

**FÖTAL DÖNEMDE NİKOTİNE MARUZ
KALAN SIÇANLARDA OLUŞAN BÖBREK
HASARININ ENGELLENMESİNDE ELLAGİC
ASİTİN KORUYUCU ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Hurrem Turan AKKOYUN

Veteriner Fizyoloji Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Ali KARADENİZ**

Doktora Tezi-2012

TC
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FÖTAL DÖNEMDE NİKOTİNE MARUZ KALAN
SIÇANLARDA OLUŞAN BÖBREK HASARININ
ENGELLENMESİNDE ELLAGİC ASİTİN KORUYUCU
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Hurrem Turan AKKOYUN

**Veteriner Fizyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Ali KARADENİZ**

**Erzurum
2012**

TC
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FÖTAL DÖNEMDE NİKOTİNE MARUZ KALAN
SIÇANLARDA OLUŞAN BÖBREK HASARININ
ENGELLENMESİNDE ELLAGİC ASİTİN KORUYUCU
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Hurrem Turan AKKOYUN

Tez savunma tarihi : 15.06.2012

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ali KARADENİZ (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Fikret ÇELEBİ (Atatürk Üniversitesi)


Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ali ÇINAR (Yüzüncü Yıl Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mustafa GÜL (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Nejdey ŞİMŞEK (Atatürk Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

**Doktora Tezi
Erzurum-2012**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbreğin Embriyolojik Gelişimi	3
2.1.1. Pronefroz	3
2.1.2. Mezonefroz	4
2.1.3. Metanefroz	4
2.2. Böbrek Anatomisi	5
2.2.1. Böbreğin Yapısı	7
2.2.1.1. Sinus renalis	7
2.2.1.2. Medulla renalis (Medulla)	8
2.2.1.3. Korteks renalis	8
2.2.2. Böbrek Segmentleri	9
2.2.3. Böbreğin Lenf Drenajı	10
2.2.4. Böbreğin Damarları	10
2.2.5. Böbreğin Sinirleri	12
2.3. Böbreğin Görevleri	12
2.4. Böbreğin Fizyolojisi	12
2.5. Böbreğin Histolojisi	13
2.6. Nikotin ve Nikotinin Yapısı	16
2.7. Nikotinin Farmakokinetik Özellikleri	19
2.8. Nikotinin Etki Mekanizması	20
2.9. Nikotinin Etkileri	23
2.10. Serbest Radikaller	27
2.10.1. Serbest Radikallerin Oluşumu	27
2.10.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	29
2.10.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)	30
2.10.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	31
2.10.2.3. Hidroksil Radikali (OH^{\cdot})	32
2.10.2.4. Singlet Oksijen (1O_2)	34
2.10.2.5. Hipokloröz Asit (HOCl)	35
2.10.2.6. Nitrik Oksit Radikali (NO^{\cdot})	35
2.10.2.7. Lipid Peroksil Radikali (LOO^{\cdot})	37
2.10.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları	38
2.10.4. Serbest Radikallerin Etkileri	42
2.10.4.1. Proteinlere Etkileri	43

2.10.4.2. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri	44
2.10.4.3. Karbonhidratlara Etkileri	45
2.10.4.4. Membran Lipidlerine Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)	46
2.11. Serbest Radikallere Karşı Antioksidan Savunma	48
2.12. Endojen Antioksidanlar	50
2.12.1. Enzimatik Antioksidanlar	50
2.12.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	51
2.12.1.2. Katalaz (CAT)	52
2.12.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	52
2.12.1.4. Glutasyon S-Transferaz (GST)	53
2.12.1.5. Glutasyon Redüktaz (GR)	54
2.12.1.6. Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz	54
2.12.2. Enzim Olmayan Antioksidanlar	55
2.12.2.1. Glutasyon (GSH)	55
2.12.2.2. Ürat	55
2.12.2.3. Seruloplazmin	55
2.12.2.4. Bilirubin	56
2.12.2.5. Melatonin	56
2.12.2.6. Sistein	56
2.12.2.7. Transferin	56
2.12.2.8. Elbesen	57
2.12.2.9. Demir Şelatörleri	57
2.12.2.10. Albumin	57
2.12.2.11. Sitokinler	57
2.12.2.12. Mannitol	58
2.12.2.13. Deferoksamin	58
2.12.2.14. Allopurinol	58
2.13. Eksojen Antioksidanlar	58
2.13.1. Vitamin Olan Antioksidanlar	58
2.13.1.1. β -Karoten	58
2.13.1.2. Askorbik asit (Vitamin C)	59
2.13.1.3. α -Tokoferol (Vitamin E)	61
2.13.2. İlaç Olan Antioksidanlar	62
2.13.3. Sentetik Antioksidanlar	63
2.14. Oksidatif Stres	63
2.15. Ellagic Asit	65
3. MATERYAL VE METOT	74
3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Grupları	74
3.2. Biyokimsyal Analizler	76
3.2.1. Malondialdehit (MDA) Analizi	76
3.2.2. Total Glutasyon (GSH) Analizi	78
3.2.3. Glutasyon Peroksidaz(GSH-Px) Analizi	79
3.2.4. Superoksit Dismutaz (SOD) Analizi	80
3.2.5. Nitrik Oksit (NO) Analizi	82
3.2.6. Protein Tayini	83

3.3. Kullanılan Kimyasallar	84
3.4. Kullanılan cihaz ve Ekipmanlar	85
3.5. Histolojik Çalışmalar	86
3.6. İstatistiksel Analiz	87
4. BULGULAR	88
4.1. Vücut Ağırlığı ve Makroskobik Bulgular	88
4.2. Biyokimyasal Bulgular	89
4.2.1. Malondialdehid (MDA)	89
4.2.2. Total glutatyon (GSH)	91
4.2.3. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)	92
4.2.4. Süperoksit dismutaz(SOD)	93
4.2.5. Nitrik oksit (NO)	95
4.3. Histopatolojik Bulgular	97
5. TARTIŞMA	100
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	118
KAYNAKLAR	119
ÖZGEÇMİŞ	152
EK.1.ETİK KURUL ONAY FORMU	153

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalıŐmayı değerli bilgi ve katkıları ile yÖneten, tezimin her aŐamasında yardımlarını esirgemeyen daniŐman hocam Sayın Doç. Dr. Ali KARADENİZ'e sonsuz saygı ve Őukranlarımı sunarım.

Tez çalıŐmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Fikret ÇELEBİ'ye, histopatolojik incelemelerde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Doç. Dr. Nejdet ŞİMŞEK ve AraŐ. Gör. Adem KARA'ya, biyokimyasal analizlerde yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Abdulkadir YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan ve olacaklarını bildiğim değerli aileme ve dostlarıma sonsuz saygı ve Őukranlarımı sunarım.

H.Turan AKKOYUN

ÖZET

Fötal Dönemde Nikotine Maruz Kalan Sıçanlarda Oluşan Böbrek Hasarının Engellenmesinde Ellagic Asitin Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi

Amaç: Bu çalışmada, fötal dönemde nikotine maruz bırakılan sıçanlarda oluşan böbrek hasarının engellenmesinde ellagic asitin koruyucu etkisi incelendi.

Materyal ve metot: Bu çalışmada yetişkin 20 adet dişi rat kullanıldı. Ratlar her grupta 5 adet olacak şekilde Kontrol, Nikotin, Ellagic asit, Nikotin + Ellagic asit olarak 4 gruba ayrıldı. Her kafese 1 adet erkek rat bırakılarak ratların gebe kalması sağlandı. Nikotin ve Ellagic asit uygulaması gebelik boyunca ve doğumu izleyen 15. güne kadar devam ettirildi. Onbeşinci günün sonunda bütün gruplardaki yavrular eter anestezisi altında ötenazi edilerek böbrek dokuları biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için alındı.

Bulgular: Yapılan değerlendirmelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında nikotin uygulanan annelere ait yavruların vücut ağırlığı, (GSH), (GSH-Px) ve (SOD) enzim düzeylerinde azalma, (MDA) ve (NO) düzeylerinde ise artış görüldü. Ayrıca histokimyasal incelemelerde böbrek gelişiminin yavaşladığı da tespit edildi.

Diğer taraftan Nikotin + Ellagic asit verilen gruba ait yavrulardaki bu değerler sadece nikotin verilen grup ile karşılaştırıldığında değerlerin kontrol grubuna yakın olduğu görüldü.

Sonuç: Sonuç olarak, nikotin uygulanan gebe ratların yavrularına ait böbrek dokularındaki hasarın varlığı hem biyokimyasal olarak (kontrol grubuna göre MDA ve NO düzeylerinde artış, GSH, GSH-Px ve SOD gibi antioksidan enzim düzeylerinde ise düşüş

hem de immunhistokimyasal olarak tespit edilmiştir. Ellagic asit uygulaması ile nikotinin böbrekte oluşturduğu oksidatif stres ve histolojik değişikliklerin azaltılabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Böbrek , Ellagic asit, Fötüs, Nikotin

ABSTRACT

Investigation Of The Protective Effects Of Ellagic Acid In The Prevention Of The Kidneys Damage Occurring In Rats Exposed To Nicotine In Fetal Period

Aim: In this study, the protective effects of ellagic acid in the prevention of the kidneys damage occurring in rats exposed to nicotine in fetal period were investigated

Materials and method: In this study, 20 admit female rats were used. The rats were divided into 4 groups as 5 rats were in one group. The group were Control, Nicotine, Ellagic acid, Nicotine + Ellagic acid. A male rat was put into each cage (group) so that the female rats can pregnant. Nicotine and ellagic acid treatments continued throughout the pregnant period and also for 15 days after deliver. At the end of 15 th day all neonatal rats were killed under ether anaesthesia and their kidneys were taken for biochemically and histopathologically examinations.

Results: Lower body weight, total glutathione (GSH) level, the activities of glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD), and higher levels of malaondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) were found in neonatal rats of female mothers which were exposed to nicotine, compared with the control group. In addition, attenuation of the development of the kidneys was determined. On the other hand these values were similar to control group when the values of nicotine+ ellagic acid group were compared with nicotine group.

Conclusion: As a result, the existence of kidney damage in neonatal rats of the nicotine treated pregnant rats was confirmed by both biochemical (increased MDA and NO levels and decreased GSH, GSH-Px and SOD levels compared with control group) and

immunohistochemical. It was detected that by means of ellagic acid application of histological changes and oxidative stress occurring by nicotine would be reduced.

Key Words: *Kidney, Ellagic acid, Fetus, Nicotine*

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

KAVRAM	KISALTMA
Adenozin trifosfat	ATP
Alfa	α
Asetik asit	CH ₃ COOH
Asetil kolin	ACh
Beta	β
Bikarbonat	HCO ₃
Bovine serum albumin	BSA
Çinko sülfat	ZnSO ₄
Dithio 2 nitrobenzoik asit	DTNB
Epsilon	ϵ
Etilen diamintetraasetik, di sodyum tuzu	EDTA
Flavin adenin dinükleotit	FAD
Gama	γ
Glutasyon	GSH
Glutasyon peroksidaz	GSH-Px
Glutasyon redüktaz	GR
Glutasyon S-transferaz	GST
Hidrojen fosfat	H ₂ PO ₄
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂
Hidroksil radikali	OH
Hipokloröz asit	HOCl
Kalsiyum	Ca ⁺⁺
Karbon tetra klorür	CCl ₄
Katalaz	CAT
Lipid peroksil radikali	LOO
Malondialdehid	MDA
Merkezi sinir sistemi	MSS
Mililitre	ml / mL
Milimolar	mM
Muskarinik asetilkolin reseptörü	mAChR
Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat	NADPH
Nikotinik asetilkolin reseptörü	nAChR
Nitrik oksit	NO
Nitroblue tetrazolium	NBT
Potasyum	K ⁺
Potasyum nitrat	KNO ₃
Reaktif oksijen türleri	ROS
Sigma	δ
Singlet oksijen	¹ O ₂
Sodyum	Na ⁺
Sodyum dodesil sülfat	SDS
Sodyum hidrojen fosfat di hidrat	NaHPO ₄ 2H ₂ O

Sodyum karbonat	Na ₂ CO ₃
Sodyum klorür	NaCl
Sodyum nitrat	NaNO ₃
Sodyum nitrit	NaNO ₂
Sülfat	SO ₄ ⁻²
Süperoksit anyonu	O ₂ ⁻
Süperoksit dismutaz	SOD
Tiyobarbiturik asit	TBA

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1.	Böbreğin embriyonal gelişimi	5
Şekil 2.2.	Böbreğin genel şekli	7
Şekil 2.3.	Böbreğin enine kesiti	9
Şekil 2.4.	Böbrekte (ön ve arkadan) segmenter yapı	10
Şekil 2.5.	İnsan böbreğinin arter ve venöz sistemi	11
Şekil 2.6.	Nefronun anatomik yapısı	14
Şekil 2.7.	Nikotinin yapısı	19
Şekil 2.8.	Asetilkolinin kimyasal yapısı	20
Şekil 2.9.	Kolinergik sinaps boyunca nöral iletimi	22
Şekil 2.10.	Ellagic asitin kimyasal yapısı	65
Şekil 2.11.	Temel flavonoid yapısı	68
Şekil 2.12.	Ellagitaninlerin hidrolizasyonu	71
Şekil 3.13.	Araştırmada kullanılan Sprague Dawley cinsi rat	74
Şekil 4.14.	Ortalama vücut ağırlıkları	89
Şekil 4.15.	Malondialdehidin gruplar arasındaki dağılımı	90
Şekil 4.16.	Total glutatyonun gruplar arasındaki dağılımı	92
Şekil 4.17.	Glutatyon peroksidazın gruplar arasındaki dağılımı	93
Şekil 4.18.	Süper oksit dismutazın gruplar arasındaki dağılımı	94
Şekil 4.19.	Nitrik oksitinin gruplar arasındaki dağılımı	95
Şekil 4.20.	Gruplara ait böbrek dokularının histolojik yapısı	98
Şekil 4.21.	Gruplara ait böbrek dokularında apoptotik (Bax) ve antiapoptotik (Bcl-2) aktivite	99

TABLolar DİZİNİ

Tablo.3.1.	Malondialdehid aktivitesi için kullanılan reaktif miktarı	77
Tablo.3.1.1	Malondialdehid aktivitesi için kullanılan pipetleme miktarı	78
Tablo.3.2.	Total glutasyon aktivitesi için kullanılan reaktif miktarı	79
Tablo.3.3.	Glutasyon peroksidaz aktivitesi için kullanılan reaktif miktarı	80
Tablo.3.4.	Süperoksit dismutaz aktivitesi için kullanılan reaktif miktarı	82
Tablo.3.5.	Nitrik oksit aktivitesi için kullanılan reaktif miktarı	83
Tablo.3.6.	Protein tayini için kullanılan reaktif miktarı	84
Tablo.3.7.	Kullanılan kimyasallar ve bu kimyasalların temin edildiği firmalar	84
Tablo.3.8.	Kullanılan cihaz ve bu cihazların temin edildiği firmalar	85
Tablo.4.1.	Ortalama vücut ve böbrek ağırlıkları	88
Tablo.4.2.	Gruplar arasındaki malondialdehid değerleri	90
Tablo.4.3.	Gruplar arasındaki total glutasyon değerleri	91
Tablo.4.4	Gruplar arasındaki glutasyon peroksidaz değerleri	93
Tablo.4.5.	Gruplar arasındaki süperoksit dismutaz değerleri	94
Tablo.4.6.	Gruplar arasındaki nitrik oksit değerleri	95
Tablo.4.7.	Bütün gruplara ait biyokimyasal analiz sonuçları	96
Tablo.4.8.	Böbreklerde apoptotik Bax ve antiapoptotik Bcl-2 immunopozitif alanların semikantitatif değerlendirilmesi	97

1. GİRİŞ

Günümüzde sigara tüketimi artmakla birlikte bayanlar arasında gebelikte kullanımı da gittikçe artmaktadır. Bu durum beraberinde sigaranın fötüs üzerine olumsuz etkilerini araştırmayı gündeme getirmiştir. Fötal büyüme ve gelişmeyi etkileyen başlıca faktörler fötal genetik yapı, uteroplasental fonksiyon ve maternal çevredir. Bütün bu faktörlerin uygun olduğu koşullarda, sağlıklı bir fötüs intrauterin büyümesini tamamlar.¹⁻⁵ Gebelikte sigara içiminin başlıca etkileri; fötusta büyüme geriliği, yüksek düşük riski, erken membran rüptürü, prematüre veya ölü doğum, plasenta yırtıkları, doğum sonrası ani bebek ölümü ve çocukluk dönemi etkileridir.^{6,7} Sigara, vazodilatör aminleri azaltarak dokularda hipoksiye ve beslenme azlığına, organlarda foksiyon bozukluklarına yol açtığı iyi bilinmektedir.⁸ Sigara dumanında 4000'den fazla kimyasal bileşen vardır. Bu kimyasallardan hangisinin gelişmekte olan bebeğe zararlı olduğu kesin olarak bilinmemekle birlikte, özellikle nikotinin ve karbonmonoksidin gebelik sonuçlarını olumsuz etkilediğine inanılmaktadır.^{9,10}

Nikotin, tütünün aktif alkaloidi olup yağda çözünür. Ağız, farenks ve akciğerlerden kolaylıkla absorbe olur. Yarı ömrü 1-2 saat olan nikotin, primer olarak karaciğerde metabolize edilerek böbreklerden atılır. Kimyasal yapısı bakımından asetilkoline yakın bir benzerlik göstermemesine rağmen asetilkolin gibi otonom sinir sistemi ganglionlarında uyarının iletimini önce uyarır, arkasından bloke eder. Nikotinin metaboliti olan "cotinine"nin hem amniyon sıvısında hem de kordon kanında tespiti ile plasenta bariyerini geçtiği kanıtlanmıştır. Ancak, fötüs üzerine olan olumsuz etkilerinin hangi mekanizmayla gerçekleştiği tam olarak bilinmemektedir. Uterus arterlerinde vazokonstriksiyon, direkt toksik etki veya plasental hasara bağlı olabileceği yönünde görüşler mevcuttur.^{11,12}

Bazı vitaminler, mineraller, fenoller ve karotenoidler antioksidan özelliğe sahip olup ilaçların ve ksenobiotiklerin oluşturdukları oksidatif hasarlara karşı koruyucu etkilere sahiptirler. Karotenoidlerin ve fenollerin oksidatif stres üzerine etkisine dair pek çok araştırma yapılmıştır.¹³ Bir fenolik bileşik olan ellagic asit yumuşak ve sert kabuklu çoğu meyvede bulunmaktadır. Ayrıca ellagic asit ile yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda yüksek antioksidan özellikte olduğu ve bu sayede antibakteriyel, antihistaminik ve antikanser etkisinin bulunduğu bildirilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda nikotin uygulamalarının mide mukozasında iskemiye ve karaciğerde hasara neden olduğu bildirilmektedir. Ancak, nikotine fetal dönemde maruz kalma sonucu meydana gelen hasarlar ve bunun engellenmesine yönelik antioksidan maddelerin kullanılması ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bildirilen güçlü antioksidan özelliklerinden yola çıkarak bu çalışmada, kronik nikotin uygulanan gebe sıçanlarda nikotinin yavrularda meydana getireceği böbrek hasarının engellenmesinde ellagic asitin koruyucu etkileri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbreğin Embriyolojik Gelişimi

İnsanlarda intrauterine yaşam boyunca kranialden kaudale doğru, birbirinden farklı üç böbrek sistemi peşpeşe ve kısmen de üst üste binecek şekilde oluşur: pronefroz, mezonefroz ve metanefroz. Bu sistemlerden birincisi, rudimenter ve işlevsizdir. İkinci sistem intrauterin yaşamın erken döneminde kısa bir süre fonksiyon gösterebilir. Üçüncü sistemden ise kalıcı böbrekler meydana gelir.¹⁴ Üriner sistemin gelişmesinde klasik yaklaşım daha fazla kabul görmektedir. Pronefroz en ilkel böbrek tipi olup aşağı sınıf ve amphioxus'da fonksiyoneldir. Pronefrozun dejenerasyonu ile daha kaudal'de gelişen mezonefroz kurbağada ve mezonefrozun dejenerasyonu ile kaudal'de gelişen metanefroz kanatlı, memeli hayvan ve insanda fonksiyoneldir.¹⁵

