termodinamik olarak daha stabil olduğundan daha yaygındır. Sigma tipi ise daha reaktiftir ve hızla delta tipine dönme eğilimindedir. $O_2^{\downarrow\uparrow}$, oksijen elektronlarının dışarıdan enerji alması sonucunda kendi dönüş yönünün ters yönündeki farklı bir yörüngeye geçmesi ile oluşabileceği gibi, $O_2^{\bullet-}$'nin dismutasyonu ve MPO'nun katalizlediği H_2O_2'nin HOCl ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir. $O_2^{\downarrow\uparrow}$, membran lipitlerini de içeren birçok molekülü oksitleyebilir (2, 5).

2.1.2.6. Hidroperoksil radikali ($HO_2^{\bullet}$)

$O_2^{\bullet-}$ asidik ortamda daha reaktif olup protonlanarak kendisinden daha kuvvetli bir oksidan olan $HO_2^{\bullet}$'yi oluşturur (3).

$$O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow HO_2^{\bullet}$$

2.1.2.7. Peoksil radikali ($ROO^{\bullet}$)

Alkil radikalleri, $OH^{\bullet}$'nin başta yağ asitleri olmak üzere, nükleik asitler, karbonhidratlar ve proteinler gibi çeşitli moleküllerden bir proton çıkarması sonucunda

oluşur. Karbon merkezli bu $R^{\bullet}$'ler hızlı bir şekilde O_2 ile reaksiyona girerek $ROO^{\bullet}$'yu oluştururlar. Oluşan $ROO^{\bullet}$ çok uzun ömürlü olup, lipit peroksidasyonunu başlatır (3).

$$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$$

2.1.2.8. Alkoksil radikali ($RO^{\bullet}$)

$ROO^{\bullet}$'dan bir oksijen atomu çıkması sonucunda oluşur (3).

2.1.3. Nitrik Oksit ve Nitrozatif Stres

Azot monoksit veya nitrojen monoksit olarak da bilinen ve kararsız bir yapıya sahip olan NO, küçük molekül ağırlıklı, renksiz, kokusuz ve toksik bir gazdır. Suda ve daha kolay bir şekilde organik çözücülerde çözünebilen ve kısa ömürlü bir moleküldür. Nötr olduğundan hücre membranından kolaylıkla geçip, otokrin ve parakrin davranış göstererek efektör molekül olarak rol oynar (1, 3).

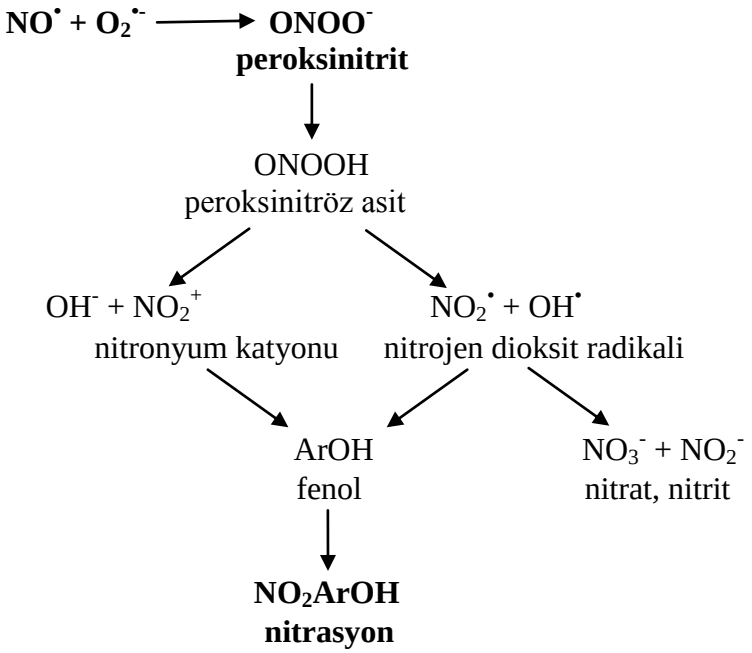
Dış yörüngesinde eşleşmemiş elektron bulunması nedeniyle radikal özelliği taşıyan NO molekülünde paylaşılmamış elektron nitrojen atomu üzerinde yerleşik değil, nitrojen ve oksijen atomları üzerinde delokalize halde bulunur. NO radikalinin bu özelliği kendi reaktivitesini baskılar, stabilitesini arttırır ve biyolojik koşullarda sentezlendiği yerden daha uzak mesafeye difüzyonunu sağlar. Oksi radikallerde paylaşılmamış elektron tek atom üzerine lokalize olduğundan, bu radikaller son derece reaktif, kısa ömürlü ve kısıtlı difüzyona sahiptirler (6).

NO, O_2, $O_2^{\bullet-}$ ve Fe, Cu, Co, Mn gibi geçiş metalleri ile reaksiyona girer. Eşleşmemiş elektronlarından biri tek e^- oksidasyonu ile uzaklaştırılırsa NO^+, tek e^- redüksiyonu ile de NO^- oluşur. NO'nun $O_2^{\bullet-}$ ile reaksiyonu sonucu oluşan $ONOO^-$ anyon radikali, serbest radikal olmayan ancak çok kısa ömürlü ve öncüllerinden daha reaktif, kararlı yapıda bir moleküldür. Fizyolojik pH'da protonlanması sonucunda $OH^{\bullet}$ gibi davranan ve kuvvetli bir oksidan madde olan ONOOH oluşur. Oluşan bu ONOOH ise çok kararsızdır ve hızla NO_3^-'e dönüşür. NO'nun oksijenli çözeltilerde otooksidasyonu sonucu oluşan tek kararlı ürünü ise NO_2^-'dir (7) (Şekil 2-1).

$$O_2 + NO^{\bullet} \rightarrow ONOO^-$$

$$NO^{\bullet} + O_2^{\bullet-} \rightarrow ONOO^- + H^+ \rightarrow ONOOH$$

$$ONOOH \rightarrow OH^{\bullet} + NO_2^- \rightarrow NO_3^-$$



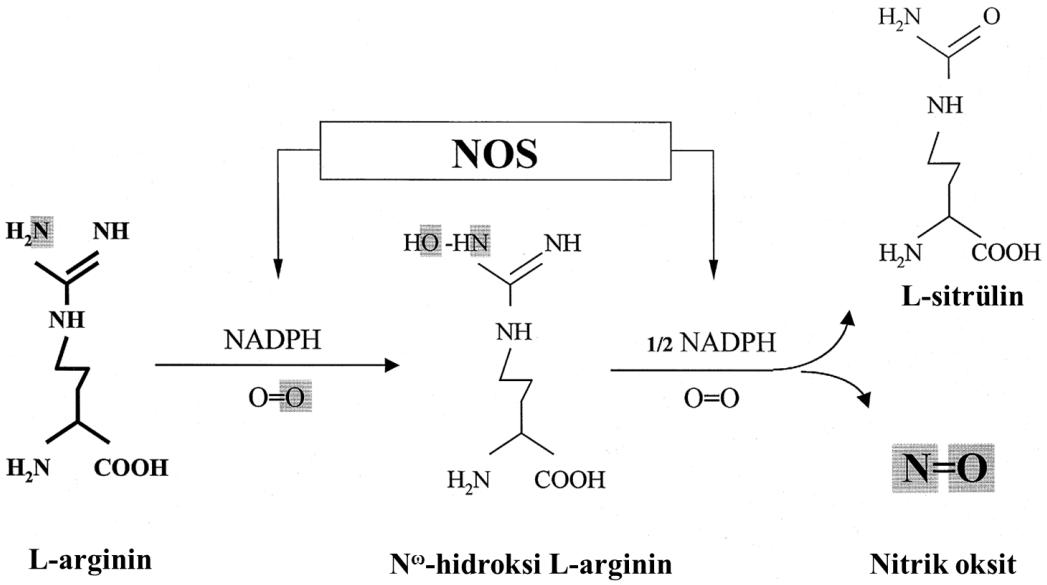
Şekil 2-1: Peroksinitrit oluşumu ve kimyasal reaktivitesi

NO, sinir sistemi ve vasküler sistemde birçok fizyolojik role sahiptir. Nöronların proliferasyon ve farklılaşmasında, sinaptik aktivitede, nöral plastisitede ve hafıza fonksiyonunda görev alır. Sinir sisteminde nörotransmisyon ve nöromodülasyonda, vasküler sistemde ise kan basıncının düzenlenmesinde, trombosit agregasyon ve adezyonunun önlenmesinde görev alır. İmmün sistem hücrelerinde spesifik olmayan savunma mekanizmalarına ve makrofaj aracılı hücre ölümüne katılan NO, antitümör, sitotoksik ve antimikrobiyal etkilerini yüksek konsantrasyonlarda gösterir. Düşük konsantrasyonlarda guanilat siklazı stimüle ederek vazodilatasyonda, nöronal sinyal iletiminde ve nöroendokrin aktivitede rol oynar (8).

Damar düz kas hücrelerinde guanilat siklazın hem prostetik grubundaki ferröz demir ile reaksiyona giren NO, cGMP düzeylerini arttırarak vazorelaksasyona neden olur. Yine benzer bir etkiyle cGMP bağımlı bir mekanizma ile trombosit agregasyonunu inhibe eder. NO, değişik dokularda ADP-riboziltransferazların aktivasyonu yoluyla, ADP-ribozilasyonunu uyarır. G proteinlerinin ADP ribozilasyonuna, nörotransmisyonda ve ayrıca arteriyal tonusun kontrolünde de ihtiyaç vardır (6, 9).

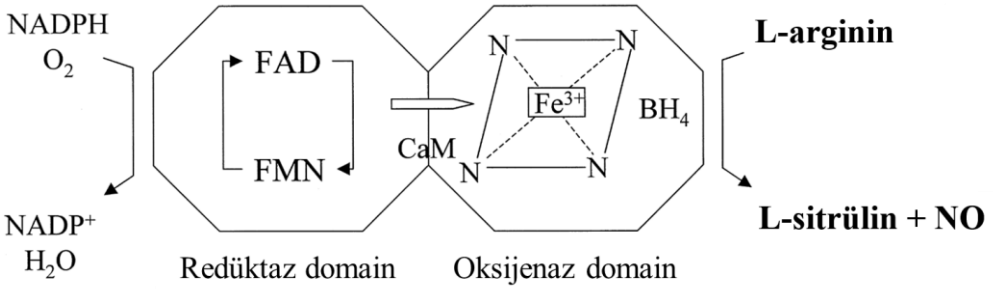
NO, lokal olarak başlıca endotelyum ve sinir hücreleri olmak üzere makrofajlar, trombositler ve düz kas hücrelerinde NOS (EC 1.14.13.39) aracılığı ile L-arginin'in

terminal guanido azotunun hidrolize uğrayarak L-sitrüline dönüşümü sırasında meydana gelir. İki basamaklı olan bu tepkimenin ilk basamağında argininin guanido nitrojeni hidroksillenerek oldukça stabil N^{ω}-hidroksi L-arginin oluşur. Enzime sıkı bağlı olan bu ara ürün ikinci aşamada L-sitrülin ve NO oluşturmak üzere ileri oksidasyona uğrar. Reaksiyon sırasında kalmoduline (CaM), kosubstrat olarak O_2 ve NADPH'a, kofaktör olarak BH_4, FAD, FMN ve hem (protoporfirin IX)'e ihtiyaç vardır (10) (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: NO sentezi

Bidomain yapıya sahip ve polipeptit zincirinde hem bölgesi içeren kompleks bir enzim olan NOS, amino terminalinde oksijenaz, karboksi terminalinde ise redüktaz aktivitesine sahiptir. CaM, redüktazın amino terminaline bağlanarak oksijenaza elektron akımı için gerekli olduğundan her üç NOS izoformu da kofaktör olarak CaM'a ihtiyaç duyar. Enzimin N-terminali hem, BH_4 ve L-arginin için, C-terminali FAD, FMN ve NADPH için bağlanma bölgeleri içerir (10) (Şekil 2-3).



Şekil 2-3: NOS monomeri

NOS'un nöronal form, endoteliyal form ve indüklenebilir form olmak üzere 3 izoformu bulunur (10):

A. Konstitütif form (cNOS):

a. Nöronal NOS (nNOS, Tip I)

b. Endoteliyal NOS (eNOS, Tip III)

B. İndüklenebilir form: İndüklenebilir NOS (iNOS, Tip II)

nNOS, 1433 aminoasit uzunluğunda ve 161 kDa ağırlığında, eNOS ise 1153 aminoasit uzunluğunda ve 133 kDa ağırlığındadır. nNOS ve eNOS formlarının aktiviteleri Ca^{2+} ve CaM'a mutlak bağımlıdır. Hücre içinde artan Ca^{2+}, CaM ile bir kompleks oluşturarak eNOS'u aktive eder. Endotel hücresi tarafından sentezlenen NO, guanilat siklazı aktive ederek düz kaslarda gevşemeye neden olur. nNOS ise beyin ve periferik nöronlarda salınan izoenzimdir. Nörotransmitter veya nöromodülatör olarak etki eder. RNA ve protein ekspresyonları süreklidir. nNOS ve eNOS isimli enzimler düşük miktarlarda (pM) ve kısa süreli NO sentezine yol açarlar (10).

iNOS, 1203 aminoasit uzunluğunda ve 131 kDa ağırlığındadır. iNOS enzim indüksiyonu çeşitli bakteriyel ürünlere ve proinflamatuvar sitokinlere bağımlıdır. Enzim alt birim olarak CaM'a ihtiyaç duyarken, aktivitesi hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonuna bağımlı değildir (9). nM düzeyde üretilen iNOS etkisi uzun sürelidir (10).

NO önemli miktarlarda oluştuğunda ve hücresel mikroortam değiştiğinde ($O_2^{\bullet-}$ oluştuğunda) NO kimyası N_2O_3 ve $ONOO^-$ oluşturacak yönde değişir. Oluşan bu "reaktif nitrojen türleri" ise oksidatif ve nitrozatif stres oluşturarak sitotoksik sonuçlara yol açarlar.

2.1.4. Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)

NO, $O_2^{\bullet-}$ veya O_2 ile birlikte reaksiyona girerek RNS adı verilen çeşitli reaktif ara ürünlerin oluşumuna neden olur (Tablo 2-3). Oluşan bu ara ürünler oksidatif ve nitrozatif stres oluşturarak toksik sonuçlara yol açar. Nitrozatif stres, nitrozilasyon reaksiyonlarına yol açarak ve proteinler ile etkileşerek yapı ve fonksiyon bozukluklarına neden olabilir (11).

Tablo 2-3: Biyolojik sistemlerde oluşabilecek reaktif nitrojen türleri

- Nitroksil anyonu (NO^-)	- Peroksinitrit ($ONOO^-$)	- Nitril katyonu (NO_2^+)
- Nitröz oksit (N_2O)	- Dinitrojen trioksit (N_2O_3)	- Peroksinitrat (O_2NOO^-)
- Dinitrojen dioksit (N_2O_2)	- Nitrojen dioksit radikali ($NO_2^{\bullet}$)	- Nitrat (NO_3^-)
- Nitrozil katyonu (NO^+)	- Dinitrojen tetraoksit (N_2O_4)	
- Nitrit (NO_2^-)	- Dinitrojen pentaoksit (N_2O_5)	

2.1.4.1. Peroksinitrit ($ONOO^-$)

NO molekülünün $O_2^{\bullet-}$ ile reaksiyona girmesi sonucunda meydana gelen ve son derece reaktif bir metabolit olan $ONOO^-$, oldukça kısa ömürlüdür ve bir serbest radikal değildir. $ONOO^-$ oluşumu, NO metabolizmasının primer yollarından biridir (11).

Yarı ömrü 1 saniyeden daha az olan $ONOO^-$, fizyolojik koşullarda protonlanmış şekli olan ONOOH'a dönüşür. Bu molekül daha sonra çok daha toksik olan NO_2^+, $NO_2^{\bullet}$ ve $OH^{\bullet}$ radikallerini oluşturur (7).

$$NO + O_2^{\bullet-} \rightarrow ONOO^-$$

$$ONOO^- + H^+ \leftrightarrow ONOOH \leftrightarrow OH^{\bullet} + NO_2^{\bullet}$$
$$\downarrow$$
$$NO_2^+$$

Biyolojik koşullarda üretilen $O_2^{\bullet-}$, SOD tarafından H_2O_2'ye çevrilir. Organizmada SOD konsantrasyonu, NO'nun fizyolojik düzeylerinden daha yüksektir ve bu $ONOO^-$ oluşumunu sınırlar. Fakat organizmada NO konsantrasyonu arttığında, NO ve SOD, $O_2^{\bullet-}$ için yarışır ve $ONOO^-$ oluşumu artar. Oldukça toksik bir molekül olan $ONOO^-$, farklı moleküllerle reaksiyona girerek, lipit peroksidasyonunu uyarabilir, DNA

zincir kırılmalarına neden olabilir ve çeşitli aminoasit rezidülerini oksitleyebilir (7, 12). NO ve $O_2^{\bullet-}$ düzeyleri arasındaki denge NO'nun prooksidan ve antioksidan davranışını belirlemede etkili faktördür.

$ONOO^-$, fenilalanin, tirozin ve triptofanın da dahil olduğu aromatik bileşikleri nitrolayabilir (13). Protein moleküllerinde en fazla çalışılmış olan 3-NT molekülüdür.

2.1.4.2. Nitrotirozin (NT)

Stabil bir molekül olan NT, $ONOO^-$ veya diğer RNS tarafından tirozin aminoasidinin nitrolanması ile oluşur. Tirozin nitrasyonu iki aşamada gerçekleşir. Birinci aşamada oluşan tirozil radikalinin, ikinci aşamada $NO_2^{\bullet}$ ile reaksiyonu sonucunda 3-NT oluşur (13).

1. $TyrH + CO_3^{\bullet-} \rightarrow Tyr^{\bullet} + HCO_3^-$
2. $Tyr^{\bullet} + NO_2^{\bullet} \rightarrow Tyr\text{-}NO_2$

Tirozinin orto pozisyonunun nitrolanması yoluyla oluşan 3-NT, $ONOO^-$'nun ana ürünü olmasının yanı sıra çeşitli RNS aracılığı ile de meydana gelebilir.

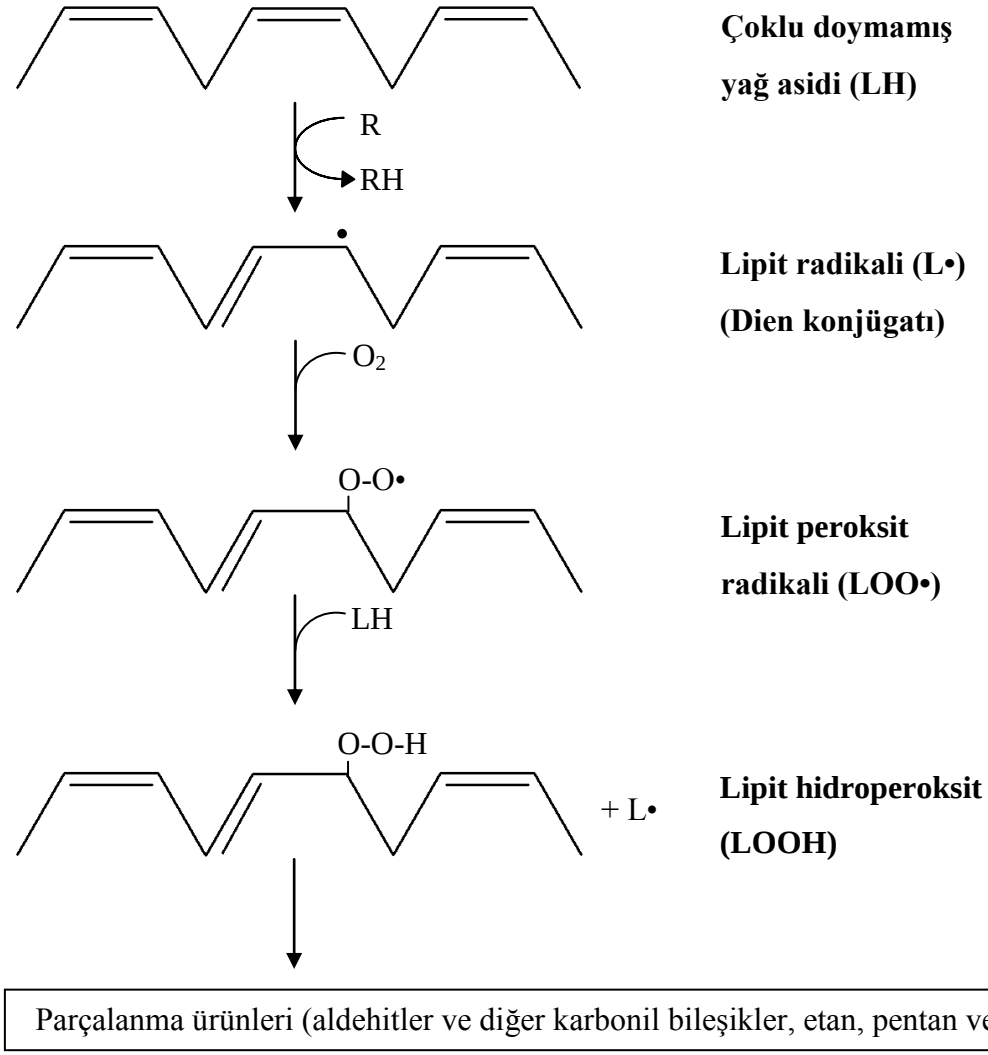
NT, $ONOO^-$'nun *in vivo* spesifik bir belirtecidir. NT'nin $ONOO^-$ oksidasyonunun stabil son ürünü olmasına bağlı olarak, NT konsantrasyonu NO-bağımlı *in vivo* hasarın tespitinde kullanışlı bir belirteçtir (14).

2.1.5. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri - Lipit Peroksidasyonu

Biyomembranlar ve hücre içi organeller membran fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin varlığı nedeni ile oksidatif ataklara duyarlıdır. Serbest radikallerin oluşturduğu hasarlar arasında en önemlilerinden biri olan lipit peroksidasyonu, membran yapısında yer alan PUFA'nın oksijen radikallerine maruz kalması sonucunda oluşur (3).

Lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli bir radikal etkisiyle membran yapısında bulunan konjüge olmayan PUFA zincirindeki α-metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlar. Hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidi zincirinin radikalleşmesine neden olur. Oluşan $L^{\bullet}$ dayanıksız

bir yapıya sahip olduğundan bir dizi spontan değişikliğe uğrar. Önce molekül çift bağ aktarımı ile 233 nm'de karakteristik UV absorbansı veren konjüge dienleri oluşturur. Lipit radikalinin O_2 ile reaksiyona girmesi sonucunda $LOO^{\bullet}$ meydana gelir. Bu radikaller de membran yapısındaki diğer PUFA'ları etkileyerek yeni $L^{\bullet}$'lerin oluşumuna yol açar, kendisi de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak LOOH'a dönüşür. Bu otokatalitik reaksiyonlar LOOH'ların aldehit ve diğer karbonil bileşikleri ile etan, pentan gibi uçucu gazlara dönüşmesi ile sona erer (3, 15) (Şekil 2-4).



Şekil 2-4: Çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu

Biyolojik membranlardaki lipit peroksidasyonu, membran akıcılığında ve membran potansiyelinde azalmaya, H^+ ve diğer iyonlara geçirgenlikte artışa ve sonuç olarak hücre ve organel yapısında bozulmaya yol açar (1).

Lipit peroksidasyonunun ölçümü doku hasarının iyi bir göstergesi olarak kabul edildiğinden, peroksidasyon sırasında oluşan konjüge dienlerin ölçümü, *in vivo* lipit peroksitlerin düzeyini yansıtması açısından kullanılan bir yöntemdir (3).

2.1.6. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri - Protein Oksidasyonu

Protein oksidasyonu, proteinlerin ROS veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucunda meydana gelir. Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları arasında enzim aktivitesinde azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, protein agregasyonu, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler sıralanabilir.

Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca moleküler mekanizmalar protein karbonil (PCO) oluşumu ile karakterize edilen metal katalizli protein oksidasyonu, protein tiyol gruplarının kaybı, NT ve ileri oksidasyon protein ürünlerinin oluşumu olarak sıralanabilir.

Reaktif türevlerin doğrudan proteinler (primer modifikasyon reaksiyonları), karbonhidratlar ve lipitler ile reaksiyona girmesi sonucunda oluşan ürünler, tekrar proteinler ile reaksiyona girerek sekonder modifikasyon reaksiyonlarına yol açarlar. Reaktif türevler ya peptit bağları ile ya da aminoasit yan zincirleri ile reaksiyona girer. Bu reaksiyonlar, redoks reaksiyonlarına giren demir ve bakır gibi metal katyonlardan etkilenir. Oksidatif modifikasyona uğramış proteinler ya düşük molekül ağırlıklı ürünlere ayrılır ya da çapraz bağlı yüksek molekül ağırlıklı ürünleri oluşturur.

Protein oksidasyonu esas olarak $OH^{\bullet}$ ile başlar. Diğer taraftan oksidasyon sürecinde O_2 ile birlikte, $O_2^{\bullet-}$ ve $HO_2^{\bullet}$'nin varlığı da gereklidir. Bu ROSlar aminoasit yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağların oluşumuna ve protein omurgasının oksidasyonu yolu ile protein fragmentasyonuna neden olur.

ROS'un proteinlerle etkileşimi sonucunda, histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda aminoasit kalıntısında ve/veya proteinlerin peptit omurgasında oluşan oksidatif hasara bağlı olarak PCO ürünleri meydana gelir. PCO düzeylerinin saptanması protein oksidasyonunu belirlemede duyarlı bir yöntemdir (14).

2.1.7. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere Etkileri – Oksidatif DNA Hasarı

ROS oluşumunda artma, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve/veya DNA onarım mekanizmalarında defekt varlığı oksidatif DNA hasarının artmasına yol açar. Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da, tek ve çift zincir kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme) veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir (1).

DNA'da oksidatif hasara yol açan başlıca etkenler arasında iyonize radyasyon, yüksek oksijen konsantrasyonu, ksantin oksidaz ve substratları sayılabilir (16).

RNS, DNA bazlarının nitrolanmasına veya deaminasyonuna neden olur. RNS etkisi ile sitozinden urasil, guaninden ksantin ve adeninden hipoksantin oluşur.

DNA hasar göstergesi olarak sıklıkla baz hasarları analizlenmiştir. Cu^{2+} iyonları DNA'da guanin-sitozinden zengin bölgelerde yüksek oranda bulunduğundan oksidatif hasara en fazla maruz kalan baz guanindir. Bu nedenle en yaygın olarak ölçülen baz hasarı 8OHdG'dir. 8OHdG oksidatif DNA baz hasarının bir belirteci olarak kabul edilir (1, 2).