2.1.1. Pronefroz

Bu geçici, fonksiyonel olmayan yapılar insan embriyosunda ilk olarak dördüncü haftanın başlangıcında ortaya çıkarlar. Pronefrozlar, emriyonun boyun bölgesinde az sayıda hücre kümesi ve kıvrılmış tübüler yapılar ile temsil edilirler. Pronefrik duktus, kaudal olarak uzanır ve kloaka'ya açılır.¹⁶ Evcil hayvanlarda pronefrik kanal fonksiyonel değildir. Sadece koyunda pronefrik tüpçükler iyi gelişmiştir ve pronefrik kanal ile bağlantı kurmuşlardır.¹⁵ Bir kaç adet (7-8) borucuktan ibaret olan pronefroz, kanatlılarda, memeli hayvanlarda ve insanda kısa süre görev yapar sonra körelir; fakat kanal varlığını sürdürerek mezonefroz için boşaltıcı kanal olarak hizmet eder.¹⁷

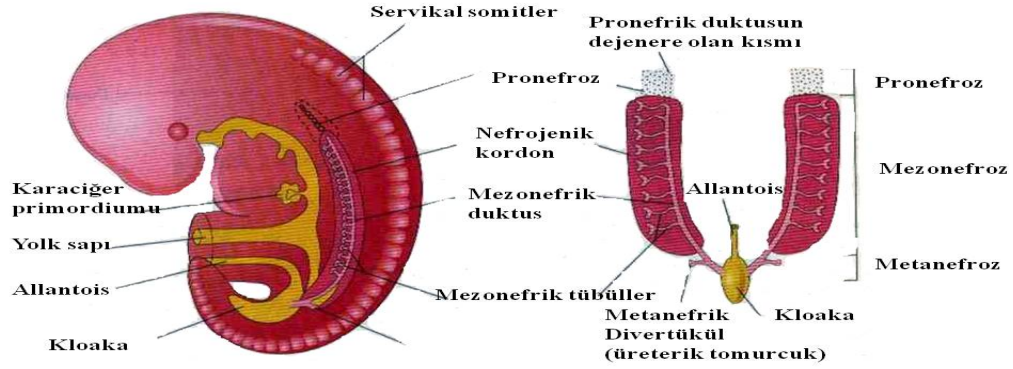
2.1.2. Mezonefroz

Mezonefroz 4. hafta sonlarında, rudimenter pronefroz'un kaudalinde büyük bir organ olarak dikkati çeker. Mezonefroz, kalıcı böbrekler ya da metanefroz oluşuncaya kadar ara böbrekler olarak işlev görür. Mezonefroz sistem gelişirken, aramezodermin segmentsiz olan aşağı torasik ve lumbal bölgesinde 2-3 ya da daha fazla sayıda mezonefroz tübüleri gelişir. Kısa sürede uzayarak, S-şeklinde kıvrılırlar. Medial uçları glomerulus ve Bowman kapsül'ü kazanır ve ilk böbrek cisimciği oluşur. Mezonefroz tübüllerinin lateral uçları, pronefroz kökenli bir çift mezonefro'za ya da Wolff kanal'larına açılır. Bu kanallar önceleri kloakaya daha sonra da urogenital sinus'a açılır.¹⁸ Memeli hayvanlarda ve insanda mesonefroz'un cranial bölümü körelerek kaybolur, kaudal bölümü ise erkekte testisin boşalma yollarından *duktuli efferentes*'i, mesonefroz kanalı'da *duktus epididimidis* ve *duktus deferens*'i meydana getirir. Dişide ise, kalıntı halindeki epoophoron ve gartner kanalcıklarını yapar. Kurbağa ve balıklarda mesonefros daimi böbrek görevini yapar.¹⁷

2.1.3. Metanefroz

Üçüncü üriner organ olan metanefroz veya kalıcı böbrek, 5. haftada belirir. İki yerden köken alarak gelişir. Üreter dalı ya da metanefrik diverticulum, metanefrik blastem ya da metanefrik mezoderm. Metanefrik blastem yakınından dorsal tomurcuk olarak çıkar. Metanefrik blastem dokusundan, kalıcı böbreğin işlev gören birimi olan nefron, üreter dalından ise toplayıcı kanallar gelişmektedir. Metanefrozun bu her iki taslağı da mezodermal kökenlidir.^{14,18} Metanefroz tip böbrek, metanefrogenezisi için metanefrik mezenşim ve metanefrik divertikülümün karşılıklı etkileşimine ihtiyaç duyar. Metanefrik mezenşimin olmaması durumunda üreter tomurcuğı dallanmaz, üreter tomurcuğunun

olmaması halinde de metanefrik mezenşimal hücreler epiteliyal tubul hücrelerine değişmez¹⁵(Şekil 2.1).¹⁶



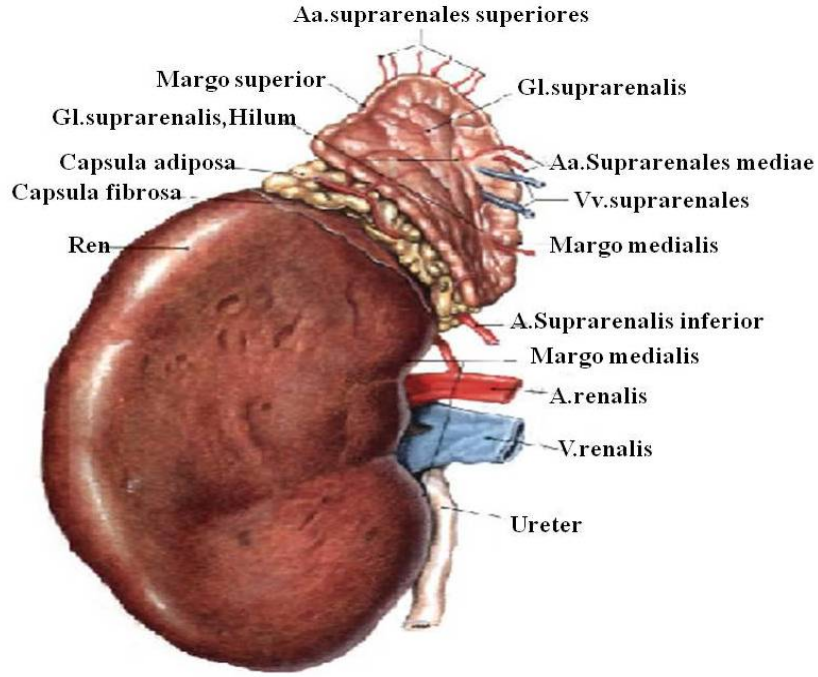
Şekil 2.1. Böbreğin embriyonal gelişimi

2.2. Böbrek Anatomisi

Böbrekler, karın boşluğunun üst bölümünde, kolumna vertebralisin sağında ve solunda birer tane olarak bulunan organlardır.¹⁹ İnsanlarda sağ böbrek, sol böbreğe göre 1-2 cm daha aşağıdadır.²⁰ Tavşanlarda ise midenin geniş ve eğri yapısından dolayı sağ böbrek sol böbreğe göre daha üstte (başa yakın) yer almaktadır.²¹ Kanatlı böbreğinin dış görünümü düzensiz, yassı ve 3 parçadan oluşan bir görünüme sahiptir.²² Böbreklerin rengi, kapsadığı kana ve hayvan türüne bağlı olarak kahverengimsi kırmızıdan, mavimsi kırmızıya kadar değişir. Equide ve carnivor'da parlak mavimsi kırmızı, domuz ve ruminantlar'da koyu kahverengidir.²³ Şekil bakımından fasulyeye benzeyen böbreklerin ön (dorsal) ve arka (ventral) iki yüzü, dış ve iç iki kenarı (margo lateralis, margo medialis), üst (extremitas cranialis) ve alt (extremitas caudalis) iki ucu vardır.²⁴ Böbreğin dış kenarı dışbükeydir ve iç kenardan daha kalın, iç kenarı içbükey olup, dış kenardan daha kısadır.

Orta bölümünde bir yarık ya da çöküntü bulunur, buna *Hilus renalis* denir. *Hilus renalis*'den *A. renalis* ve sinirler organa girer, *V. renalis*, lenf damarları ve üreter ise organdan çıkar. Hilus, aynı zamanda böbreğin ortasında yer alan ve iç yüzü böbrek kapsülünün devamı bir kapsül ile örtülü olan ve sinus renalis denilen boşluğa açılır.¹⁹ İnsanlarda her bir böbrek yaklaşık 12 cm uzunluğunda, 4 cm kalınlığında, 6 cm genişliğindedir.²⁰ Ağırlığı erkeklerde 150 gram, kadınlarda 135 gram kadardır.²⁵ Kadınlarda böbrekler genellikle daha kısa ve daha hafiftir. Sağ böbrek sola nisbeten biraz daha küçük ve daha hafiftir.²⁶ Böbreği içten dışa doğru *Kapsula fibrosa*, *kapsula adipoza* ve *fasiya renalis* olmak üzere üç kılıf sarar.²⁷ *Kapsula fibrosa*, böbreği dıştan saran, ince fakat sağlam fibröz bir kılıftır. Böbrek hilusuna geldiğinde iki yaprağa ayrılır. Bu yapraklardan birisi, böbrek hilus'unda bulunan yapıların üzerine geçerek, onların adventitiası olarak devam eder. Diğer yaprak ise hilum renale'den içeri girer ve papillalar hariç olmak üzere, sinus renalis'in iç yüzünü döşer.²⁸

Kapsula adipoza, fibröz kapsülün dış tarafında bulunan yağ tabakasıdır.¹⁴ Bu kapsül daha ziyade böbreğin arka yüzünde kalın olup *sinus renalis* içindeki yağlı gözeli doku ile uzanır.²⁹ *Fasiya renalis*, karın duvarındaki *fasiya subseroza*'nın kapsula adipozayı dıştan saran bölümüne denir. Periton ile *fasiya endoabdominalis* arasında bulunan *fasiya subseroza*, böbreğin dış kenarı yakınında yoğunlaşır ve iki yaprağa ayrılır. Bu yapraklardan birisi böbreğin ön, diğeri ise arka tarafından geçerek mediale doğru uzanır. *Fasiya prerenalis* de denilen ön yaprak, medialde böbrek damarları, *v.kava inferior* ve aorta'nın önünden geçerek karşı tarafın aynı yaprağı ile birleşir. *Fasiya retrorenalis* de denilen arka yaprak, ön yapraktan daha kalındır. Arka yaprak *M. psoas major*'un *fasiyası* ve *fasiya prevertebralis* ile kaynaşır²⁸(Şekil 2.2).³⁰



Şekil 2.2. Böbreğin genel şekli

2.2.1. Böbreğin Yapısı

Taze bir böbreği kenarlarından geçen bir kesitle ikiye ayırarak kesit yüzeyini incelediğimizde, renk ve fonksiyon bakımından farklı iki bölümden oluştuğunu görürüz. Daha açık renkli (kırmızı) olan dış kısmına kortex renalis, daha koyu renkli (kahverengi-kırmızı) ve çizgili görünümlü olan iç kısmına ise medulla renalis denir. Orta kısmında bulunan böbrek şeklindeki boşluğa da sinüs renalis denilir.³¹

2.2.1.1. Sinus Renalis

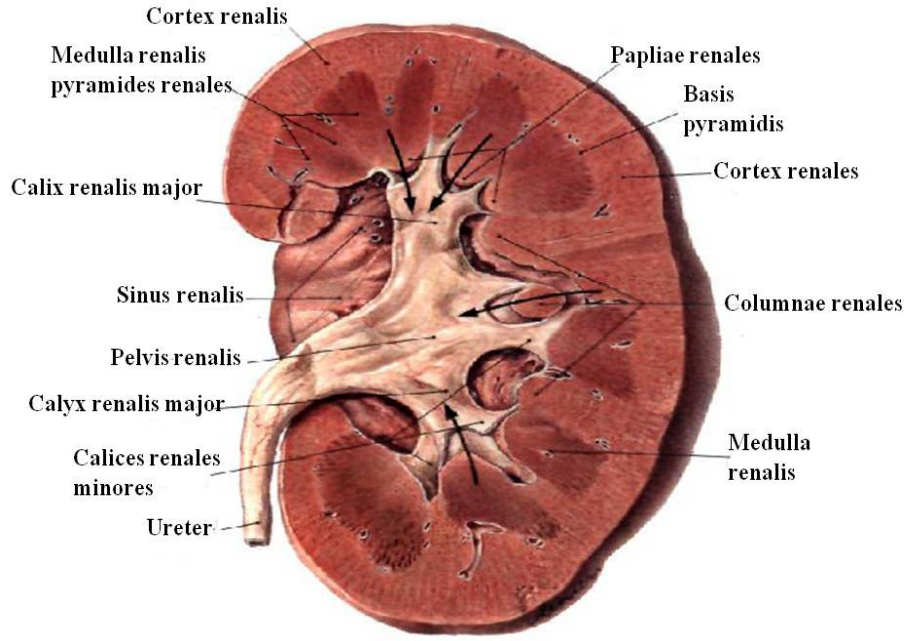
Böbrek, her iki kenarından geçecek şekilde ön-arka yarılarda ayrıldığında, hilus renalenin böbrek içinde bir boşlukla devam ettiği görülür. Böbrek şeklinde olan bu boşluğa sinus renalis denir. Sinus renalisde pelvis renalisin üst bölümü, kalix renalisler, böbrek damarları (*A. segmentalis*'ler) ve bunlar arasındaki boşlukta da yağ dokusu bulunur.³¹

2.2.1.2. Medulla Renalis (Medulla)

Soluk renkli, çizgili, konik şekilli bölümdür. Konik oluşumlara piramides renales (Malpighi piramitleri) denir. Piramitlerin tabanı (*basis pyramidis*) kortex renise, uçları sinus renalise doğrudur. Uç kısımları *kaliks renalis minor'ların* içine doğru uzanan papillaları (*papillae renales*) yaparlar. Papillaların sayısı yaklaşık 5-11 kadardır. Bu papillaya açılan ductus uriniferilerin (*ductus papillaris* veya *bellini kanallarının*) sayısı 116-776 arası değişir.³²

2.2.1.3. Korteks Renalis

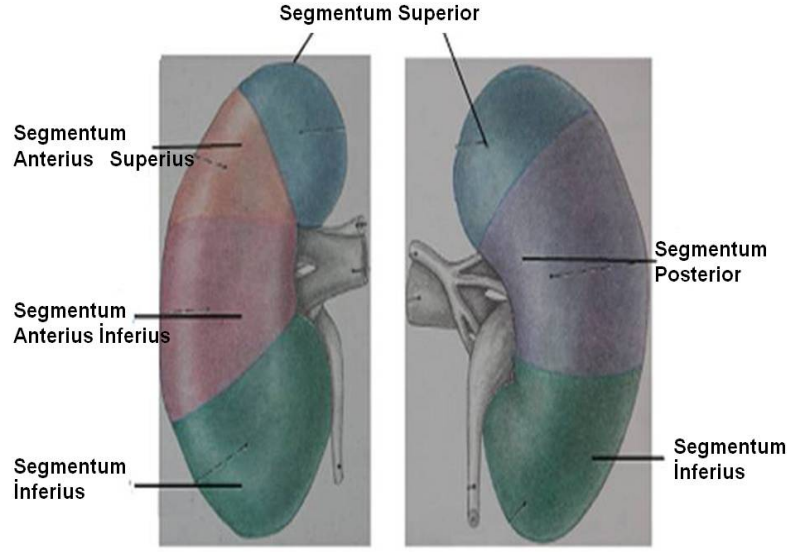
Kapsula fibrosanın altında bulunan kısımdır. İdrarı yapan oluşumların bulunduğu kesimdir. Böbrek cisimciklerinin varlığı nedeniyle esmer kırmızı renkte görülür. Bu cisimcikler taze kadavralarda dağınık tarzda, küçük kırmızı benekler ya da noktalar halinde görülür. Bu beneklerin ya da noktaların tümü *corpuscula renis'*dir (*Malpighi cisimcikleri*). *Korteks renis'te* ayrıca *pyramides renales* (*Malpighi piramitleri*) arasında, korteksin en dış kesiminden itibaren *sinus renalis'e* kadar uzanan sütun şeklindeki oluşumlar görülür. Bu oluşumlara *kolumna renales* adı verilir. Ayrıca, *pyramides renales'in* taban kesimlerinden böbreğin dış yüzüne doğru ışınal tarzda uzantılar bulunur. Böbreğin medullar kesiminden gelen bu uzantılara medulla uzantıları veya ferrein uzantıları denir¹⁹(Şekil 2.3).³⁰



Şekil 2.3. Böbreğin enine kesiti

2.2.2. Böbreğin Segmentleri

Böbrek, kan damarlarının dağılım sahasına göre 5 segmente ayrılır. Bunlardan birisi üst kutupta (*segmentum superius*) , birisi alt kutupta (*segmentum inferius*) , ikisi ön yüzün orta kısmında (*segmentum anterius superius*, *segmentum anterius inferius*) , birisi de arka yüzün orta kısmında (*segmentum posterius*) bulunur^{31,32}(Şekil 2.4).³⁰



Şekil 2.4. Böbrekte (ön ve arkadan) segmenter yapı

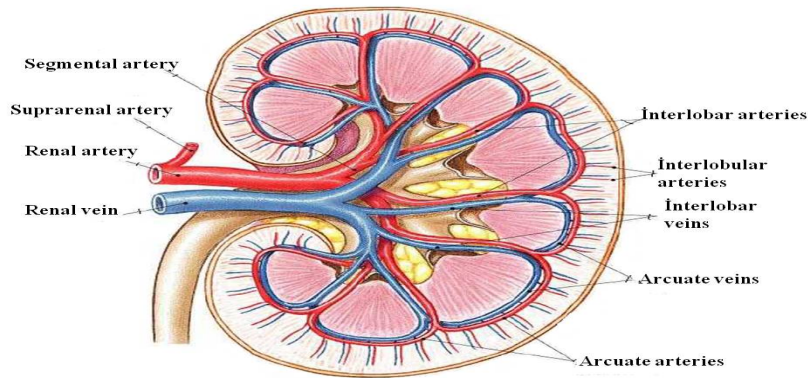
2.2.3. Böbreğin Lenf Drenajı

Lenf damarları üç pleksus oluşturur. Bunlardan birincisi tubulus renalis'lerin çevresinde, ikincisi fasiya renalis'in altında, üçüncüsü de corpus adiposum pararenale'de bulunur. Birinci pleksustaki damarlar birleşerek 3-4 ana dal oluşturur. Hilum renale'den çıkarken diğer iki pleksus'un damarları ile birleşir. Böbrekten çıkan lenf damarları *V. renalis*'i takip ederek aortanın yan tarafındaki nodi lymphatici lumbales (aortici laterales)'e açılırlar.²⁸

2.2.4. Böbreğin Damarları

A. renalis 1.ve 2. lumbal omur düzeyinde aorta abdominalis'ten ayrılır. Sağ *A. renalis*, sol *A. renalis* daha uzundur. Hilus renalis'ten böbreğe giren *A. renalis*, hilus içinde segmenta renalia adı verilen dallara ayrılır. Bu dallar ilk olarak *A. lobaris*'e ayrılır. *A. lobaris*'de *aa. interlobares renis*'e ayrılır. *Aa. interlobares renis*'in her biri korteks renis

ile medulla renis sınırı üzerinde *aa. arcuateae*'ya ayrılır. *Aa. arcuatae*'lardan da *aa. interlobulares* denilen ve korteks renis'e yönelen dallar başlangıç alır.¹⁹ *A. interlobularis*'lerden yan taraflara uzanan ince dallara *arteriola glomerularis afferens* denir. Bunlar *kapsula glomerularis*'in (Bowman kapsülü) damar kutbundan girerek içeride *rete capillare glomerulare* denilen kılcal damar yumağını oluştururlar. Bu kılcal damar yumağı, tekrar birleşerek *arteriola glomerularis efferens*'i oluşturur. Bu da arterin girdiği kutupdan çıkarak *V. interlobularis*'e açılır. *V. interlobularis*'de arterleri takip ederek sırasıyla *V. arcuata*, *V. interlobularis*, *V. segmentalis* ve sonuçta *V. renalis* olarak *V. kava inferior*'a açılır.³¹ *Arteriola glomerularis efferens*, kortikal bölgeye gelince tekrar kılcal dallara ayrılır. Bu kılcal damarlar kökenini nefrogen dokudan alan idrar kanalcıklarının etrafında *rete kapillare peritubulare korticale* denilen bir ağ oluştururlar. Bu ağdaki kan, konsantre olup yavaş seyrederek. İdrar kanallarındaki ise fazla suludur. Bu nedenle kan, idrar toplama kanalındaki suyu tekrar emer. Bu şekilde glomerulustan süzülerek Bowman kapsülüne geçen suyun büyük bir kısmı, bu ağ vasıtasıyla tekrar emilmiş olur. Bu emilme esnasında bir takım maddeler de kan dolaşımına geri döner²⁸ (Şekil 2.5).³²



Şekil 2.5. İnsan böbreğinin arter ve venöz sistemi

2.2.5. Böbreğin Sinirleri

Plexus renalis, ganglion coeliacum, plexus coelicus, ganglion aorticorenale, *n. splanchnicus* minor, *n. splanchnicus* lumbalis 1 ve *pleksus aorticus*'tan gelen liflerden oluşmuş bir sinir ağıdır. Ağın büyük bir bölümü *A. renalis* başlangıcının arkasında bulunur. Böbrek içinde *A. renalis*'in dalları çevresinde devam ederek damarları, glomerulusları ve tubulusları özellikle korteks tubuluslarını innerve eder.³³

2.3. Böbreklerin Görevleri

Canlı bedeninde iç ortamın değişmez tutulması (homeostasis) normal yaşam için çok önemlidir. İç ortamın değişmez tutulmasında akciğerler ve böbrekler etkin görevlere sahiptir. Kimyasal dengelemede akciğerler oksijen ve karbondioksit miktarını belirli düzeyde tutma işini başarır.³⁴ Bazı ilaçlar, toksinler ve zararlı olabilecek kimyasal maddeler, vücut dışına çıkarılır.²⁰ Hidrojen ve bikarbonat iyonlarının idrarla kaybını düzenleyerek kanın PH'sının dengelenmesine katkıda bulunur. Azotlu artık ürünler olan üre ve ürik asidin atılmasını sağlar. Ayrıca (eritrosit yapımını stümüle eden) eritropoetin hormonunu üretir.³⁵

2.4. Böbreklerin Fizyolojisi

Böbrekler görevini üç temel olay sayesinde gerçekleştirir.³⁵

1- Filtrasyon: Kanın süzülmesi olayıdır. Kan afferent arteriollerden glomerulusa doğru akarken yüksek basınçtan dolayı plazma, kan hücreleri ve büyük proteinler hariç glomeruler kapsüle geçer. Hücreler ve büyük proteinler endotelial membrandan geçemeyecek kadar büyük oldukları için glomerulusda kalırlar. Bu olaya glomeruler filtrasyon, süzülen sıvıya da filtrat adı verilir.³⁵

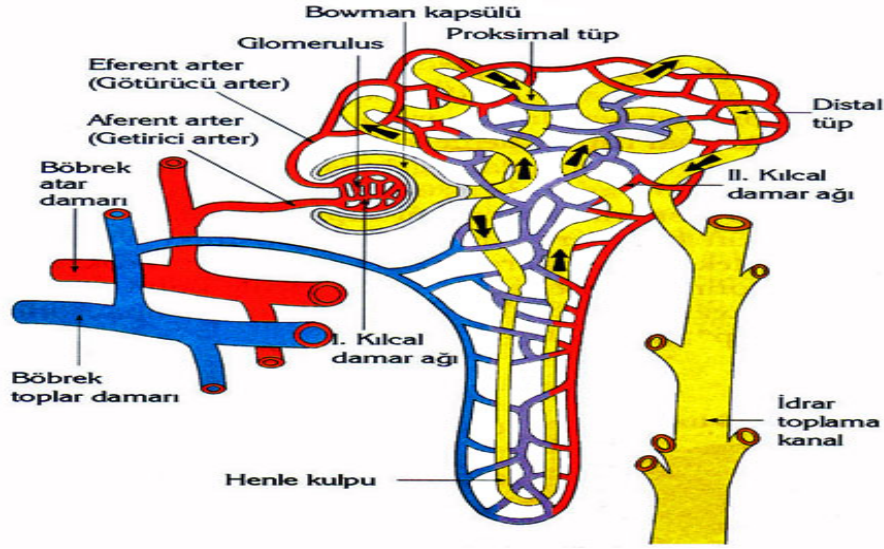
2- Geri emilme (Reabsorpsiyon): Glomerulus'ta süzülen ve nefronun çeşitli bölümlerine giren süzüntüdeki bir takım maddeler organizma için gereklidir ve bunların tekrar kana geri emilmesi gerekir. Başta su, sodyum, potasyum, klor ve glikoz gibi maddeler tekrar geri emilir.³⁴

3- Sekresyon: Vücut için yararsız veya zararlı olan artık ve yabancı maddelerin kandan alınıp tubül sıvısına verilmesidir.³⁶

2.5. Böbreğin Histolojisi

Böbrek dışta korteks ve içte medulla olmak üzere iki bölüme ayrılabilir. İnsanda böbrek medullası 10-18 adet konik ya da piramidal şekilli yapılar olan medüller piramitlerden oluşur. Her bir medullar piramidin tabanından kortekse uzanan birbirine paralel tübül demetleri olan, medullar uzantılar çıkar.³⁷

Nefron böbreğin idrar oluşumunu gerçekleştiren fonksiyonel birimidir. Her bir böbrekte yaklaşık 1-1,2 milyon kadar nefron vardır.³⁵ Bu sayı türlere göre değişir, köpeklerde yaklaşık 400.000 , kedilerde 200.000'dir. Carnivor ve domuz nefronunun oluşumu, doğumu takiben birkaç hafta sürer. Erişkin böbrek yapısı tamamlandıktan sonra, artık yeni nefronlar şekillenmez. Nefronlar, korteks içinde (superfisiyal, midkortikal veya yukstamedullar) yerleşimlerine göre, ya da nefron tubulunun uzunluğuna göre (kısa ve uzun) sınıflandırılırlar. Kısa tubullu nefronlar dış medulladan geri dönerler, uzun tubullu nefronlar ise iç medullaya kadar inerler. Bazı türlerde (kedi ve köpek gibi) yalnız uzun nefronlar varken, bazılarında (kunduz) sadece kısa tubullu nefronlar vardır.³⁸ Her nefron genişlemiş bir bölüm olan malpighi cisimciği, proksimal tubul, henle kulpu, distal tubul ve toplayıcı kanallardan oluşmaktadır³⁷(Şekil 2.6).³⁹



Şekil 2.6. Nefronun anatomik yapısı

Kortekste bulunan malpighi cisimciği nefronun ilk bölümünü oluşturur. Kanın filtre edilmesi burada olur. malpighi cisimciği küresel şekilde olup, büyüklüğü türlere göre değişir.³⁸ Her böbrek cisimciğinin çapı yaklaşık 200 μm ' dir ve kapiller bir yumak olan glomerülden oluşmuştur. Bu yumak Bowman kapsülü olarak adlandırılan iki tabakalı epitelden bir kapsülle sarılmıştır.³⁷ Glomerulus kapillerine kan afferent arteriyol ile gelir, efferent arteriyol ile çıkar. Bowman kapsülünün pariyetal tabakası bazal membrana yaslanmış tek sıra yassı epitel hücrelerelerinden oluşur. Glomerulun üzerini saran visseral yaprağın hücreleri ise yıldız şekilli uzun uzantıları bulunan podositlerdir.⁴⁰ Her bir primer uzantı ayakcık (pedisel) denilen glomerülün kapillerlerini saran çok sayıda ikincil uzantı oluşturur. İkincil uzantılar, 25 nm'lik sabit bir mesafede, bazal lamina ile doğrudan temas halindedir. Ancak podositlerin hücre gövdeleri ve birincil uzantıları bazal laminaya değmez. Podositlerin sekonder uzantıları birbirleriyle aralarında 25 nm'lik aralık olacak şekilde kenetlenirler. Bu aralıklar, süzülme ya da filtrasyon yarıklarını oluşturur.³⁷

Proksimal tubul bowman kapsulun'den sonraki kısım olup, buradaki epitel hücreleri mikrovilluslara sahiptirler ve bu hücrelerde fırça kenar denilen yapıyı oluşturular. Bu hücreler sayesinde glomerulusta kandan filtre edilen sıvıdan su, üre, elektrolitler, glukoz ve bazı aminoasitler ile polipeptidlerin geri emildikleri yerdir. Bu kanalda su ve sodyum çok büyük oranda geri emilmesinin yanı sıra kalsiyum (Ca^{++}) ile potasyum (K^+) gibi elektrolitler, üre, ürik asit askorbik asit, glukoz, keton cisimleri, hidrojenfosfat (H_2PO_4), klor (Cl^-), sülfat (SO_4^{-2}) ve bikarbonat (HCO_3); penisilin, histamin, organik asitler ve organik bazların büyük çoğunluğu geri emilir.³⁵

Henle kulpu proksimal tubulüse yapıca çok benzemekle birlikte birer adet, ince ve kalın inici-çıkıcı kollardan oluşan U şeklinde yapıdır. Kalın çıkan kol yapıca distal kıvrımlı tubule çok benzer. Medullanın dış kısmında, dış çapı 60 μm olan kalın inen kol birdenbire 12 μm ye kadar daralarak inen kolun ince bölümü olarak devam eder. Nefronun bu bölümünün lümeni geniştir çünkü duvar epitelinin çekirdekleri yalnızca çok hafif şekilde lumene doğru çıkıntı yapan yassı epitel hücrelerinden oluşmuştur. Bütün nefronların yedide biri (1/7) kortikomedüller sınırın yakınında bulunur, bu yüzden bunlara jukstamedüller nefron adı verilir. Diğer nefronlara ise kortikal nefronlar denir.³⁷

Distal tubulus henle kulpunun kalın kısmı kortekse girdiğinde distal tubuller başlar. Distal tubuller, genellikle korteks bölgesinde bulunur ve proksimal tubuller ile karmaşık ağlar oluşturular. Distal tubuller proksimal tubullere benzese'de bazı yönleriyle bunlardan ayrılırlar. Distal tübüllerde fırçamsı kısımlar adeta yok gibidir. Lumen ise daha geniştir. Distal tubülüsü oluşturan hücreler içinde organeller az olduğu için stoplazma boyalarına

karşı duyarlılıkları daha azdır. Ayrıca distal tubülüslerin boyları proksimal tubüllerden çok daha kısadır.³⁴

Toplayıcı kanallar distal tubullerin devamı olan kanallar olup korteks medulla sınırında görülmeye başlar. Proksimalden distale gidildikçe toplama kanallarının epiteli tek katlı kübük epitelten, tek katlı prizmatik epitele dönüşür. Soluk boyanan epitel hücrelerinde fırçamsı kenar ve bazal çizgilenme görülmez. Toplama kanalları kaliks renalise yaklaştıkça birleşerek yüksek boylu prizmatik epitel ile döşeli daha büyük kanalları oluşturur.⁴⁰

2.6. Nikotin ve Nikotinin Yapısı

1512 yılında Portekiz'e getirilen tütün bitkisinin öğütülerek enfiye şeklinde migren baş ağrılarında kullanımı, 1559 yılına kadar Avrupa'ya yayılmadan bu ülkede sınırlı kaldı. 1560 yılında Jean Nicot isimli bir kişi tarafından kraliyet ailesine düğün hediyesi olarak Paris'e götürülmesinin ardından 1570 yılında tütün bitkisi için *Nicotiana tabacum* ismi kullanılmaya başlanmıştır.⁴¹ *Nicotiana tabacum*, yani tütün bitkisi *Solanaceae* ailesinin bir üyesidir.⁴² Buna dayanarak Nikotin piridin ve pirolidin halkasından oluşan nikotin alkaloid olup canlıda bağımlılık oluşmasına yol açar.^{43,44} *Solanaceae* ailesinden olan patates, domates, patlıcan ve biber gibi sebzeler düşük miktarda nikotin içermektedir. Bu familyadan olmayan karnabahar ve çayda'da nikotin tesbit edilmiştir.⁴²

Alkaloidler ikincil bitki metabolitleri sınıfından olup genellikle halka yapıları içerisinde bir ya da daha fazla azot atomu içeren ve bitki metabolizmasında aminoasitlerden türeyen bazik doğal organik ürünler olarak bilinirler.⁴⁵ Alkaloidler, bitkilerde en fazla yer alan toksik bileşiklerdir ve suda az, organik çözücülerde ise daha fazla çözünürler.⁴⁶

Bitkilerde hücre öz suyunda erimiş olarak bulunan alkaloidler bitki organlarında dağınık olarak yer almaz genellikle belli bir organda (kök, kabuk, meyve, tohum vb.) daha yüksek oranda bulunurlar.⁴⁷ Alkaloidler genellikle yapılarında azot atomu ile birlikte bir yada daha fazla fenol yada indol halkası içerirler. Karbon halkası içerisindeki azotun yeri bitkinin ve alkaloidin türüne göre değişir. Alkaloidler yüksek bitkilerde bol miktarda bulunur. Yüksek bitki familyalarının %20'sini alkaloidlerin oluşturduğu tahmin edilmektedir.⁴⁸ Yapılarından yola çıkarak alkaloidler, şekil ve orjinlerine göre 3 ana gruba ayrılırlar. Bunlar a) Gerçek alkaloidler, b) protoalkaloidler ve c) yalancı alkaloidlerdir.

a-Gerçek Alkaloidler

Gerçek alkaloidler, aminoasitten köken alırlar ve heterosiklik halkalarını bir azotla ortaklaşa kullanırlar. Gerçek alkaloidlerin öncülleri, L-ornitin, L-lizin, L-tirozin, L-triptofan ve L-histidin aminoasitleridir. Düşük dozlarda bile etkili biyolojik aktivitelere neden olan oldukça yüksek reaktif moleküllerdir. Gerçek alkaloidler acı bir tada sahiptir ve kahverengi bir sıvı olan nikotinin dışında hepsi beyaz ve katıdır. Suda çözünebilir tuzları oluşturan alkaloidlerin pek çoğu, bu tuzları oluşturabilmek için asitlerle birleşen kristal maddelerdir. Bitkilerde serbest durumda, tuz olarak ve N-oksit olarak bulunurlar.⁴⁹

b-Protoalkaloidler

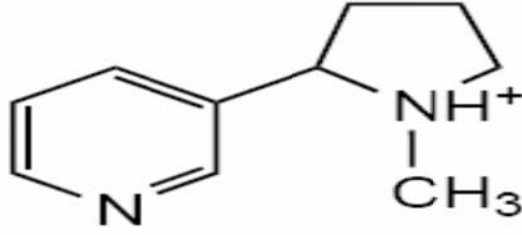
Protoalkaloidler, aminoasitlerden türevlenirler ancak, heterosiklik halkanın bir parçası değildirler. Bu tip alkaloidler L-tirozin ve L-triptofandan oluşan bileşikler olup halkasal yapıya sahiptirler. Hordenin ve meskalin bu tip alkaloidlere örnektirler.⁴⁹

c-Yalancı Alkaloidler

Yalancı alkaloidler, aminoasitlerden kök almayan temel karbon iskeletine sahip bileşiklerdir. Bunlar aminoasitlerin öncül veya postkürsörlerinden oluşmaktadırlar. Kapseisin ve kafein bu gruba örnek olarak verilebilir.⁴⁹

Bitkilerde hücre öz suyunda erimiş olarak yer alan alkaloidler genellikle belirli bir organda (kök, kabuk, yaprak, meyve ve tohum gibi) daha yüksek oranda bulunurlar. Alkaloidlerin çoğu bir türe ya da yakın türlere özeldir. Bir kısmı ise bir familyaya hastır. Bu nedenle bitkilerde nadiren bir tek alkaloid vardır.⁴⁶ Çoğu kez küçük farklarla aynı yapıya sahip bir grup alkaloid bir arada bulunabilir.⁴⁷ Bunlardan biri diğerinden daha fazla ya da daha aktiftir. Alkaloidler canlılar ve insanlar üzerinde önemli fizyolojik etkilere sahiptirler. Düşük dozlarda çok güçlü etki gösteren bileşiklerdir.⁴⁸ Alkaloidlerin canlılar üzerinde gösterdiği antibiyotik, antiviral, antitümör, antisitosidal, ve antidepresif etkileri nedeni ile büyük ilgi uyandırır. Alkaloid alımıyla birlikte hayvanlarda beyin, omurilik, sinir sistemi bozuklukları meydana gelir ve ani ölümler gözlenebilir.⁴⁷

B vitamini yada niasin olarak bilinen nikotinik asitten türemekte olan nikotin 1828'de izole edilmiş, 1904 yılında da laboratuvar ortamında sentezlenmiştir. Nikotin 162.23 kDa moleküler ağırlığa sahiptir ve açık kimyasal adı 3- (1-Metil-2-pirolidinil) piridin'dir.⁴¹ Nikotin suda fazla çözünür. Küçük molekülü ve lipofilik bir madde olması nedeniyle deri ve mukozalardan kolayca ve hızla emilir.⁵⁰ Çok düşük miktarlarda bile uyarıcı etkisi olan nikotinin saf formu ise yüksek derecede zehirleyicidir ve insektisid olarak kullanılmaktadır⁴¹(Şekil 2.7).⁵¹



Şekil 2.7. Nikotinin yapısı

2.7. Nikotinin Farmakokinetik Özellikleri

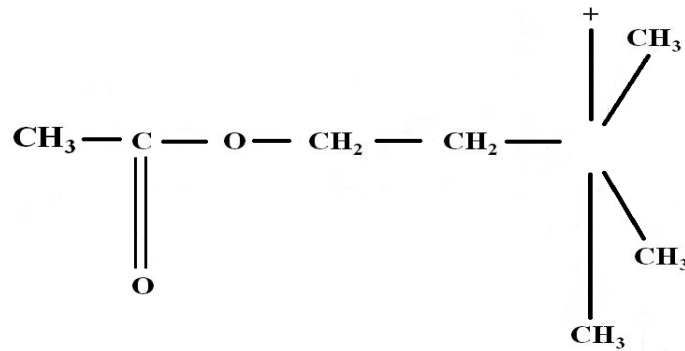
Nikotin, piridin ve pirolidin halkarından ibaret yarı ömrü 1-2 saat olan bir amindir. Ufak molekülü ve lipofilik bir madde olması nedeniyle cilt ve mukozalardan kolayca absorbe edilir. Vücuda giren nikotinin kolayca biyolojik membranları ve kan beyin bariyerini geçtiği gösterilmiştir.^{52,53} Sigara dumanındaki nikotin katran damlacıkları içerisinde alveollere kadar ulaştıktan sonra burada, fizyolojik olarak pH seviyesi emilebilecek duruma gelme imkanı bulur ve süratle emilir. Emildikten sonra dolaşıma karışır ve çeşitli dokulara taşınır. Nikotinin beyine ulaşması için 10-19 saniye yeterlidir. Arteriyel kanda bulunan nikotinin venöz kandakinden 6 misli fazla olmasından dolayı beyinde yüksek konsantrasyona ulaşır.⁵⁴