2.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

Fizyolojik koşullarda, hücreler oluşan serbest radikallerin neden olabileceği hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur. Antioksidanlar, serbest radikal oluşumunun önlenmesinde, başlatıcı reaktif türleri uzaklaştırıcı, oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı ve katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etkilere sahiptir (17, 18).

Antioksidanlar, oluşan oksidan moleküllere karşı etkilerini 4 yolla gösterirler:

a. Süpürücü (scavenging) etki: ROS'u etkileyerek oluşmuş olan radikalleri daha az reaktif başka bir moleküle çevirme; antioksidan enzimler bu tip etki gösterirler.

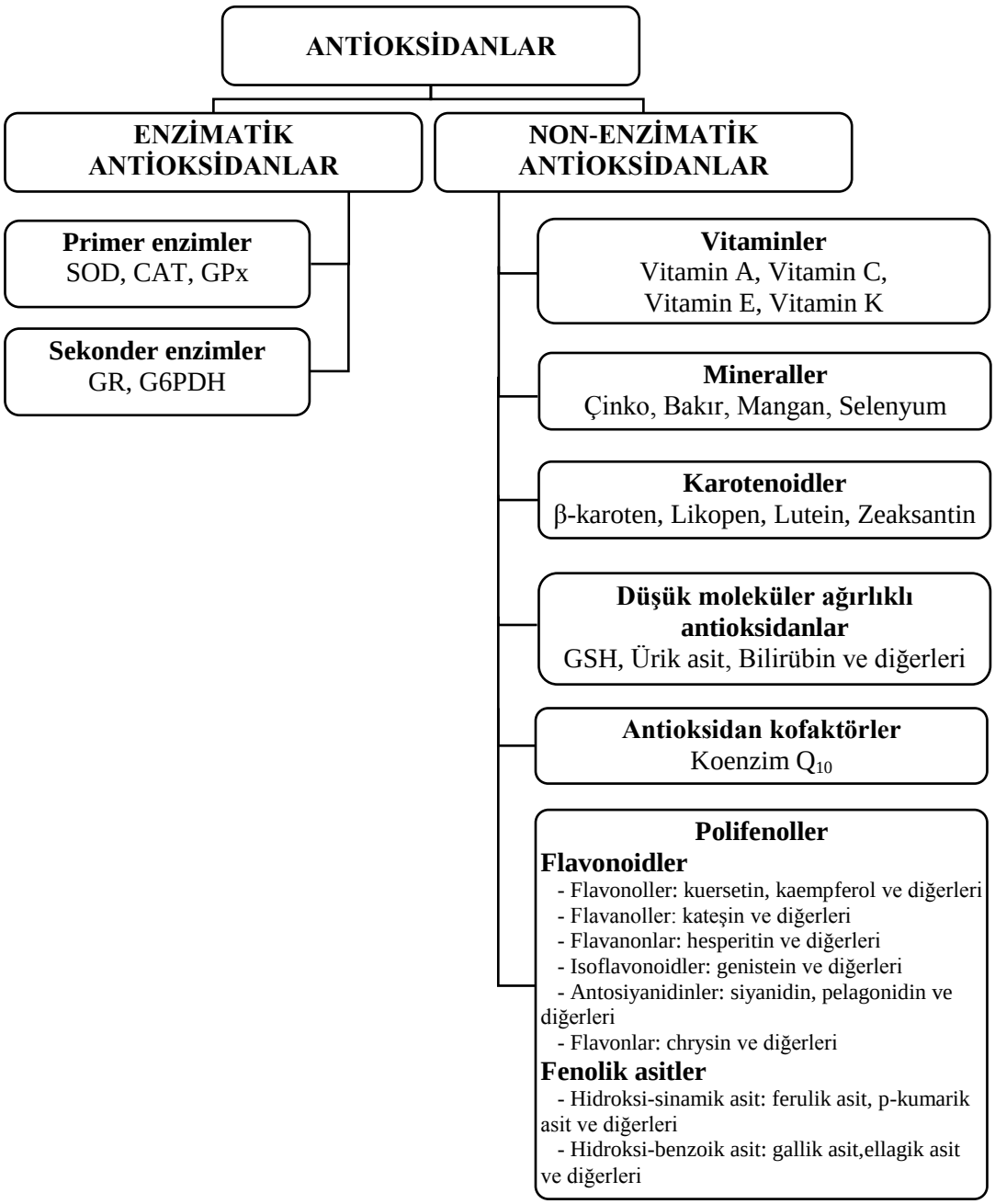
b. Baskılayıcı (quencher) etki: Oksidanlara proton aktararak aktivite kaybına neden olma; vitaminler ve flavonoidler bu tür etkiye örnektir.

c. Zincir kırıcı etki: ROS'u veya zincirleme reaksiyonları başlatacak diğer maddeleri kendine bağlayıp zincirlerini kırarak fonksiyonlarını önleyici etki; hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

d. Onarıcı etki: Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri; bu gruba DNA tamir enzimleri ve metiyonin sülfoksit redüktaz örnek verilebilir.

Antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere başlıca iki gruba ayrılır. Bu antioksidanlardan enzimler, düşük moleküler ağırlıklı moleküller ve enzim kofaktörlerini içerenler endojen olarak üretilir. Non-enzimatik antioksidanlar ise çoğunlukla diyet kaynaklıdır. Antioksidan enzimler oksidatif stresin neden olduğu şiddetli akut hasara karşı koymada daha kuvvetli ajanlardır (18) (Tablo 2-4).

Tablo 2-4: Antioksidanların sınıflandırılması



2.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

2.2.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1)

ROS'a karşı primer antioksidan enzim olan SOD, $O_2^{\bullet-}$'nin H_2O_2 ve O_2'ye dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir (19).

$$2\ O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Bu reaksiyon oksidatif strese karşı ilk savunmada rol oynar. Zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısı olan $O_2^{\bullet-}$'nin bu sistem sayesinde hücresel kompartmandaki düzeyleri kontrol altında tutulur. Organizma, oksidatif stresin arttığı durumlarda SOD enzimi aktivitesini arttırarak koruyucu etkinliğini devam ettirir.

SOD'un sitozolik CuZn-SOD (SOD-1), mitokondriyal Mn-SOD (SOD-2) ve ekstraselüler CuZn-SOD (SOD-3) olmak üzere üç izoenzimi bulunmaktadır. Formları arasında aminoasit dizilimi, aktif metal bölgesi ve hücresel dağılım gibi farklılıklar bulunur.

SOD-1: Majör intraselüler SOD, homodimer yapıda ve 32 kDa ağırlığındadır. Esas olarak sitozolde lokalize olan SOD-1'in mitokondride membranlar arası alanda, nukleus, lizozom ve peroksizomlarda da bulunduğu immünohistokimyasal yöntemler ile gösterilmiştir. SOD-1'in katalitik aktivitesinde Cu^{2+}, stabilitesinde Zn^{2+} kofaktör olarak görev alır (20). SOD-1, karaciğer, eritrosit, beyin ve nöronlarda yüksek konsantrasyonlarda bulunur (17, 21).

SOD-2: Mitokondriyal matrikste lokalize olan SOD-2, 96 kDa ağırlığında ve homotetramer yapıdadır. Katalitik aktivitesinde Mn^{3+}'nın rol oynadığı SOD-2, özellikle kalp, beyin, karaciğer ve böbreklerde yüksek konsantrasyonlarda bulunur (21).

SOD-3: Ekstraselüler matrikste ve hücre yüzeyinde lokalize olan SOD-3, 135 kDa ağırlığında, homotetramerik sekretuvar bir glikoproteindir. Enzim aktivitesinden Cu^{2+}, stabilitesinden Zn^{2+} sorumludur. Başlıca vasküler düz kas hücrelerinde ve fibroblastlarda sentezlenir (20, 21).

2.2.1.2. Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6)

Her biri ferriprotoporfirin grubundan oluşan idantik 4 alt birim içermektedir. Ayrıca her alt birim enzimi kendi substratı olan H_2O_2'ye karşı koruyan ve etkinliğini arttıran NADPH içermektedir. Enzim özellikle eritrosit, hepatosit ve böbrekte yüksek miktarda bulunmakta ve oksidatif stres ile up-regüle edilmektedir (21).

CAT, dismutasyon mekanizması ile H_2O_2'nin H_2O ve O_2'ye dismutasyonunu katalizleyerek, biyolojik sistemleri H_2O_2'nin zararlı etkilerine karşı korur (17).

$$2\ H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$$

CAT, ayrıca fenol, alkol gibi farklı substratların, H_2O_2'nin çift redüksiyonu ile detoksifikasyonunu sağlar.

$$H_2O_2 + RH_2 \rightarrow R + 2H_2O$$

2.2.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GPx; EC 1.11.1.9)

GPx, organik hidroperoksitlerin (lipit hidroperoksitler, DNA hidroperoksitler) veya H_2O_2'nin GSH tarafından indirgenmesini katalizler (17).

$$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$$
$$ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + GSSG + H_2O$$

Selenyuma bağımlı ve bağımsız iki tipi mevcuttur. Selenyuma bağımlı olan GPx (Se-GPx) sitozol ve mitokondride bulunur. Hem H_2O_2 hem de lipit hidroperoksiteleri metabolize eder. Selenyumdan bağımsız olan GPx (non-Se-GPx) ise sadece lipit hidroperoksitleri metabolize eder. Bu fonksiyonu ile lipit peroksidasyonunun başlamasını ve ilerlemesini önler.

GPx enziminin 4 alt tipi bulunur (21):

GPx-1: Selenyum içeren GPx-1 idantik 4 alt birim içeren bir selenosistein rezidüsünden oluşur. Özellikle eritrosit, karaciğer ve böbrekte yüksek miktarda bulunur.

GPx-2: Selenyum bağımlı sitozolik GPx olarak bilinir ve primer olarak gastrointestinal dokularda eksprese edilir. Oral olarak alınan lipit peroksitlere karşı korumada önemli rol oynar.

GPx-3: Ekstraselüler GPx-3 başlıca plazmada bulunmasının yanı sıra böbrek, akciğer, kalp ve plasentada da eksprese edilir. GPx-4'e göre daha az etkin olan bu enzim, fosfatidilkolin gibi kompleks lipitlerin hidroperoksitlerini indirger.

GPx-4: Enzim, fosfolipit hidroperoksit GPx olarak da isimlendirilir. Birçok dokuda bulunur ve hem sitozol hem de membranlarla ilişkilidir. Diğer GPx'lerin aksine monomer halinde bulunur. Küçük boyutu ve hidrofobik yüzeyi sayesinde membrandaki peroksidize fosfolipitleri ve kolesterolleri indirger. Membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğunda, membranı peroksidasyona karşı koruyarak, vitamin E ile sinerjistik etki gösterir (21).

$$PLOOH + 2GSH \rightarrow PLOH + GSSG + H_2O$$

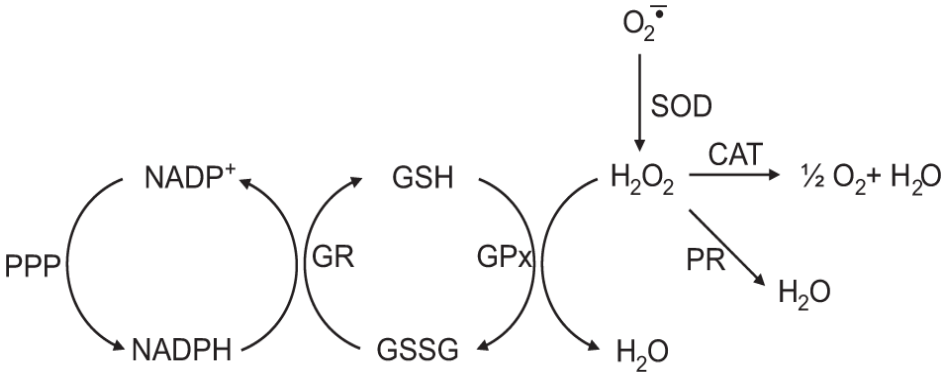
2.2.1.4. Glutatyon Redüktaz (GR; EC 1.8.1.7)

GR, NADPH varlığında GSSG'nin GSH'a indirgenmesini katalizler.

$$GSSG + NADPH \rightarrow 2GSH + NADP^+$$

Bu oksidoredüksiyon enziminin koenzimi NADPH, prostetik grubu ise FAD'dır. Dimerik yapıda bulunan GR sitozol ve mitokondride lokalizedir. GR bir flavoenzim olup FAD ile aktive edilir.

GR, NADPH'tan bir elektronun GSSG'nin disülfit bağlarına aktarılmasını katalizler. Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarına karşı savunmada önemli rol oynar ve majör kaynağı pentoz fosfat yoludur (17) (Şekil 2-5).



Şekil 2-5: Bazı enzimatik antioksidanlar arasındaki ilişki ve H_2O_2'nin enzimatik detoksifikasyonu

(PPP: Pentoz fosfat yolu, PR: Peroksiredoksin)

2.2.1.5. Glutatyon S-Transferaz (GST; EC 2.5.1.18)

GST, hücresel detoksifikasyon ve transporttan sorumlu iki protein alt biriminden oluşan mültifonksiyonel protein ailesidir. Genel olarak üç sitozolik ve bir mikozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılır. GST ailesi hepatositlerdeki başlıca detoksifiye edici sistemdir.

Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynayan GST, başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipit hidroperoksitlere karşı non-Se-GPx aktivitesi gösterir (22).

$$ROOH + 2\ GSH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$$

2.2.1.6. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PDH; EC 1.1.1.49)

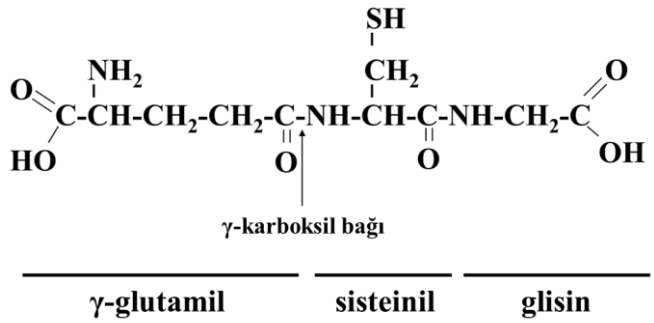
Sitoplazmik ara ürünler olan NADPH ve GSH konsantrasyonları hücrenin redoks durumunun akut değişikliklerini yansıtırlar. NADPH/$NADP^+$ ve GSH/GSSG oranlarındaki değişiklikler akut prooksidan stres ile antioksidan savunma arasındaki dengesizliğin belirtisidir. Oluşan $NADP^+$'nın tekrar NADPH'a dönüşebilmesini katalizleyen G6PDH, pentoz fosfat yolunun oksidatif faz hız kısıtlayıcı enzimidir (22).

2.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

2.2.2.1. İndirgenmiş Glutatyon (GSH)

Suda çözünebilen bir antioksidan olan GSH (γ-L-glutamil-L-sisteinil-glisin), organizmada tiyol grubu içeren, düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptittir. Organizmada tüm hücrelerde, özellikle karaciğerde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Hücresel GSH'ın yaklaşık %90'ı sitozolde, %10'u mitokondrilerde ve küçük bir bölümü de endoplazmik retikulumda bulunur (23).

GSH yapısındaki peptit bağı, glutamat aminoasidinin N-terminalinde bulunan γ-karboksil grubu ile sistein aminoasidi arasında bulunur. Glutamatın α-karboksil grubu yerine, γ-karboksil grubu ile oluşturulan bu bağın hidrolizinde γ-glutamiltranspeptidaz isimli enzim rol oynar (Şekil 2-6).

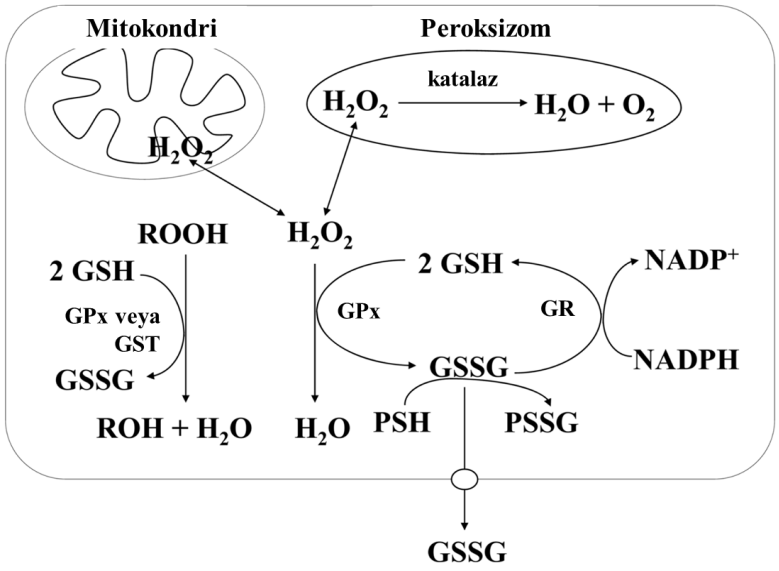


Şekil 2-6: Glutatyon yapısı

GSH sentezi 2 basamakta gerçekleşir. Birinci basamak hız kısıtlayıcı basamaktır ve γ-glutamilsistein sentetaz (EC 6.3.2.2) GSH'ın prekürsör aminoasitleri olan glutamat ve sisteinden, γ-glutamilsistein oluşumunu katalizler. İkinci basamakta ise glutatyon sentetaz (EC 6.3.2.3), glisin ve γ-glutamilsisteinden glutatyonu sentezler. Bu sentezde bir molekül GSH için 2 molekül ATP hidrolizlenir. GSH, negatif feedback ile glutamilsistein oluşum hızını ve böylece kendi sentezini de denetler (23).

1. L-glutamat + L-sistein + ATP → γ-glutamil-L-sistein + ADP + Pi
2. γ-glutamil-L-sistein + L-glisin + ATP → GSH + ADP + Pi

Glutatyon önemli bir antioksidan moleküldür. Aerobik metabolizma sonucunda oluşan H_2O_2, sitozol ve mitokondrilerde Se-GPx, peroksizomlarda ise CAT aracılığı ile metabolize olur. Bu reaksiyon sonucunda oluşan GSSG'nin GR enzimi aracılığı ile NADPH varlığında tekrar GSH'a indirgenmesi ile bir redoks döngüsü oluşur. GPx veya GST enzimleri aracılığı ile organik peroksitler de indirgenebilir. Şiddetli oksidatif stres koşullarında, hücre içi birikmiş GSSG, hücre dışına aktif transport ile taşınabilir veya protein sülfidrilleri ile etkileşerek karma disülfitleri oluşturabilir (24) (Şekil 2-7).



Şekil 2-7: Glutatyonun antioksidan etkileri

GSH, içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasara karşı korur (23). GSH, sistein deposu olmasının yanı sıra, biyotransformasyon ile oluşan zehirli maddelerin, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda, serbest radikallerin temizlenmesinde, DNA sentezi, mikrotübül-ilişkili süreçlerde ve immün fonksiyonlar gibi hücresel süreçlerin düzenlenmesinde, NO homeostazisinin sağlanmasında, post-translasyonel modifikasyonlar ile protein aktivitesinin düzenlenmesinde (protein S-glutatyonilasyon) ve nörotransmitter reseptör aktivitelerin düzenlenmesinde de rol oynayan mültifonksiyonel bir moleküldür (24).

2.2.2.2. Vitamin C (Askorbik Asit)

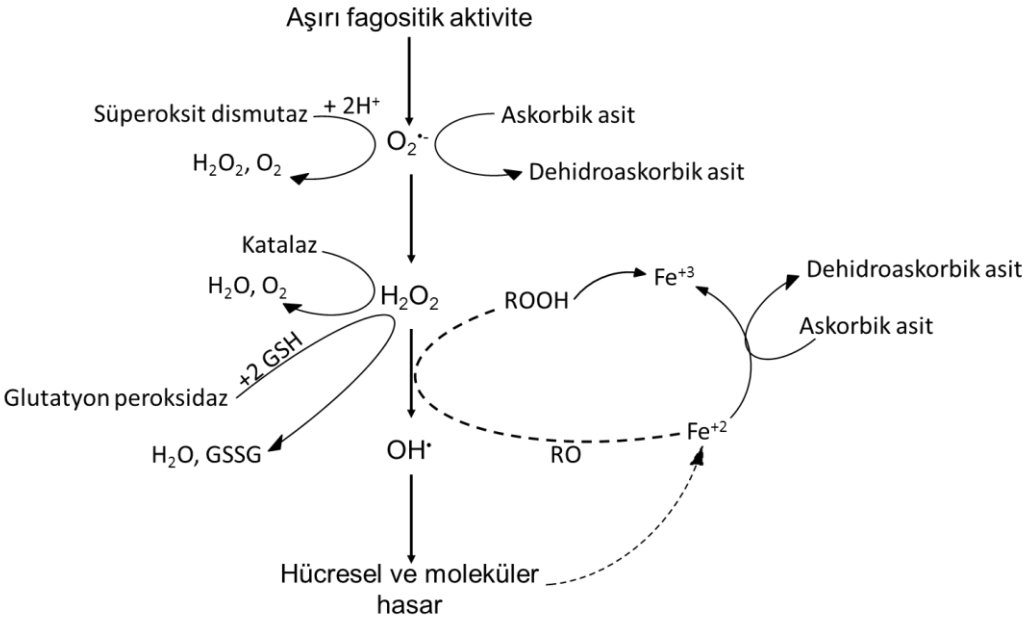
Biyolojik ortamlarda askorbat olarak bulunan vitamin C, ekstraselüler sıvının en önemli antioksidanıdır. Suda çözünebilen bir antioksidan olan vitamin C, bir dizi enzimatik reaksiyon sonucunda UDP-Glukoz'dan sentezlenen 6 karbonlu bir laktondur. Ancak askorbat sentezinin son basamağını katalizleyen enzim glukonolakton oksidaz insanlarda bulunmadığından diyetle alınması zorunludur (25, 26).

$$\text{L-glukono-}\gamma\text{-lakton} + O_2 \rightarrow \text{L-askorbat} + H_2O_2$$

Askorbik asit memelilerde çeşitli reaksiyonlara elektron verici olarak katılır. 6 karbonlu moleküldeki 2. ve 3. karbonlar arasındaki çift bağın elektronlarını vererek indirgeyici özellik gösterir ve bu özelliğinden dolayı antioksidan olarak adlandırılır. Yüksek reaktiviteye sahip serbest radikallerin ($RO^{\bullet}$, $RO_2^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$, $NO_2^{\bullet}$) askorbat tarafından indirgenmesi ile daha zayıf reaktif özelliğe sahip askorbil radikali oluşur. Askorbil radikalinin bu düşük reaktivitesi, askorbik asidin antioksidan etkisinin temelini oluşturur (25) (Şekil 2-8).

Askorbat etkili olarak H_2O_2, hipoklorit, $O_2^{\bullet -}$, $OH^{\bullet}$ ve $ROO^{\bullet}$ radikallerini ve $O_2^{\downarrow\uparrow}$'yi tutar. Askorbat sıvı fazdaki tüm $ROO^{\bullet}$'ları plazma lipitlerine difüze olmadan tutarak, biyomembranları peroksidatif hasardan korur (22).

Askorbik asit, farklı metabolik yollarda rol oynayan birçok enzimin kofaktörü olarak da görev alır (Tablo 2-5). Bu reaksiyonlarda vitamin C'nin temel rolü, çeşitli mono- ve dioksijenazların aktif merkezlerindeki metal iyonlarını indirgemektir. Bu özellik vitamin C'nin indirgeyici potansiyelinden kaynaklanır (25).



Şekil 2-8: Askorbik asidin antioksidan savunmadaki rolü

Tablo 2-5: Askorbik asitin kofaktör olduğu bazı enzimler ve diğer metabolik rolleri

Kofaktörü olduğu enzim	Enzim fonksiyonu
Prolil / lizil hidroksilaz	Kollajenin post-translasyonel modifikasyonu
γ-bütirobetain hidroksilaz, ε-N-trimetil-lizin hidroksilaz	Karnitin sentezi
Dopamin β-monooksijenaz	Noradrenalin sentezi
Peptidilglisin α-hidroksilleyici monooksijenaz	Glisin-uzantılı peptidlerin amidleşmesi
Hidroksifenilpiruvat dioksijenaz	Tirozin katabolizması
Demir metabolizması	Demirin intestinal absorpsiyonu için Fe^{3+}'ün Fe^{2+}'ye indirgenmesi
Demir alımının ve sekestrasyonunun düzenlenmesi	Hücrelerde demirin depolanması için ferritin sentezinin uyarılması

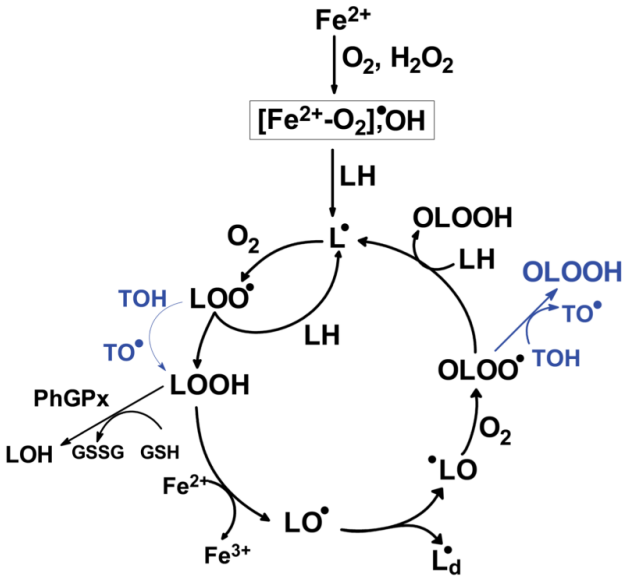
Vitamin C'nin, vitamin E'yi α-tokoferoksil radikalinden rejenere ederek bir ko-antioksidan olarak davranma özelliği vardır. *In vivo* çalışmalarda vitamin C yokuluğunda vitamin E'nin prooksidan özellik gösterdiği saptanmıştır (26).

Vitamin C, fizyolojik ve yüksek konsantrasyonlarda antioksidan etkilidir. Düşük konsantrasyonlarda ise Na^+-K^+-ATPaz aktivitesini azaltır, membran fosfolipit yapısını değiştirerek, lipit peroksidasyonunu arttırarak prooksidan aktivite gösterir. Bu şekilde vitamin C, doza bağımlı olarak paradoksal bir etki gösterir (22, 26).