Nikotin polar bir bileşik olması nedeniyle yağ dokusunda az depolanır. Özellikle beyin, kalp, karaciğer ve kaslarda birikir.⁵⁰ Karaciğerde ve bir kısmı da bu dokularda oksitlenerek asit metabolitler şeklinde böbreklerden atılır. Nikotin, esas olarak pirolidin halkasının C ve N atomlarının oksitlenmesiyle % 70-80 oranında kotinine ve % 4 oranında ise nikotin N²- oksite dönüşür. Bu maddelerin farmakolojik etkinlikleri nikotininkine göre daha düşüktür. Bütün bu metabolitler idrarla atılırlar.⁵⁵

Nikotinin çoğu zararlı etkisi, damar endotelinde hasar oluşturarak kolayca dokulara geçebilmesinden kaynaklanmaktadır.⁵³ Damar endotelinde morfolojik değişiklikler yaparak damar yatağında hasara yol açar. Yapılan çalışmalarda damar endotel hücresinde DNA sentezini uyardığı ve vasküler proliferasyona yol açtığı gösterilmiştir.⁵⁶

2.8. Nikotinin Etki Mekanizması

Dışarıdan alınan etken maddeler, vücuttaki etkilerini vücutta doğal olarak bulunan maddeleri taklit ederek veya vücutta devam eden bir takım işlemleri engelleyerek gösterirler. Nikotinin hedef hücrelerde etkisini nikotinik tipteki asetilkolin reseptörlerini aktive ederek oluşturduğu bilinmektedir.^{57,58} Asetil kolin (ACh) omurgalı ve omurgasız türlerinin her ikisinde uyarıcı bir nörotransmitterdir.(Şekil 2.8).⁵⁹ Asetil kolinin iki tip reseptörü vardır. Bunlar; muskarinik (mAChR) ve nikotinik (nAChR) asetilkolin reseptörleridir. Muskarinik reseptörler, hem merkezi hem de periferel sinir sistemi nöronlarında ve otonom sinir sistemi tarafından kontrol edilen kalp, solunum sistemi ve gastrointestinal sistemde, üriner yollarda, göz ve ekzokrin bezlerde bulunur. Bu reseptörler pek çok temel fizyolojik işlevleri düzenlemeye aracılık eder.^{42,60}



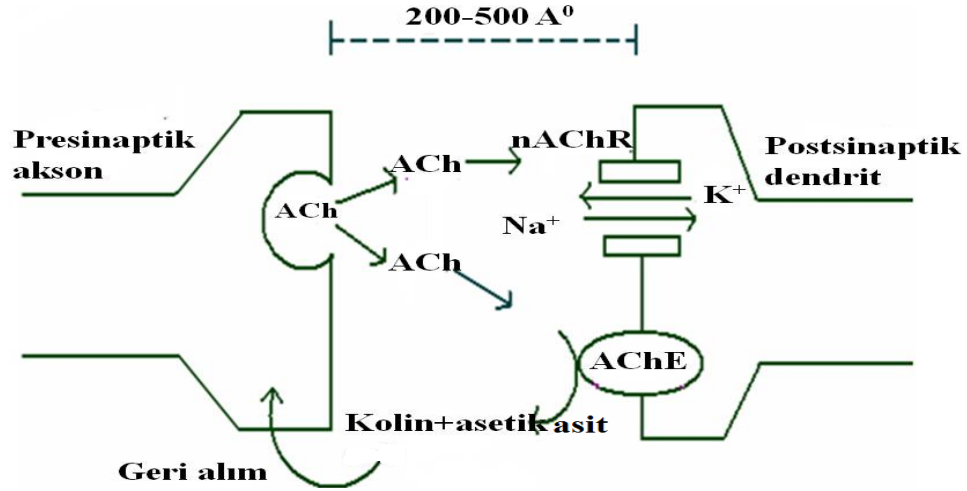
Şekil 2.8. Asetilkolinin kimyasal yapısı

Nikotinik reseptörler ise; nöromusküler kavşak, otonomik gangliyonlar, adrenal medullanın hücreleri, duyuusal sinir uçları, merkezi sinir sistemi nöronların da bulunur.⁵⁰

Bazal ön beyin, kolinerjik sistem, dikkat, bilişsel performans, bellek, beyin kan akımı, serebral glukoz kullanımı ve EEG aktivitesi gibi birtakım işlevleri kordine eder/düzenlerler.⁶¹ Nikotinik reseptörler, merkezi bir por etrafına simetrik olarak dizilmiş beş alt üiteden oluşan ve moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 280 kDa olan glikoproteinlerdir. Alfa (α), beta (β), gama (γ), sigma (δ), epsilon (ϵ) alt birimleri katyon kanalları ile direkt olarak kenetlenmiş durumdadır. α reseptör alt biriminin en az sekiz, β reseptör alt biriminin ise en az üç izoformu olduğu gösterilmiştir.⁶² Her bir alt ünite M1, M2, M3 ve M4 ile adlandırılan protein yapıda dört trasmembran segmente sahiptir. M2 alt ünitesi iyon kanalının lümenini astarlar ve iyon kanal blokerleri için bağlanma bölgelerini içerir. Günümüzde kassal tipte ve nöronal tipte olarak 17 nAChR alt ünitesi belirlenmiştir. Kassal tipte nAChR'leri iki α , bir β , bir γ ve bir δ alt ünitesinden oluşmuştur. Nöronal nAChR'leri tek bir alt ünite tipine sahip homomerik reseptörler ve farklı alt ünite tiplerinin oluşturduğu heteromerik reseptörler olmak üzere iki gruba ayrılırlar.⁶³

Nikotinik reseptörler Na^+ 'u, az derecede Ca^{+2} ve K^+ 'u geçiren kanallardır. Bu kanalların açılması hücrelerin depolarizasyonuna neden olur.⁶² Nikotinik asetilkolin ve diğer nörotransmitter kapılı iyon kanalları, sinir sistemi boyunca sinaptik iletide anahtar rol oynarlar. Genel olarak sinaptik iletim nikotinik kolinerjik sinaps boyunca iki adımda yürütülür. Önce ACh ekzositoz yoluyla presinaptik membrandan salınır ve nAChR/iyon kanal kompleksinin ekstrasellüler alanındaki bağlanma bölgesi ile birleşir. Sonra oluşan reseptör-molekül kompleksindeki yapısal şekil değişikliği iyon kanalının açılmasına neden olur ve hücre içindeki Na^+ 'un hücre içine, hücre içindeki K^+ 'nın ise hücre dışına akışını sağlayarak membran potansiyelindeki eşitliği bozar. Nikotinik asetilkolin reseptörleri böcek ve omurgalı sinir sisteminde sinaptik iletimi sağlamakla birlikte dağılımları ve yapıları

farklılık gösterir. Omurgalılarda nAChR'leri nöromusküler kavşağa, Merkezi sinir sistemine, periferel sinir sistemine ve bazı mekanosensör hücreler üzerinde dağılış göstermektedirler (Şekil 2.9).⁶³



Şekil 2.9. Kolinerjik sinaps boyunca nöral iletimi

Merkezi sinir sistemine hakim olan reseptörler α_4 ve β_4 izoformlarıdır. Sıçan beyinde yüksek affiniteli nikotin bağlanma yerlerinin % 90'ı bu nitelikte olduğu saptanmıştır ve nikotinin kronik uygulamasında yüksek affiniteli reseptör sayısının arttığı belirlenmiştir.⁶² Nikotinik asetilkolin sinir sisteminde yaygın bir şekilde bulunur. Merkezi sinir sisteminde nAChR yoluyla iletilen kolinerjik innervasyon, uyanıklık, uyku, yorgunluk, anksiyete, ağrı duyusunun merkezi olarak işlenmesi, gıda alımı ve çok sayıda bilişsel işlev gibi fizyolojik olayların düzenlenmesinde görev alır.⁶⁴ Nikotinik reseptörler aktive olması sonucu voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının açıldığı, dopamin, serotonin (5-HT), ve norepinefrin, arttığı gösterilmiştir.^{52,62} Preklinik çalışmalar nikotinin, dopamin, norepinefrinin, serotonin (5-HT), glutamat, aminobutirik asit ve endojen opioid peptidler

gibi çok sayıda merkezi nörotransmitter sistemlerinin işlevlerini değiştirdiğini göstermişlerdir.⁶⁴

2.9. Nikotinin Etkileri

Nikotin doğrudan ve dolaylı olarak MSS'inde fizyolojik, biyokimyasal ve davranışsal olayları etkiler. Beyinde düşük dozda uyarıcı, yüksek dozda ise inhibe edici etkiler oluşturur.⁶⁵ Farklı doz ve sürelerde nikotine maruz bırakılan laboratuvar hayvanları ve insanlarda nikotinin lokomotor aktiviteyi arttırdığı vücut sıcaklığını değiştirdiği, dikkat ve kavramayı arttırdığı ve antidepresif etkili olduğu bilinmektedir.^{66,67} Akut olarak uygulanan nikotin, nAChR fonksiyonlarını etkiler. Nikotinin kronik uygulamalarında ise nikotine bağlı olarak farklı veya ilave etkiler de ortaya çıkar. Kronik nikotin uygulaması, beyinde nikotine duyarlı nAChR fonksiyonunun hızlı ve sürekli olarak kaybolmasına neden olmaktadır. Gangliyonik $\alpha 3\beta 4$ nAChR'leri veya kassal tipteki $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ nAChR lerinin de kronik nikotin alımıyla hızlı ve sürekli olarak kaybolduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle nikotinin nAChR fonksiyonlarının azalmasına neden olabileceği düşünülmektedir.⁶⁸

Nikotinin, periferik ve MSS'de reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini uyararak oksidatif stresin oluşumuna yol açtığı kabul edilmektedir. Nikotinin mitokondrial solunum zincirini kırarak süperoksit anyonunu ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumunu arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca nikotinin sitokrom P450'nin monooksijenazlarınca yönlendirilen metabolizması oksijene ihtiyaç duyar. Yüksek doz nikotin ve enantiomerlerin hücre içi metabolizması sırasında sitokrom P450 enzimlerinin aktivitesi artarak serbest radikal oluşumuna neden olabilir.⁶⁹ Nikotin, sitokrom P450 sistemi üzerinde pirolidin halkasındaki C ve N atomlarının oksitlenmesiyle kotinine dönüştürülür. Kotinin

nefronlarda 10 kat konsantrasyon olduktan sonra böbreklerden atılır. Nikotinin idrar ve tükürük bezi konsantrasyonları nikotine maruziyetin belirlenmesindeki en değerli belirteçlerdir.⁵⁰

Nikotinin, vazokonstriksiyon ve doku hipoksisi gibi mikrovasküler dolaşıma direkt ve indirekt etkileri mevcuttur. Kan viskozitesini artırır, eritrosit deformasyonu ve trombosit adezyonuna neden olur ve trombus oluşmasını kolaylaştırır. Nikotinin sempatik sinir sistemini'de uyardığı düşünülmektedir.⁷⁰ Sempatik sinir sisteminin aktivasyonu ile plazma trigliserid ve çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) seviyesinde yükselme yapar.⁷¹ Bu uyarının etkilerinden biri'de tükürüğü azaltmasıdır. Tükürük azlığının neden olduğu ağız kuruluğu diş ve diş etleri üzerinde bakteri plaklarının teşekkülünü kolaylaştırır. Nikotinin damarları daraltıcı etkisine bağlı olarak dişetinde kan akımı azalır. Dişetine yeterli oksijen ve kan hücrelerinin ulaşmasına engel olur. Bu durum dişetin kendini koruyucu ve tamir edici özelliğini zayıflatır.^{70,72}

Nikotinin kardiovasküler sistem üzerine olan etkisi, artan katekolaminlerin yol açtığı sempatik nöral uyarılma ile olmaktadır. Merkez sinir sistemi ile periferik kemoreseptörler, özellikle karotiddeki kemoreseptörleri doğrudan etki ile beyin sapı ve omurilik aktive olur. Periferik mekanizmalar ile adrenal medulladan ve damarlardaki sinir uçlarından ketakolamine salınımı artar. Bu etkiler kalp atım sayısını artırır, kan basıncı yükseltir, cilt ve koroner damarlar ile çizgili kas damarlarında ise genişlemeye neden olur.⁵⁴

Nikotin parasempatik ganglion stimülasyonu ile gastrointestinal sistemde ise; peristaltik hareketleri hızlandırır ve tonusunu artırır, midenin boşalma süresi kısalır, asit salgısı artar.²⁶ Nikotinin uzun süreli intramusküler verilmesi histamine bağlı gastrik ülserlerin artmasına neden olur. Uzun süre ağızdan verilmesi durumunda ise kanayan mide ülserlerine sebep olmakta ve gastrik mukozal hasarı arttırmaktadır.⁷³

Nikotinin üst ve alt solunum yolu enfeksiyonları başta olmak üzere birçok enfeksiyona zemin hazırlaması, immun sistem üzerine de ciddi etkilerinin olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra, başta akciğer kanseri olmak üzere diğer organ kanserlerinin, alerjik hastalıkların ve aterosklerozun gelişiminde, hücresel ve humoral immun sistem üzerine yaptığı değişiklikler oldukça etkili olmaktadır. Kanda serum immunoglobulin, lizozim ve CD16 doğal öldürücü hücre sayısında düşüklük alveolar markofajların yapı ve fonksiyonlarında azalma oluşur.⁷⁴

Nikotinin ürogenital sistem üzerine de önemli toksik etkileri bulunmaktadır. Nikotin renal arter vasıtasıyla verildiğinde, sürrenal medulladan katekolaminlerin salınımını arttırarak glomerüler filtrasyon hızını arttırmakta, bunun sonucunda da salüretik ve diüretik etkinlik göstermektedir.²⁶ Nikotine maruz kalma ile nefrotoksite ve nefropati arasında pozitif bir ilişki kurulmuştur. Renal fonksiyon üzerine kontaminant etkisi ise araştırılmaktadır.⁷⁵ Nikotinin sistemik verilmesiyle kan basıncında artma, total renal kan akımında azalma, korteksin iç ve dış kısmında kan akımında belirgin olarak azalma görülür.⁷⁶ Nikotin verilmesiyle böbrekten Na ve Cl atılımında, glomerüler filtrasyon hızında ve total solüt atılımında artma gözlenirken, K atılımında ve fraksiyonel Na atılımında pek değişiklik gözlenmemiştir.⁷⁷ Nikotin mesanede akut dönemde asetilkolin salınımıyla kontraksiyona neden olurken, kronik veriliminde ise mesane epitelinde metaplazi, displazi, ve uzun dönemde kanser gelişimine neden olmaktadır. Nikotinin testis üzerine olan etkilerine bakıldığında, seminifer tubuluslara minimal etkilidir. Sperm sayısı, morfolojisi ve hareketliliği üzerine pek fazla etkili olmayıp, fertilité üzerine ise etkisiz kabul edilmektedir.²⁶

Annenin daha önce ve gebelik sırasında çok sigara içmesinin, düşüklere, ölü doğumlara ve yeni doğan yavrunun ölünme neden olduğu bilinmektedir. Alınan nikotin miktarına bağlı olarak, Placenta previa (plasentanın uterus ağzında oluşması) ve Abruptio placenta (plasentanın yerleşme yerinden aniden ayrılması) görülür. Nikotin büyüyen dokulara direkt etki edebileceği gibi plasentadaki kan damarlarının daralmasına da sebep olabilir. Nikotinin etkisi ile uterustan placentaya doğru olan kan akımı azalarak iskemiye bağlı nekrozlar oluşur. Yine nikotinin etkilerine bağlı olarak erken doğum, düşük, doğum ağırlığında azalma ve fötüsün kol ve bacaklarında hareket geriliği tesbit edilmiştir.⁷⁸ Kemiricilerde, hamilelik döneminde deneysel olarak uygulanan nikotinin fötüslerde gelişme geriliğine, doğum ağırlığının düşmesine, kol ve bacaklarda gelişme geriliğine ve doğum sonrası ölümlerde artışa neden olduğu bilinmektedir.⁷⁸

Nikotin, endotel tabaka üzerinde de olumsuz etkiler yapar. Endotel tabaka vasküler tonusu devam ettiren kan akımının düzenlenmesinde rol alan oldukça aktif bir yapıdır. Endotel, damar duvarının lümen tarafında trombosit ve lökosit aktivasyonunu önler. Nikotin myokardın oksijen ihtiyacı ile koroner kalp akımı arasındaki oranı bozarak etkisini gösterir. Sistolik kan basıncını yükselterek ve kalp hızını arttırarak myokardial oksijen ihtiyacını arttırır. Endotel hasar sonucu monosit ve makrofajlar damar duvarına yapışırlar ve lipoproteinler doku sıvısına geçerler.⁷³ Serumda kolesterol, fosfolipid, trigliserid ve trigliseritten zengin lipoprotein sentezini arttırarak ateroskleroza yol açtığı bilinmektedir.⁷⁹

Nikotin solunum merkezini düşük dozlarda uyararak taşipne yapar. Bu olay düşük dozda nikotin verildiğinde aortik ve karotik glomuslardaki kemoreseptörlerin uyarılmasından doğan indirekt bir etkiye bağlıdır. Doz arttırıldığında ise solunum merkezini direkt uyarır. Daha yüksek dozlara çıkıldığında solunum merkezinin aşırı

uyarımı veya periferik etkisine bağlı olarak solunum kaslarında felç gelişebilir.²⁶ Kandaki epinefrin seviyesini arttırarak nabzı hızlandırır ve periferal vazokonstriksiyona sebep olarak deri ısısını dūřürür.⁷² Nikotin oldukça toksik bir madde olup 60 mg'ı bir erişkini solunum felci sonucu öldürebilir. Dūřük dozlarda alınan nikotin bulantı, kusma, salivasyon, periferal vasokonstriksiyona bağlı deride solukluk, güçsüzlük, peristaltizmin artmasına bağlı karın ağrısı, ishal, bař dönmesi, kan basıncında artma, taşikardi, tremor ve soğuk terlemedir. Nikotin toksisitesi sonucunda ortaya çıkan diğer bazı durumlar ise konsantrasyon güçlüğü, konfüzyon, duyuusal algı bozukluğu REM uykusunda azalmaya yol açar.⁸⁰

2.10. Serbest Radikaller

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron içeren hem organik hem de anorganik moleküller halinde bulunan maddelerdir.⁸¹ Ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktif olup, çevrelerindeki atom ve moleküllere adeta saldırırlar. Serbest radikaller ortaklanmamış elektronun belirtilmesi amacıyla üst kısımlarına yazılan bir nokta (X[.]) ile gösterilirler. Bu elektronlar orbital denen bölgelerde dönerler. Her orbital normal şartlarda birbirine zıt yönde dönen iki elektron ihtiva eder.⁸²

2.10.1. Serbest Radikallerin Oluşumu

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı vardır. Hücre içerisinde de ciddi miktar ve çeşitlilikte radikal üretilmektedir. Radikaller, başlıca 3 temel mekanizma ile oluşur:

1. Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık, kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir.⁸³ Moleküllerdeki bağların homolitik olarak parçalanması sonucu elektronlardan her biri farklı atomlar üzerinde kalır.⁸²

2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya molekülün heterolitik bölünmesi. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalır.⁴ Örneğin askorbik asit, glutatyon ve tokoferoller gibi hücresele antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur.⁸³

3. Radikal özelliği taşımayan normal bir moleküle tek bir elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşturuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksidin oluşumuna neden olur. Bu mekanizma ile radikal yapımı biyolojik sistemlerde yaygın olarak gerçekleştiğinden canlılar için önemlidir.⁸⁵

Serbest radikallerdeki çiftlenmemiş elektronlar kararlı duruma geçmek ister ve kararlı halde bulunan bir bileşikten elektron alarak bu bileşiği yeni bir serbest radikal haline dönüştürür. Kısa ömürlü olmalarına karşın radikal olmayan maddeler ile reaksiyona girip onları da radikal yapmaları ve bir dizi zincir reaksiyonu başlatıp birçok radikal oluşturmalarından dolayı oldukça tehlikelidirler. Serbest radikallerin başlattığı bu zincirleme tepkimeler dizisi antioksidanlar tarafından durduruluncaya kadar devam eder.⁸⁶

2.10.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

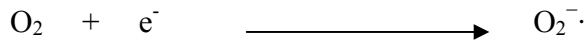
Normal şartlarda oksijen kararlı, kokusuz, tatsız, renksiz, sudaki çözünürlüğü sınırlı olan bir gazdır.⁸⁷ Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijen kaynaklıdır.⁸⁸ Oksijen atomunun dış yörüngesini oluşturan p orbitalinde iki elektronun eksik olmasından dolayı 'diradikal' olarak değerlendirilir. Bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca tepkimeye girmesini sağlar. Radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş tepkime verir.⁸⁴

Memeliler ATP üretiminin büyük bir kısmını mitokondrial elektron transport zincirinde oksijenin tamamlanmış redüksiyonuyla elde ederler.⁸⁹ Moleküler oksijen elektron transferiyle suya kadar indirgenir. Bu yol dört elektron gerektirir ve bu yolda reaktif ara moleküller oluşur ki bunlar süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleridir. Bunlar önemli oksidatif stres ajanları olup ROS olarak adlandırılırlar. Reaktif oksijen türleri, maruz kalınan miktar ve süreye bağlı olarak hücre fonksiyonlarını bozarlar ve biyolojik molekülleri hasara uğrattırır.^{84,89}

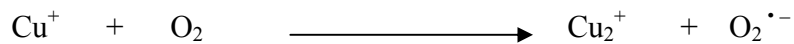
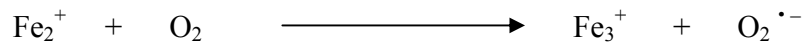
Oksijenin indirgenmesi sonucu önce $O_2^{\cdot-}$, daha sonra H_2O_2 , singlet oksijen (1O_2), hidroksil radikali (OH^{\cdot}) ve nötrofillerden salıverilen myeloperoksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon sonucu hipokloröz asit (HOCl) oluşur. İskemik dokuların reperfüzyonu sırasında ksantin oksidaz enzimi de süperoksit radikali için kaynak oluşturabilir. Yine markofajlarda nitrik oksit (NO^{\cdot}) radikali oluşur. Nitrik oksit ve süperoksit radikalinin reaksiyonu sonucu oldukça güçlü olan peroksi nitrit ($ONOO^{\cdot}$) oluşabilir.⁹⁰ Serbest oksijen radikalleri hücrelerde bulunan lipid; DNA, protein ve karbohidrat metabolizmalarında oksidatif hasara sebep olurlar.^{89,91} Bu oksidatif hasarlarda hücrenin ölümüne neden olarak yaşlanma, diyabet, kanser gibi kronik hastalıkları başlatırlar.⁹²

2.10.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Süperoksit radikali hemen hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi ya da oksijene tek bir elektron transferi sonucu oluşur.^{93,94} Süperoksit radikali hem çevresel etmenler hem de organizmadaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikalidir.

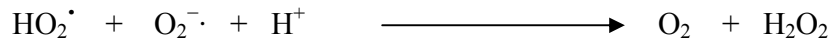


Süperoksitin *in vivo* oluşmasına yol açan mekanizmaların başında mitokondrinin iç membranında oksijenin suya redüksiyonunu sağlayan elektron–trasport zinciri gelir.⁹³ Başta çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında $O_2^{\cdot-}$ bir ürün olarak oluşabilir.⁸⁵ Hücre membranındaki siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimleri, lökosit mebranındaki NADH oksidaz enzimi, triptofan dehidrogenaz enzimleri ksantin oksidaz gibi oksidan enzimler $O_2^{\cdot-}$ üretimine neden olurlar. *İnvivo* iskemi ve hipoksi, ksantin oksidazı, dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüştürerek $O_2^{\cdot-}$ oluşumuna yol açar.⁹⁵ Aynı zamanda adrenalin, flavin nükleotidleri, tiyol bileşikleri ve glikoz gibi moleküller, oksijenli ortamda okside olarak süperoksit oluştururlar.⁹³ Ayrıca indirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu da $O_2^{\cdot-}$ meydana gelmektedir.



Markofajların fagositozu esnasında ve bazı hücrelerin üremesinde ve farklılaşmasının regüle edilmesi esnasında da O_2^- üretilir.⁹³ Aktive edilen fagositik lökositler bol miktarda O_2^- üreterek fagozom içine ve buldukları ortama verirler. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır.⁸⁵ Süperoksit radikalının kendisi direkt zarar vermez. Bu radikalın asıl önemi H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır.⁸² Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir. Oksidan perhidroksi radikalini oluşturmak üzere protonlanır.⁸⁴

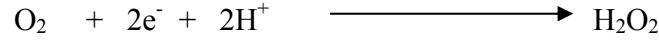
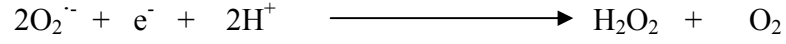
Asidik koşullarda O_2^- ile H^+ reaksiyonundan perhidroksil radikali oluşabilir. Daha sonra perhidroksil radikali hidrojen peroksit oluşturur.⁹⁶



Süperoksit radikali çeşitli çevresel etkilerle de oluşabilmektedir. Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar (alfa, beta, gamma) oksijenden O_2^- oluşumuna neden olurlar. Ayrıca organik moleküllerin bulunduğu ortamda O_2^- oluşumu iki kat artar. Katekolaminlerin, tiyollerin, ferrodoksinin ve hemoglobinin otooksidasyonu gibi enzimatik veya enzimatik olmayan reaksiyonlar ile de O_2^- meydana gelir.⁹⁷

2.10.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Süperoksit radikaline bir elektron eklenmesiyle ya da O_2 çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu güçlü bir oksidan olan H_2O_2 oluşur.⁹⁸



Hidrojen peroksitin asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur. Bu reaksiyon radikal olmayan ürünler meydana getirdiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalizlenir. Enzimatik dismutasyon nötr ve alkali pH'da daha belirgindir.⁹⁹

Hidrojen peroksit oldukça mobil olup membranları kolayca geçebilir. Çok güçlü bir sitotoksindir ve özellikle endotel hücrelerine hasar verir. Kendisi bir serbest radikal olmayıp OH oluşturarak toksisitesini gösterir. Hidrojen peroksit zayıf oksijen bağlarıyla gevşek olarak bağlanır ve kolayca koparak her biri, bir eşlenmemiş elektron içeren bir OH ve bir de hidroksil iyonu oluşturur.⁹⁰

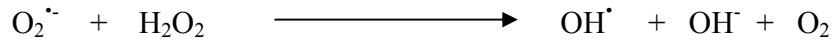
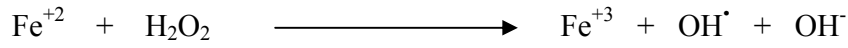
2.10.2.3. Hidroksil Radikali (OH \cdot)

Canlılarda üretilen OH \cdot başlıca iki mekanizma ile oluşabilir.

1) İyonlaştırıcı radyasyonun etkisi ile sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması gerçekleşir. Uyarılmış su molekülü (H₂O^{*}) homolitik yıkım ile; H₂O⁺ ise bir su molekülü ile tepkimeye girerek hidroksil radikali oluştururlar. Bu tepkimeler çok kısa sürede gerçekleşir ve üretilen OH \cdot , radyasyonun canlılardaki toksik etkisinden sorumlu başlıca kimyasal türdür.⁸³

2) Hidrojen peroksitin eksik indirgenmesi ile OH yapımı, vücutta bu radikalin en önemli kaynağıdır. Hidrojen peroksitin iki elektron ile indirgenmesi ile su oluşurken, tek elektron ile indirgenmesi OH[•] yapımına neden olur.⁸³

Hidroksil radikali, H₂O₂ geçiş metalleri özellikle Fe⁺³ varlığında indirgenmesi ile *Fenton Reaksiyonu* sonucunda ya da H₂O₂, O₂^{-•} varlığında *Haber-Weiss Reaksiyonu* sonucunda oluşur. Bu reaksiyon katalizörsüz oldukça yavaşken, Fe⁺³ katalizörlüğünde oldukça hızlı gerçekleşir.^{100,101}



Serbest radikaller içinde OH[•] biyokimyadaki en reaktif molekül olup yarı ömrü çok kısa olup diğer kimyasal türlerle sıklıkla reaksiyona girer ve yarı ömürleri daha uzun olan radikaller oluşturur.⁹⁰ Bir OH[•] yüzlerce yağ asidini ve yan zincirlerini lipid hidroperokside çevirebilir, bu oluşan hidroperoksitler birikerek membran bütünlüğünü bozar. Ayrıca, hücrenin karbohidrat, aminoasit, DNA vb. metabolizmasına da zarar verir.⁹⁸

Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan OH[•] su dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle difüzyon limiti hızı ile tepkimeye girer. Bu nedenle 10⁻⁹ saniyeden daha kısa bir ömre sahiptir. Hidroksil radikalının tepkimeleri başlıca; ⁸⁵

- a) Elektron transfer tepkimeleri,
- b) Hidrojen çıkarma tepkimeleri,
- c) Katılma tepkimeleridir.

Bütün bu tepkimeler, OH[•]'ın paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır. Katılma tepkimeleri, özellikle elektronca zengin moleküllerle (pürin ve primidin bazları, aromatik amino asitler gibi) gerçekleşir. Hidroksil radikalının organik moleküllerden hidrojen atomu alarak suya indirgendiği tepkime, hidrojen çıkarma tepkimesi olarak bilinir. Bir radikalın katılma tepkimesinde ise biyomolekül oksitlenir ve tepkimede sonlanır.⁸⁵

Her tür biyolojik molekül OH[•]'ın bir hedefi ise de özellikle elektronca zengin bileşikler tercihli hedeflerdir. Nükleik asitler, proteinler ve lipidlerde başlatılan radikalik tepkimelerde binlerce farklı ara ürünler oluşabilir.

2.10.2.4. Singlet Oksijen (¹O₂)

Singlet oksijen, oksijenin yüksek enerjili mutajenik bir formudur.¹⁰² Yapısında eşlenmemiş elektronu bulunmaması nedeniyle serbest radikal olmadığı halde serbest oksijen radikalleri arasında yer alması bu reaksiyonların başlamasına sebep olması açısından önemlidir.

Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunda spin kısıtlamasının kaldırılmış olması nedeniyle reaktivitesi çok yüksektir. Aldığı enerjisi çevreye dalga enerjisi şeklinde verip oksijene geri dönebildiğinden oluşumu kemilüminesans ölçümü ile izlenebilir.⁸⁵

Başlıca şu mekanizmalarla vücutta oluşabilir:

- a) Hidroperoksitlerin metallere varlığındaki yıkım tepkimelerinde,
- b) Kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında,

c) Pigmentlerin (örneğin flavin içeren nükleotidler, retinal, bilirubin) oksijenli ortamda ışığı absorblamasıyla,

d) Prostaglandin endoperoksit sentaz, sitokrom p450 tepkimeleri, myelo/kloro/laktoperoksidaz enzimlerinin etkileri sırasında.⁸⁵

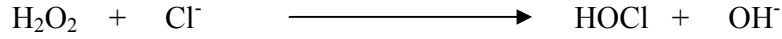
Oksijenin bu enerjetik reaksiyonu sonucunda iki tip $^1\text{O}_2$ üretilir. Bunlar, sigma singlet oksijen ve delta singlet oksijendir. Sigma singlet oksijenin enerjisi daha fazladır ve çok kısa ömürlüdür. Delta singlet oksijen ise daha uzun ömürlüdür ve gözlenen kimyasal reaksiyonlardan esas sorumlu form olduğu kabul edilmektedir.¹⁰³

Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan tepkimeye girerek peroksi radikalini oluşturur ve OH^\cdot kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir.⁸³

Bitkilerde de özellikle yapraklardaki klorofilin büyük bir kısmı tilakoid membranlarda en çok bulunan protein tutucu kompleks II'ye bağlanır ve bu nedenle stres koşulları altında bu klorofil-protein kompleksinde büyük miktarlarda $^1\text{O}_2$ üretilebileceği düşünülmüştür.¹⁰⁴

2.10.2.5. Hipokloröz Asit (HOCl)

Hipokloröz asit enzimatik olarak nötrofiller tarafından üreten güçlü bir oksidandır. Nötrofiller, makrofajlar ve eozinofiller $\text{O}_2^{\cdot-}$ üretirler. Özellikle nötrofiller içerdikleri myeloperoksidaz enzimi aracılığıyla üretilen süperoksitin dismutasyonu ile oluşan H_2O_2 klorür iyonu ile birleştirilerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'e dönüştürürler.¹⁰⁵



Nötrofiller aktive olduğunda oksijenin O_2^- dönüşümü 20 kat artar ki buda oksijenin tüketiminin artmasını ifade ettiği için solunum patlaması olarak adlandırılır. Artan metabolizma sonucu oluşan H_2O_2 yaklaşık % 40 kadarı HOCl geri kalanı ise OH^- dönüşür.⁹⁰ Fagositik hücrelerce bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynar. Son zamanlarda hücre lizislerine ve dolayısıyla ölüme yol açabilmektedir.¹⁰⁶ Ayrıca DNA'daki purin bazlarını da kolay bir şekilde klorlayarak hasara sebep olur.

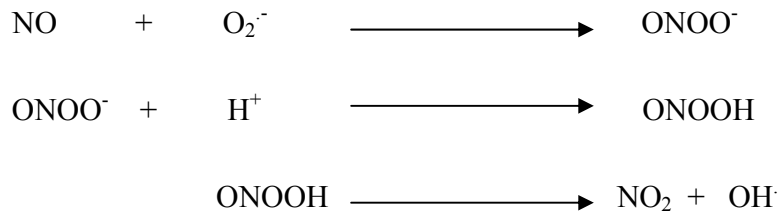
2.10.2.6. Nitrik Oksit Radikali (NO)

Nitrik oksit, fizyolojik süreçlerde önemli bir role sahip serbest radikaldir. Nitrik oksit vasküler endotelial hücrelerde oluşturulan önemli bir vazodilatördür. Nitrik oksit sentezinin insanda vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli rol oynadığı, böylece kan basıncı'nın kontrolünde önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir.¹⁰⁷ Vücudumuzda nitrik oksit sentezini sağlayan mekanizmalar son derece kısıtlıdır. Vücuda giren nitro bileşiklerinin metabolize edilmesi sırasında oluşan NO bir tarafa bırakılacak olursa, endojen NO oluşturan tek kaynak nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleridir.⁸⁵ Bu enzimler tarafından üretilen çok düşük derişimlerdeki NO sinir sistemi ve düz kaslarda hücre içi ve hücreler arası haberci molekül olarak kullanılır.⁸⁵

Aşırı NO üretiminin, kronik enflamasyon, kalp çarpıntısı ve septik şok, diyabet gibi durumlara sebep olduğu öne sürülmüştür. Biyolojik sistemlerde üretilen yüksek konsantrasyonlardaki NO'nun zararlı etkileri üç mekanizma ile gerçekleşir. Bunlardan ilki; NO'nun oksijene benzer şekilde hücre içine geçerek paylaşılmamış elektronu bulunan bir molekül olduğu için hücre içinde proteinlerin yapısında bulunan demir gibi geçiş

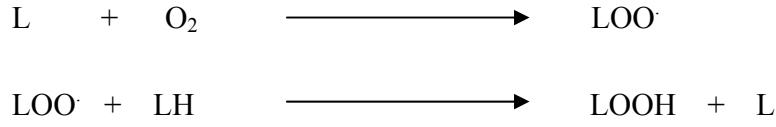
metallerine bağlanması ve ortama serbest demir salınımına neden olmasıdır. İkincisi; otooksidasyon ile N-nitroso bileşiklerini oluşturarak DNA'ya zarar veren azot üç oksit (N_2O_3) oluşturmasıdır. Son olarak da; nitrik oksit oksijen radikalleriyle reaksiyona girerek DNA, proteinler ve hücre membran lipidlerini okside eden peroksinitrit üretir.¹⁰⁸ Oluşan ONOO proteinlerin ve DNA'nın oksidatif hasarına sebep olmaktadır. Nitrik oksit hücre fonksiyonlarının regülasyonunda ve dokuların yaşam ile ilgili özelliklerinde etkili bir şekilde kullanılır.¹⁰⁹

Peroksinitritin, nitrik oksite bağlı bir toksisiteye de sahip olduğu tahmin edilmektedir. Nitrik oksit Fe-S proteinlerinden demiri çıkararak yerine kendisi bağlanır. Böylece fenton reaksiyonunu stimüle eder ve bu mekanizma ile karsinogeneziste rol oynar. Peroksinitrit, nitrik oksit toksisitesinin başlıca sorumlusudur. Peroksinitritin proteinlere doğrudan zararlı etkileri vardır ve azot dioksit (NO_2), OH, nitronyum iyonu gibi toksik ürünlere dönüşür.¹¹⁰ Peroksinitrit, nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) oluşturmak üzere metabolize edilir.



2.10.2.7. Lipid Peroksil Radikali (LOO^\cdot)

Oksijen radikalleri çoklu doymamış yağ asitlerine etkiyerek lipid peroksidasyonuna yol açar.¹¹¹ Reaktif serbest radikalleri ve metabolitler membrandan bir hidrojen uzaklaştırarak lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Oluşan lipid radikali oksijenle reaksiyona girerek LOO^\cdot oluşturur.