2.2.2.3. Vitamin E (α-tokoferol)

Vitamin E, yapısal olarak kroman hakla ve 2. karbona bağlı 16 karbonlu fitil yan zinciri içerir. Vitamin E, majör olarak 2 grup molekülden oluşur. Birinci grup tokoferoller, ikinci grup ise tokotrienoller olarak adlandırılır. Tokoferoller α-, β-, γ-, δ- olmak üzere 4 çeşit molekül ve bunların stereoizomerlerinden oluşur (27). Kroman halka üzerinde metil gruplarının yeri ve sayısı molekülün formunu belirler. Tokotrienoller ise, tokoferollerden farklı olarak yan zincirde 3', 7' ve 11' pozisyonlarında çift bağ içerirler. Bu iki gruptan α-tokoferol, içerdiği 3 metil grubu ile en yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir (28).

Önemli bir endojen ve eksojen antioksidan olarak membran bütünlüğünün korunması α-tokoferolün başlıca fonksiyonlarından biridir. Lipofilik özelliğinin yüksek olması nedeni ile kolayca membran fosfolipitlerine difüze olabilir ve 20 karbonlu doymamış yağ asitlerini indirgeyerek serbest oksijen radikallerinin biyomembranlarda oluşturabileceği lipit peroksidasyonunu önler. Böylece eikosanoid oluşumunun başlangıç aşaması önlenir (Şekil 2-9).



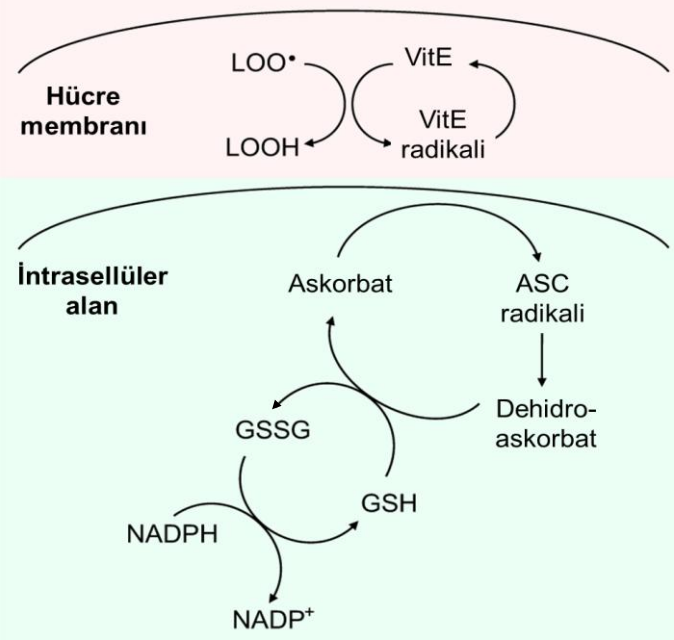
Şekil 2-9: Lipit peroksidasyonunda tokoferolün rolü

TOH: tokoferol, TO•: tokoferoksil radikali

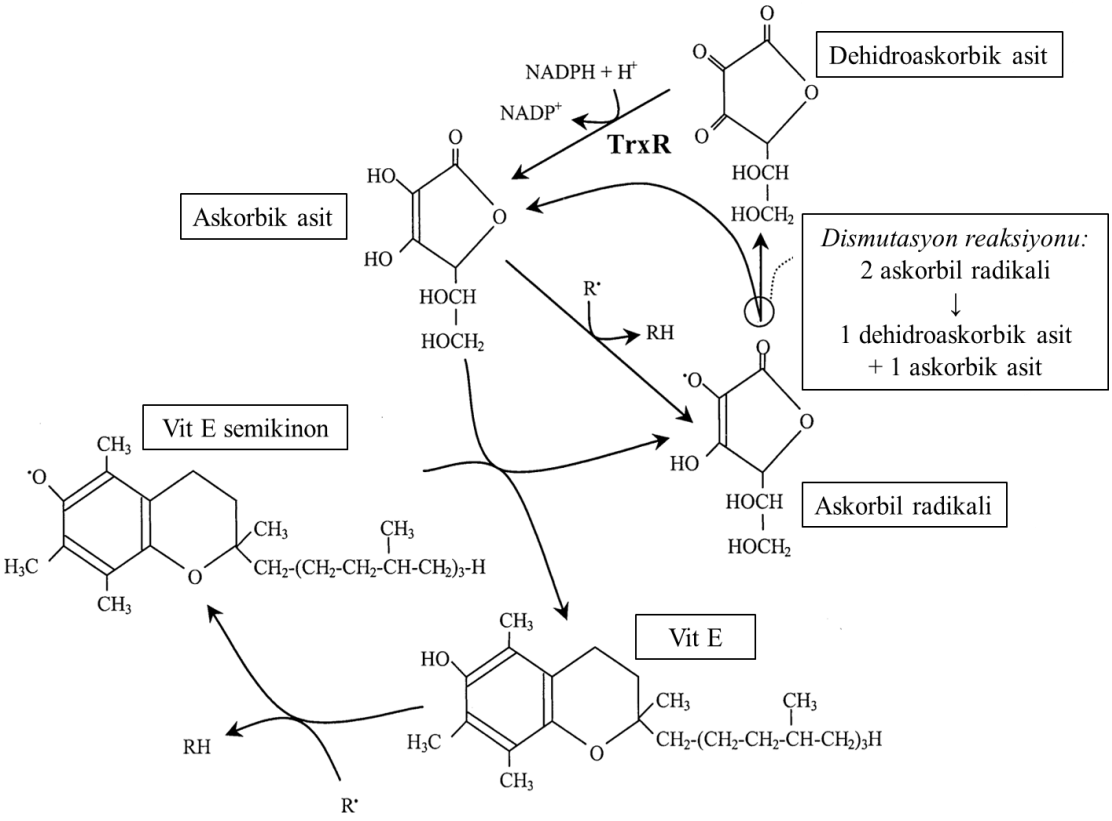
Vitamin E, ROO• ve RO• ile reaksiyona girerek daha az toksik ve radikal olmayan bileşiklerin oluşmasına yol açar, kendisi de daha stabil ve reaktivitesi az olan bir radikale dönüşür. Oluşan bu tokoferol radikali askorbat, GSH veya ubikinol ile tekrar α-tokoferole dönüşebilir (28) (Şekil 2-10, Şekil 2-11).

$$ROO^{\bullet} + \text{Vit E} \rightarrow ROOH + \text{Vit E}^{\bullet}$$

Vitamin E, ROS uyarılı LOO•'nun üretimini inhibe ederek, membran fosfolipitlerini PUFA'ların peroksidasyonundan, hücresel proteinleri ve DNA'yı oksidatif hasardan koruyarak ve membran dejenerasyonunu önleyerek antioksidan etki gösterir. Vitamin E eksikliğinde hepatik CAT, GPx ve GR enzim aktiviteleri azalır, karaciğer lipit peroksidasyonu artar, nörolojik ve kardiyovasküler bozukluklar görülür. Ancak bu bozukluklar vitamin E süplementasyonu ile giderilebirlir (29).



Şekil 2-10: Lipofilik ve hidrofilik antioksidanlar arasındaki ilişki

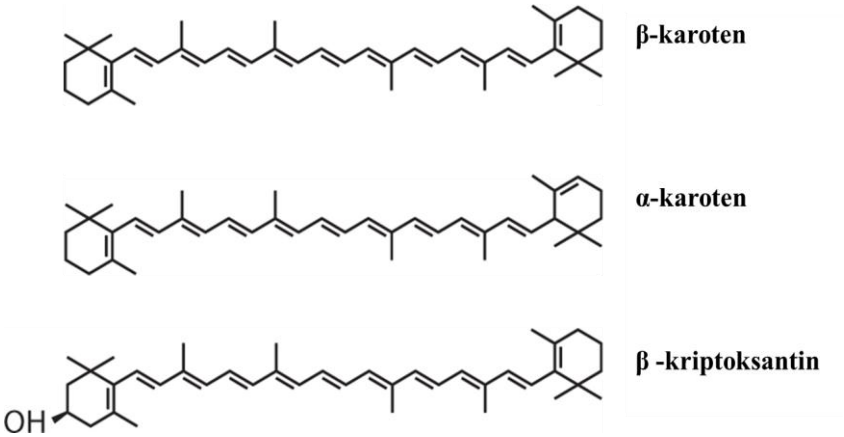


Şekil 2-11: Vitamin E ve vitamin C arasındaki ilişki

2.2.2.4. Karotenoidler ve β-karoten

Karotenoidler bitki, mantar ve bakterilerde sentezlenen, 15 konjüge çift bağ içerebilen izoprenoid bileşiklerdir. Tanımlanmış ~600 adet karotenoid bileşiği arasında ~50 tanesi diyette bulunurken, ~10 tanesi insan plazmasında anlamlı düzeylerdedir. En önemli bitkisel orijinli antioksidanlar α-karoten, β-karoten ve β-kriptoksantindir (Şekil 2-12). Bu bileşiklerin 2 temel fonksiyonu bulunmaktadır; antioksidan etki gösterirler ve retinoidlerin doğal prekürsörleridir (Provitamin A karotenoidleri olarak da adlandırılırlar) (31).

Majör besinsel vitamin A prekürsörü olan β-karoten, $O_2^{\downarrow\uparrow}$'yi baskılayıcı etkiye sahiptir ve hücre membranında serbest radikalleri temizleyerek antioksidan etki gösterir. $ROO^{\bullet}$ ile reaksiyona girerek ROS etkisi ile oluşan lipit peroksidasyonunun ilerlemesini inhibe eder ve LDL oksidasyonunu önler. β-karoten, lipoproteinlerde vitamin E'yi oksidasyondan korur, membran lipitlerini korumada vitamin E ve vitamin C ile sinerjistik etki gösterir (30).



Şekil 2-12: Bitkisel kaynaklı antioksidanlar

2.3. *Hippophae Rhamnoides* L.

Elaegnaceae familyasının bir üyesi olan *Hippophae rhamnoides* L. (Seabuckthorn: SBT) soğuğa dayanıklı, yaprak döken çalı ve küçük ağaç formundadır. Sarı, turuncu, kırmızı renkli meyveleri yüzyıllardır Asya ve Avrupa'da besin, terapötik ve farmasötik amaçlı kullanılmaktadır (32, 33) (Şekil 2-14).

SBT, Çin, Danimarka, Finlandiya, Fransa, Almanya, Hollanda, Norveç, Polonya, Rusya, İsveç, İngiltere ve Türkiye'nin bulunduğu 27°-69′ EN enlem ve 7 EW°-122′ EE boylam arasında doğal yayılış gösterir (32, 33).

Bitkinin önemi, meyve içeriğinin besinsel değerinden kaynaklanır. SBT'nin tüm bölümleri, vitaminler (A, C, E, K, riboflavin, folik asit), karotenoidler (α-, β-, δ-karoten, likopen), fitosteroller (ergo-, stigma-, lansterol, amirinler), organik asitler (malik asit, oksalik asit), PUFA ve bazı esansiyel aminoasitler gibi çok sayıda biyoaktif madde kaynağı olarak değerlendirilir (34-36).

SBT, özellikle tohum yağının gıda, tıp, farmakoloji ve kozmetik alanlarında değerlendirilen ekonomik değeri yüksek biyoaktif maddeler içermesi nedeniyle son yıllarda pek çok ülkede tarımı yapılan önemli bir bitki haline gelmiştir (Tablo 2-6).



Şekil 2-13: SBT genel görünüşü

Tablo 2-6: SBT'nin kullanılan bölümleri ve kullanım alanları

Meyve	Meyve suyu		Sporcu içecekleri, sağlık şurupları
	Meyve posası	Yağ	Eczacılık, kozmetik
		Artıkları	Hayvan yemi
	Eterik yağ		Eczacılık, içecek, besin
Tohum	Yağ		Eczacılık, kozmetik
	Artıkları		Hayvan yemi
Yaprak			Eczacılık, kozmetik, çay, hayvan yemi
Kabuk			Eczacılık, kozmetik

2.3.1. Tarihçe

SBT birçok durumda kullanılmış zengin bir tarihe sahiptir. M.S. 618'de Tang Hanedanı'ndan itibaren geleneksel Çin tıbbında kullanılmıştır. Ayrıca M.Ö. 800'lerde Tibet medikal klasiği olan "rGyud Bzi" kayıtlarında da bulunmaktadır. Antik Yunan tarihinde ise atların yemine katılan SBT yapraklarının atların gürbüzleşme ve parlak tüylü olma nedeni olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle Latince *Hippophae* adı "parlayan at" anlamına gelmektedir (33).

Yerel olarak besin, ilaç, yakıt ve yem olarak önemli biyokaynaklardan biri olarak değerlendirilmiştir. Yüzyıllardır Orta ve Güneydoğu Asya'da çeşitli hastalıkları önlemek amacıyla, geleneksel tıpta ilaç olarak kullanılmıştır. Avrupa ve Asya'da SBT meyveleri, bitkisel ilaç ve doğal cilt bakımı için kaynak olarak kullanılmıştır. Orta Asya yerlileri SBT meyvelerini hipertansiyon, sindirim sistemi ve cilt hastalıklarında tedavi amaçlı kullanmıştır. Tibet ve Moğolistan geleneksel tıbbında meyveler, öksürük tedavisinde, kan dolaşımının ve sindirim sistemi fonksiyonlarının iyileştirilmesinde kullanılmıştır. Rusya'da cilt hastalıkları, sarılık, astım, romatizma ve laksatif amaçlı gastrointestinal tedavide kullanılmıştır (32).

2.3.2. Taksonomi ve Tür Özellikleri

- Regnum (Alem): Plantae
- Filum (Şube): Magnoliophyta
- Clasis (Sınıf): Magnoliopsida
- Ordo (Takım): Rosales
- Familia (Aile)*: Elaeagnaceae*
- Genus (Cins): *Hippophae* L.
- Species (Tür): *Hippophae rhamnoides*

Hippophae cinsi 7 tür ve 9 alttür ile temsil edilmektedir. Simpodial dallanma gösteren, çeşitli yükseklikte, yaprak döken, ağaç ve çalılardır. Kök sistemi pek çok yan köklerden meydana gelen uzun horizontal yapı ile karakterize edilir. Yapraklar, alternat dizilişli, yaprak kenarı genellikle düz, taban lanseolat, gümüşi-bronz renkte tüylerle örtülmüştür. Meyve rengi sarıdan koyu kırmızıya kadar değişebilir, şekli küresel veya oval olabilir. Olgunlaşmış meyve genellikle turuncu renkte ve küresel şekillidir. Çiçeklenme nisan-mayıs, meyve oluşumu eylül-ekim aylarında görülür. Bu türün kromozom sayısı 2n=24'tür (37).

SBT, -43°C sıcaklıktan +40°C sıcaklığa, deniz kıyısı çevrelerinde deniz suyundan kaynaklanan tuzlu, pH'sı 8 olan topraklara tolerans göstermektedir. Bu bitkinin büyük kökleri toprak kaymasının olduğu yamaçlarda, toprağı tutma yeteneğine sahiptir. Kök nodüllerinde azot fikse eden *Pseadomonas radicicola* ve *Frankia* mikroorganizmaları bulunur. Bu simbiyotik ilişki aşınmış bölgelerde su ve toprak korunması için SBT'yi optimal bir bitki yapmaktadır. Bitki ve mikroorganizmanın simbiyotik birlikteliğinden dolayı kıyı alanlarda yetişebilir. SBT'nin kökleri topraktaki çözülmeyen organik ve mineral maddeleri çözebilir forma dönüştürebilir. Rizomlu kökleriyle hızla yayılabilme özelliğine sahiptir. Tepe ve yamaçlarda, vadi ve nehir yataklarında, deniz kıyısı bölgeleri boyunca yetişmektedir (37) (Şekil 2-15).



Şekil 2-14: Nehir ve dere kıyılarında yetişen SBT taksonlarına ait genel görünüş (Kastamonu-Tosya)

2.3.3. İçerik

SBT meyve ve yapraklarında bulunan çeşitli biyoaktif bileşikler taranmaktadır. Meyvelerde bulunan karotenoid, tokoferol, tokotrienol, esansiyel yağ asitleri ve diğer biyoaktif bileşik içerikleri ile yapraklarda bulunan polifenoller birçok araştırmacı tarafından incelenmektedir (32).

SBT meyveleri, çeşitli vitaminler (C ve E), karotenoidler (β-karoten, likopen, lutein ve zeaksantin), flavonoidler (izorhamnetin, kuersetin, izorhamnetin-3-β-D-glukozid, izorhamnetin-3-β-D-glukozaminid, kaempferol ve diğerleri), organik asitler, mikro- ve makrobesinler gibi bileşikler açısından zengin bir kaynaktır. Nütrisötik ve kozmetik içerik olarak kullanılan zeaksantin ve β-kriptoksantin esterleri kromatografik analizler ile SBT meyvelerinde saptanmıştır. Zengin antioksidan içeriğine ek olarak, meyveler ayrıca palmitik asit, oleik asit (ω-9), palmitoleik asit (ω-7), linoleik asit (ω-6) ve linolenik asit (ω-3) gibi yağ asitleri (%13,7 doymuş ve %86,3 doymamış) ve fitosteroller açısından da zengindir (35-38) (Tablo 2-7).

SBT'nin en iyi bilinen ürünleri esansiyel yağ asitlerinden zengin (ω-3 ve ω-6) tohum yağı ve yüksek düzeyde ω-7 içeren meyve yağıdır (32). SBT yağında fitosterollerin esas bileşeni olarak β-sitosterol tanımlanmıştır (39). Doğu ve Avrupa ülkelerinin çoğunda, β-karoten içeriği SBT yağlarının kalite göstergesi olarak rol

oynamaktadır. SBT meyvelerinden ekstrakte edilen yağ, UV ışnı absorbe etmekte, cildi korumakta, farmasötik ve kozmetik endüstrilerde hammade olarak kullanılmaktadır(34).

SBT yaprakları başlıca flavonoid, karotenoid, serbest ve esterleşmiş steroller, triterpenol ve izoprenol içeren biyoaktif maddeleri içermektedir. Yapraklar aynı zamanda önemli antioksidanlar olan β-karoten, vitamin E, kateşinler, ellagik asit, ferulik asit, folik asit ve anlamlı düzeylerde Ca^{2+}, Mg^{2+} ve K^{+} açısından zengin kaynaklardır. Flavonoller, lökoantosiyanidinler, (-)epikateşin, (+)gallokateşin, (-)epigallokateşin ve gallik asit yapraklardaki polifenolik bileşiklerdir. Yapılan çalışmalarda, SBT yaprak ekstrelerinde kuersetin-3-O-galaktozid, kuersetin-3-O-glukozid, kaempferol ve izorhamnetin gibi fenolik bileşiklerin varlığı saptanmıştır (32).

Tablo 2-7: SBT'de bulunan major fitokimyasallar ve etkileri

Fitobileşenler	Tıbbi Etkileri
Tokoferoller	Antioksidan olarak rol oynar, lipit peroksidasyonunu azaltır, analjezik etki gösterir.
Karotenoidler	Antioksidan olarak rol oynar, kollajen sentezi ve epitelizasyona yardımcıdır.
Vitamin K	Kanamayı önler, yara iyileşmesini sağlar, anti-ülser etki gösterir.
Vitamin C	Antioksidan etki gösterir, hücre membran bütünlüğünü korur, kollajen sentezini hızlandırır.
Vitamin B kompleksi	Hücre onarımı ve sinir rejenerasyonunu uyarır.
Fitosteroller	Ciltte mikrosirkülasyonu arttırır, anti-ülser, anti-aterojenik, anti-kanser etki gösterir, inflamatuvar süreci düzenler.
Polifenolik bileşikler	Antioksidan, sitoprotektif, kardiyoprotektif ve yara iyileştirici etki gösterir.
PUFA	İmmünomodülatör, nöroprotektif ve anti-tümör etki gösterir.
Organik asitler	Kalp krizi ve felç riskini azaltır, anti-ülser, yara iyileştirici ve anti-artritik etki gösterir.
Kumarin ve triterpenler	İştah, uyku, hafıza ve öğrenmenin kontrolünde etki gösterir.
Çinko	Kan dolaşımını güçlendirir, anti-tümör etki gösterir, hücre proliferasyonuna yardımcı olur, enzim kofaktörü olarak işlev görür, vitamin A'nın kullanımını arttırır.

2.3.4. Preklinik Çalışmalar

SBT, radyasyon hasarı azaltıcı, yanık, oral inflamasyon ve gastrik ülser tedavi edici, kanser ve kalp hastalıklarını önleyici etkiye sahip önemli tıbbi değeri olan bir bitki olarak değerlendirilmektedir. Hastalık önleyici etkisi, antioksidan fitokimyasal içeriği ve serbest radikal hasarını azaltıcı özelliğinden kaynaklanmaktadır (33).

SBT ile ilişkili yapılan çeşitli preklinik çalışmalarda SBT'nin antioksidan, immünomodülatör, anti-kanser, anti-bakteriyel ve anti-viral etkilere sahip olduğu, karaciğer koruyucu, anti-stres, adaptojenik, kardiyoprotektif ve anti-aterojenik aktivite gösterdiği, radyasyona karşı koruyucu, akut ve kronik yaralarda iyileştirici etki gösterdiği saptanmıştır (Tablo 2-8).

2.3.5. Güvenlik ve Toksisite Çalışmaları

Deney hayvanları ile yapılan güvenlik ve toksisite çalışmalarında SBT esaslı formülasyon ve ekstraktlar kullanılmıştır.

Çalışmalarda, SBT'nin arsenik-uyarılı oksidatif hasara karşı ve sülfür dioksit inhalasyonuyla uyarılan hasara karşı koruyucu role sahip olduğu gösterilmiştir (60, 63).

Yapılan bir çalışmada, SBT bazlı bitkisel antioksidan süplementinin akut ve subakut toksisite ve etkinliği araştırılmıştır. 2000-10000 mg/kg doz aralığında akut, 2000, 4000, 8000 mg/kg dozlarda ise subakut toksisite özelliği farelerde oral uygulama ile çalışılmış, bu yüksek doz uygulamalar sonucunda mortalite veya herhangi bir toksik etki görülmediği, hematolojik ve biyokimyasal parametrelerde bir değişiklik gözlenmediği, histopatolojik analizde ise vital organlarda normal yapıların korunduğu bildirilmiştir (64).

Yapılan bir başka çalışmada, 100 mg/kg/gün doz olacak şekilde 90 gün boyunca SBT sulu yaprak ekstresi uygulaması sonucunda hiçbir yan etki gözlenmediği belirtilmiştir (53).

Tablo 2-8: SBT'nin farklı bölümlerinin farmakolojik etkileri

Bitki bölümleri	Farmakolojik etkileri	Deney modeli	Kaynak
Yaprak	Antioksidan, immünomodülatör, sitoprotektif aktivite	*in vitro*, sıçan	40, 41
	Anti-stres ve adaptojenik aktivite	sıçan	42, 43
	Hipobarik hipoksiye karşı koruma, akciğerlerde transvasküler sıvı sızıntının düzenlemesi	sıçan	44
	Karaciğer koruyucu etki	sıçan	45, 46
	Akut ve kronik yanık yaralarında iyileştirici etki	sıçan	47-50
	Anti-inflamatuvar etki	sıçan	51, 52
	Anti-bakteriyel ve anti-viral etki	*in vitro*	47
Meyve	Antioksidan ve hücre koruyucu aktivite	*in vitro*	40
	Anti-stres aktivite	sıçan	53
	Radyoprotektif etki	sıçan, fare	54, 55
Tohum yağı	Beyinde hipoksi uyarılı transvasküler sızıntıya karşı koruma	sıçan	56
	Anti-aterojenik aktivite	tavşan	57
	Karaciğer koruyucu etki	fare	58
	Yanık yaralarında, atopik dermatit ve mukozal hasarda iyileştirici etki	sıçan	59
Meyvelerden izole edilen flavonlar	Dermal yaralarda iyileştirici etki	sıçan	60
	Anti-apoptotik, antioksidan, immünomodülatör etki	sıçan	61, 62

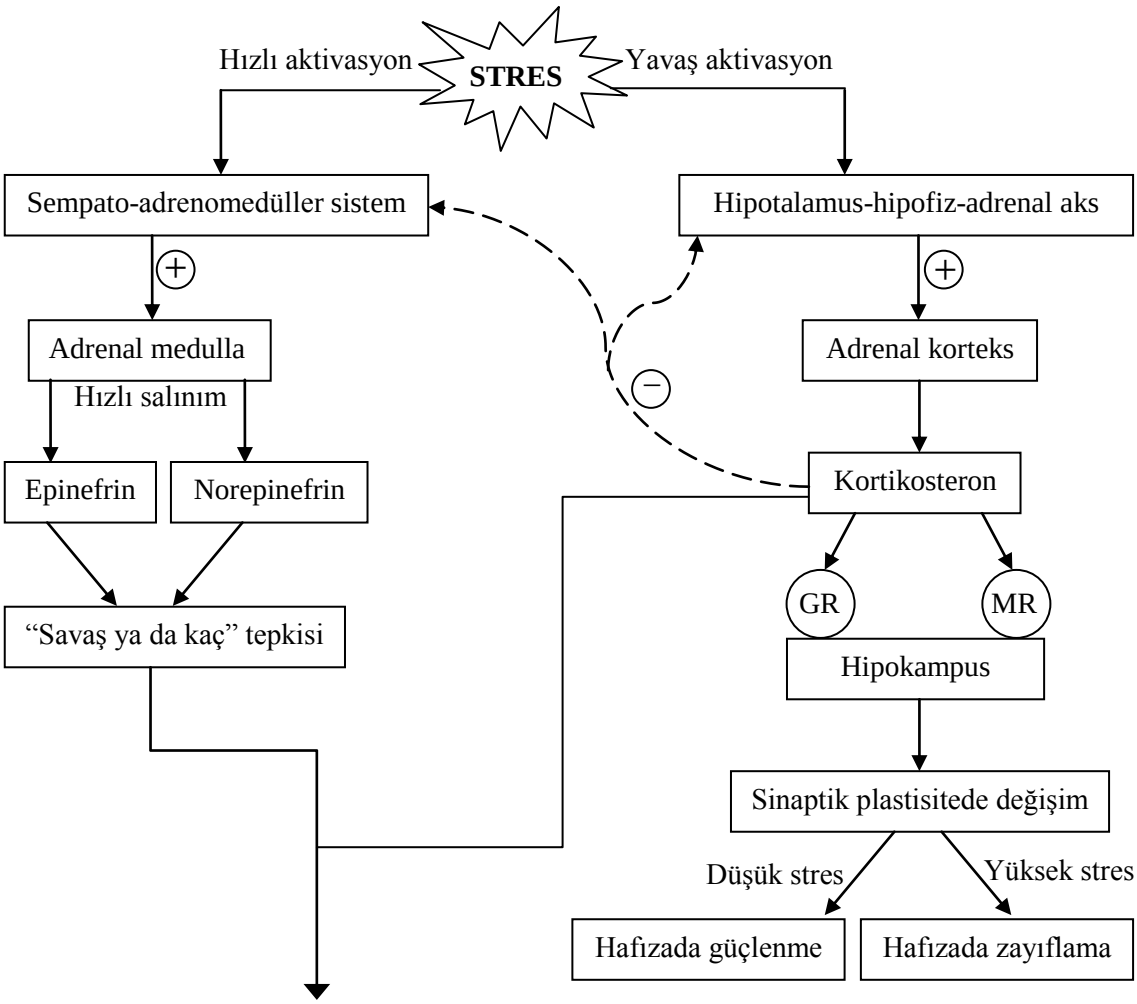
2.4. Stres

Stres, organizmada homeostazı bozma eğiliminde olan fiziksel, mental, duygusal, internal veya eksternal tüm olumsuz uyarılara karşı oluşan biyolojik reaksiyonların toplamı olarak tanımlanabilir (65). Stres etkenleri, hipotalamus-hipofiz-adrenal aksını (HPA) ve sempatik sinir sistemini aktive ederek fizyolojik değişimler ile sonuçlanan iç veya dış kaynaklı uyarılardır. Stres uyarılarına uzun süreli maruziyet depresyona, post-travmatik stres bozukluğuna ve anksiyeteye yol açabilmektedir. Beyin dokusu, stres-uyarılı dejeneratif koşullara yüksek duyarlılık gösterdiğinden ve yüksek miktarda PUFA içerdiğinden serbest radikal ataklarına karşı hassastır (66).