Lipid peroksil radikali başka bir lipidden hidrojen atomu uzaklaştırır ve lipid hidroperoksit ile başka bir lipid radikali oluşturur. Bu zincir reaksiyonunun NO'nun lipid peroksil radikali ile etkileşerek inhibe ettiği gösterilmiştir.⁹⁰



Bunların yanı sıra serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller (R·), alkoksil radikalleri (RO·), tiyol radikalleri (RS·) gibi önemli serbest radikallerde mevcuttur. Bunlardan özellikle poliansature yağ asitlerinden meydana gelen peroksil radikali yarı ömrü uzun olan bir radikaldir. Tiyol radikalleri ise oksijenle tekrar tepkimeye girip sülfenil (RSO·) veya Thiyl peroksil (RSO₂·) gibi radikalleri meydana getirirler.^{84, 112}

2.10.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları

Serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir.¹¹³ Serbest radikaller genel olarak; aktive olmuş fagositler, antineoplastik ajanlar, küçük moleküllerin otooksidasyonu, enzimler ve proteinler, mitokondrial elektron transport sistemleri, peroksizomlar, plazma membranı, endoplazmik retikulum ve nükleer membran transport sistemleri tarafından üretilirler.^{84,113} Hücrelerde normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin aktif yerinde ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluşabilir. Bazen bu serbest radikal ara ürünler enzimlerin aktif yerinden sızarlar, moleküler oksijenle etkileşirler ve sonuçta serbest radikaller oluşur.¹¹⁰

Hücrelerde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirinden sızıntıdır. İç mitokondrial membranda lokalize oksidatif fosforilasyon zinciri komponentleri büyük oranda indirgendiği zaman süperoksit radikalının açığa çıkışı artar. Bu durum mitokondrial radikal yapımını etkileyen endojen faktörlerin solunumu regüle eden maddeler olduğunu düşündürür. Solunumu regüle eden maddeler kullanıma hazır NAD'ye bağlı substratlar, süksinat, adenosin difosfat ve oksijendir. Eğer oksijen sitokrom oksidaz tarafından suya redüksiyonu sınırlı olacak miktarda bulunursa artan solunum zinciri redüksiyonu ve hücre içinde redükte kofaktörlerin birikimi radikal yapımını artırır.¹¹⁴

Birçok enzimin katalitik siklusları sırasında serbest radikaller ortaya çıkar. Sitokrom p450, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlarda serbest radikaller oluşur.¹¹¹ Bu enzimlerden en önemlisi ksantin oksidaz'dır. Ksantin oksidaz enzimi oksidoredüktazlar sınıfına giren ve molibden (Mo) içeren bir flavoproteindir.^{115,116} Ksantin oksidaz enzimi hipoksantinine ksantine, ksantinine ise ürik aside yükseltgenmesi reaksiyonunu katalizler.¹¹⁶ Ksantin oksidaz hasarlanmış dokularda bir dehidrojenaz olarak vardır. Pürinlerin yıkım yolunda hipoksantinden ksantin ve ksantinden ürik asit oluşum basamaklarında elektron alıcısı olarak moleküler oksijenden daha çok NAD⁺ kullanılır. Oksijensizliğe bağlı olarak ADP'nin ATP'ye fosforilasyonunun azaldığı durumlarda (iskemi gibi) ADP yıkılır ve pürin bazı, ksantin oksidazın bir oksidaz olarak etkili olmasıyla hipoksantine dönüştürülür. Ksantin oksidazın aktivite göstermesi durumunda hipoksantin ksantine ve ksantin ürik aside dönüşürken moleküler oksijen kullanılmakta, moleküler oksijen hidrojen perokside indirgenmektedir. İskemi durumlarında oksijen

seviyesi düşük olduğundan önemli hasar olmaz. Ancak oksijen seviyesi normale dönünce XO etkisiyle fazla miktarda H_2O_2 ve O_2^- oluşur.¹¹⁰

Peroksizomlarda hücre içi önemli bir radikal olan H_2O_2 kaynağıdır.¹¹⁷ Bu organeldeki D-aminoasit oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asidi açıl CoA oksidaz gibi oksidazlar süperoksit üretmeden bol miktarda H_2O_2 üretimine sebep olurlar.⁸⁴

Fagositik hücre membranının NADPH oksidaza bağlı serbest radikal üretimi serbest radikallerin önemli bir kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranında araşidonik asidin salınımına yol açar. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu da çeşitli serbest radikal ara ürünler meydana gelebilir. Mikrozomal ve plazma membranı tarafından radikal üretiminin önemli enzimleri olan lipoksijenaz ve siklooksijenaz aktivitesi, serbest radikaller için önemli bir kaynaktır.¹¹⁸

Bazı yabancı toksik maddeler hücrede serbest radikal üretimini arttırmaları. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler yada serbest radikallerin ortadan kaldırılmasını sağlayan antioksidan aktiviteyi düşürürler. Bu tip maddeler dört grupta toplanabilir.¹¹⁰

- 1) Toksinin kendisi bir serbest radikaldir. Örneğin; kirli havanın koyu rengini veren azot dioksit gazı böyle bir maddedir. Azot dioksit etkili bir lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır.
- 2) Toksin bir serbest radikale metabolize olur. Örneğin kuru temizlemelerde kullanılan toksik bir madde olan karbon tetra klorür (CCl_4), karaciğerde sitokrom p450 tarafından triklorometil serbest radikale (CCl_3) dönüştürülür. Triklorometil serbest radikale moleküler oksijenle etkileşerek peroksil serbest radikali oluşturur.

3) Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir. Karaciğerde biriken paraquat bir serbest radikale indirgendikten sonra tekrar yükseltgenerek rejenere edilirken oksijen indirgenir ve böylece bol miktarda süperoksit radikali üretilmiş olur.

4) Toksin antioksidan aktiviteyi düşür. Örneğin; parasetamol karaciğerde sitokrom p450 tarafından, glutatyonla reaksiyona giren bir ürün oluşturarak sonuçta glutatyonun miktarını azaltır.

Organizmanın doğasından kaynaklanmayan sadece dış etkenlerin varlığında oluşan reaksiyonlar sonucunda da serbest radikaller açığa çıkabilir. Bunlar serbest radikallerin eksojen kaynakları olarakta bilinir.⁸⁸

- İlaçlar; Aminotriazol, asetaminofen, hiperbarik oksijen, klonazin, 3,4-metilendioksimetafetamin, nitrofurantion, siklosporin, trisiklik antidepresanlar, troglitazon.
- Radyasyon; Ultraviyole ışık, x-ray, gama ışınları
- Alışkanlık yapan maddeler; Alkol ve uyuşturucular
- Çevresel ajanlar; hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler; mineral tozlar, ozon, toksinler, solventler, yangın, kükürt dioksit, asbest lifleri karbon monoksit.
- Metal iyonları; Demir, bakır, kadmiyum, nikel, krom, civa
- Stres; Streste katekolamin düzeyi artar ve oksidasyon ile serbest radikaller miktarı artar.^{83,88, 119}

2.10.4. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikallerin biyolojik sistemlerdeki zararlı etkileri çeşitlidir. Oksidatif atağa meyilli olan nükleik asitler, proteinler, karbonhidratlar ve lipidler gibi bütün hücre elemanlarında hasara yol açarlar.¹¹¹ Serbest radikaller hücrelerin öncelikle; DNA, protein, karbohidrat, enzimler ve hücre fosfolipidlerinin çoklu doymamış yağ asitleri olmak üzere organik ve inorganik bileşiklerle reaksiyona girerler. Özellikle DNA'ya saldıran serbest radikaller önemli zararlara neden olurlar.^{120, 121}

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar. Süperoksit radikali ve OH⁻ stoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Membranlarda lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran permeabilitesi artar. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein, sülfhidril grupları ve diğer aminoasit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur.¹¹⁰

Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı oluşur.¹¹⁹ Hücrede reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir. Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarının birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Diabet mellitus, kanser, yaşlanma, sigara içimi ile ilgili kronik hastalıklarda rol oynadıkları, yara iyileşmesi, granülasyon dokusu, kollajen ve kıkırdak doku üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir.¹²²

2.10.4.1. Proteinlere Etkileri

Serbest radikallerin atağı sonucu proteinlerde oluşan yapısal değişiklikler üçe ayrılabilir.¹¹¹

1. Aminoasitlerin modifikasyonu,
2. Proteinlerin fragmantasyonu,
3. Proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmalarıdır.

Proteinlerin, reaktif oksijen türevleri ile kovalent modifikasyonu sonucu protein oksidasyonu meydana gelir. Araştırmacılar protein oksidasyonuna yol açan ana mekanizmaların polipeptit omurgasındaki çeşitli aminoasitlerin α -karbon atomlarından hidroksil radikalinin etkisiyle hidrojen atomunun çıkarılması sonucunda başladığını saptamışlardır. Protein oksidasyonu esas olarak hidroksil radikali ile başlar. Diğer taraftan oksidasyon süresince O_2 ile birlikte $O_2^{\cdot-}$ ve onun protonlanmış formu olan HO_2^{\cdot} 'nin varlığı da gereklidir. Adı geçen bu reaktif oksijen bileşikleri aminoasitlerin yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna ve protein omurgasının oksidasyonu yolu ile proteinin parçalanmasına neden olur.^{123,124} Özellikle kükürt içeren aminoasitler ve doymamış aminoasitlerin (triptofan, tyrozin, fenilalanin, metiyonin, sistein, histidin) serbest radikallerle reaksiyonları sonucu kimyasal değişiklikler ortaya çıkar.¹²⁵

X ve gama ışınlarıyla suyun radyolizinden veya hidrojen peroksidin metal katalizli yıkımından açığa çıkan hidroksil radikali polipeptit omurgasındaki α -karbon atomundan hidrojen atomunun çıkarılmasına neden olur. Peptid zincirindeki α -hidrojen atomunu kaybetmiş olan aminoasit kalıntısı karbon merkezli radikal haline dönüşür. Oluşan karbon

merkezli radikal moleküller, oksijen ile hızlı bir şekilde reaksiyona girer ve daha sonra alkilperoksidi verecek olan alkilperoksil radikal ara ürününü oluştururlar. Alkilperoksit, alkoksil radikali üzerinden hidroksi protein türevini verir. Reaksiyon basamaklarının pek çoğunda Fe^{+2} ve Cu^{+} varlığında hidrojen peroksit ile etkileşim önem taşır. Bu metabolik yolda oluşan alkil, alkilperoksil ve alkoksil radikal ara ürünleri aynı veya farklı protein molekülündeki aminoasitlerin R yan zincirleri ile etkileşerek yeni karbon merkezli radikallerin oluşumuna yol açar.^{124,126} Oluşan karbon merkezli radikaller diğer bir karbon merkezli radikal ile etkileşerek protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna yol açar.

2.10.4.2. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

Her türlü radyasyon (UV, görünür ışık, ısı, X ışınları vb.) hücrelerde iyonların, serbest radikallerin ve enerji kazanmış moleküllerin oluşumuna neden olur. Hidroksil radikalleri; DNA'daki heterosiklik bazlarla ve deoksiriboz-fosfatlarla reaksiyon verirler. Reaksiyon sonucu, DNA bazlarını modifiye eder ve riboz- fosfat zincirinin kırılmasına yol açar. *In vitro* olarak sulu çözeltilerle yapılan çalışmalarda OH^{\cdot} radikalinin deoksiriboz ve tetrasiklik bazlarla kolaylıkla reaksiyon verdiği gözlenmiştir. Fakat çift zincirli DNA molekülünde heterosiklik bazlar OH^{\cdot} radikallerine karşı sterik olarak çok iyi korunmuşlardır. Ayrıca enzimatik radikal yakalayıcılar öncü hidroksil radikallerinin konsantrasyonunu düşürerek DNA'yı korurlar.¹²⁵

Ayrıca aktive olmuş nütrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit, membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir.

2.10.4.3. Karbonhidratlara Etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar.¹¹⁰ Glikoz, mannoz ve deoksi şekerler fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğrayarak süperoksit ve hidrojen peroksiti meydana getirirler. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu; hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehyitler meydana gelir. Bağ dokunun önemli bir mukopolisakkariti olan hiyaluronik asidin inflamatuvar eklem hastalıklarında sinovial sıvıda artmış olan H₂O₂ ve O₂⁻ ile parçalanabildiği gösterilmiştir.¹²⁷

Okzoaldehyitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı çeşitli hastalıkların patolojisinde önemli rol oynarlar.¹²⁸

Glikozaminoglikan olan ve sinovyal sıvının viskozitesinde önemli rol oynayan hiyalüronik asidin reaktif oksijen türleri ile etkilenmesi ile bağ dokusu stabilitesi bozulur. Bağ dokusunun dayanıklılığının sağlanmasında etkin rol oynayan hiyalüronik asit özellikle süperoksit grubundan etkilenerek bağ dokuda bozulmalara ve bağ doku sıvısının akışkanlığının kaybolmasına neden olur.¹²⁹

Bu etkilerinden dolayı serbest radikaller çeşitli hastalıkların oluşumunda önemli rol oynarlar. Diabet ve diabet komplikasyonlarının gelişimi, Behçet hastalığı, kroner kalp hastalığı, romatoid artrit, hipertansiyon, çeşitli kas ve göz hastalıkları, kanser ve yaşlılık gibi birçok hastalıkta serbest radikal üretiminin arttığı belirlenmiştir.¹¹⁰

2.10.4.4. Membran Lipidlerine Etkileri (Lipid Peroksidasyon)

Serbest radikaller savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştukları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenirler fakat lipidler en hassas olanlarıdır.⁸⁴

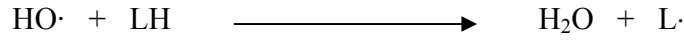
Lipid peroksidasyonu membranlarda bulunan (fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısında yer alan) çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehitler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler, veya başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar.¹³⁰ Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerlediği için oldukça zararlıdır.

Lipid peroksidasyonu organizmada oluşan kuvvetli bir radikal etkisi ile membran yapısında bulunan konjuge olmayan çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki metilen gruplarından, bir hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlamaktadır. Bu olay yağ asidi zincirinin radikalleşmesine neden olur. Yani yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır.⁸⁴ Oluşan lipid radikali (L') dayanıksızdır ve bir dizi spontan değişikliğe uğrar. Lipid radikalinin moleküler oksijenle tepkimeye girmesi sonucu lipid peroksit radikali meydana gelmektedir. Lipid peroksil radikalleri zincir reaksiyonlarının başlatıcısıdır. Bu radikallerde membran yapısındaki diğer çok doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni L' oluşumunu sağlamakta kendileri ise açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid

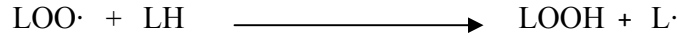
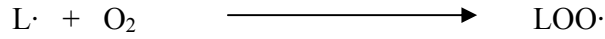
hidroperoksitlere (LOOH) dönüşmektedirler.¹¹⁷ Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder.¹¹⁰

Lipid peroksidasyonu meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Genellikle membrana yakın bölgelerde ortaya çıkan OH⁻ membran fosfolipidlerinin yağ asidi yan zicirlerine saldırmasıyla oluşur.⁸⁴

Tepkimenin ilk basamağı temel olayların meydana geldiği başlangıç aşamasıdır. Bu basamakta çok zincirli doymamış yağ asitlerine RH yada oksijen köklerinin girmesiyle yada molekülden çıkmasıyla L[•] meydana gelir.¹²⁹



Gelişme aşaması olarak isimlendirilen ikinci basamakta ise meydana gelen lipid grubu moleküler oksijen ile birleşerek hızla LOO[•] grubuna dönüşür.¹²⁹



Üçüncü aşama yıkım aşamasıdır.¹²⁹ Bu safha tek elektron üzerinden yeniden yapılanma lipidin parçalanması ile sonuçlanır. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan LOOH yıkımı geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Plazma membranı ve subsellüler organel lipid peroksidasyonu, serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallerinin varlığıyla artar. Lokal olarak hidrojen peroksitten fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir.¹¹⁰

Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda

tiobarbütirik asitle ölçülebilen malondialdehit meydana gelir. Bu metod LOO[•] seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır.^{84,131} Küçük bir molekül olan malondialdehit kolay difüzlendiği için DNA bazları ile rahatlıkla reaksiyona girer. Bütün bu olumsuz etkiler, malondialdehite mutajenik genotoksik ve kanserojenik bir özellik verir.¹²⁵

Lipid peroksidasyon genel olarak iki tiptir:¹¹⁷

1. Non-enzimatik lipid peroksidasyon: herhangi bir radikalın çoklu doymamış yağ asidindeki metilen karbonundan hidrojen atomunun uzaklaştırılması reaksiyonlarını kapsar.

2. Enzimatik lipid peroksidasyon: Siklooksijenaz ve lipooksijenaz reaksiyonları sonucunda oluşan hidroperoksid ve endoperoksidler enzimatik reaksiyon ürünleridir.

Oluşan LOOH membranlarda birikimi sonucu membran fonksiyonları bozulur ve hücre kollabe olur. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması nedeniyle reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Peroksil radikalleri ve aldehytler membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur.⁸⁴ Lipid peroksidasyon ürünleri DNA hasarına ve Na/K ATPaz ve glutamat taşıyıcıları gibi proteinlerin inhibisyonuna neden olur. Artan lipid peroksidasyonu ve azalan antioksidan korumalar sonucu epoksitler oluşur. Bunlar hücre içinde nükleofilik merkez ile spontan olarak reaksiyona girip DNA, RNA ve proteinlere kovalent olarak bağlanır. Böyle bir reaksiyon sitotoksositeye, alerjiye, mutajeniteye ve kansinojenezise neden olabilir.¹³²

2.11. Serbest Radikallere Karşı Antioksidan Savunma

Organizmada serbest oksijen radikallerinin hasar oluşturucu etkilerine karşı koruyucu antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Bu sistemlerin bir kısmı radikal

oluşumunu, bir kısımda radikallerin zararlı etkilerini önlerler.⁸³ Organizmanın pro-oksidan/antioksidan dengesi sağlıklı bir yaşam sürdürebilmek için çok önemlidir.¹³³ Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir.¹³⁴

Etkilerini; lokal oksijen konsantrasyonunu azaltarak, hidroksil radikallerini temizleyip lipid peroksidasyonun başlamasını önleyerek, geçiş metal iyonlarını bağlayıp etkisizleştirerek, peroksitlerin alkol gibi nonradikal ürünlere dönüşmesinde etkin rol oynayarak ve zincir reaksiyonlarına neden olan tüm radikallerle reaksiyona girip zinciri kırarak gösteren antioksidanlar; intrasellüler ve ekstrasellüler ya da endojen ve eksojen antioksidanlar olmak üzere iki grupta incelenirler. En belirgin özellikleri okside olan substratlara oranla çok daha az konsantrasyonlarda bile substratın oksidasyonunu geçiktirmeleri ve inhibe etmeleridir.^{83, 135}

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve meydana getirdikleri hasarı önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere organizmayı koruyan antioksidan savunma sistemi dört yolla etki göstermektedir.¹³³

1. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine toparlayıcı etki denir. Antioksidan enzimler, trakeobronşial mukus ve küçük moleküller bu tip bir etki gösterirler.⁸³

2. Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.¹³³

3. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif hale dönüştüren olaya bastırıcı etki adı verilir. Vitaminler, flavanoidler, trimetazidin ve antosiyanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.⁸³

4. Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklinde onarıcı etki gösterirler.¹³³

Hücrelerin sağlıklı bir şekilde fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri oksidan ve antioksidan maddeler arasındaki dengeye bağlıdır. Antioksidanlar, gerek hücresel komponentler veya plazma bileşenleri olarak, gerekse yiyecek katkısı olarak çok önemli rol oynamaktadırlar. Antioksidanların oksidatif hasara karşı dokuları veya hücreleri koruyucu özellikleri göz önüne alındığında yaşlanmaya, doku hasarına ve toksik ajanlar ile zehirlenmeye karşı koruyucu ajanlar olarak gösterilmektedir.¹³⁶

2.12. Endojen Antioksidanlar

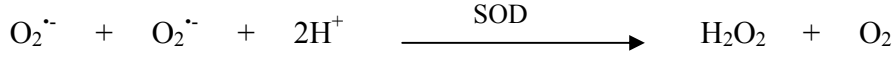
Doğal (endojen) antioksidanlar enzim ve enzim olmayan antioksidanlar olarak iki şekilde incelenirler.¹³³

2.12.1. Enzimatik Antioksidanlar

Bilinen en önemli enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon S-transferaz ve mitokondriyal sitokrom oksidazdır. Enzimatik antioksidanlar serbest radikallerin ortadan kaldırılması ve baskılanmasında önemli bir role sahiptir.¹³⁷

2.12.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz süperoksit radikalinin dismutasyonunu sağlayan, yani $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan bir enzimdir.^{138, 139}

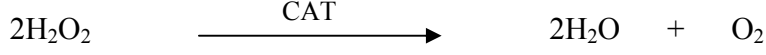


İnsanda süperoksit dismutazın üç formu bulunmaktadır. Bunlar sitosolik Cu/Zn SOD, mitokondriyal Mn SOD ve extrasellüler SOD'dir.¹³⁸ Yine çeşitli hayvan türlerinde üç formuna (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD ve Fe-SOD) rastlanmıştır. Cu/Zn SOD hayvansal hücrelerin sitosolünde yer alan enzimin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 32 kDa'dur. Birbirinin aynı olan iki alt üniteden meydana gelir. Her altünite'de bir Cu atomu, bir Zn atomu, bir zincir içi disülfid köprüsü, bir sülfhidril grubu ve asetillenmiş bir terminal amino grubu bulunduğu tesbit edilmiştir. Mn-SOD prokaryotik hücrelerde molekül ağırlığı 40 kD olan iki alt birimden oluşan ve enzimin alt birimi başına birer atom Mn bağlı olan bir dismutaz içerirler. Hücrel Mn-SOD içeriği kalp, beyin, karaciğer, böbrek gibi yüksek metabolik aktivitesi olan dokularda daha fazladır.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Bazı bakterilerde ve hayvan türlerinde bulunan demir içeren Fe-SOD'nin çevreden gelen radikallere karşı koruyucu fonksiyon gördüğü kabul edilmektedir.¹⁴¹

Süperoksit dismutazın fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. Süperoksit dismutaz fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde rol oynar.

2.12.1.2. Katalaz (CAT)

Katalaz bitkilerde en önemli H₂O₂ gidericisi ve peroksizomların ise yapı bileşenidir, hidrojen peroksitin suya dönüşümünü enzimatik olarak katalizler.^{142, 143}



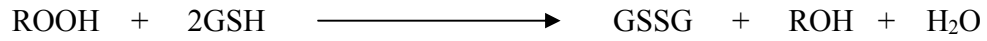
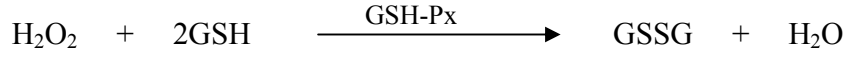
Yapısında Fe⁺³ bulunduran dört hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir. Peroksizomlarda lokalize olur.^{144,145} Aerobik mikroorganizmaların tümünde, omurgalı ve omurgasız hayvanlarda bitkilerde ve mantarlarda mevcut olan bu enzim, yüksek bir turnover sayısına sahiptir. Bitkisel kaynaklardan elde edilen katalazlar hem grubu içeren ve alt ünite başına 54-59 kDa molekül ağırlığına sahip dört alt ünitelerden oluşur.¹⁴³ Örneğin; kabakta 55 kDa, mercimekte 54 kDa, salatalıkta 54.5 kDa, pamukta ise 55 kDa'dır.¹⁴² Bu enzim yalnızca hidrojen peroksit, metil yada etil hidroperoksitler gibi küçük molekülleri azaltmayı içerir, büyük moleküler peroksidazları metabolize edemez, örneğin, lipit hidroperoksidaz.¹⁴⁶

Katalaz, normal fotosentetik gelişmede de önemli bir role sahiptir. Yapılan birçok çalışma dış etkilerden dolayı meydana gelen strese karşı, katalazın savunma mekanizması için çok önemli bir komponent olduğunu ortaya koymuştur. Bununla beraber katalazın bitkilerdeki biyogenesi hala tamamen anlaşılmış değildir.¹⁴⁷

2.12.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumlu sitosolik bir enzimdir.^{138,148} Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 80 kDa'dur. Birbirinin aynı dört subüniteden oluşan tetramerik bir enzimdir. Her subünite bir selenyum

atomu içerir. Bu nedenle hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan, savunma sistemi için gerekli bir enzimdir.¹⁴⁹ Glutasyon peroksidaz aşağıdaki reaksiyonları katalizler.



Enzim aktivitesinin % 60-75'i ökaryot hücrelerin stoplazmasında, % 25-40'ı ise mitokondride bulunur. Enzim aktivitesinin en fazla olduğu dokular ise eritrositler ve karaciğerdir. Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGSH-Px) adı verilen bir enzim monomerik yapıdadır ve esas olarak membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirir. Bu enzim'de selenyum atomu içeren sitosolik bir enzimdir. Membrana bağlı vitamin E'nin yetersiz olduğu durumlarda PLGSH-Px membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlar.¹³⁸

Glutasyon peroksidazın fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte glutasyon peroksidaz solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önler. Glutasyon peroksidaz eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır.¹¹⁰

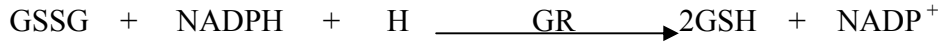
2.12.1.4. Glutasyon S-Transferaz (GST)

Glutasyon S-Transferazlar her biri iki alt birimden oluşmuş kompleks bir enzim ailesidir.¹⁵⁰ Toksik metabolitlerle GSH'nin konjugasyonunu katalizleyen GST enzimi toksik metabolitlerin detoksifikasyonuna yol açan bir enzimdir.⁸² Öncelikle araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı selenyum (Se) bağımsız GSH peroksidaz gibi aktivite göstererek antioksidan etki gösterir.⁸³

Glutasyon S-Transferaz dimerik yapıda olup sitosolde bulunmaktadır. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda rolleri olan GST çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin glutasyon ile konjugasyonunu katalize eder.¹³³ Glutasyon S- Transferazlar katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Bunlar hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Glutasyon S-Transferazlar karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin daha az reaktif konjugatlara dönüşümünü katalize eder.¹¹⁰

2.12.1.5. Glutasyon Redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz bir pridin nükleotid içeren flavo enzimdir.¹⁵¹ Okside glutasyon (GSSG) NADPH bağlı GR tarafından redükte formuna indirgenir.¹⁵²



Glutasyon redüktaz hücrelerde indirgenmiş glutasyonun yüksek seviyelerde tutulması için önemlidir.¹⁵³ NADPH'tan bir elektronun okside glutasyonun disülfid bağlarına aktarılmasını katalizler. Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarına karşı gereklidir ve major kaynağı pentoz fosfat yoludur.

2.12.1.6. Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, O_2^- detoksifiye eder. Bu reaksiyon fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden bir reaksiyon olup bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır.⁸⁴

2.12.2. Enzim Olmayan Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar içerisinde yer alan enzim olmayan antioksidanların en bilinenleri olarakta; glutatyon, ürat, melatonin, sistein, seruloplazmin, hemoglobin vs. sayılabilir.¹³³

2.12.2.1. Glutatyon (GSH)

Vücutta enzimatik olmayan önemli bir antioksidan olan redükte glutatyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Redükte glutatyon; glutamik asit, sistein ve glisin içeren bir tripeptit olup, aktif sülfidril (-SH) grubuna sahiptir. En önemli görevi enzim ve proteinlerin -SH gruplarının indirgenmesi ile redükte formlarının yeterli düzeylerde kontrolünü sağlamaktır. Böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller.^{83,84}

Ayrıca glutatyon, yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunu ve aminoasitlerin membranlardan transportunu sağlar.¹¹⁰

2.12.2.2. Ürat

Pürin metabolizmasında son ürün olarak oluşan ürik asit, insan dokularında ürat oksidaz bulunmadığı için birikir. Ürik asit 1O_2 , $ROO\cdot$, ozon ve HOCl için güçlü bir temizleyicidir ve endojen bir antioksidan olarak kabul edilir.¹³³

2.12.2.3. Seruloplazmin

Bakır iyonlarını bağlamak sureti ile metal katalizli reaksiyonları sınırlar.¹¹⁷ Seruloplazmin olasılıkla SOD benzer bir mekanizmayla etki gösterir. Ferro demiri, ferri demire yükseltgeyerek fenton reaksiyonunu ve böylece OH oluşumunu inhibe eder.¹¹⁰

2.12.2.4. Bilirubin

Bilirubinün büyük bir kısmı ömrünü dolduran eritrositlerin parçalanmasından kaynaklanır ve dolaşımdan karaciğer tarafından alınır ve biyotransformasyona uğrar. Safra ve idrarla atılır. Bilirubin peroksi radikalini süpürmede alfa-tokoferol kadar etkilidir. Lipit peroksidasyonu ile ilgili en iyi antioksidandır. Serbest bilirubin olmasına rağmen plazma membranlarında ve mikrozomlarda etkilerini gösterir. Muhtemelen bilirubinün fizyolojik fonksiyonlarından biri'de membranlarda zincir kırıcı antioksidan olmasıdır.¹⁵⁴ Süperoksit, hidroksil ve çoğunlukla mikromolar konsantrasyonlarda hücre dışı peroksil radikalleri toplayıcısıdır.

2.12.2.5. Melatonin

Melatonin yaşlanma karşıtı, kimyasal karsinogenlere karşı DNA'yı koruyucu etkisi olan ve pineal bezden salgılanan bir hormondur. Antioksidan aktivitesi reaktif serbest radikallere karşı direkt kovucu etkisinden daha çok antioksidatif enzimleri stimüle etme yeteneği ile ortaya çıkmaktadır.¹⁵⁵

Melatonin güçlü bir radikal süpürücüsü olduğu gibi radikaller üzerine dolaylı etkilere'de sahiptir. Melatonin hidroperoksitleri metabolize eden GSH-Px enzimini aktive ederek, O_2^- , H_2O_2 katalizleyen SOD aktivitesini artırarak, oksidatif stres sırasında katalaz aktivitesindeki azalmayı önleyerek antioksidan etki göstermektedir.¹³³

2.12.2.6. Sistein

Sistein, serbest radikal ve hipoklorit toparlayıcısıdır.¹⁵⁶

2.12.2.7. Transferrin

Transferrin metal katalizli lipid peroksidasyonuna yol açan demir iyonlarını bağlayarak serbest demir oluşumunu önler.¹¹⁷

2.12.2.8. Elbesen

Selenyumlu bir bileşik olup iyi bir antioksidandır. Glutasyon peroksidaz aktivitesini güçlendirir. Ayrıca lipoksijenaz yolunu inhibe eder.⁸⁴

2.12.2.9. Demir Şelatörleri

Demir şelatörleri hücre içine girerek serbest demiri bağlamak suretiyle onu etkisizleştirirler, böylece Fenton reaksiyonunu ve sonuçta OH[·] oluşumunu inhibe ederler. Bu özelliklerinden dolayı reperfüzyonda kullanılmalarının faydalı olduğu kaydedilmiştir.¹³³

2.12.2.10. Albumin

Son çalışmalar albuminin antioksidan özellikleri olduğunu ortaya koymuşlardır.¹⁵⁷ Plazmanın zincir kırıcı antioksidan aktivitesine yol açan plazma sülfhidril gruplarının major komponentidir. Geçiş metallerini bağlar, HOCl ve LOOH toparlayıcısıdır.¹⁵⁶

2.12.2.11. Sitokinler

Sitokinler hücrel düzenleyici proteinlerdir. Çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanır ve hedeflenen hücrelerin davranışlarını etkilerler. Belli bir sitokin çeşitli hücreler tarafından farklı dokularda salgılanır fakat aynı biyolojik etkiyi gösterir. Sitokinlerin etkileri sistematik veya lokalizedir. Vücudun farklı dokularında çeşitli hücreler tarafından belli uyarıcılara karşı salgılanıp pek çok farklı biyolojik fonksiyonları kontrol eden sitokinlerin hücre bölünmesi üzerine de etkileri vardır.¹⁵⁸ Başta katalaz olmak üzere antioksidan enzimleri aktive eder. Ancak bu faydalı etkileri yanında proteolitik enzimleri aktive ettiklerinden dolayı zararlı da olabilirler.⁸⁴

2.12.2.12. Mannitol

Serbest radikalleri temizler. İskemi sırasında nötrofillerin kapiller damarlarda oluşturdukları tıkaçları çözer ve kan akımını düzenler. Hidroksil radikali toparlayıcı etki gösterir.^{84, 159}

2.12.2.13. Deferoksamin

Ortamda Fe^{+2} ve Fe^{+3} gibi metal iyonlarının bulunması ile iskemi-reperfüzyon hasarında sitotoksik etkisi olan hidroksil radikallerinin oluşması hızlanır. Deferoksamin Fe bağlayıcı bir şelatördür.¹⁶⁰

2.12.2.14. Allopurinol

Allopurinol ve oksipurinol gibi ajanlar iskemi- reperfüzyon hasarında üretilen serbest radikallerin üretiminde katalizör rolü oynayan ksantin oksidazın aktivitesini inhibe eder. Allopurinol iskemi-refüzyon hasarında artan vasküler permeabilityi düzenleyici etki göstererek ve nötrofillerin ortama gelmesini sağlayan maddeleri uzaklaştırarak hasarı önler.¹⁶⁰

2.13. Eksojen Antioksidanlar

Bu grupta; vitamin olan antioksidanlar, ilaç ve sentetik antioksidanlar yer alır.

2.13.1. Vitamin Olan Antioksidanlar

2.13.1.1. β -Karoten

Karotenoidler bitkilerde ve hayvansal dokularda bulunan kırmızı-sarı pigmentlerdir. Gıdalarda bulunan karotenoidler sekiz tane beş karbonlu izoprenoid biriminin bir araya gelmesiyle oluşan 40 karbonlu polienlerdir. Doğada 670'den fazla karotenoid bulunmakta ve bunların çoğu antioksidan aktivite göstermektedir. Bunlardan en önemli karotenoid β -karotendir.¹⁶¹

β -karoten yağda çözünen güçlü bir antioksidandır. Metabolizmada zamanla bağırsak mukozasında ve karaciğerde enzimatik reaksiyonlarla A vitaminine dönüştürülür. β -karotenden iki molekül retinal oluşur. Daha sonra retinal redüktaz enzimi vasıtasıyla retinole (Vitamin A) çevrilir. A vitamini yapısındaki çift bağlar nedeniyle çok kolay oksitlenebilir. Atmosferik oksijen ve UV ışık, molekülü oksitleyerek inaktive eder.¹⁶² Vitamin A, epitel dokunun olgunlaşması ve farklılaşması için gereklidir. Yapısındaki β -karotenden dolayı görme olayında da rol oynar. β -karotenin kanser ve kalp hastalıklarında olumlu etkisinin olduğu ayrıca bağışıklık sistemini’de güçlendirdiği saptanmıştır.¹⁶³ Vitamin A’nın ön maddesi olan β -karotenin singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksit radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev yaptığı saptanmıştır.¹¹⁰ Yiyeceklerde yaygın olarak bulunan sarı sebzeler, domates, kayısı, portakal, yumurta sarısı, piliç, tereyağı, alabalık, sarı mısır temel karotenoid kaynaklarıdır.¹⁶⁴

2.13.1.2. Askorbik Asit (Vitamin C)

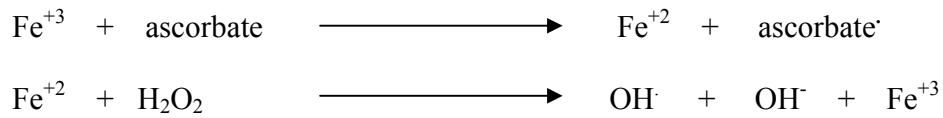
Askorbik asit bir ketolaktondur. İndirgeyici ekivalantların vericisi olarak davrandığında dehidroaskorbik asite oksitlenir ve buda bir vitaminin bir kaynağı olarak davranabilir. Askorbik asit moleküler oksijen, nitrat ve sitokrom a ve c gibi bileşiklerin indirgenmesine olanak sağlayan + 0.08 V’luk bir hidrojen potansiyeline sahip indirgeyici ajan olup, bu indirgeyici aktivitesinden dolayı da güçlü bir antioksidandır.¹⁶⁵ Organizmada birçok hidrosilasyon reaksiyonunda indirgeyici ajan olarak görev yapar.

Limon suyundan 1932 yılında kristalize olarak izole edilen askorbik asit altı karbonlu basit bir yapıya sahiptir. Bir enodiol lakton halkası içerir. Asit özelliği üçüncü karbonundaki enolik hidrojenin kolaylıkla verilmesinden ileri gelir. Askorbik asit insanlar

ve diğer primatlar, kobaylar, balıklar, kuşlar vs. için diyetle alınması gereken bir vitamindir.¹⁶² Askorbik asitin fizyolojik rolünün tersinir olarak indirgenip yükseltgenmesi ile ilgili olduğu bilinmektedir. En iyi bilinen fonksiyonları prolinden hidroksi prolin ve lizinden hidroksil lizin sentezindeki görevidir.^{162, 165}

Tirozinden epinefrin sentezinin dopamin β -hidroksilaz basamağında görev alır. Tirozin yıkımında p-hidroksi fenil pirüvatın oksidasyonunda rol alır. Safra asitlerinin sentezinde başlangıç basamağında rol alır.¹¹⁰ Askorbik asit demir ve oksijenle beraber kollajen dokunun sentezi sırasında lizin ve prolinin hidrolizasyonu için gereklidir. Askorbik asit eksikliğinde kollajen demetler anstabil ve kolay degrave olduklarından derinin gerginliği ve kapiler frajilite azalır.¹⁶⁶

Askorbik asit diğer bir özelliği antioksidan etkisi yanında oksidan etki'de göstermesidir. Çünkü askorbik asit, Fe^{+3} 'ü, Fe^{+2} indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek selüler ajandır. Bu yolla askorbat proteine bağlı Fe^{+2} uzaklaştırarak ya da doğrudan Fe^{+3} indirgeyerek fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye uygun olan Fe^{+2} dönüştürür. Bu özelliğinden dolayı askorbik asit serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir pro-oksidan olarak değerlendirilir.⁸³



Askorbik asit membran içindeki ve ekstrasellüler sıvılardaki lipid peroksidasyonunu önler, geniş dozaj limiti içerisinde toksik etkiye sahip değildir.¹⁶⁷ Askorbik asit güçlü antioksidan özelliğinden dolayı $OH\cdot$, O_2^- , nitrojen dioksit gibi serbest radikaller ile ozon, 1O_2 , ONOO gibi nonradikal ürünleri yakalayarak, proteinler, lipid ve DNA gibi biyolojik

olarak önemli makromolekülleri oksidatif hasardan korur. Yine LOO başlatıcı radikalleri temizleyerek membran lipidlerini oksidan hasara karşı korur.^{168,169}

2.13.1.3. α -Tokoferol (Vitamin E)

En iyi bilinen ve en geniş kapsamlı kullanılan antioksidanlardır.¹⁶¹ α - tokoferol hidrolitik kesilmeyle hidrokinonlara dönüşebilen ve reverzibl olarak kinonlara oksitlenebilen yapılardır. Bu durum onların antioksidan özelliklerini ve doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu engelleme etkisini açıklar. Yapıları birbirine benzeyen çok sayıda tokoferol bileşiği bulunmaktadır.¹⁷⁰ Bu bileşikler molekülün kromonal halkasındaki metil gruplarının sayısı ve pozisyonuna göre α , β , γ ve δ tokoferoller olarak adlandırılır. Bunlar içerisinde α -tokoferol en geniş doğal dağılıma ve en yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir.¹⁷¹ Yapısında bulunan fenolik hidroksil grubuna ait aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır.

α -Tokoferol dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. α - tokoferol emilimi canlının emilim düzeyi ile doğrudan ilgilidir. α - tokoferol, besinlerden lipidlerle birlikte ince bağırsaklardan safra asitlerinin yardımıyla emilir. Daha sonra lipoprotein ve şilomikronlarla bağlanarak lenf sıvısıyla plazmaya taşınır. Böylece tüm organizmaya taşınır.¹⁷² En yüksek α - tokoferol konsantrasyonları mitokondri ve mikrozoamlar gibi membrandan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur. α - tokoferol, O_2^- ve OH serbest radikallerini, 1O_2 , LOO ve diğer radikal örneklerini indirger.