Stres, hipofizden adrenokortikotropik hormon (ACTH) salınımı ile tetiklenen adrenal steroidlerin serbestleşmesine yol açan hipofiz-adrenal aksın aktivasyonunu da içeren çeşitli fizyolojik değişimlere yol açmaktadır. ACTH uyarımı, çeşitli stres etkenlerine karşı hipotalamustan salınan kortikotropin salgılatıcı faktör (CRF) tarafından kontrol edilmektedir. Hipokampus ve amigdala gibi bazı beyin bölgelerinden salınan stres-uyarılı norepinefrin, HPA aksının aktivasyonunu kolaylaştırmaktadır (66). HPA aksı ve merkezi sinir sisteminin aktivasyonu "stres hormonları" olarak adlandırılan glukokortikoid ve katekolaminlerin üretimine yol açmaktadır. Bu glukokortikoidler HPA aksının aktivitesini feedback mekanizması ile hipofiz bezi, hipotalamus ve medial prefrontal kortekste kendi reseptörlerine bağlanarak inhibe etmektedir (67) (Tablo 2-9).

Bu sistemlerdeki herhangi bir düzensizlik, çeşitli stres ilişkili komplikasyonlara yol açabilir. Organizmada strese yanıtta glukokortikoidler önemli role sahiptir. Stres ve glukokortikoidler insanlarda ve hayvan modellerinde bilişsel fonksiyonlarda spesifik etkilere sahiptir. Adrenal steroidler ve stres, işlemsel ve uzamsal hafızada kısa süreli ve geri dönüşümlü bozukluğa yol açabilmektedir (66).

Stres durumunda NO ve ROS üretiminin arttığı, GPx, CAT ve SOD gibi çeşitli serbest radikal detoksifiye edici enzim aktivitelerinin azaldığı gösterilmiştir. Beyin dokusu yüksek miktarda PUFA içerdiğinden, oksidatif stresin yol açtığı lipit peroksidasyonundan etkilenmekte ve bu reaksiyonlar beyin dokusu hücre membranında yapısal ve fonksiyonel hasara yol açmaktadır (66).



Fizyolojik Değişiklikler	**Patolojik Değişiklikler**
Kalp atış hızında artış	**Cilt:** sedef hastalığı, ürtiker, kellik
Kan basıncında artış	**Gastrointestinal sistem:** inflamatuvar bağırsak hastalığı, peptik ülser
Kan glukoz düzeyinde artış	**İnflamatuvar hastalıklar:** romatoid artrit
Kolesterol düzeyinde azalma	**Kardiyovasküler sistem:** kardiyomiyopati, koroner arter hastalığı
Solunum ile ilgili düzensizlik	**Psikolojik:** depresyon, anksiyete, şizofreni, insomni
	Nörodejenerasyon: Alzheimer hastalığı, multiple skleroz
	Solunum: bronşiyal spazm

Tablo 2-9: Vücutta stres etkenlerine yanıt olarak farklı fizyolojik ve patolojik değişimler

GR: Glukokortikoid reseptörü, MR: mineralokortikoid reseptörü

2.4.1. Stres ve Deneysel Hayvan Modelleri

Stres için farklı hayvan modelleri geliştirilmiş, doğal ve sentetik kökenli bileşiklerin anti-stres aktivitelerini değerlendirmek amacıyla sıkça kullanılmıştır. Stres ile ilgili araştırmalar, yeni terapötik yaklaşımların tanımlanması ve uygun hayvan modeli kullanılarak strese yanıt mekanizmasının anlaşılması üzerine yoğunlaşmıştır.

Araştırmacılar çeşitli fiziksel, fizyolojik, akut ve kronik stres modelleri geliştirmiştir. Bunlar;

- Soğuk suya batırma ile stres,
- Soğuk ortam izolasyonu ile stres,
- İmmobilizasyon/kısıtlama ile stres,
- Elektrikli ayak şoku ile stres,
- Zorunlu yüzdürme stresi,
- Besinden yoksun aktivite stresi,
- Gündüz-gece ışık değişimi kaynaklı stres (uyku yoksunluğu),
- Ses kaynaklı stres,
- Post-travmatik stres,
- Kronik öngörülemeyen stres modelleridir (67).

Birçok fiziksel stres modelinin temeli, vücut ısısındaki değişimlere dayanmaktadır. Isıdaki akut değişim, hipotalamusta ısı değişim merkezinin aktivasyonuna ve adrenokortikal hormonların salınımına yol açmaktadır. Stres sonunda, hayvanlarda glukokortikoid salınımının inhibisyonu bozulmakta ve biriken glukokortikoidlere maruziyet dejenerasyona yol açmaktadır. Soğuk su veya dondurucu kullanılarak ısıda keskin düşüş sağlamak akut stresi uyarmak amacıyla sıklıkla kullanılmıştır (67).

Soğuk ortam izolasyonu yönteminde, sıçanlar akut stres oluşturmak için 1 kez, kronik stres için 7-10 gün boyunca +4˚C'de 15 dakika süreyle tek tek soğutucuda tutulmuştur (68, 69). Modifiye edilen bir yöntemde, 30 dakika boyunca 4±2˚C'de soğuğa maruziyet ile stresin indüklenmesi sağlanmıştır. Bir diğer modifikasyonda ise sıçanlar tel kafeslere yerleştirilerek –8˚C'de 4 saat soğutulmuş bölmelerde soğuğa

maruz bırakılmıştır. Sıçanlar bu ortama sadece 1 kez maruz bırakılmış ve stres deneyi boyunca vücut sıcaklıkları monitörde izlenmiştir (70). Vücut sıcaklığındaki bu keskin düşüş strese yanıt gelişiminde adrenokortikoid seviyelerinde de keskin bir artışa yol açmıştır. Soğuk suya batırma modelinin aksine, sıçanların suda boğulması önlendiğinden daha güvenli bir yöntemdir. Ancak kronik maruziyette adaptasyon gelişimi ile strese yanıtın oldukça azalması önemli bir dezavantajdır (67).

İmmobilizasyon hayvanlarda stres-ilişkili biyolojik, biyokimyasal ve fizyolojik yanıt çalışmalarında stres etkeni olarak kullanılmaktadır. Önceden belirlenen zaman periyodunda sıçan/farelerin immobilize edilmesiyle, laboratuvar hayvanlarında stresi uyarmak amacıyla altın standart protokol Kvetnansky ve ark tarafından geliştirilmiştir. Bu tipik immobilizasyon prosedürüne göre düz bir levha üzerinde yüzükoyun pozisyonda hayvan ekstremiteleri gerilerek yapışkan bant ile sabitlenmekte, ayrıca baş hareketini de engelleyebilmek amacıyla boyun bölgesi metal bir halka ile sabitlenebilmektedir (71). Hayvanlar akut stres oluşturmak amacıyla 1 kez, 20 dk - 6 saat arasında, kronik stres oluşturmak amacıyla ise 5-30 gün boyunca 20 dk - 2,5 saat/gün olacak şekilde değişebilen sürelerde immobilize edilebilmektedir (67, 72). İmmobilizasyon, kompleks bir stres etkenidir ve fiziksel olduğu kadar psikolojik boyut da içermektedir. İmmobilizasyon sırasındaki mücadele ve ilişkili kas yoğunluğu, fiziksel egzersizin şiddetli bir türünü yansıtmaktdır. Stres modeli olarak immobilizasyon kullanımının esas avantajı fiziksel ve mental stresin kaçınılmaz üretimidir. İmmobilizasyon kaynaklı stres, sıçanlarda akut stres uyarımı için yaygın olarak kullanılmakta ve bu tip fiziksel stres, stres kaynaklı nörodejenerasyon, post-travmatik bozukluk çalışmalarında ve immün sistem üzerine stres etkilerinin analizinde de en faydalı modellerden biri olarak değerlendirilmektedir (67).

Kısıtlayıcı stres ise hayvanların belirli zaman periyodunda hareket etmesinin engellendiği, immobilizasyon stresinin modifiye edilmiş bir türüdür (72). Hayvanların hareket aralığı oldukça sınırlı olmasına rağmen, ekstremiteler sabitlenmemiş ve kısıtlayıcı streste hayvan kapalı alanda kalmıştır. Bu nedenle kısıtlayıcı stresin immobilizasyona göre daha az etkili bir stres yöntemi olduğu, nöral ve endokrin parametreler ile karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir (67). Buna rağmen, kısıtlayıcı stres sıçanlarda akut ve kronik stresin uyarılmasında yaygın olarak kullanılan bir modeldir. Kısıtlayıcı stres modelinde, deney hayvanı iyi havalandırılmış bir plastik tüp veya

tel-örgü kafeslere yerleştirilmekte, hayvanların hareketi büyük ölçüde sınırlandırılmaktadır. Bu kategorideki modeller arasında hareket kısıtlayıcıların boyutu ve kısıtlama süresi bakımından farklılıklar bulunmaktadır. Kısıtlayıcı stres genellikle 5,5 cm çapında, 18 cm uzunluğunda ve hava deliği bulunan yarı-silindirik akrilik hareket kısıtlayıcıları ile veya 25x9x7 cm^3 boyutunda 1,5 cm çapında havalandırma deliği bulunan hareket kısıtlayıcıları kullanılarak uygulanmaktadır. Hayvanlara akut stres oluşturmak amacıyla 1 kez, 15 dk - 3,5 saat arasında, kronik stres oluşturmak amacıyla ise 7-21 gün boyunca 1-6 saat/gün olacak şekilde değişebilen sürelerde stres uygulanmaktadır (72).

İmmobilizasyon ile birlikte soğuk ortama maruziyet, kısa zaman diliminde (3 saat) gastrik ülserasyon oluşumunu şiddetli bir şekilde arttırmaktadır. Kısıtlama ile ülserleşmeyi arttırmak için 2 farklı soğuğa maruziyet yöntemi uygulanmaktadır. İlk yöntemde, hayvan immobilize edildikten sonra 3 saat boyunca buzdolabı gibi soğuk bir ortama (5±1˚C) yerleştirlmektedir (70, 73). Bir diğer yöntemde ise, hayvan silindirik bir tüpte kısıtlanmakta ve sonrasında 1 saat boyunca soğuk suya (22˚C) dikey bir şekilde batırılmaktadır (74). Bu iki stres etkeninin kombinasyonunun şiddetli strese yol açtığı, davranışsal yanıttan sorumlu beyin bölgelerinde katekolaminerjik sistemi ve HPA aksı ile nöroendokrin yanıtı uyardığı gösterilmiştir (75). Tek bir etkene kıyasla, farklı stres etkenlerinin kombinasyonunun daha iyi ülserojenik uyaran olduğu düşünülmektedir (67).

2.4.2. Stres ve Gastrik Mukozal Hasar

Literatürde stres-ilişkili mukozal hastalık, stres-ilişkili hasardan stres ülserasyonuna kadar olan süreçleri kapsayan bir terimdir. Stres-ilişkili hasar gastrointestinal kanama ile sonuçlanan yüzeysel mukoza erozyonlarını tanımlarken, stres ülserleri daha merkezidir ve submukozaya doğru derinleşir. Kritik hastalarda, stres ilişkili mukozal hastalık yaygın bir komplikasyondur. Stres ülserasyonu, kanama riskini arttırdığından homeostatik dengeyi sağlamak amacı ile yoğunlaştırılmış eritrosit transfüzyonu ve müdahaleli yöntemleri gerektirmektedir (65).

Multifaktöriyel stres-ilişkili mukozal hastalık patogenezi, tam olarak aytınlatılamamış olmakla birlikte, temelde splanknik iskemi, konak savunmasında kayıp ve gastrik asit artışı ile ilişkilidir. Normal durumda gastrik mukozal savunma sistemi gastrik lümen boyunca gastrik asit, pepsin ve safra asitlerinin sert koşullarından bağırsağı korumaktadır (65). Agresif faktörlere karşı gastrointestinal mukozanın savunma mekanizmaları esas olarak fonksiyonel, hümoral ve nöronal faktörlerden oluşmaktadır (76). Bu savunma sistemi ekstraselüler mukus bariyeri, hücresel membran özellikleri, hızlı epitelyal hücre onarımı, mukozal HCO_3^- sekresyonu, yüksek mukozal kan akış hızı, nörohümoral faktörler ve prostaglandinlerden (PG) oluşmaktadır (65). Alkali mukus sekresyonu, mukozal mikrosirkülasyon ve motilite fonksiyonel faktörler olarak rol oynarken, PG ve NO ise hümoral faktörler olarak etki etmektedir (76).

Endojen ve eksojen aktif oksijen ve serbest radikallerin oluşumu, mukozal hasara neden olabilir. $OH^{\bullet}$'ın hücre membranı ile etkileşimi ile oluşan lipit peroksidasyon süreci sonucunda konjüge dienler ve LOOH gibi lipit-türevli serbest radikaller oluşur ve bu radikaller oksidatif hasara yol açarlar (76).

2.4.3. Fitokimyasallar ve Anti-ülserojenik Etkileri

Bitkisel ilaçların terapötik olarak kullanımı Çin'de yaklaşık 5000 yıl öncesine dayanmaktadır. Birçok bitki ekstraktı terapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Baharat ve bitkiler, lipit peroksidasyonunun neden olduğu hastalıkları önlemede ve oksidatif strese karşı savunmada rol oynayarak doğal antioksidan kaynaklar olarak kullanılmaktadır. Yöresel bitkilerin tedavi edici özellikleri başta flavonoidler olmak üzere kumarinler, fenolik asitler ve antioksidan mikrobesinler gibi organik ve inorganik bileşikler içermesinden kaynaklanmaktadır (76).

Fitokimyasal olan flavonoidler ve diğer polifenoller, non-esansiyeldirler ve sekonder bitki metabolitleri olarak adlandırılırlar. Flavonoidler $O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$, $ROO^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$ radikallerini baskılamada rol oynarak antioksidan etki gösterirler (76).

Bitkilerin anti-ülserojenik farmakolojik etkileri flavonoid içeriklerine bağlıdır. Flavonoidler, yaygın olarak bitkilerde ve diyette bulunan difenilpropanlardır. Flavonlar, izoflavonlar ve flavanonlar bu grubun üyeleridir. Flavonoidler içerdikleri birçok –OH grubu aracılığı ile $ROO^{\bullet}$ radikallerine karşı güçlü antioksidan etki gösterirler (76).

Birçok *in vitro* çalışmada flavonoidlerin $O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$, $ROO^{\bullet}$ radikallerini temizlediği ve siklooksijenaz-2 veya lipoksijenaz yolu ile araşidonik asit kaskadının çeşitli aşamalarına etki ettikleri ve membran stabilize edici özelliğe sahip oldukları gösterilmiştir. Flavonoidler, sitoprotektif etki göstererek gastrik mukozada hem mukusun hem de mukus içeriğindeki PG'lerin artışını sağlamaktadır. Birçok flavonoidin çeşitli deneysel ülser modelleri ile oluşturulan gastrik mukozal lezyonlarda, farklı nekrotik ajanlara karşı gastrik mukozayı koruduğu gösterilmiştir (76).

Flavonoidler, geçiş metallerini bağlayarak, hücreler tarafından oksidan enzimlerin veya serbest radikallerin üretimini inhibe ederek, α-tokoferoksil radikalinin α-tokoferole geri dönüşümünü sağlayarak birçok mekanizmada antioksidan etki gösterirler. Ayrıca gastrik mukoza üretimini arttırır, mukozal asit sekresyonunu baskılar, pepsinojen üretimini inhibe eder ve ülserojenik lezyonları azaltırlar. Bitkilerde bulunan flavonoidler, triterpenler ve tanninler gastrik lezyonlara karşı antioksidan aktiviteyi arttıran aktif bileşiklerdir. Flavonoidlerin, GSH metabolimasına etki ederek, ROSları baskılayarak ve glutamat tarafından indüklenen hücresel ölüm kaskatının son basamağında Ca^{+2} girşini inhibe ederek bu 3 mekanizma ile koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır (76).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Aletler ve Kimyasal Maddeler

3.1.1. Aletler ve Cam Malzemeler

Spektrofotometre (Shimadzu UV-1800)

ELISA okuyucu (Bio-Tek, ELX 800)

Otomatik yıkayıcı (Bio-Tek, ELX 50)

Homojenizatör (Heidolph, RZR 2021)

Santrifüj (soğutmalı) (Sigma, 3-18K)

Elektronik tartı (Shimadzu AX 200)

pH metre (Ohaus, Starter-3100)

Etüv (Heraeus)

Sıcak su banyosu (Lab Companion, BS-21)

Distile su cihazı (Ultramax-Silver, PA-E)

Derin dondurucu (-80˚C) (Haier, Ult Freezer)

Otomatik pipetler, deney tüpleri, balon joje, mezür, beher vb. cam malzemeler, tek kullanımlık küvetler, eppendorf tüpler, pipet uçları vb. sarf malzemeleri

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

Hippophae rhamnoides yağı (Pharma-Nord)

3-Nitrotirozin ELISA kiti (Hangzou Eastbiopharm)

Glutatyon Peroksidaz kolorimetrik kit (Cayman Chemical Company)

Glutatyon kolorimetrik kit (Cayman Chemical Company)

Nitrit/Nitrat kolorimetrik yöntem kiti (Roche)

5’5-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (Sigma)

Albümin (Sigma)

Askorbik asit (Sigma)

Bakır(II)-klorid dihidrat (Sigma)

Bakır(II)-sülfat pentahidrat (Merck)

Disodyum EDTA (Merck)

Folin & Ciocalteu’s fenol reaktifi (Sigma)

Glisin (Sigma)

Hidroklorik asit (Sigma)

Ketamin (Bremer Pharma)

Ksantin (Sigma)

Ksantin oksidaz (Sigma)

Ksilazin (Alfasan)

Metafosforik asit (Sigma)

Neokuprin (Sigma)

Nitroblue tetrazolium (Sigma)

PBS tablet (Invitrogen)

Potasyum nitrat (Sigma)

Potasyum-sodyum tartarat tetrahidrat (Sigma)

Sistein (Sigma)

Sodyum dodesil sülfat (Sigma)

Sodyum hidroksit (Merck)

Sodyum karbonat (Merck)

Sodyum sitrat (Sigma)

Trietanolamin (Sigma)

Tris-hidroksimetil-aminometan (Sigma)

Üre (Sigma)

3.2. Deney Hayvanlarına Uygulanan İşlemler

3.2.1. Deney Hayvanlarının Genel Özellikleri ve Deney Modeli

Bu çalışmaya ait 30.05.2013 tarihli ve 2013/64 sayılı etik kurul onayı İ.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmış ve çalışmada kullanılan 32 adet Wistar Albino soyu erkek sıçanlar İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir.

Her kafeste 4 sıçan olacak şekilde, 4 grup için toplam 8 kafeste muhafaza edilen sıçanlar, 12 saatlik karanlık-aydınlık periyotlarında, 22±2˚C sıcaklık ve %50±5 nem içeren koşullarda tutulmuştur. Her gün kafes bakımı yapılan sıçanlar, ticari standart pellet formunda sıçan yemi ve musluk suyu ile *ad-libitum* serbest beslenmiştir.

Sıçanlar rastgele olarak 4 gruba ayrılmıştır:

Grup I: Kontrol grubu (Kontrol, n=8)

Grup II: Soğuk + immobilizasyon stresi uygulanan grup (Stres, n=8)

Grup III: SBT uygulanan grup (SBT, n=8)

Grup IV: SBT ve soğuk + immobilizasyon uygulanan grup (SBT + Stres, n=8)

Çalışmada kullanılan SBT yağının uygulama dozu 200 mg/kg/48saat olarak belirlenmiş ve III. ve IV. gruplara 10 gün boyunca günaşırı olacak şekilde intraperitoneal yolla toplamda 5 kez uygulanmıştır (42, 43, 45). I. ve II. gruplara ise aynı şekilde %0,9'luk izotonik serum fizyolojik uygulanmıştır (Tablo 3-1).

10. gün sonunda II. ve IV. gruplar 6 saatlik soğuk ve immobilizasyon stresine maruz bırakılmıştır. +4˚C'de sıçanlar 13 cm uzunluğunda ve 7 cm çapında silindirik tel kafeslere yerleştirilmiştir (67, 72) (Şekil 3-1).

Süre sonunda 10 mg/kg ksilazin ve 50 mg/kg ketamin anestezisi altında tüm grupların sakrifikasyonları gerçekleştirilmiş, beyin ve karaciğer dokuları alınmış, örnek homojenatları hazırlanana kadar -80˚C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3-1: Ticari olarak temin edilen SBT preparatının 1 doz içeriği

SBT yağ içeriği	50 mg
Doymuş yağ asitleri	10,5 mg
Tekli doymamış yağ asitleri	24 mg
Palmitoleik asit (ω-7)	12 mg
Oleik asit (ω-9)	9 mg
cis-Vaksenik asit (ω-7)	3 mg
Çoklu doymamış yağ asitleri	15 mg
Linoleik asit (ω-6)	8,5 mg
α-Linolenik asit (ω-3)	6,5 mg
Vitamin E (α-tokoferol)	0,2 mg
Vitamin A (β-karoten)	20 µg



Şekil 3-1: Soğuk ve immobilizasyon stres modeli

3.2.2. Doku Homojenizasyonu

Kontrol ve deney gruplarına ait doku örnekleri yaş olarak tartıldıktan sonra, pH=7,4 olan fosfat tamponlu serum fizyolojik ile homojenize edilip, %20'lik (w/v) homojenatlar hazırlanmıştır. Elde edilen doku homojenatları yaklaşık olarak 4ºC'de soğuk ortamda 30 saniye süreyle, orta şiddette iki kez sonike edilmiştir. Sonikasyon işleminden sonra tayinler için hazırlanan homojenatlar soğutmalı eppendorf santrifüjü ile 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş, çalışmalar süpernatantlardan alınan örneklerle yapılmıştır.

3.3. Yöntemler

3.3.1. 3-Nitrotirozin Miktar Tayini

Çalışmada Hangzou Eastbiopharm 3-NT ELISA Kiti (Katalog No: CK-E10766) kullanılmıştır. Kullanılan ELISA testi sandviç prensibine dayalı solid faz enzim bağlı immünosorbent bir ölçümdür.

3.3.1.1. Prensip

Örnek ve standartlar 3-NT'yi tanıyan antikor ile kaplı kuyucuklara yüklenir ve inkübasyon sırasında 3-NT solid faza bağlı antikorlar tarafından yakalanır. Örnekteki bağlı olmayan materyal yıkama ile uzaklaştırılır. Biotinlenmiş 2. antikor kuyucuklara eklenir. İşaretli antikorlar yakalanmış 3-NT'ye bağlanır. İşaretin fazlası yıkama ile uzaklaştırılır. Streptavidin-peroksidaz konjügatı kuyucuklara yüklenir ve bu konjügat spesifik olarak yakalanmış 3-NT üzerine bağlı biotinle işaretli antikor ile reaksiyona girer. Fazla konjügat yıkama ile uzaklaştırılır ve kuyucuklara kromojen solüsyonları eklenir. Örnekteki mevcut 3-NT miktarı ile orantılı olarak renk oluşumu gözlenir. Reaksiyon stop solüsyonu ile durdurulur ve 450 nm'de absorbans ölçülür. Standart konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri belirlenerek standart grafiği çizilir. Bu grafik üzerinden örneklerin 3-NT konsantrasyonları hesaplanır.

3.3.1.2. Kullanılan Çözeltiler

Standart solüsyon (2400 nmol/L): Seyreltme tamponu ile standart seri hazırlanmıştır.

Seyreltme tamponu

Streptavidin-HRP konjüge reaktifi

Yıkama solüsyonu: Seyreltme tamponu ile 30 kat dilüe edilmiştir.

Biotin-3-NT antikoru

Kromojen solüsyonu A

Kromojen solüsyonu B

Stop solüsyonu

3.3.1.3. 3-NT Standart Serisinin Hazırlanması

Standart No.1	-	1200 nmol/L ;	120 µL Standart solüsyon	+	120 µL Seyreltme tamponu
Standart No.2	-	600 nmol/L ;	120 µL Standart No.1	+	120 µL Seyreltme tamponu
Standart No.3	-	300 nmol/L ;	120 µL Standart No.2	+	120 µL Seyreltme tamponu
Standart No.4	-	150 nmol/L ;	120 µL Standart No.3	+	120 µL Seyreltme tamponu
Standart No.5	-	75 nmol/L ;	120 µL Standart No.4	+	120 µL Seyreltme tamponu
Standart No.6	-	37,5 nmol/L ;	120 µL Standart No.5	+	120 µL Seyreltme tamponu

3.3.1.4. Yöntem

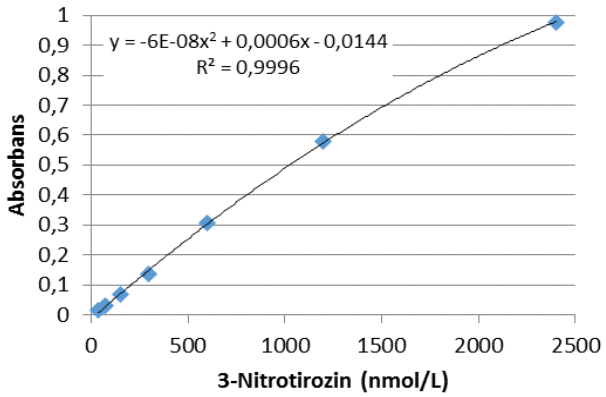
Kör kuyucukları: 100 µL distile su,

Standart kuyucukları: 50 µL standart ve 50 µL streptavidin-HRP,

Örnek kuyucukları: 40 µL örnek, 10 µL 3-NT antikoru ve 50 µL streptavidin-HRP yüklendikten sonra 37˚C'de 60 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda dilüe edilmiş yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkanmıştır.

Tüm kuyucuklara 50 µl kromojen solüsyonu A ve 50 µl kromojen solüsyonu B eklenmiş, 37˚C'de 10 dk karanlık ortamda inkübe edilmiştir.

Son aşamada, tüm kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu ilave edilmiş ve reaksiyon durdurulmuştur. 10 dk içerisinde 450 nm'de absorbans ölçülmüş ve sonuçlar standart eğri grafiğine göre değerlendirilmiştir (Şekil 3-2).



Şekil 3-2: 3-Nitrotirozin standart eğrisi

3.3.2. Nitrit-Nitrat Tayini

Çalışmada Roche Nitrit - Nitrat kolorimetrik yöntem kiti (Katalog No: 11746081001) kullanılmıştır. NO, kısa yarı ömrü ve kararsız yapısı nedeniyle biyolojik sistemlerde O_2 ile reaksiyona girerek hızlıca NO_2^- ve NO_3^-'e oksitlenmektedir. Bu nedenle düzeyleri, kararlı son ürünleri olan NO_2^- ve NO_3^- düzeylerinin ölçümü ile dolaylı olarak ölçülmektedir.

3.3.2.1. Prensip

Nitrat, NADPH varlığında, nitrat redüktaz tarafından nitrite indirgenmektedir.

$$NO_3^- + NADPH + H^+ \xrightarrow{\text{Nitrat redüktaz}} NO_2^- + NADP^+ + H_2O$$

Oluşan nitrit, sülfanilamid ve N-(1-naftil)-etilendiamin dihidroklorid ile reaksiyona girerek kırmızı-mor renkli diazo bileşiğini oluşturmaktadır.

$$NO_2^- + \text{Sülfanilamid} + \text{N-(1-naftil)-etilendiamin} \rightarrow \text{Diazo bileşiği}$$

Bu bileşiğin 540 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek, toplam nitrit ve nitrat konsantrasyonu ölçülmektedir (77).

3.3.2.2. Kullanılan Çözeltiler

Potasyum fosfat tamponu (pH=7,5)

NADPH tableti: Her bir tablet 0,5 mg NADPH içermektedir.

Reaksiyon karışımı: 1 NADPH tableti 3 ml potasyum fosfat tamponunda çözülerek hazırlanmıştır.

Liyofilize nitrat redüktaz (4U): 0,7 ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

Renk reaktifi I: Sülfanilamid içermektedir.

Renk reaktifi II: N-(1-naftil)-etilendiamin dihidroklorid içermektedir.

Stok potasyum nitrat solüsyonu (500 mg nitrit/L): 81,5 mg (±0,1 mg) KNO_3 100 ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

Hazırlanan stok solüsyondan dilüsyon ile 5,00 - 0,05 mg/L konsantrasyon aralığında standartlar hazırlanmıştır.

3.3.2.3. Yöntem

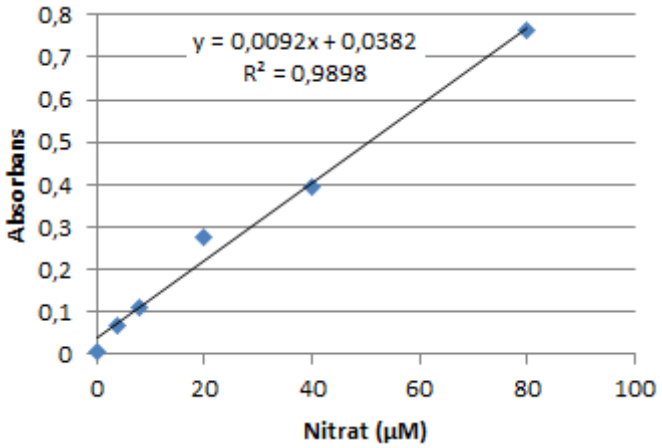
	Kör [NO_2^- + NO_3^-]	Örnek [NO_2^- + NO_3^-]
Örnek	-	500 µl
Distile su	500 µl	-
Reaksiyon karışımı	250 µl	250 µl
Nitrat redüktaz	20 µl	20 µl
Karıştırılıp, 15-25˚C'de 30 dk inkübe edildi, A_1 absorbansı okundu.		
Renk reaktifi I	250 µl	250 µl
Renk reaktifi II	250 µl	250 µl
Karıştırılıp, 15-25˚C'de ve karanlıkta 10-15 dk inkübe edildi, A_2 absorbansı okundu.		

3.3.2.4. Hesaplamalar

$$\Delta A_{Nitrit+Nitrat} = (A_2 - A_1)_{Nitrit+Nitrat} - (A_2 - A_1)_{Kör\ Nitrit+Nitrat}$$

KNO_3'ten NO_3^-'e çevirme faktörü = 0,613

Hesaplamalar standart eğri kullanılarak absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar bulunarak yapılmıştır (Şekil 3-3).



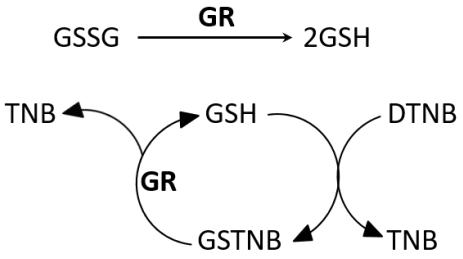
Şekil 3-3: Nitrat strandart eğrisi

3.3.3. Total Glutatyon Miktar Tayini

Çalışmada Cayman Glutatyon Kit (Katalog No: 703002) kullanılmıştır. Bu kit ile GSH ölçümü enzimatik geri dönüşüm yöntemi ile GR kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.3.1. Prensip

GSH'da bulunan sülfidril grupları 5,5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyona girerek sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik (TNB) asiti oluşturmaktadır. Beraberinde oluşan karma disülfit GSTNB (GSH ve TNB) GR tarafından indirgenerek, GSH'ın geri dönüşümünü ve daha fazla TNB'nin üretimini sağlamaktadır. TNB'nin üretimi ile örnekteki GSH konsantrasyonu birbiri ile doğru orantılıdır. 405-414 nm'de TNB'nin absorbans ölçümü, örnekteki GSH ile ilgili değerlendirme sağlamaktadır (78-80) (Şekil 3-4).



Şekil 3-4: GSH döngüsü

3.3.3.2. Deproteinasyon Ön İşlemi

Proteinlerde bulunan partiküller ve sülfidril gruplarının neden olabileceği interferansları önlemek amacıyla mümkün olduğunca örneklerde bulunan proteinlerin uzaklaştırılması gerekmektedir.

Metafosforik asit çözeltisi: 5 g MPA, 50 ml Milli-Q su ile hazırlanmıştır. Örneğe eşit hacimde MPA çözeltisi eklenerek, vortekslenmiş ve 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda 2000xg'de en az 2 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant elde edilmiştir.

Trietanolamin çözeltisi (4M): 531 µl TEAM ve 469 µl Milli-Q su ile hazırlanmıştır. Elde edilen her 1 ml süpernatant için 50 µl olacak şekilde TEAM çözeltisi eklenerek vortekslenmiş ve örnekler GSH tayini için hazırlanmıştır.

3.3.3.3. Kullanılan Çözeltiler

GSH-MES tamponu: 0,4 M MES, 0,1 M fosfat ve 2 mM EDTA içermektedir. 60 ml Milli-Q su kullanılarak dilüe edilmiştir.

GSSG standardı: 25 µM GSSG içermektedir.

GSH ko-faktör karışımı: Liyofilize $NADP^+$ ve glukoz-6-fosfat, 0,5 ml saf su ile dilüe edilmiştir.

GSH enzim karışımı: GR ve G6PDH içeren vial 2 ml MES tamponu ile sulandırılmıştır.

GSH-DTNB: Liyofilize DTNB içeren vial 0,5 ml Milli-Q su ile dilüe edilmiştir.

Reaksiyon karışımı: 20 ml hazırlanmıştır. 11,25 ml MES tamponu, 0,45 ml ko-faktör karışımı, 2,10 ml enzim karışımı, 2,30 ml Milli-Q su ve 0,45 ml DTNB içermektedir.

3.3.3.4. GSH Standart Serisinin Hazırlanması

	GSSG standardı (µl)	**MES tamponu (µl)**	**GSSG konsantrasyonu (µM)**	**Total GSH ekivalenti (µM)**
Standart No. 1	0	500	0	0
Standart No. 2	5	495	0,25	0,50
Standart No. 3	10	490	0,50	1,00
Standart No. 4	20	480	1,00	2,00
Standart No. 5	40	460	2,00	4,00
Standart No. 6	80	420	4,00	8,00
Standart No. 7	120	380	6,00	12,00
Standart No. 8	160	340	8,00	16,00

3.3.3.5. Yöntem

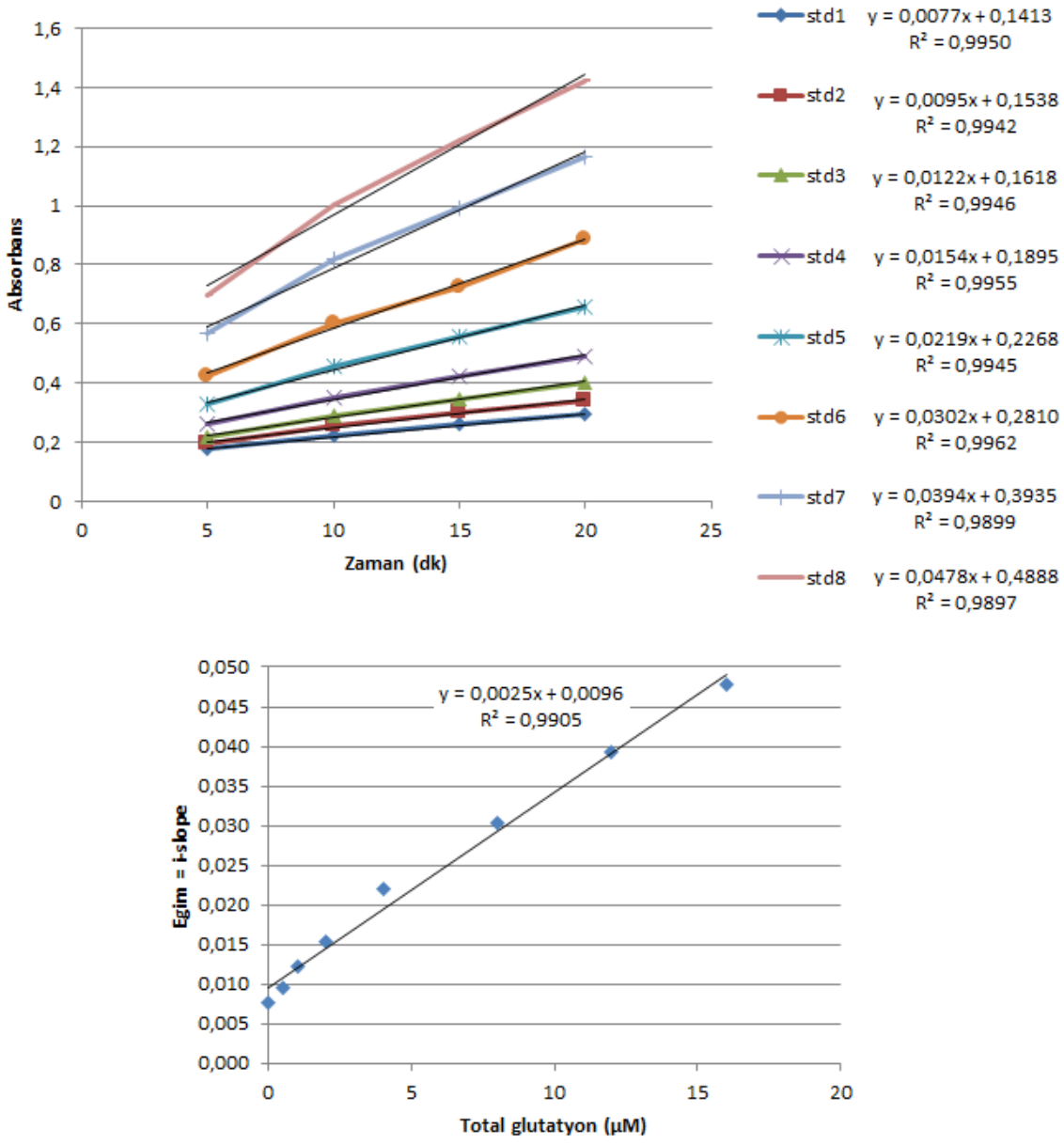
Standart kuyucukları: 50 µl A-H standartları,

Örnek kuyucukları: 50 µl örnek eklenmiştir.

Reaksiyon karışımı taze olarak hazırlanmış ve tüm kuyucuklara 150 µl eklenmiş ve karanlıkta inkübe edilmiştir.

Süre sonunda 405 nm'de 20 dk boyunca 5'er dakikalık aralıklarla toplam 4 absorbans ölçümü yapılmıştır.

Sonuçlar standart eğri grafiğine göre hesaplanmıştır (Şekil 3-5).



Şekil 3-5: Total glutatyon standart eğrisi

3.3.4. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi Tayini

Çalışmada Cayman Glutatyon Peroksidaz Kit (Katalog No: 703102) kullanılmıştır. Bu kit ile GPx aktivitesi, GR ile eşleşmiş reaksiyon sonucu indirekt olarak ölçülmektedir.

3.3.4.1. Prensip

GPx tarafından ROOH redüksiyonu sonucu oluşan GSSG, GR ve NADPH ile tekrar indirgenmiş formuna dönüşmektedir.

$$ROOH + 2\,GSH \xrightarrow{GPx} ROH + GSSG + H_2O$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2\,GSH + NADP^+$$

NADPH'ın $NADP^+$'ye oksidasyonu ile birlikte 340 nm'de absorbansta azalma meydana gelmektedir. GPx aktivitesinin hız kısıtlayıcı olduğu koşullarda A_{340}'daki azalma ile örnekteki GPx aktivitesi doğru orantılıdır (81).

3.3.4.2. Kullanılan Çözeltiler

GPx tamponu (10x): 50 ml Tris-HCl ve 5 mM EDTA içermektedir (pH=7,6). 3 ml tampon, 27 ml saf su ile dilüe edilmiştir.

GPx örnek tamponu (10x): 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA ve 1 mg/ml BSA içermektedir. 2 ml örnek tamponu, 18 ml saf su ile dilüe edilmiştir.

GPx (kontrol): 50 µl GPx içermektedir. 10 µl enzim, 490 µl örnek tamponu ile dilüe edilmiştir.

GPx ko-substrat karışımı: Liyofilize NADPH, GSH ve GR içermektedir. 2 ml saf su ile dilüe edilmiştir.

GPx kümen hidroperoksit (2,5 ml)

3.3.4.3. Yöntem

Non-enzimatik kuyucukları: 120 µl GPx tamponu ve 50 µl ko-substrat karışımı,

Pozitif kontrol kuyucukları: 100 µl GPx tamponu, 50 µl ko-substrat karışımı ve 20 µl GPx,

Örnek kuyucukları: 100 µl GPx tamponu, 50 µl ko-substrat karışımı ve 20 µl örnek yüklenmiştir.

Tüm kuyucuklara 20 µl kümen hidroperoksit eklenerek reaksiyon başlatılmışıtr.

Birkaç saniye sonunda, 340 nm'de dakikada 1 kez olacak şekilde 5 absorbans ölçümü yapılmıştır.

3.3.4.4. Hesaplama

$$\Delta A_{340/dk} = \frac{\left| A_{340}\ (2.\ zaman) - A_{340}\ (1.\ zaman) \right|}{2.\ zaman\ (dk) - 1.\ zaman\ (dk)}$$

$$\text{GPx aktivitesi} = \frac{\Delta A_{340/dk}}{0{,}00373\ \mu M^{-1}} \times \frac{0{,}19\ ml}{0{,}02\ ml} \times \text{örnek dilüsyonu} = \mu mol/dk/ml$$

$0{,}00373\ \mu M^{-1}$: NADPH ekstinksiyon katsayısı

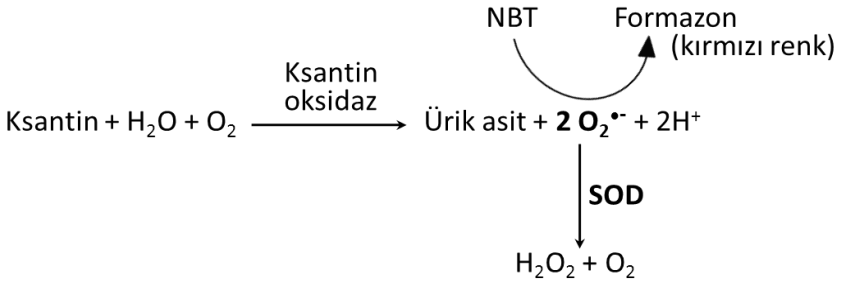
1 Ünite: 25˚C'de 1 dk.da 1 µmol NADPH'ın $NADP^{+}$'ye oksidasyonunu sağlayan enzim miktarıdır.

3.3.5. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayini

Dokularda SOD aktivitesi Sun'ın modifiye yöntemine göre ölçülmüştür (82).

3.3.5.1. Prensip

Yöntemin esası ksantin/ksantin oksidaz sistemiyle oluşturulan $O_2^{\bullet-}$'nin NBT'yi indirgemesinin SOD tarafından inhibisyonuna dayanmaktadır (Şekil 3-6). 1 Ünite SOD aktivitesi NBT'nin indirgenmesini %50 inhibe eden protein konsantrasyonu olarak ifade edilmektedir.



Şekil 3-6: NBT ve SOD aktivitesi

3.3.5.2. Kullanılan Çözeltiler

Ksantin oksidaz çözeltisi (0,2 U/ml)

Bakır klorür çözeltisi (8 mM)

Ksantin çözeltisi (0,3 mM)

Na_2EDTA çözeltsi (0,6 mM)

NBT çözeltsi (150 μM)

Sodyum karbonat çözeltisi (0,6 mM)

Albümin çözeltisi (% 100 mg)

Reaksiyon karışımı (pH=10,2): 40 ml ksantin çözeltisi, 20 ml Na_2EDTA çözeltisi, 20 ml NBT çözeltsi, 12 ml sodyum karbonat çözeltisi ve 6 ml albümin çözeltsi içermektedir.

3.3.5.3. Yöntem

	Kör (ml)	Örnek (ml)
Reaksiyon karışımı	2,850	2,850
Distile su	0,05	-
Örnek	-	0,05
Ksantin oksidaz	0,05	0,05
Karıştırılıp, 25˚C'de 20 dk inkübe edilmiştir.		
Bakır klorür	0,05	0,05

Kör ve örneklerin 560 nm dalga boyunda formazon oluşumları ölçülmüştür.

3.3.5.4. Hesaplama

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(A_{kör} - A_{örnek})}{A_{kör}} \times 100$$

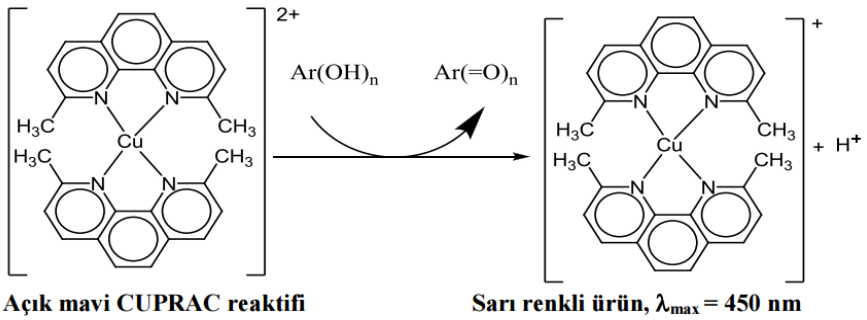
Bu reaksiyon karışımında %50 inhibisyon, 1 Ünite enzim aktivitesine karşılık gelmektedir.

3.3.6. Total Antioksidan Kapasite Tayini

Beyin ve karaciğer dokularında total antioksidan kapasite tayininde CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity; Cu(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi kullanılmıştır.

3.3.6.1. Prensip

Bu yöntemde, kromojenik reaktif olarak kullanılan, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuprin:Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu Cu(II)-Nc kompleksi (CUPRAC reaktifi)'nin antioksidan varlığında Cu(I)-Nc kelatına indirgenmesi ve bu kelatın maksimum ışığı absorpladığı dalgaboyu olan 450 nm'deki absorbansının ölçümünden yararlanarak antioksidan kapasite hesaplanmaktadır (83) (Şekil 3-4).



Şekil 3-7: Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlar ile reaksiyonu sonucu Cu(I)-Nc kelatının oluşumu

3.3.6.2. Kullanılan Çözeltiler

$CuCl_2.2H_2O$: 10^{-2} M konsantrasyonunda saf su ile hazırlanmıştır.

Neokuprin: $7{,}5x10^{-3}$ M konsantrasyonunda etil alkol ile hazırlanmıştır.

%5 SDS'li üreli tampon: 0,086M Tris-hidroksimetil aminometan, 0,09M glisin ve 4mM sodyum sitrattan oluşan karışım 8M üre çözeltisi ile çözülmüş ve pH'sı 6M HCl ile 7'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan bu üreli tampon ile %5 SDS'li tampon (w/v) hazırlanmıştır.

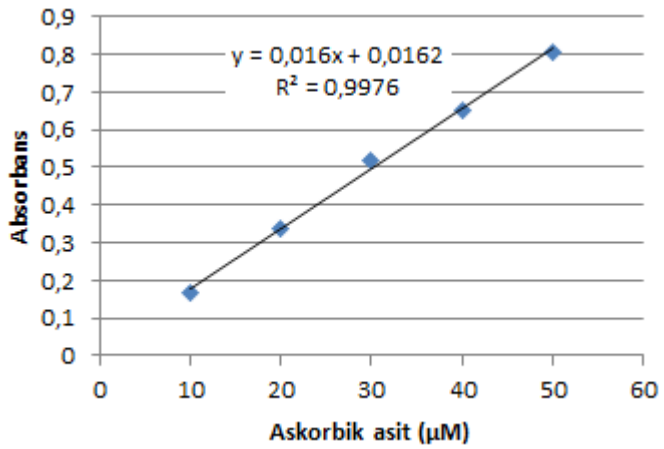
Standart Tris tamponu: 0,086M Tris-hidroksimetil aminometan, 0,09M glisin ve 4mM sodyum sitrattan oluşan karışımın pH'sı 6M HCl ile 8'e ayarlanmıştır.

3.3.6.3. Yöntem

	Kör (µl)	Standart (µl)	Örnek (µl)
$CuCl_2$	400	400	400
Neokuprin	400	400	400
%5 SDS'li üreli tampon	400	400	400
Standart Tris tamponu	380	380	380
Distile su	20	-	-
Standart	-	20	-
Örnek	-	-	20

Karıştırılıp oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildikten sonra, 450 nm dalga boyunda köre karşı standart ve örneklerin absorbansları okunmuştur.

Sonuçlar standart eğri grafiğine göre hesaplanmıştır (Şekil 3-8).

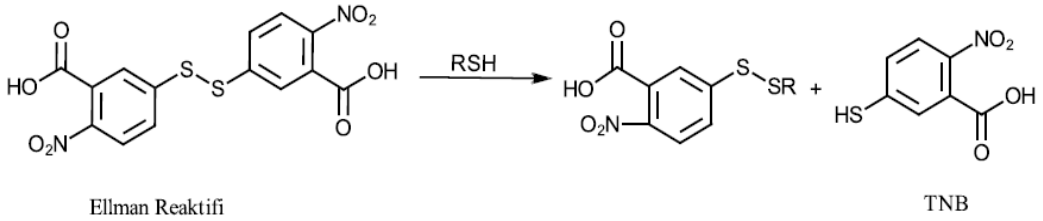


Şekil 3-8: Askorbik asit standart eğrisi

3.3.7. Total Tiyol Tayini

3.3.7.1. Prensip

İlk olarak G.L. Ellman tarafından serbest tiyol miktarının belirlenmesi için geliştirilen yöntemde 5,5'ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB/Ellman reaktifi) kullanılmaktadır. Ellman reaktifi hızlı ve spesifik olarak serbest -SH gruplarıyla reaksiyona girerek, 412 nm'de maksimum absorbansa sahip sarı renkli kromojenik 5-tiyo-2-nitrobenzoat (TNB) anyonunu oluşturur (84) (Şekil 3-9).



Şekil 3-9: Ellman reaktifinin tiyol grupları ile etkileşimi

3.3.7.2. Kullanılan Çözeltiler

Standart Tris tamponu: 0,086M Tris-hidroksimetil aminometan, 0,09M glisin ve 4mM sodyum sitrattan oluşan karışımın pH'sı 6M HCl ile 8'e ayarlanmıştır.

Üreli tampon: 0,086M Tris-hidroksimetil aminometan, 0,09M glisin ve 4mM sodyum sitrattan oluşan karışım 8M üre çözeltisi ile çözülmüş ve pH'sı 6M HCl ile 7'ye ayarlanmıştır.

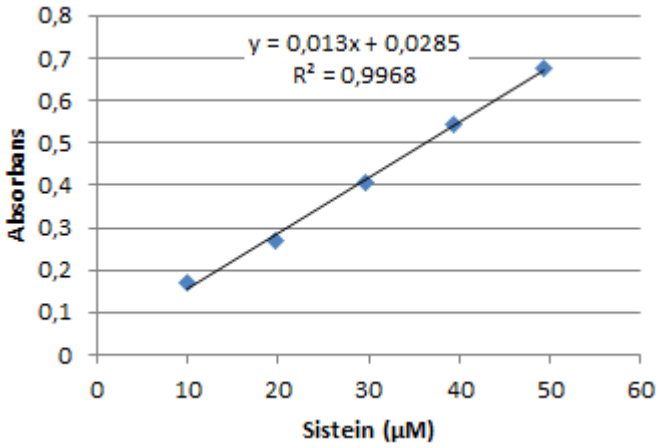
Ellman reaktifi: 4 mg DTNB, 1 ml standart Tris tamponunda çözülerek hazırlanmıştır.

3.3.7.3. Yöntem

	Kör (µl)	Standart (µl)	Örnek (µl)
Distile su	20	-	-
Standart	-	20	-
Örnek	-	-	20
Üreli tampon	1980	1980	1980
Ellman reaktifi	30	30	30

Karıştırılıp oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildikten sonra, 412 nm dalga boyunda köre karşı standart ve örneklerin absorbansları okunmuştur.

Sonuçlar standart eğri grafiğine göre hesaplanmıştır (Şekil 3-10).



Şekil 3-10: Sistein standart eğrisi

3.3.8. Total Protein Tayini

Beyin ve karaciğer dokularında protein düzeylerinin belirlenmesinde Folin Lowry yöntemi kullanılmıştır (85).

3.3.8.1. Prensip

Yöntem, alkali koşullarda bakır (II) iyonlarının proteinlerin peptid bağları ile kompleks oluşturması (Biüret reaksiyonu) ve daha sonra ilave edilen Folin-Ciocalteau ayıracının proteinlerde bulunan tirozin ve triptofan ile indirgenerek, şiddetli mavi-yeşil renk vermesi esasına dayanmaktadır. Reaksiyon sonucu oluşan mavi renkli ürünün absorbansı 750 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

3.3.8.2. Kullanılan Çözeltiler

Bakır sülfat (%0,1)

Alkali tartarat stok çözeltisi: 1 L, 0,1 N NaOH içinde 20,1 g sodyum karbonat, 0,5 g sodyum tartarat çözülerek hazırlanmıştır.

Alkali tartarat çalışma çözeltisi: 9 birim alkali tartarat stok çözeltisi, 1 birim bakır sülfat çözeltisi ile seyreltilerek oluşturulmuştur.

Folin-Ciocalteau reaktifi: 1:1 distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır.

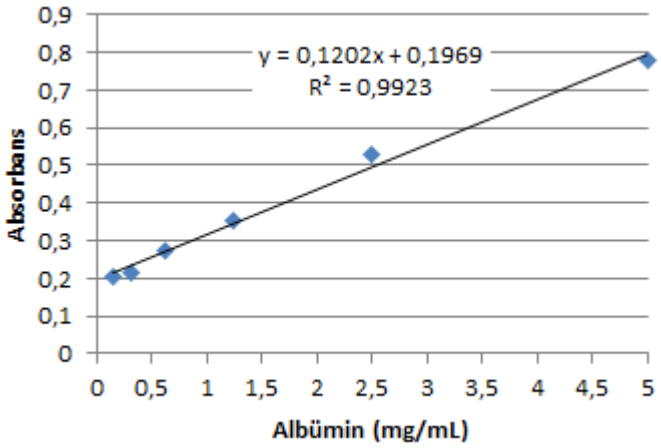
3.3.8.3. Yöntem

	Kör (ml)	**Standart (ml)**	**Örnek (ml)**
Distile su	0,01	-	-
Standart	-	0,01	-
Örnek	-	-	0,01
Alkali tartarat çalışma çözeltisi	2,5	2,5	2,5
Oda sıcaklığında, 15 dk inkübe edilmiştir.			
Folin-Ciocalteau reaktifi	0,25	0,25	0,25

Karıştırılıp oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildikten sonra, 750 nm dalga boyunda köre karşı standart ve örneklerin absorbansları okunmuştur. Sonuçlar standart eğri grafiğine göre hesaplanmıştır (Şekil 3-11).

3.3.8.4. Hesaplama

$$\% \text{ mg protein} = \frac{A_{\text{örnek}}}{A_{\text{standart}}} \text{ x 100 x dilüsyon faktörü}$$



Şekil 3-11: Albümin standart eğrisi

3.3.9. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizi SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 21.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır.

Tanımlayıcı değerler ortalama, standart sapma, medyan ve minimum-maksimum olarak verilmiştir. Kontrol, Stres, SBT ve SBT+Stres gruplarının karşılaştırmasında Kruskal Wallis testi kullanılmış, $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Grupların ikili karşılaştırmaları Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney-U testi kullanılarak yapılmış, düzeltilmiş anlamlılık sınırı $p<0,008$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Karaciğer dokusu 3-nitrotirozin düzeyleri Tablo 4-1'de, beyin dokusu 3- nitrotirozin düzeyleri ise Tablo 4-2'de gösterilmiştir.

Karaciğer dokusu total nitrit + nitrat düzeyleri Tablo 4-3'te, beyin dokusu total nitrit + nitrat düzeyleri ise Tablo 4-4'te gösterilmiştir.

Karaciğer dokusu total glutatyon düzeyleri Tablo 4-5'te, beyin dokusu total glutatyon düzeyleri ise Tablo 4-6'da gösterilmiştir.

Karaciğer dokusu glutatyon peroksidaz aktiviteleri Tablo 4-7'de, beyin dokusu glutatyon peroksidaz aktiviteleri ise Tablo 4-8'de gösterilmiştir.

Karaciğer dokusu süperoksit dismutaz aktiviteleri Tablo 4-9'da, beyin dokusu süperoksit dismutaz aktiviteleri ise Tablo 4-10'da gösterilmiştir.

Karaciğer dokusu total antioksidan kapasite düzeyleri Tablo 4-11'de, beyin dokusu total antioksidan kapasite düzeyleri ise Tablo 4-12'de gösterilmiştir.

Karaciğer dokusu total tiyol düzeyleri Tablo 4-13'te, beyin dokusu total tiyol düzeyleri ise Tablo 4-14'te gösterilmiştir.

Karaciğer dokusu GSH/GSSG düzeyleri Tablo 4-15'te, beyin dokusu GSH/GSSG düzeyleri ise Tablo 4-16'da gösterilmiştir.

Karaciğer dokusu 3-nitrotirozin düzeylerinin ikli karşılaştırılması Şekil 4-1'de, beyin dokusu 3-nitrotirozin düzeylerinin ikli karşılaştırılması ise Şekil 4-2'de gösterilmiştir.

Karaciğer dokusu total nitrit + nitrat düzeylerinin ikili karşılaştırılması Şekil 4-3'te, beyin dokusu total nitrit + nitrat düzeylerinin ikili karşılaştırılması ise Şekil 4-4'te gösterilmiştir.

Karaciğer dokusu total glutatyon düzeylerinin ikili karşılaştırılması Şekil 4-5'te, beyin dokusu total glutatyon düzeylerinin ikili karşılaştırılması ise Şekil 4-6'da gösterilmiştir.

Karaciğer dokusu glutatyon peroksidaz aktivitelerinin ikili karşılaştırılması Şekil 4-7'de, beyin dokusu glutatyon peroksidaz aktivitelerinin ikili karşılaştırılması ise Şekil 4-8'de gösterilmiştir.

Karaciğer dokusu süperoksit dismutaz aktivitelerinin ikili karşılaştırılması Şekil 4-9'da, beyin dokusu süperoksit dismutaz aktivitelerinin ikili karşılaştırılması ise Şekil 4-10'da gösterilmiştir.

Karaciğer dokusu total antioksidan kapasite düzeylerinin ikili karşılaştırılması Şekil 4-11'de, beyin dokusu total antioksidan kapasite düzeylerinin ikili karşılaştırılması ise Şekil 4-12'de gösterilmiştir.

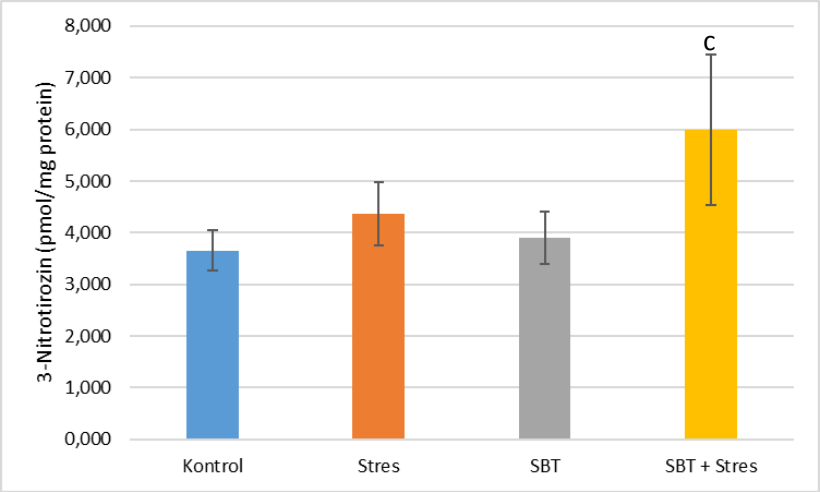
Karaciğer dokusu total tiyol düzeylerinin ikili karşılaştırılması Şekil 4-13'te, beyin dokusu total tiyol düzeylerinin ikili karşılaştırılması ise Şekil 4-14'te gösterilmiştir.

Karaciğer dokusu GSH/GSSG düzeylerinin ikili karşılaştırılması Şekil 4-15'te, beyin dokusu GSH/GSSG düzeylerinin ikili karşılaştırılması ise Şekil 4-16'da gösterilmiştir.

4.1. 3-Nitrotirozin Düzeyleri

Tablo 4-1: Karaciğer dokusu 3-nitrotirozin düzeyleri (pmol/mg protein)

	KONTROL	STRES	SBT	SBT + STRES
	3,28	3,66	4,39	4,01
	3,70	4,89	4,01	5,56
	3,24	4,76	4,51	4,28
	3,79	3,91	4,15	6,23
	3,22	3,83	2,88	7,27
	4,24	4,30	3,64	3,82
	3,63	4,80	3,82	8,35
	4,15	4,77	3,83	8,41
ORT ± SS	**3,66 ± 0,40**	**4,37 ± 0,60**	**3,90 ± 0,51**	**5,99 ± 1,46**
MEDYAN (MİN - MAK)	**3,66 (3,22 - 4,24)**	**4,53 (3,66 - 4,89)**	**3,92 (2,88 - 4,51)**	**5,89 (3,82 - 8,41)**



Şekil 4-1: Gruplara ait karaciğer dokusu 3-nitrotirozin düzeylerinin karşılaştırılması

(c: kontrol grubuna göre)

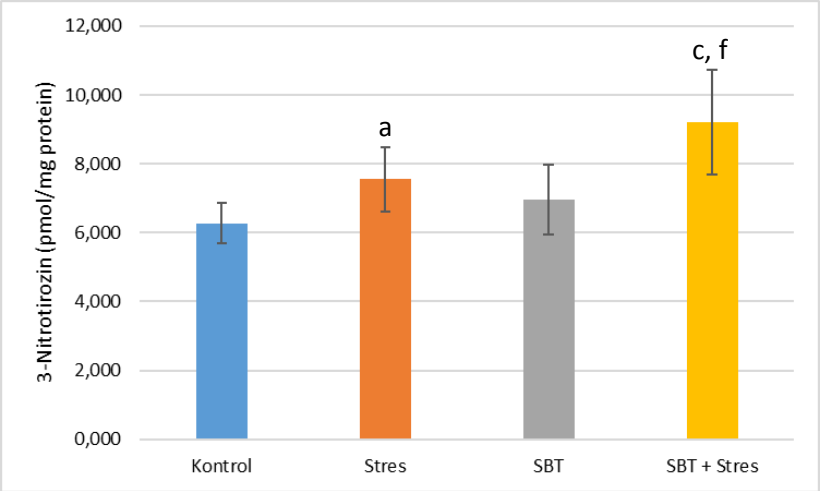
Grupların ikili karşılaştırılmasında;

Kontrol ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,002) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Grupların diğer ikili karşılaştırmalarında anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,008).

Tablo 4-2: Beyin dokusu 3-nitrotirozin düzeyleri (pmol/mg protein)

	KONTROL	STRES	SBT	SBT + STRES
	6,22	7,54	6,63	10,15
	7,00	7,11	5,80	7,78
	5,83	7,21	8,61	10,89
	6,61	8,71	6,14	11,71
	5,56	6,94	7,40	7,65
	6,42	8,97	7,67	8,50
	5,55	6,12	7,58	8,37
	6,98	7,79	5,85	8,52
ORT ± SS	**6,27 ± 0,58**	**7,55 ± 0,94**	**6,96 ± 1,01**	**9,20 ± 1,52**
MEDYAN (MİN - MAK)	**6,32 (5,55 - 7,00)**	**7,38 (6,12 – 8,97)**	**7,02 (5,80 - 8,61)**	**8,51 (7,65 - 11,71)**



Şekil 4-2: Gruplara ait beyin dokusu 3-nitrotirozin düzeylerinin karşılaştırılması

(a, c: kontrol grubuna göre; f: SBT grubuna göre)

Grupların ikili karşılaştırılmasında;

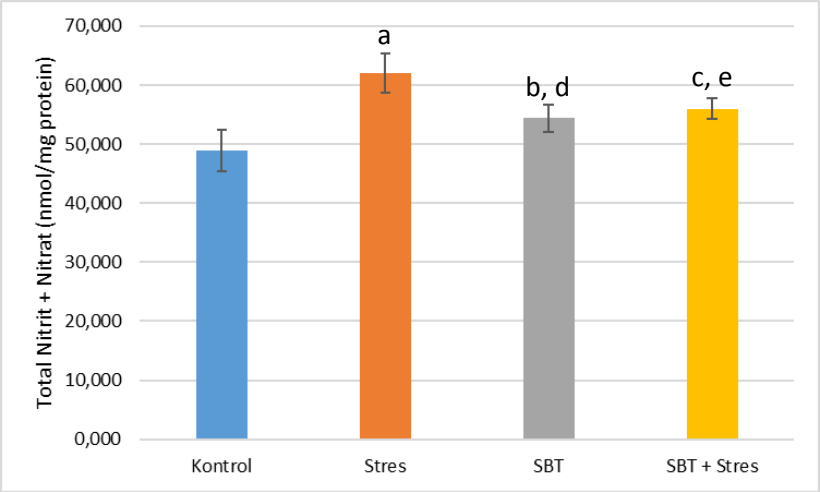
Kontrol ve Stres grupları arasında (p=0,007), Kontrol ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,0001), SBT ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,005) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Grupların diğer ikili karşılaştırmalarında anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,008).

4.2. Total Nitrit + Nitrat Düzeyleri

Tablo 4-3: Karaciğer dokusu total nitrit + nitrat düzeyleri (nmol/mg protein)

	KONTROL	STRES	SBT	SBT + STRES
	52,63	65,63	57,27	57,58
	45,63	61,83	52,61	58,08
	51,48	66,14	55,93	56,33
	44,82	58,13	57,87	54,79
	47,65	60,72	52,63	53,62
	49,67	65,82	51,92	57,38
	53,87	58,63	52,67	56,30
	45,62	59,84	54,32	53,72
ORT ± SS	**48,92 ± 3,50**	**62,09 ± 3,33**	**54,40 ± 2,33**	**55,98 ± 1,74**
MEDYAN (MİN - MAK)	**48,66 (44,82 - 53,87)**	**61,28 (58,13 – 66,14)**	**53,49 (51,92 - 57,87)**	**56,31 (53,62 - 58,08)**



Şekil 4-3: Gruplara ait karaciğer dokusu total nitrit + nitrat düzeylerinin karşılaştırılması

(a, b, c: kontrol grubuna göre; d, e: stres grubuna göre)

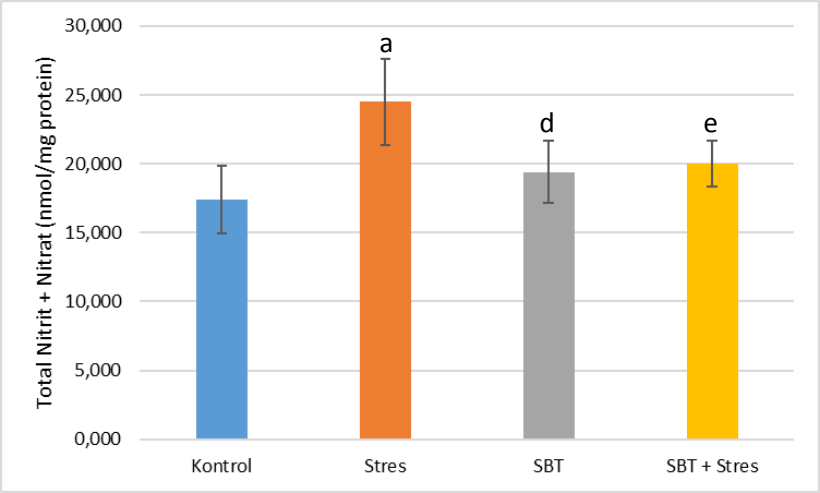
Grupların ikili karşılaştırılmasında;

Kontrol ve Stres grupları arasında (p=0,0001), Kontrol ve SBT grupları arasında (p=0,005), Kontrol ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,001), Stres ve SBT grupları arasında (p=0,0001), Stres ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,0001) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

SBT ve SBT + Stres gruplarının ikili karşılaştırmasında ise anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,008).

Tablo 4-4: Beyin dokusu total nitrit + nitrat düzeyleri (nmol/mg protein)

	KONTROL	STRES	SBT	SBT + STRES
	20,73	22,85	16,63	22,54
	18,56	21,74	19,94	19,92
	15,14	23,57	22,67	19,72
	16,41	29,94	16,77	18,58
	20,53	21,69	21,86	22,66
	16,72	22,97	17,78	18,53
	17,26	24,74	18,79	19,62
	13,74	28,67	20,88	18,75
ORT ± SS	**17,39 ± 2,46**	**24,52 ± 3,13**	**19,42 ± 2,29**	**20,04 ± 1,67**
MEDYAN (MİN - MAK)	**16,99 (13,74 - 20,73)**	**23,27 (21,69 - 29,94)**	**19,36 (16,63 - 22,67)**	**19,67 (18,53 - 22,66)**



Şekil 4-4: Gruplara ait beyin dokusu total nitrit + nitrat düzeylerinin karşılaştırılması

(a: kontrol grubuna göre; d, e: stres grubuna göre)

Grupların ikili karşılaştırılmasında;

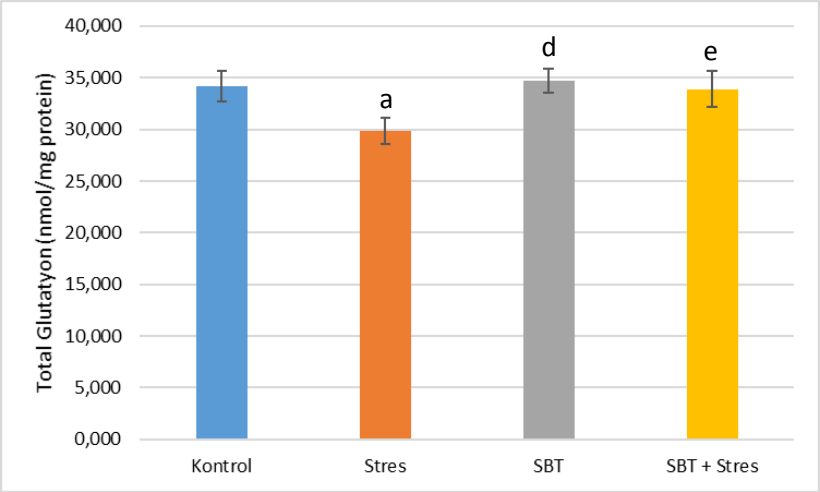
Kontrol ve Stres grupları arasında (p=0,0001), Stres ve SBT grupları arasında (p=0,002), Stres ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,002) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Grupların diğer ikili karşılaştırmalarında anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,008).

4.3. Total Glutatyon Düzeyleri

Tablo 4-5: Karaciğer dokusu total glutatyon düzeyleri (nmol/mg protein)

	KONTROL	STRES	SBT	SBT + STRES
	32,75	29,82	34,82	31,84
	35,69	29,97	35,18	32,27
	32,87	30,79	35,58	33,72
	36,72	30,18	35,62	35,64
	34,28	28,67	34,76	36,56
	33,57	31,93	32,86	35,28
	34,72	27,73	33,15	32,58
	32,87	29,82	35,76	33,28
ORT ± SS	**34,18 ± 1,46**	**29,86 ± 1,27**	**34,72 ± 1,12**	**33,90 ± 1,73**
MEDYAN (MİN - MAK)	**33,92 (32,75 - 36,72)**	**29,90 (27,73 - 31,93)**	**34,99 (32,86 - 35,76)**	**33,50 (31,84 - 36,56)**



Şekil 4-5: Gruplara ait karaciğer dokusu total glutatyon düzeylerinin karşılaştırılması

(a: kontrol grubuna göre; d, e: stres grubuna göre)

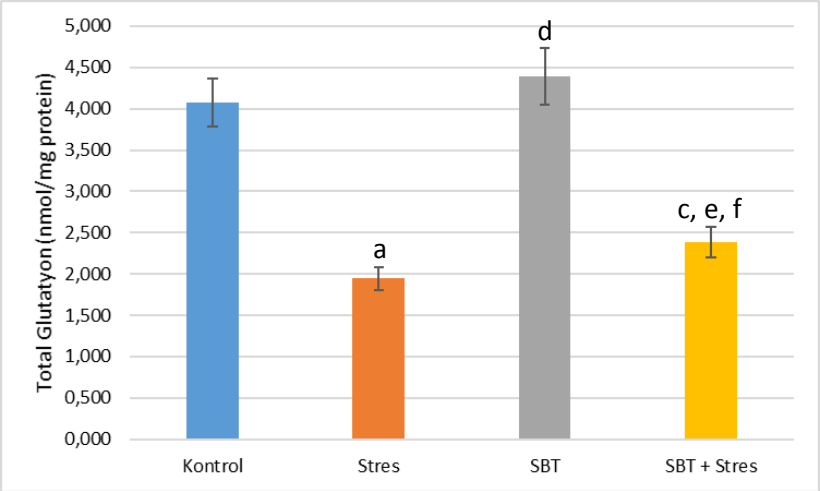
Grupların ikili karşılaştırılmasında;

Kontrol ve Stres grupları arasında (p=0,0001), Stres ve SBT grupları arasında (p=0,0001), Stres ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,0001) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Grupların diğer ikili karşılaştırmalarında anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,008).

Tablo 4-6: Beyin dokusu total glutatyon düzeyleri (nmol/mg protein)

	KONTROL	STRES	SBT	SBT + STRES
	3,68	1,97	4,05	2,58
	4,96	1,80	4,33	2,42
	3,86	1,81	4,68	2,63
	4,33	2,23	4,03	2,45
	3,65	1,94	4,38	2,38
	4,08	1,84	4,76	2,16
	4,61	1,93	4,03	2,10
	4,10	2,04	4,87	2,38
ORT ± SS	**4,07 ± 0,29**	**1,94 ± 0,14**	**4,39 ± 0,34**	**2,39 ± 0,19**
MEDYAN (MİN - MAK)	**4,02 (3,68 - 4,61)**	**1,93 (1,80 - 2,23)**	**4,35 (4,03 - 4,87)**	**2,39 (2,10 - 2,63)**



Şekil 4-6: Gruplara ait beyin dokusu total glutatyon düzeylerinin karşılaştırılması

(a, c: kontrol grubuna göre; d, e: stres grubuna göre; f: SBT grubuna göre)

Grupların ikili karşılaştırılmasında;

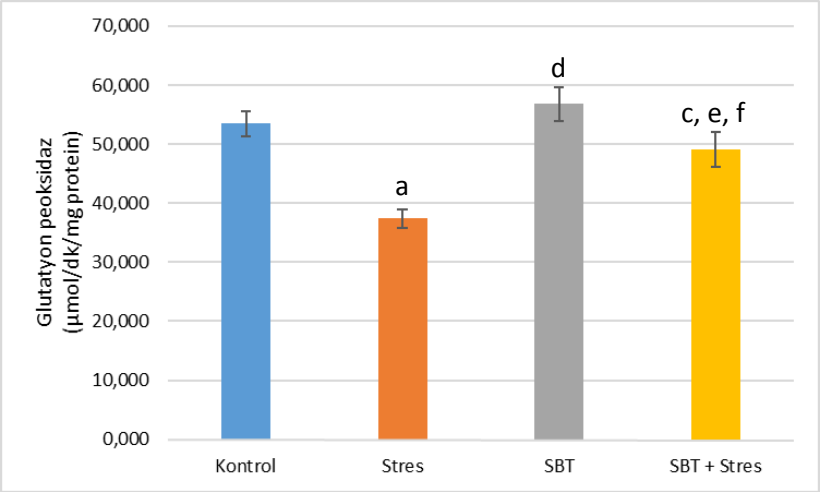
Kontrol ve Stres grupları arasında (p=0,0001), Kontrol ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,0001), Stres ve SBT grupları arasında (p=0,0001), Stres ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,001), SBT ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,0001) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Kontrol ve SBT gruplarının ikili karşılaştırmasında ise anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,008).

4.4. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi

Tablo 4-7: Karaciğer dokusu glutatyon peroksidaz aktivitesi (µmol/dk/mg protein)

	KONTROL	STRES	SBT	SBT + STRES
	56,78	36,87	58,94	51,84
	54,25	40,63	59,87	48,93
	51,25	35,25	54,62	50,84
	53,52	36,83	53,53	52,75
	56,20	37,88	58,28	48,85
	51,63	36,60	52,48	49,73
	52,63	36,74	57,70	43,76
	51,53	38,44	59,39	46,50
ORT ± SS	**53,48 ± 2,13**	**37,41 ± 1,61**	**56,85 ± 2,87**	**49,15 ± 2,92**
MEDYAN (MİN - MAK)	**53,07 (51,25 - 56,78)**	**38,85 (35,25 - 40,63)**	**57,99 (52,48 - 59,87)**	**49,33 (43,76 - 52,75)**



Şekil 4-7: Gruplara ait karaciğer dokusu glutatyon peroksidaz aktivitelerinin karşılaştırılması

(a, c: kontrol grubuna göre; d, e: stres grubuna göre; f: SBT grubuna göre)

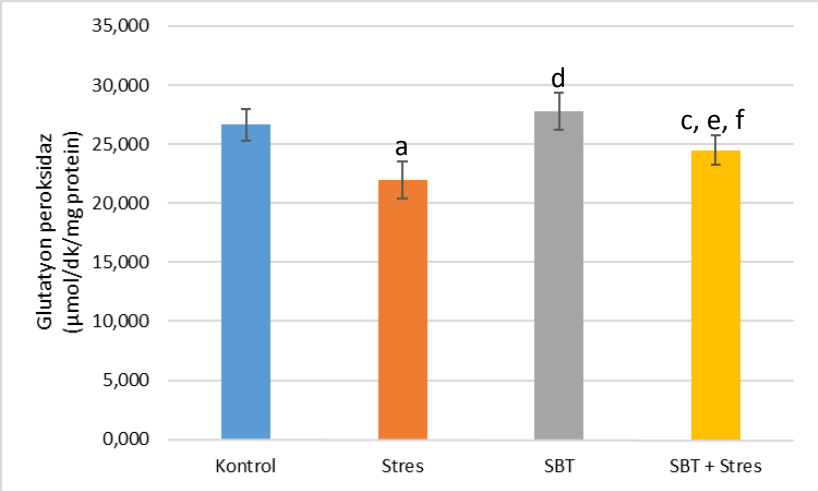
Grupların ikili karşılaştırılmasında;

Kontrol ve Stres grupları arasında (p=0,0001), Kontrol ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,007), Stres ve SBT grupları arasında (p=0,0001), Stres ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,0001), SBT ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,0001) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Kontrol ve SBT gruplarının ikili karşılaştırmasında ise anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,008).

Tablo 4-8: Beyin dokusu glutatyon peroksidaz aktivitesi (µmol/dk/mg protein)

	KONTROL	STRES	SBT	SBT + STRES
	27,47	23,18	26,38	22,74
	26,85	20,37	28,16	23,98
	26,77	19,42	26,36	23,66
	25,85	22,73	27,87	26,71
	25,74	21,33	28,36	24,48
	28,41	21,65	29,87	23,86
	24,14	22,87	29,63	24,66
	27,84	24,04	25,64	25,83
ORT ± SS	**26,63 ± 1,36**	**21,95 ± 1,54**	**27,79 ± 1,56**	**24,49 ± 1,26**
MEDYAN (MİN - MAK)	**26,81 (24,14 - 28,41)**	**22,19 (19,42 - 24,04)**	**28,02 (25,64 - 29,87)**	**24,23 (22,74 - 26,71)**



Şekil 4-8: Gruplara ait beyin dokusu glutatyon peroksidaz aktivitelerinin karşılaştırılması

(a, c: kontrol grubuna göre; d, e: stres grubuna göre; f: SBT grubuna göre)

Grupların ikili karşılaştırılmasında;

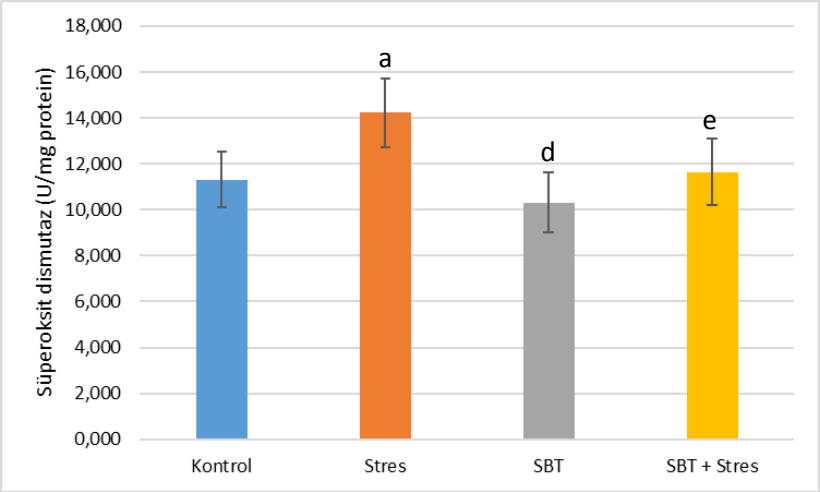
Kontrol ve Stres grupları arasında (p=0,0001), Kontrol ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,007), Stres ve SBT grupları arasında (p=0,0001), Stres ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,005), SBT ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,002) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Kontrol ve SBT gruplarının ikili karşılaştırmasında ise anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,008).

4.5. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

Tablo 4-9: Karaciğer dokusu süperoksit dismutaz aktivitesi (U/mg protein)

	KONTROL	STRES	SBT	SBT + STRES
	12,73	14,87	9,65	11,86
	11,98	15,36	12,69	13,34
	9,84	16,73	9,24	13,75
	10,64	13,83	10,63	10,76
	12,84	12,83	11,85	10,61
	10,93	12,52	9,37	9,83
	9,68	12,73	9,70	12,61
	11,83	14,87	9,32	10,43
ORT ± SS	**11,31 ± 1,22**	**14,22 ± 1,49**	**10,31 ± 1,31**	**11,65 ± 1,46**
MEDYAN (MİN - MAK)	**11,38 (9,68 - 12,84)**	**14,35 (12,52 - 16,73)**	**9,68 (9,24 - 12,69)**	**11,31 (9,83 - 13,75)**



Şekil 4-9: Gruplara ait karaciğer dokusu süperoksit dismutaz aktivitelerinin karşılaştırılması

(a: kontrol grubuna göre; d, e: stres grubuna göre)

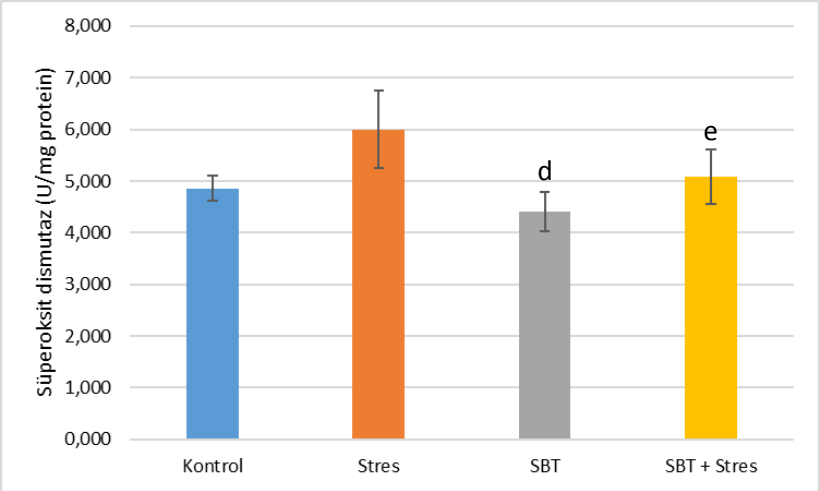
Grupların ikili karşılaştırılmasında;

Kontrol ve Stres grupları arasında (p=0,003), Stres ve SBT grupları arasında (p=0,0001), Stres ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,007) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Grupların diğer ikili karşılaştırmalarında anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,008).

Tablo 4-10: Beyin dokusu süperoksit dismutaz aktivitesi (U/mg protein)

	KONTROL	STRES	SBT	SBT + STRES
	4,98	6,38	4,37	5,38
	4,83	6,44	4,62	4,84
	4,72	5,74	4,24	5,73
	4,67	6,27	4,73	5,37
	5,14	4,37	4,84	4,68
	5,23	5,75	3,87	5,64
	4,79	6,84	4,71	4,75
	4,52	6,18	3,86	4,27
ORT ± SS	**4,86 ± 0,24**	**6,00 ± 0,75**	**4,41 ± 0,39**	**5,08 ± 0,52**
MEDYAN (MİN - MAK)	**4,81 (4,52 - 5,23)**	**6,23 (4,37 - 6,84)**	**4,50 (3,86 - 4,84)**	**5,10 (4,27 - 5,73)**



Şekil 4-10: Gruplara ait beyin dokusu süperoksit dismutaz aktivitelerinin karşılaştırılması

(d, e: stres grubuna göre)

Grupların ikili karşılaştırılmasında;

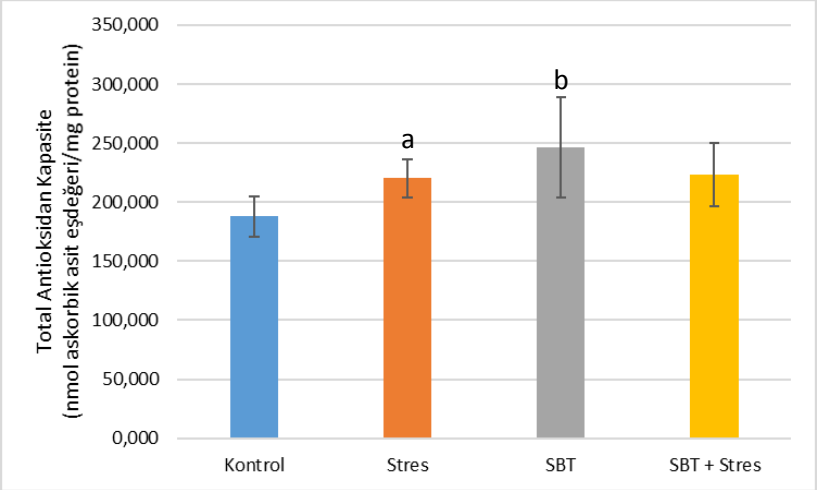
Stres ve SBT grupları arasında (p=0,002), Stres ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,007) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Grupların diğer ikili karşılaştırmalarında anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,008).

4.6. Total Antioksidan Kapasite Düzeyleri

Tablo 4-11: Karaciğer dokusu total antioksidan kapasite düzeyleri (nmol askorbik asit eşdeğeri/mg protein)

	KONTROL	STRES	SBT	SBT + STRES
	192,2	250,7	265,7	253,6
	173,4	220,6	255,4	182,9
	186,6	224,0	321,1	252,8
	182,6	220,1	206,8	205,0
	178,4	201,7	283,5	218,9
	227,5	224,9	198,0	216,1
	183,5	222,5	230,8	253,3
	178,4	196,9	210,9	203,6
ORT ± SS	**187,8 ± 17,0**	**220,2 ± 16,3**	**246,5 ± 42,8**	**223,3 ± 27,0**
MEDYAN (MİN - MAK)	**183,0 (173,4 - 227,5)**	**221,6 (196,9 - 250,7)**	**243,1 (198,0 - 321,1)**	**217,5 (182,9 - 253,6)**



Şekil 4-11: Gruplara ait karaciğer dokusu total antioksidan kapasite düzeylerinin karşılaştırılması

(a, b: kontrol grubuna göre)

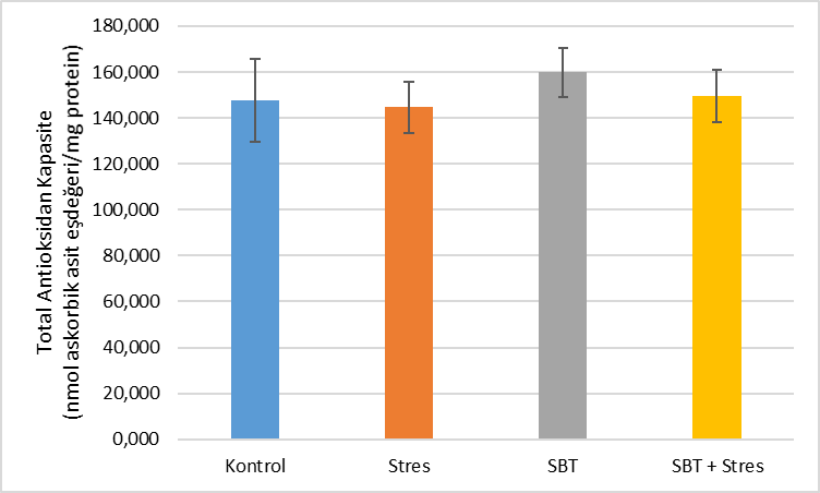
Grupların ikili karşılaştırılmasında;

Kontrol ve Stres grupları arasında (p=0,007), Kontrol ve SBT grupları arasında (p=0,001) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Grupların diğer ikili karşılaştırmalarında anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,008).

Tablo 4-12: Beyin dokusu total antioksidan kapasite düzeyleri (nmol askorbik asit eşdeğeri/mg protein)

	KONTROL	STRES	SBT	SBT + STRES
	127,6	135,1	159,3	135,1
	165,4	139,1	163,6	164,0
	160,7	160,8	144,1	166,1
	167,4	137,0	156,6	150,1
	129,3	129,0	151,9	143,2
	160,4	155,6	172,1	140,4
	143,3	152,3	176,4	156,2
	126,4	148,5	154,3	141,0
ORT ± SS	**147,6 ± 17,9**	**144,7 ± 11,2**	**159,8 ± 10,6**	**149,5 ± 11,5**
MEDYAN (MİN - MAK)	**151,9 (126,4 - 167,4)**	**143,8 (129,0 - 160,8)**	**157,9 (144,1 - 176,4)**	**146,6 (135,1 - 166,1)**



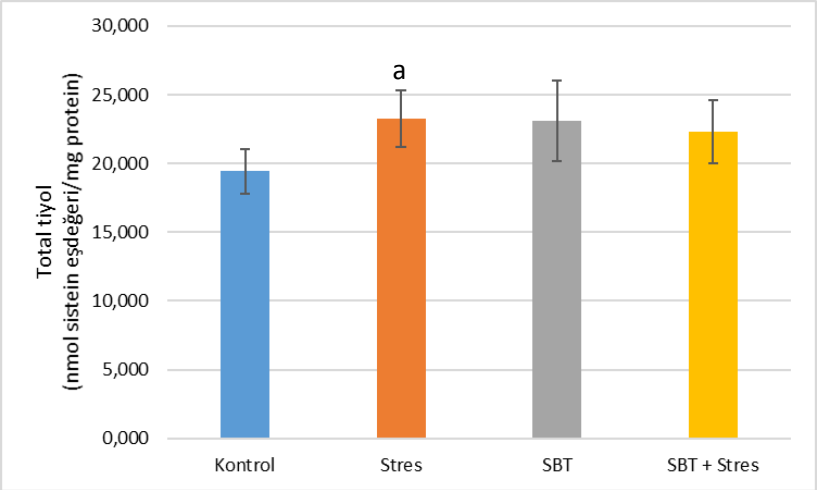
Şekil 4-12: Gruplara ait beyin dokusu total antioksidan düzeylerinin karşılaştırılması

Grupların ikili karşılaştırmalarında anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,008).

4.7. Total Tiyol Düzeyleri

Tablo 4-13: Karaciğer dokusu total tiyol düzeyleri (nmol sistein eşdeğeri/mg protein)

	KONTROL	STRES	SBT	SBT + STRES
	17,64	21,98	18,62	23,16
	18,07	23,97	20,99	19,25
	20,23	24,97	25,01	22,80
	20,33	26,12	20,77	20,44
	17,95	19,67	25,63	20,97
	21,66	24,56	21,56	21,30
	21,39	22,32	25,51	23,88
	18,11	22,52	26,72	26,53
ORT ± SS	**19,42 ± 1,66**	**23,26 ± 2,04**	**23,10 ± 2,96**	**22,29 ± 2,30**
MEDYAN (MİN - MAK)	**19,17 (17,64 - 21,66)**	**23,24 (19,69 - 26,12)**	**23,29 (18,62 - 26,72)**	**22,05 (19,25 - 26,53)**



Şekil 4-13: Gruplara ait karaciğer dokusu total tiyol düzeylerinin karşılaştırılması

(a: kontrol grubuna göre)

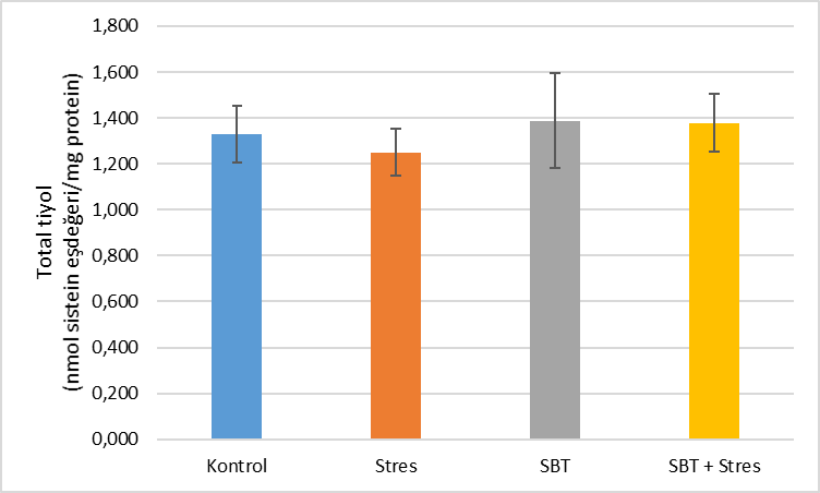
Grupların ikili karşılaştırılmasında;

Kontrol ve Stres grupları arasında (p=0,002) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Grupların diğer ikili karşılaştırmalarında anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,008).

Tablo 4-14: Beyin dokusu total tiyol düzeyleri (nmol sistein eşdeğeri/mg protein)

	KONTROL	STRES	SBT	SBT + STRES
	1,39	1,38	1,80	1,52
	1,44	1,17	1,31	1,48
	1,30	1,20	1,48	1,34
	1,27	1,20	1,15	1,52
	1,29	1,19	1,17	1,22
	1,13	1,30	1,46	1,25
	1,26	1,15	1,38	1,26
	1,54	1,41	1,36	1,44
ORT ± SS	**1,33 ± 0,12**	**1,25 ± 0,10**	**1,39 ± 0,21**	**1,38 ± 0,13**
MEDYAN (MİN - MAK)	**1,29 (1,13 - 1,54)**	**1,20 (1,15 - 1,41)**	**1,37 (1,15 - 1,80)**	**1,39 (1,22 - 1,52)**



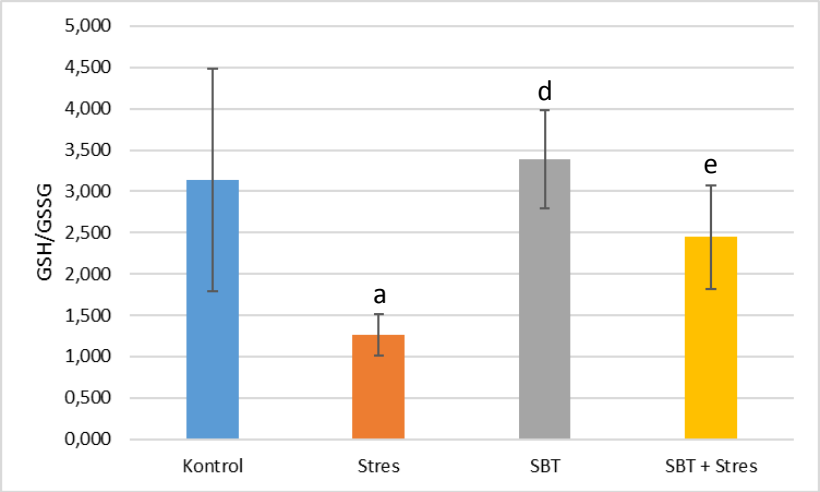
Şekil 4-14: Gruplara ait beyin dokusu total tiyol düzeylerinin karşılaştırılması

Grupların ikili karşılaştırmalarında anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,008).

4.8. GSH/GSSG Düzeyleri

Tablo 4-15: Karaciğer dokusu GSH/GSSG düzeyleri

	KONTROL	STRES	SBT	SBT + STRES
	2,10	1,27	2,76	2,36
	2,07	1,37	2,94	2,97
	5,76	1,10	3,48	2,04
	2,48	1,40	3,98	2,99
	2,06	1,14	3,33	1,44
	4,55	1,24	3,16	1,79
	3,16	0,85	4,50	3,00
	2,92	1,72	2,91	2,97
ORT ± SS	**3,13 ± 1,35**	**1,26 ± 0,25**	**3,38 ± 0,59**	**2,45 ± 0,63**
MEDYAN (MİN - MAK)	**2,70 (2,06 - 5,76)**	**1,26 (0,85 - 1,72)**	**3,25 (2,76 - 4,50)**	**2,66 (1,44 - 3,00)**



Şekil 4-15: Gruplara ait karaciğer dokusu GSH/GSSG düzeylerinin karşılaştırılması

(a: kontrol grubuna göre; d, e: stres grubuna göre)

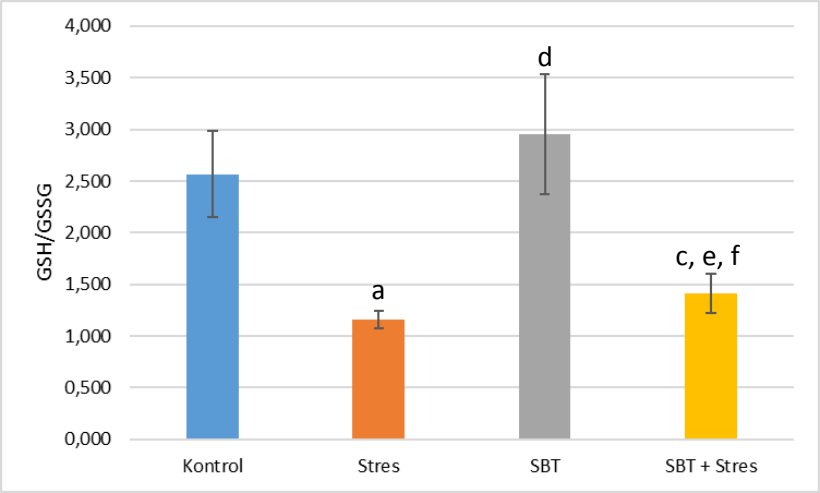
Grupların ikili karşılaştırılmasında;

Kontrol ve Stres grupları arasında (p=0,0001), Stres ve SBT grupları arasında (p=0,0001), Stres ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,0001) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Grupların diğer ikili karşılaştırmalarında anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,008).

Tablo 4-16: Beyin dokusu GSH/GSSG düzeyleri

	KONTROL	STRES	SBT	SBT + STRES
	2,45	1,12	2,21	1,74
	2,32	1,09	3,91	1,25
	2,17	1,11	3,42	1,61
	3,03	1,27	2,51	1,34
	2,21	1,27	3,32	1,46
	3,28	1,14	3,04	1,30
	2,77	1,24	2,40	1,17
	2,30	1,06	2,80	1,41
ORT ± SS	**2,56 ± 0,42**	**1,16 ± 0,08**	**2,95 ± 0,58**	**1,41 ± 0,19**
MEDYAN (MİN - MAK)	**2,38 (2,17 - 3,28)**	**1,13 (1,06 - 1,27)**	**2,92 (2,21 - 3,91)**	**1,37 (1,17 - 1,74)**



Şekil 4-16: Gruplara ait beyin dokusu GSH/GSSG düzeylerinin karşılaştırılması

(a, c: kontrol grubuna göre; d, e: stres grubuna göre; f: SBT grubuna göre)

Grupların ikili karşılaştırılmasında;

Kontrol ve Stres grupları arasında (p=0,0001), Kontrol ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,0001), Stres ve SBT grupları arasında (p=0,0001), Stres ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,003), SBT ve SBT + Stres grupları arasında (p=0,0001) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Kontrol ve SBT gruplarının ikili karşılaştırmasında ise anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,008).

5. TARTIŞMA

Stres oluşumu için farklı hayvan modelleri geliştirilmiş, doğal ve sentetik kökenli bileşiklerin anti-stres aktivitelerini değerlendirmek amacıyla bu yöntemler sıkça kullanılmıştır. Son yıllarda stres ile ilgili araştırmalar, yeni terapötik yaklaşımların tanımlanması ve uygun hayvan modeli kullanılarak strese yanıt mekanizmasının anlaşılması üzerine yoğunlaşmıştır.

Hippophae rhamnoides L. (Seabuckthorn: SBT), özellikle tohum yağının gıda, tıp, farmokoloji ve kozmetik alanlarında değerlendirilen ekonomik değeri yüksek biyoaktif maddeler içermesi nedeniyle yakın zamanda pek çok ülkede tarımı yapılan önemli bir bitki haline gelmiştir. SBT'nin tüm bölümleri, vitaminler, karotenoidler, fitosteroller, organik asitler, PUFA ve bazı esansiyel aminoasitler gibi çok sayıda biyoaktif madde kaynağı olarak gösterilmektedir (34-36). SBT, radyasyon hasarı azaltıcı, yanık, oral inflamasyon ve gastrik ülser tedavi edici, kanser ve kalp hastalıklarını önleyici etkiye sahip önemli tıbbi değeri olan bir bitki olarak değerlendirilmektedir. Bu etkileri, antioksidan fitokimyasal içeriği ve serbest radikal hasarını azaltıcı özelliğinden kaynaklanmaktadır (33). SBT ile ilişkili yapılan çeşitli preklinik çalışmalarda SBT'nin antioksidan, immünomodülatör, anti-kanser, anti-bakteriyel ve anti-viral etkilere sahip olduğu, karaciğer koruyucu, anti-stres, adaptojenik, kardiyoprotektif ve anti-aterojenik aktivite gösterdiği, radyasyona karşı koruyucu, akut ve kronik yaralarda iyileştirici etki gösterdiği saptanmıştır (40-62).

Stres oluşturduğumuz sıçan modelinde, karaciğer dokusunda endojen total antioksidan kapasitenin artması, strese karşı organizmanın kendisini korumaya bir yanıtı gibi gözükmektedir. İçerdiği yüksek antioksidan kapasite ile tek başına SBT uygulaması sonucu, en yüksek antioksidan kapasiteye ulaşılmıştır. Streste SBT uygulamasının, yalnız SBT uygulanan grup kadar antioksidan kapasiteyi yükseltememesi, yeterli ekzojen SBT desteğinin, endojen antioksidan sentez gerekliliğini azalttığı düşünülmektedir.

Suda çözünebilen bir antioksidan olan GSH, organizmada tiyol grubu içeren, düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptittir. GSH, içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasara karşı korur (23). GSH, sistein deposu olmasının yanı sıra, biyotransformasyon ile oluşan

zehirli maddelerin, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda, serbest radikallerin temizlenmesinde, DNA sentezi ve immün fonksiyonlar gibi hücresel süreçlerin düzenlenmesinde, NO homeostazisinin sağlanmasında, post-translasyonel modifikasyonlar ile protein aktivitesinin ve nörotransmitter reseptör aktivitelerin düzenlenmesinde de rol oynayan mültifonksiyonel bir moleküldür (24).

Karaciğer total tiyol oluşumu değerlendirildiğinde; stres modeli tek başına en az SBT uygulanan grup kadar total tiyol oluşumuna neden olmuştur. Bu durum organizmanın strese karşı etkin bir total tiyol potansiyeline erişebileceğini göstermiştir.

Karaciğer total glutatyon üretimi stres ile diğer gruplarla kıyaslandığında kontrol grubu değerlerinin altında kalmıştır. SBT'nin antioksidan içeriği strese yanıtta yararlı gözükmektedir.

Karaciğer dokusu antioksidan-oksidan dengesinin yalnız stres oluşturulan grupta tüm gruplara göre anlamlı düşük bulunmuş olması, stresin en önemli etkisinin antioksidan-oksidan dengenin oksidasyon lehine geliştirmesidir. Fakat streste SBT uygulamasının bu dengeyi anlamlı bir şekilde antioksidanlar lehine çevirebilmiş olması SBT'nin etkin antioksidan özelliğini ispat edebilecek niteliktedir.

ROS'a karşı primer antioksidan enzim olan SOD, $O_2^{\bullet-}$'nin H_2O_2 ve O_2'ye dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir. Bu reaksiyon oksidatif strese karşı ilk savunmada rol oynar. Zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısı olan $O_2^{\bullet-}$'nin bu sistem sayesinde hücresel kompartmandaki düzeyleri kontrol altında tutulur. Organizma, oksidatif stresin arttığı durumlarda SOD aktivitesini arttırarak koruyucu etkinliğini devam ettirir (19). GPx ise organik hidroperoksitlerin veya H_2O_2'nin GSH tarafından indirgenmesini katalizler. Bu fonksiyonu ile lipit peroksidasyonunun başlamasını ve ilerlemesini önler (17).

Karaciğer dokusunda oksijen radikali detoksifikasyon enzimleri değerlendirildiğinde; stresle SOD aktivitesi muhtemel akut radikal artışına bağlı olarak indüklenmiştir. SBT uygulanması içerdiği antioksidan kapasite ile kısmen radikal temizlemiş, SOD ihtiyacını anlamlı olarak azaltmıştır. Buna karşılık karaciğer dokusu sekonder antioksidan enzim olarak GPx aktivitesi stresin getirdiği oksidatif yükten olumsuz etkilenmiş ve aktivitesi azalmıştır. Fakat SBT uygulaması strese rağmen GPx aktivitesini olumlu yönde normal düzeylere yakın değerlere yükseltebilmiştir. Bu durum

SBT'nin antioksidan özelliğinin bir yönünü sekonder oksijen radikal detoksifikasyon mekanizmasını destekleyerek gerçekleştirdiğini düşündürmektedir.

NO, $O_2^{\bullet-}$ veya O_2 ile birlikte reaksiyona girerek reaktif nitrojen türlerinin oluşumuna neden olur. Oluşan bu ara ürünler oksidatif ve nitrozatif stres oluşturarak toksik sonuçlara yol açar. Niztrozatif stres, nitrozilasyon reaksiyonlarına neden olarak ve proteinler ile etkileşerek yapı ve fonksiyon bozukluklarına neden olabilir (11).

Karaciğer dokusu nitrozatif stres değerlendirildiğinde; stres uygulaması ile anlamlı artmış total nitrit + nitrat düzeyleri denyesel stresin nitrozatif stresi de arttırdığını göstermiştir. SBT uygulaması strese rağmen nitrozatif stresi anlamlı azaltarak antioksidan sistemi destekleyici etki göstermiştir.

Tirozin aminoasidinin orto pozisyonunun nitrolanması yoluyla oluşan 3-nitrotirozin, peroksinitritin ($ONOO^-$) ana ürünü olmasının yanı sıra çeşitli reaktif nitrojen türleri aracılığı ile de meydana gelebilir. Nitrotirozin, $ONOO^-$'nun *in vivo* spesifik bir belirtecidir (13,14).

Karaciğer dokusunda hem stres hem SBT uygulanan grup 3-nitrotirozin düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı artmış bulunmuştur. Bu durumda SBT'nin etkin olmadığı gibi peroksinitrit ile korele 3-nitrotirozin artışının oluşması olumsuz gibi gözükmektedir. Zira peroksinitrit üretimi sonucunda oluşan peroksinitröz asit (ONOOH) homolitik füzyon ile nitril katyonu (NO_2^+), nitrojen dioksit radikali ($NO_2^{\bullet}$) ve hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) gibi yüksek reaktiviteye sahip toksik ürünlerin oluşumuna neden olmakta ve prooksidan etkinin amplifiye olmasına yol açmaktadır. Benzer sonuçlar beyin (substantia nigra ve striatum) dokusunda vitamin A'nın yarattığı NO ve $O_2^{\bullet-}$'den türevlenen peroksinitrit üretiminin artmış olabileceği veya NO katabolizma hızının azalmış olabileceği uluslararası bir çalışmada da gösterilmiştir (86). Yüksek antioksidan içeriği ile (vitamin A dahil) SBT'nin çalışmamızda benzer etkiyi göstermiş olması prooksidan etkiyi düşündürmektedir.

Beyin dokusu total antioksidan kapasitesi ve total tiyol düzeyleri stres oluşturulan deney hayvanlarında, diğer deney gruplarıyla kıyaslandığında fark bulunmamış olması, stres oluşumundan beyin dokusunun fazla etkilenmemiş görünmesi, belki de beyin dokusunun karaciğer dokusu kadar antioksidan üretme potansiyeline sahip olmadığını düşündürmektedir.

Bunun yanında beyin dokusu total glutatyon düzeyinin stresle anlamlı azalmış bulunması beyin dokusu glutatyon içeriğinin karaciğer dokusuna göre protein başına düşük olması ve stresten daha çok etkilenebileceğinin bir sonucu olarak düşünülmüştür. Fakat SBT uygulaması ile anlamlı artmış bulunan total glutatyon düzeyleri göz önüne alındığında, SBT beyin dokusunda önemli antioksidan katkı sağlamıştır.

Beyin dokusu antioksidan enzimlerinden SOD'un stresle artması ve SBT uygulanan gruplarda azalması, karaciğer dokusu ile paralellik arzetmektedir. Bu durum SBT uygulamasının her iki dokuda da strese karşı koruyucu etkisini göstermektedir. Bunun yanında beyin dokusu sekonder antioksidan enzimi GPx'in stresle azalması fakat SBT uygulaması ile GPx aktivitesinin her iki SBT grubunda anlamlı artması, SBT'nin karaciğer dokusunda olduğu gibi beyin dokusundaki sekonder oksijen radikal detoksifikasyonu destekleyici etkisinin bir göstergesidir.

Beyin dokusu nitrozatif stresi, stres modelinde total nitrit + nitrat düzeyleri ölçüldüğünde anlamlı arttığı bulunmuştur. Doku protein başına nitrozatif stres değerleri karaciğerde daha yüksek bulunmasına rağmen, beyin dokusu protein başına 3-nitrotirozin düzeylerinin stresle karaciğer dokusundan daha yüksek bulunması beyin dokusunun oksidatif stresten daha çok etkilenebileceğini düşündürmektedir. Beyin dokusu eNOS ve daha az oranda iNOS üretimi yanında diğer dokulardan farklı olarak yüksek nNOS aktivitesine yani NO üretimine sahiptir (10). Bu durum 3-nitrotirozin oluşumuna katkıda bulunmuş olabilir. 3-nitrotirozin değerleri hem nitrozatif hem de oksidatif stres sonucunda oluşan peroksinitrit düzeyleri ile korele olduğundan, artan protein başına 3-nitrotirozin düzeyleri beyin hasarı oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Soğuk ve immobilizasyon stresi ile indüklenen oksidatif ve nitrozatif stresin karaciğer ve beyin dokuları total nitrit + nitrat düzeylerinin stres ile birlikte artış gösterdiği, SBT uygulamasının ise stres grubu değerlerinin kontrol grubuna yakın düzeyde sonuçlar vermesi, SBT'nin içerdiği antioksidanların stresten korumada etkili olduğunu göstermektedir. Stres ile birlikte karaciğer dokusunda 3-nitrotirozin düzeyleri kontrol ile kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunamazken, beyin dokusu 3-nitrotirozin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir. SBT uygulaması sonucunda ise her iki dokuda da 3-nitrotirozin düzeylerinin artışı SBT'nin oksidatif ve nitrozatif stresi indüklediği ve kısmen prooksidan etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Stres modeli ile birlikte karaciğer dokusunda total antioksidan kapasite ve total tiyol düzeyleri artış göstermiş, bu durum strese karşı organizmanın kendisini korumaya bir yanıtı olarak düşünülmüştür. Beyin dokusunda ise stres ile birlikte total antioksidan kapasite ve total tiyol düzeylerinde anlamlı bir fark bulunmaması, stres oluşumundan beyin dokusunun fazla etkilenmediğini düşündürmüştür. Stres uygulamasının karaciğer ve beyin dokularında total glutatyon düzeylerini ve glutatyon peroksidaz aktivitesini azalttığı, süperoksit dismutaz aktivitesini ise akut radikal artışına bağlı olarak indüklediği saptanmıştır. Stres ile SBT uygulaması sonucunda SOD değerlerinin kontrol grubu düzeyleriyle anlamlı fark göstermemiş olması SBT'nin etkin antioksidan özelliğinin bir göstergesidir.

Tüm bu sonuçlar gözönüne alındığında SBT'nin karaciğer ve beyin dokusu 3-NT düzeylerinde artışa yol açmasına rağmen, içerdiği yüksek antioksidan bileşikler ile, bu deneysel stres modelinde antioksidan sistemi destekleyici etkilere sahip olduğu ve oksidatif strese karşı koruyucu etki gösterdiği düşünülmektedir. Yapılacak daha sonraki çalışmalarda SBT'nin oksidatif ve nitrozatif stresteki etkileri ayrıntılı olarak incelenmeli, bunun sonucunda preklinik çalışmaların yanı sıra klinik çalışmalar ile SBT'nin suplement olarak kullanılıp kullanılamayacağı aydınlatılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Castro L, Freeman BA. Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition* 2001; **17:**161-165.
2. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, anitoxidants and disease mechanisms. *Redox Biology* 2013; **1**:244-257.
3. Gutowski M, Kowalczyk S. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta Biochimica Polonica* 2013; **60**(1):1-16.
4. Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine* 2001; **31**(11):1287-1312.
5. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 2010; **15**:186-190.
6. Mateo AO, Artinano MA. Nitric oxide reactivity and mechanisms involved in its biological effects. *Pharmacological Research* 2000; **42**(5):421-427.
7. Torreilles F, Salman-Tabcheh S, Guérin MC, Torreilles J. Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. *Brain Research Reviews* 1999; **30**:153-163.
8. Calabrese V, Cornelus C, Rizzarelli E, Owen JB, Dinkova-Kostova AT, Butterfield DA. Nitric oxide in cell survival: a janus molecule. *Antioxidants & Redox Signaling* 2009; **11**(11):2717-2739.
9. Vallance P. Nitric oxide: therapeutic opportunities. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2003; **17**:1-10.
10. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibiton. *The Biochemical Journal* 2001; **357**:593-615.
11. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; **39**:44-84.
12. O'Donnel VB, Freeman BA. Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways: implications for vascular disease. *Circulation Reasearch* 2001; **88**:12-21.

13. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *The Journal of Biological Chemistry* 2013; **288**(37):26464-26472.
14. Kayalı R, Çakatay U. Basic mechanisms of protein oxidation. *Cerrahpasa Journal of Medicine* 2004; **35**:83-89.
15. Seven A, Candan G. Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu. *Klinik Gelişim* 1995; **8**:3906-3911.
16. Burçak G, Andican G. Oxidative DNA damage and aging. *Cerrahpasa Journal of Medicine* 2004; **35**:159-169.
17. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology* 2001; **54**:176-186.
18. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Ravi Kumar MNV. Role of anitoxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *Jorunal of Controlled Release* 2006; **113**:189-207.
19. Buettner GR. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents in Medical Chemistry* 2011; **11**(4):341-346.
20. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function and diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* 2011; **15**(6): 1583-1606.
21. Forsberg L, Faire U, Morgenstern R. Oxidative stress, human genetic variation and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001; **389**(1):84-93.
22. Seven A, Candan G. Antioxidant defenece systems. *Cerrahpasa Journal of Medicine* 1996; **27**:41-50.
23. Zengin Ulakoğlu E, Gümüştaş MK, Belce A, Altuğ T, Kökoğlu E. The relationship between endogenous glutathione depletion and energy metabolism in stress-induced gastric mucosal injury. *Cerrahpasa Journal of Medicine* 1998; **29**(3):127-131.
24. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine* 2009; **30**(1-2):42-59.
25. Halliwell B. Vitamin C and genomic stability. *Mutation Research* 2001; **475**:29-35.
26. Pohanka M, Pejchal J, Snopkova S, Havlickova K, Karasova JZ, Bostik P, Pikula J. Ascorbic acid: an old player with broad impact on body physiology

including oxidative stress suppression and immunomodulation: a review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2012; **12**:35-43.

27. Landrier JF, Marcotorchino J, Tourniaire F. Lipophilic micronutrients and adipose tissue biology. *Nutrients* 2012; **4**:1622-1649.
28. Niki E, Noguchi N. Dynamics of anitoxidant action of vitamin E. *Accounts of Chemical Research* 2004; **37**(1):45-51.
29. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 2002; **18**:872-879.
30. Bendich A. From 1989 to 2001: What have we learned about the "Biological actions of beta-carotene"?. *The Journal of Nutrition* 2004; **134**:225S-230S.
31. Lintig J. Provitamin A metabolism and functions in mammalian biology. *The American Journal of Clinical Nutirtion* 2012; **96**:1234S-1244S.
32. Suryakumar G, Gupta A. Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.). *Journal of Ethnopharmacology* 2011; **138**:268-278.
33. Li TS, Beveridge T. *Sea Buckthorn : A New Medicinal and Nutritional Botanical.* Canada: Agriculture and Agri-Food Publication 10320E; 2007. pp:1-75.
34. Beveridge T, Li TS, Oomah BD, Smith A. Sea buckthorn products: manufacture and composition. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1999; **47**(9):3480-3488.
35. Yang B, Kallio HP. Fatty acid composition of lipids in Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) berries of different origins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2001; **49**(4):1939-1947.
36. Pintea A, Varga A, Stepnowski P, Socaciu C, Culea M, Diehl HA. Chromatographic analysis of carotenol fatty acid esters in Physalis alkekengi and Hippophae rhamnoides. *Phytochemical Analysis* 2005; **16**(3):188-195.
37. Li TSC, Beveridge THJ. *Sea Buckthorn (Hippophae rhamnoides L.): Production and Utilization.* Ottawa: NRC Research Press; 2003. pp:1-11.
38. Andersson SC, Olsson ME, Johansson E, Rumpunen K. Carotenoids in sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) berries during ripening and use of pheophytin a as a maturity marker. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2009; **57**(1): 250-258.

39. Sajfrtová M, Licková I, Wimmerová M, Sovová H, Wimmer Z. β-Sitosterol: supercritical carbon dioxide extraction from Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) seeds. *International Journal of Molecular Sciences* 2010; **11**(4):1842-1850.
40. Geetha S, Sai Ram M, Singh V, Ilavazhagan G, Sawhney RC. Antioxidant and immunomodulatory properties of Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides)-an in vitro study. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; **79**(3):373-378.
41. Geetha S, Singh V, Ram MS, Ilavazhagan G, Banerjee PH, Sawhney RC. Immunomodulatory effects of seabuckthorn (Hippophae rhamnoides L.) against chromium (VI) induced immunosuppression. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005; **278**(1-2):101-109.
42. Saggu S, Kumar R. Modulatory effect of seabuckthorn leaf extract on oxidative stress parameters in rats during exposure to cold, hypoxia and restraint (C–H–R) stress and post stress recovery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2007; **59**(12):1739-1745.
43. Saggu S, Kumar R. Possible mechanism of adaptogenic activity of seabuckthorn (Hippophae rhamnoides) during exposure to cold, hypoxia and restraint (C–H–R) stress induced hypothermia and post stress recovery in rats. *Food and Chemical Toxicology* 2007; **45**(12):2426-2433.
44. Puroshothaman J, Suryakumar G, Shukla D, Himani J, Harinath K, Kumar R, Sawhney RC. Modulation of hypoxia induced pulmonary vascular leakage in rats by Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011; **2011**:574524.
45. Geetha S, Jayamurthy P, Pal K, Pandey S, Sawhney RC. Hepatoprotective activity of Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) against carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. *Journal of Science of Food and Agriculture* 2008; **88**(9):1592-1597.
46. Gao ZL, Gu XH, Cheng FT, Jiang FH. Effect of sea buckthorn on liver fibrosis: a clinical study. *World Journal of Gastroenterology* 2003; **9**(7):1615-1617.
47. Upadhyay NK, Kumar MS, Gupta A. Antioxidant, cytoprotective and antibacterial effects of Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology* 2010; **48**(12):3443–3448.

48. Gupta A, Kumar R, Pal K, Banerjee PK, Sawhney RC. A preclinical study of the effects of Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) leaf extract on cutaneous wound healing in albino rats. *International Journal of Lower Extremity Wounds* 2005; **4**(2):88-92.
49. Gupta A, Kumar R, Pal K, Singh V, Banerjee PK, Sawhney RC. Influence of Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) flavone on dermal wound healing in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2006; **290**(1-2):193-198.
50. Upadhyay NK, Kumar R, Siddiqui MS, Gupta A. Mechanism of wound healing activity of Hippophae rhamnoides L. leaf extract in experimental burns. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011; **2011**:659705.
51. Ganju L, Padwad Y, Singh R, Karan D, Chanda S, Chopra MK, Bhatnagar P, Kashyap R, Sawhney RC. Anti-inflammatory activity of Seabuckthorn (Hippophae rhamnoides) leaves. *International Immunopharmacology* 2005; **5**(12):1675-1684.
52. Padwad Y, Ganju L, Jain M, Chanda S, Karan D, Kumar R, Banerjee PK, Sawhney RC. Effect of leaf extract of Sea buckthorn on lipopolysaccharide induced inflammatory response in murine macrophages. *International Immunopharmacology* 2006; **6**(1):46-52.
53. Tulsawani R. Ninety day repeated gavage administration of Hippophae rhamnoides extract in rats. *Food and Chemical Toxicology* 2010; **48**(8-9):2483-2489.
54. Kumar IP, Naimta S, Goel HC. Modulation of chromatin organization by RH-3, a preparation of Hippophae rhamnoides, a possible role in radioprotection. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2002; **238**(1-2):1-9.
55. Goel HC, Prasad J, Singh S, Sagar R, Kumar IP, Sinha AK. Radioprotection by a herbal preparation of Hippophae rhamnoides RH-3, against whole body lethal irradiation in mice. *Phytomedicine* 2002; **9**(1):15-25.
56. Puroshothaman J, Suryakumar G, Shukla D, Malhotra AS, Kasiganesan H, Kumar R, Sawhney RC, Chami A. Modulatory effects of Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) in hypobaric hypoxia induced cerebral vascular injury. *Brain Reaserch Bullettin* 2008; **77**(5):265-252.

57. Basu M, Prasad R, Jayamurthy P, Pal K, Arumughan C, Sawhney RC. Anti-atherogenic effects of Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides) seed oil. *Phytomedicine* 2007; **14**(11):770–777.
58. Hsu YW, Tsai C, Chen WK, Lu FJ. Protective effects of seabuckthorn (Hippophae rhamnoides L.) seed oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology* 2009; **47**(9):2281-2288.
59. Upadhyay NK, Kumar R, Mandotra SK, Meena RN, Siddiqui MS, Sawhney RC, Gupta A. Safety and wound healing efficacy of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) seed oil on burn wounds in rats. *Food and Chemical Toxicology* 2009; **47**(6):1146-1153.
60. Gupta R, Flora SJ. Protective effects of fruit extracts of Hippophae rhamnoides L. against arsenic toxicity in Swiss albino mice. *Human Experimental Toxicology* 2006; **25**(6):285-295.
61. Geetha S, Sairam M, Sharma SK, Ilavazhagan G, Banerjee PK, Sawhney RC. Cytoprotective and antioxidant activity of Sea buckthorn flavones (Hippophae rhamnoides L.) against tert-butylhydroperoxide induced cytotoxicity in lymphocytes. *Journal of Medicinal Food* 2009; **12**(1):151-158.
62. Mishra KP, Chanda S, Karan D, Ganju L, Sawhney RC. Effect of Seabuckthorn (Hippophae rhamnoides) flavones on immune system: an in-vitro approach. *Phytotherapy Research* 2008; **22**(11):1490–1495.
63. Ruan A, Min H, Meng Z, Lü Z. Protective effects of Sea buckthorn seed oil on mouse injury induced by sulfur dioxide inhalation. *Inhalation Toxicology* 2003; **15**(10):1053-1058.
64. Ali R, Jaimini A, Nishad DK, Mittal G, Chaurasia OP, Kumar R, Bhatnagar A, Singh SB. Acute and sub acute toxicity and efficacy studies of Hippophae rhamnoides based herbal antioxidant supplement. *Indian Journal of Pharmacology* 2012; **44**(4):504-508.
65. Monnig AA, Prittie JE. A review of stress-related mucosal disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2011; **21**(5):484-495.
66. Kumar A, Rinwa P, Kaur G, Machawal L. Stress: Neurobiology, consequences and management. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 2013; **5**(2):91-97.

67. Jaggi AS, Bhatia N, Kumar N, Singh N, Anand P, Dhawan R. A review on animal models for screening potential anti-stress agents. *Neurological Sciences* 2011; **32**:993-1005.
68. Celebi N, Turkyilmaz A, Gonul B, Ozogul C. Effects of epidermal growth factor microemulsion formulation on the healing of stress-induced gastric ulcers in rats. *Journal of Controlled Release* 2002; **83**(2):197-210.
69. Qui BS, Mei QB, Liu L, Wong KMT. Effects of nitric oxide on gastric ulceratin induced by nicotine and cold-restraint stress. *World Journal of Gastroenterology* 2004; **10**(4):594-597.
70. Meneghini A, Ferreira C, Abreu LC, Valenti VE, Ferreira M, Filho CF, Murad N. Memantine prevents cardiomyocytes nuclear size reduction in the left ventricle of rats exposed to cold stress. *Clinics* (SãoPaulo, Brazil) 2009; **64**(9):921–926.
71. Kvetnansky R, Mikulaj L. Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology* 1970; **87**(4):738-743.
72. Bali A, Jaggi AS. Preclinical experimental stress studies: Protocols, assessment and comparison. *European Journal of Pharmacology* 2015; **5**(746C):282-292.
73. Lyle N, Bhattacharyya D, Sur TK, Munshi S, Paul S, ChatterjeeS, Gomes A. Stress modulating antioxidant effect of Nardostachys jatamansi. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 2009; **46**(1):93–98.
74. Klenerová V, Sída P, KrejcíI, Hlinák Z, Hynie S. Effects of two types of restraint stress on spontaneous behavior of Sprague–Dawley and Lewis rats. *Journal of Physiology & Pharmacology* 2007; **58**(1):83–94.
75. Fernandez JL. Analysis of the cold-water restraint procedure in gastric ulceration and body temperature. *Physiology & Behavior* 2004; **82**(5):827–833.
76. Repetto MG, Llesuy SF. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazillian Journal of Medical and Biological Research* 2002; **35**:523-534.
77. Arneth W, Herold B. Nitrat/Nitrit-bestimmung in wurstwaren nach enzymatischer reduktion. *Fleischwirtschaft* 1988; **66**:761-764.

78. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anaytical Biochemistry* 1969; **27**:502-522.
79. Eyer P, Podhradsky D. Evaluation of micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent. *Anaytical Biochemistry* 1986; **153**:57-66.
80. Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. Microtiter plate assay for t-he measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anaytical Biochemistry* 1990; **190**:360-365.
81. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1967; **70**:158-169.
82. Sun Y, Oberley LW, Ying L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry* 1988; **34**(3):479-500.
83. Özyürek, M.; Güçlü, K.; Apak, R.. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *Trends in Analytical Chemistry* 2011; **30**(4):652-664.
84. Seldak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry* 1968; **25**:192-205.
85. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 1951; **193**(1):265-275.
86. De Oliveira MR, Oliveira MW, Da Rocha RF, Moreira JC. Vitamin A supplementation at pharmacological doses induces nitrosative stress on the hypothalamus of adult Wistar rats. Chemico-Biological Interactions 2009; 180(3):407-13.

ETIK KURUL KARARI

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2013/ 64 30 / 05 / 2013

Sayın: Prof. Dr. M.Koray GÜMÜŞTAŞ
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Karar No :2013/ 64

Başvuru : 19.04.2013

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen, **Yüksek Lisans Öğrencisi Nensi CAVAK'a** ait "Soğuk ve İmmobilize Stres Modelinin Sıçan Dokusu Radikal Metabolizmasına Etkisi ve Hippophae rhamnoides L. (Elaeagnaceae)'nin Koruyucu Rolünün İncelenmesi." isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Sıçan
	Cinsiyeti	Erkek
	Sayısı	32
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi		Mayıs 2013/Ekim 2015

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
İÜ HADYEK Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Pınar YAMANTÜRK ÇELİK
Üye

Prof.Dr.Ufuk ÇAKATAY
Üye

Doç.Dr.Alper OKYAR
Üye

Yard.Doç.Dr Altan ARMUTAK
Üye

Uzm.Vet.Hek.Fatma TEKELİ
Üye

Yard.Doç.Dr..Burak OLGUN
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

ÖZGEÇMIŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Nensi	**Soyadı**	Cavak
Doğ.Yeri	İstanbul	**Doğ.Tar.**	11.11.1989
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	30112859470
Email	ncavak@hotmail.com	**Tel**	(533) 774 96 86

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora	-	-
Yük.Lis.	İ.Ü., Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2016
Pedagojik Formasyon	İ.Ü., Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2011
Lisans	İ.Ü., Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2011
Lise	Özel Getronagan Lisesi	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	-		
2.			
3.			

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**YDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	İyi	İyi	İyi	56,25	

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	79,3	80,5	68,8
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office	Çok iyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayınlar:

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- Gümüştaş MK, **Cavak N**, Aras Perk A, Yavuz B. Antioxıdant Efficiency of Seabuckthorn Extract in Ehrlich Ascites Carcinoma of Balb/c Mice Model. Workshop on Determining Antioxidants as Reactive Species Scavengers, İstanbul 2014; 43.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- Gümüştaş MK, **Cavak N**, Aras Perk A, Yavuz B. Seabuckthorn Ekstraktının Balb/c Fare Modelinde Ehrlich Asit Karsinoma Üzerine Antioksidan Etkisi. XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi, İzmir. *Turk J Biochem* 2013; 38(S1).
- Gümüştaş MK, Oktay NŞ, **Cavak N**, Baysal A, Akman S, Emekli N. Deneysel Hiperlipideminin Sıçan Karaciğer Dokusu Süperoksit Dismutaz Aktivitesine, Doku ve Plazma Bakır, Çinko Düzeylerine Etkisi. XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi, Konya. *Turk J Biochem* 2012; 37(S1).
- Gümüştaş MK, Oktay NŞ, **Cavak N**, Özbek N, Akman S, Emekli N. Deneysel Hipertiroidi ve Hipotiroidi Yapılmış Hiperlipidemik Sıçanların Böbrek Dokusu Süperoksit Dismutaz Aktivitesi ve Çinko Düzeyleri. XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi, Konya. *Turk J Biochem* 2012; 37(S1).

Sertifikalar:

- International Workshop on Determining Antioxidants as Reactive Species Scavengers, IUPAC - 10.2014, İstanbul.
- Deneysel Tasarım ve Ön Biyoistatistik Sempozyumu, İstanbul Üniversitesi - 09.2014, İstanbul.
- Real-Time PCR ve Western Blot: Yeni Gelişen Teknolojiler ve Klinik Uygulamalar, Türk Biyokimya Derneği - 05.2014, İstanbul.
- XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi, Türk Biyokimya Derneği - 09.2013, İzmir.
- Hastalıkların Tanı ve İzlenmesinde Biyokimya Laboratuvarı Sempozyumu, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimleri - 05.2013, İstanbul.
- İstanbul Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, İstanbul Üniversitesi - 12.2012, İstanbul.
- New Perspectives in Molecular Life Sciences Education, Türk Biyokimya Derneği - 11.2012, İstanbul.
- XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi, Türk Biyokimya Derneği - 09.2012, Konya.
- Bilimsel Çalışmalarda İstatistiğin Rolü: Bilinmesi Gereken Yöntemler ve Uygulama Alanları, Türk Biyokimya Derneği - 03.2012, İstanbul.