α -tokoferol'ü moleküler oksijene maruz bırakılan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Bu gibi oksidasyonlar doymamış yağ asitlerinin polimerleşmesine sebep olur.¹⁷² Doymamış yağ asitleri çift bağlara sahip oldukları için oksijen ile hızlı bir şekilde reaksiyona girerek mitokondri, mikrozoam ve hücre içi zarların

yapısını ve metabolizmasını bozan peroksit ve hidroperoksitleri doyurarak peroksit radikallerinin etkinliğini azaltırlar. Böylece peroksit oluşumu önlenmiş olur.¹⁷¹

α -tokoferol yağda çözünebilen güçlü antioksidan aktiviteye sahip biyolojik bir antioksidandır.¹⁷³ Bu özelliklerinden dolayı yağ asitlerinin otooksidasyonunu önler ve hücre zarı fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikallerin etkisinden koruyarak ilk savunma hattını oluşturur, yani lipid peroksidasyonuna karşı ilk sıradaki koruma mekanizmasıdır.¹⁷¹

Glutasyon peroksidaz ile α -tokoferol serbest radikallere karşı birbirini tamamlayıcı etki gösterir. Enzim teşekkül etmiş olan peroksitleri ortadan kaldırırken, α -tokoferol peroksitlerin sentezini engeller. α -tokoferol selenyum metabolizmasında da önemli rol oynar. α -tokoferol selenyumun organizmadan kaybını önleyerek veya onu aktif şekilde tutarak selenyum ihtiyacını azaltır.¹¹⁰ Kabuklu yemişler (badem, yerfıstığı, ayçiçeği çekirdeği), tohumlar ve sebze yağları alfa tokoferol zengin gıdalara örnek verilebilir.¹⁷⁴

2.13.2. İlaç Olan Antioksidanlar

İlaç olarak kullanılan antioksidanlar arasında; NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler, antiinflamatuvar ilaçlar), Trolox-C, rekombinant süperoksit dismutaz, nonenzimatik serbest radikal toparlayıcılar (mannitol, albumin), demir redoks döngüsü inhibitörleri, nötrofil adezyon inhibitörleri, ksantin oksidaz inhibitörleri (allopurinol, oksipurinol, pterin aldehit), endojen antioksidan aktiviteyi arttıranlar (GSH-Px aktivitesini arttıran elbesen ve asetilsistein), sitokinler, barbitüratlar ve demir şelatörleri sayılabilir.⁸⁸

2.13.3. Sentetik Antioksidanlar

Gıdalarda en fazla kullanılan sentetik antioksidanlar; BHA (Butillenmiş hidroksi anisol) , BHT (Butillenmiş hidroksi toluen), PG (Propil galat) ve TBHQ (Tersiyer butil hidrokinon)'dir. Gıdalarda sentetik antioksidanların kullanımı yaklaşık 60 yıl önceye dayanmaktadır. Sentetik antioksidanlar doğal antioksidanlardan daha ucuz olmaları, yüksek stabilite ve yüksek etkinlik özellikleri nedeniyle yaygın kullanım alanlarına sahiptir. ¹⁷⁵

2.14. Oksidatif Stres

Serbest oksijen radikalleri organizmada enerjetik, reaktif ve metabolik olmak üzere üç ana mekanizmayla oluşmakta metabolik reaksiyonlar en önemli serbest oksijen radikalleri kaynağı olarak karşımıza çıkmakta, oluşan serbest oksijen radikalleri yüksek derecede reaktif olmalarından dolayı da hücrelerde zararlı etkiler meydana getirmektedirler.¹⁷⁶ Fizyolojik şartlarda oluşan reaktif oksijen ürünleri ile antioksidan defans bir denge halindedir. Yoğun serbest radikal üretimi ya da antioksidan defansın azalması biyomoleküllerde yapısal ve fonksiyonel modifikasyonlara yol açarak oksidatif strese neden olur.¹⁷⁷ Oksidatif stres; reaktif oksijen türleri tarafından meydana getirilen ve hücresel yıkıma yol açan biyomoleküllerin uygunsuz oksidasyonudur.¹⁷⁸ Ya da oksidanlara karşı antioksidan kapasitenin azalması veya oksidanların artması olarak tarif edilir.¹⁷⁹ Oksidan maddeler; hücre dışı matriksin yapısını, biyolojik membranları, DNA hasarı yaparak hücrenin genetik yapısını ve silyer fonksiyonunu bozar, enzimatik olayları etkiler, sürfaktan aktivitesini azaltır, mukus yapımı ve proteazların etkinliğini arttırarak oksidatif strese sebep olurlar.¹⁷⁹

Oksidatif yıkım farklı yollarla ortaya çıkabilir. DNA'yı etkileyebilir ve nükleotid oksidasyonu ve dimerizasyonuna yol açarak replikasyon süreci sırasında mutasyonlara

neden olabilir. Protein fonksiyonlarını tersiyer yapıyı değiştirerek ya da enzim fonksiyonlarını değiştirerek bozabilir. Yapısal proteinlere zarar verebilir. Normal koşullarda hücreler hem fizyolojik olarak hem de anormal faktörlerin etkisiyle patolojik olarak ortaya çıkan serbest radikal ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı, antioksidan savunma sisitemleri tarafından korunurlar. Enzimatik antioksidanların en önemlileri arasında SOD, sitokrom oksidaz, CAT, GSH-Px sayılabilir. Süperoksid dismutaz, O_2^- , H_2O_2 ve O_2 çeviren reaksiyonu katalizler. Bu nedenle oksidatif strese karşı ilk savunma enzimi olarak adlandırılır. Çünkü O_2^- zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir tetikleyicisidir.¹⁷⁸

Oksidatif stres ve onu izleyen doku hasarı sonucunda kronik hastalıklar ve hücre ölümü meydana gelmektedir.¹⁸⁰ Nöronlar yani sinir/ beyin hücrelerindeki oksidatif stres kendini nöro-dejeneratif hastalıklar olarak göstermektedir (Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı). Damar endotelinde oksidatif hasara yol açarak, damar sertliği gelişiminde rol oynamakta, dolayısıyla kalp-damar, beyin-damar ve diğer damar hastalıklarına neden olmaktadır.¹⁸¹ Oksidatif stresin diyabet ve diyabetin daha sonraki komplikasyonlarının patogeneğinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Enzimatik olmayan glikozilasyon, otooksidatif glikozilasyon, sorbitol yolu aktivitesi, antioksidan savunma sistemindeki bazı değişiklikler, diyabette oksidatif stresi arttıran mekanizmalar olarak bilinirler.¹⁸⁰ Artan oksidatif stres sonucu görülen olaylardan biri'de lipid peroksidasyonunun artmasıdır. Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar eritrositlerin fonksiyonlarına ait çeşitli parametreler ve membran bütünlüğünün, lipid peroksidasyonundaki artıştan olumsuz yönde etkilendiğini göstermiştir. Oksidatif stresteki artış nedeniyle meydana gelen lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan ürünler membran permeabilitesini ve mikroviskozitesini önemli ölçüde

etkileyerek eritrositlerin deformabilite yeteneğinde ve yaşam süresinde azalmaya yol açmaktadırlar.¹⁸²

Oksidatif stresin, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarıyla birçok hastalığın komplikasyonlarına katkıda bulunduğu da düşünülmektedir.⁹⁸ Artan oksidatif stresin, kanser, ateroskleroz, amiloidoz, yaşa bağlı bağışıklık yetmezliği, senil demans ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkili olduğu ve biyolojik yaşlanma süresince rol oynadığı bilinmektedir.¹⁸³

2.15. Ellagic Asit

Ellagic asit (2,3,7,8-tetrahidroksil [1] benzapiranol [5,4,3-cde] [1] benzopiran-5, 10-dione) nar, ahududu, çilek, üzüm gibi pek çok taneli meyvelerde ve cevizde bulunan bitkisel polifenol türevi bir maddedir.^{184,185} Ellagic asit, moleküler ağırlığı ile heksahidroksidifenik asidin dilaktonudur. Ellagic asit hidrofilik kısmı temsil eden dört fenolik ve iki lakton grupları (hidrojen bağ vericisi ve alıcısı olarak rol oynayabilir) ve lipofilik alanı temsil eden dört halka ile termodinamik olarak oldukça kararlı bir moleküldür. Lipofilik üstünlük gösteren molekülün dört halkası nedeniyle ellagic asit ısıya oldukça dayanıklıdır. Ellagic asit suda az, metanol ve etanolde iyi çözünen, bitkilerde serbest ve ellagitanen halinde bulunan bir polifenoliktir¹⁸⁶ (Şekil 2.10).¹⁸⁷



Şekil 2.10. Ellagic asitin kimyasal yapısı

Tıbbi bitkiler ve gıdalardaki fenolik bileşikler, polifenoller veya polihidroksifenoller adıyla bilinmektedir. Molekül formüllerinde en az 6 karbon atomu ve en az bir OH grubu içermektedirler. Polifenoller kolayca okside olabilme özelliği dolayısıyla antioksidan aktiviteye sahiptirler. Yapay antioksidanlara ilgi giderek azalmakta iken, doğal kaynaklı antioksidanlara ilgi, son zamanlarda oldukça artış göstermekte ve bunların bitkisel materyallerden elde edilmesi önem arz etmektedir.¹⁸⁸ Fenol bileşikleri ya da polifenoller bitkiler aleminde en yaygın bulunan maddeler grubunu oluşturmaktadır. Bu bileşikler bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olarak tanımlanmakta ve günümüzde 8000'den fazla fenol bileşiği yapısı bilinmektedir.¹⁸⁹ Bitkilere özgü bir bileşik grubu olan, gıdadan gıdaya miktarı ve kompozisyonu değişen polifenoller, meyve ve sebzelerin kendine özgü buruk tadını vermektedir. Polifenoller aroma oluşumundaki etkileri, renk oluşumuna ve değişimine katılmaları, antimikrobiyal ve antioksidatif etki göstermeleri, enzim inhibisyonuna neden olmaları, bazı gıdalarda saflık kriteri olmaları gibi birçok bakımdan oldukça önemlidir.¹⁹⁰

Polifenoller, serbest radikalleri sınırlayıcı antioksidatif etki gösteren güçlü antioksidanlar olarak bilinmektedir ve lipid peroksidasyonunu katalizleme yeteneğinde olan metallere karşı şelat özelliğindedirler. Fenolik içeriği yüksek olan diyetler, kardiyovasküler ve kanser gibi birtakım hastalıkların oranını azaltmada etkili olduğu ortaya konmuştur.¹⁹¹ Ayrıca kolesterol düşürücü eikosanoid sentezini düzenleyici, düşük yoğunluklu lipoprotein oluşumunu inhibe edici, hipertansiyonu önleyici, antimitojenik ve antikanserojenik etki göstermeleri nedeniyle sağlık açısından da oldukça yararlı bileşikler olduğu belirtilmektedir.¹⁹⁰

Polifenoller, ROS ve lipid bağlarını kıran radikalleri (ROO⁻), metal iyonlarının yaptığı şelatlar gibi bağlanarak süpürürler. Fenollerin emiliminde, molekül boyutu, lipofilikliği, çözünürlüğü, şelat oluşumu, gıdanın karışımı (protein, yağ, karbonhidrat) uygulanan parçalanma ve pişirme işlemi, pKa gibi fizikokimyasal faktörler, midede kalış ve bağırsaklardan geçiş süresi, lumenin pH'sı, bağırsak membranlarının geçirgenliği ilk geçiş etkisi ve karaciğerdeki biyotransformasyon ya da konjugasyon, safra salgıları, ince ve kalın bağırsaktaki mikroflora enzimlerinden ileri gelebilecek yıkıcı etkileşimler, içeriğin duodenum ve ileuma boşalma hızı, ileumda emilim için geçen süre gibi, biyolojik faktörler tarafından değişebileceğine dikkat çekilmektedir.¹⁷⁶

Bitkilerde aromatik aminoasit metabolizması sırasında sentezlenen yan bileşiklerden oluşan ikincil metabolitler oldukları varsayılan fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonid türevleri olmak üzere başlıca iki gruba ayrılmaktadır. Fenolik asitler, hidroksisinnamik asitler ve hidroksibenzoik asitler şeklinde iki gruba ayrılırlar. Polifenoller içinde en önemli ve geniş grubu oluşturan flavonoidler ise antosiyanidinler, flavon ve flavononlar, kateşin ve lökoantosiyanidinler, proantosiyanidinler olmak üzere beş gruba ayrılmaktadır.¹⁹⁰

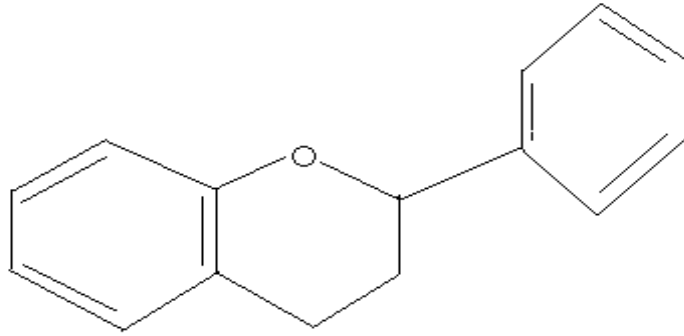
1-Fenolik Asitler

Fenolik asitler kendi içlerinde sinamik asitler ve benzoik asitler olmak üzere iki grupta toplanırlar. Bunlardan sinamik asitler C₆-C₃ karbon yapısına sahip olup bitkilerde en fazla bulunan sinamik asitlere örnek olarak p-kumarik asit, 5-hidroksiferulik asit, kafeik asit, ferulik asit ve sinapik asit verilebilir. Sinamik asitler, bitkilerde serbest durumda görülmeyip genellikle tartarik asit, kuinik asit ve şikimik asitin esterleri veya şeker esteri halinde bulunurlar. Sinamik asit ve türevlerinin yan zincirlerindeki çift bağ, bu bileşiklerin cis ve trans izomerleri halinde bulunmasına neden olurlar.¹⁹²

Benzoik asitler ise C₆-C₁ karbon yapısına sahip olup en yaygın olanları p-hidroksi benzoik asit, protokateşik asit, vanilik asit, ellagic asit ve gallik asittir. Renksiz bileşikler olan benzoik asit türevleri sinnamik asit türevlerine oranla nadir bulunmaktadır.

2-Flavonoidler

Flavonoidler biyolojik aktiviteleri olan polifenol yapıları içerisinde, en önemli ve yaygın olan yapılardır.¹⁷⁶ Flavonoidler iki benzen halkasından oluşur ve bu iki benzen halkası arasında oksijen içeren pyren halkası bağlanmıştır¹⁹³(Şekil 2.11).¹⁹⁴



Şekil 2.11. Temel flavonoid yapısı

Flavonoidler C halkasının C-3 pozisyonunda hidroksil grubu bulunduran flavonoidler 3-hidroksi flavonoidler olarak sınıflandırılırlar (flavonollar, antosiyanidinler, katesinler). Eğer flavonoidlerin C halkasının C-3 pozisyonunda hidroksil grubu yoksa bunlar 3- desoksiflavonoidler olarak sınıflandırılırlar (flavanon, flavonlar).¹⁹³

Flavonoidler büyük çoğunluğu bitkiler tarafından üretilen 4000'den fazla bileşiği içeren geniş bir ailedir. Flavonoidler bitkilerde renk verici pigmentlere sahiptirler. Bu bileşikler bitkinin büyüme ve gelişmesini etkiledikleri gibi hastalık etmenlerine karşı

savunma sisteminde bir parçasını oluştururlar. Ayrıca farmakolojik antimikrobiyal antioksidan antikanserojen özelliklerinde olduğu bilinmektedir.¹⁹²

Flavonoidler kendi içerisinde beş gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar, flavon ve flavononlar, kateşinler, antosiyanidinler, lökoantosiyanidinler ve proantosiyanidinler şeklinde sınıflandırılırlar.¹⁹⁰

Flavonlar, Flavonollar ve Flavanonlar

Bitkilere beyaz, açık sarı rengini veren maddelerdir. Sebzelerden patates, karnabahar, patlıcan ve kereviz, meyvelerden elma, armut ve şeftalide renklenmede etkiye sahip pigmentlerdir.¹⁹⁵

Luteolin, Apigenin, Tangeritin flavonlara, Quercetin, Kaempferol, Myricetin flavonollara, Hesperetin, Naringenin, Eriodictyol ise flavanonlara örnek olarak verilebilir.¹⁹⁵ Flavonollar içinde kateşin, epikateşin ile bunların polimerleri ve glikozla ester formları yer almaktadır. Bunlar enzimatik renk kararmalarında etkili olan renksiz bileşiklerdir. Flavonoller içerdikleri hidrojen atomları hidroksil ve metoksil kökleri nedeniyle birbirlerinden farklılık göstermektedir.

Kateşin

Kateşinler genellikle aglukanlar veya gallik asitte esterleşmiş halde bulunurlar. Kanseri dokuların gelişiminde ve büyümesinde etkin işlevi olan ürokinaz enzimini tutarak anti-kanserojenik bir etki göstererek kanseri önlemekte, kolesterolü düşürmektedir. Ayrıca anti- mikrobiyel bir madde olduğundan vücuda giren mikroplarında öldürme özelliğine sahiptir.¹⁹⁶

Antosiyanidinler

Antosiyaninler glikozit yapıda bileşiklerdir. Yani bazı şekerlerle, şeker olmayan başka bir maddenin birleşmesi sonucu oluşmuşlardır. Glikozitlerde şekerler dışında kalan kısma genel olarak aglikon denilmektedir. Aglikon, fenolik maddelerde antosiyanidinlerden oluşmaktadır. Antosiyanidinler, fenolik bileşiklerin $C_6 - C_3 - C_6$ şeklinde temel yapı gösteren flavonoid grubu maddelerin bir alt grubunda yer alır. Antosiyanidinler, 3., 5. ve nadiren 7. karbona bağlı bulunan azalan miktarlarda glikoz, galaktoz, ksiloz ve arabinoz gibi şekerlere sahiptirler.¹⁹⁷

Antosiyanidinler, kılcal damarları, serbest radikal saldırısından koruyarak onların kuvvetlenmesine hizmet ederken aynı zamanda sağlıklı bağ doku ve yeni kılcal damar oluşumuna da katkıda bulunmaktadır. Antosiyanidinler, platelet egregasyonu ve arteroskleroz (damar sertliği) riskini azaltmakta, bioflavanoidler gibi tüm vücutta normal bağ dokusu oluşumunu arttırmakta, retinadaki rodopsin üretimini hızlandırmakta ve genel olarak tüm vücuttaki kapiler olarakta bilinen, kılcal damarları güçlendirmektedir.¹⁹⁶

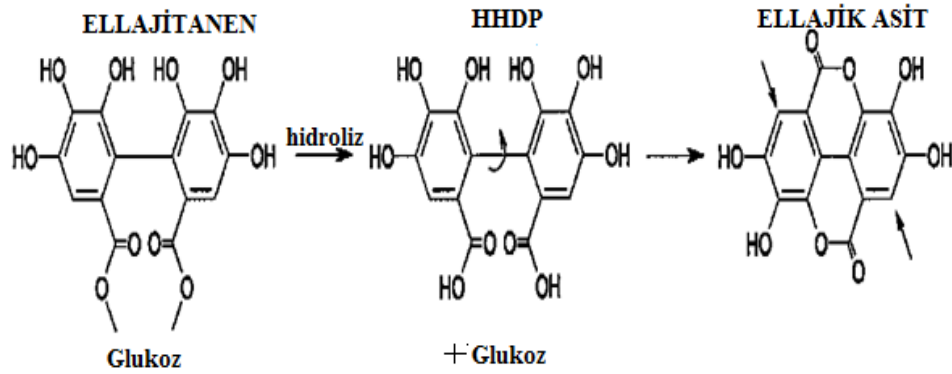
Lökoantosiyanidinler

Lökoantosiyanidinlerin en önemli özelliklerinden biri asidik ortamda ısıtılmasıyla antosiyanidinlere çevrilme özelliğine sahip bileşikler sınıfına dahil olmasıdır. Lökoantosiyanidinler 2, 3 ve 4 nolu karbon atomları asimetriktir, üç asimetrik merkez içeren bu molekülün 8 izomer yapı ihtimali mevcuttur. Ancak bu sekiz izomerin ayrı ayrı rasemik karışımlarda sayılamamış farklı karakteristik özelliklerinin incelendiği bildirilmiştir.¹⁹⁸

Proantosiyanidinler

Proantosiyaninler, damarları korumakta, cildi genç ve sağlıklı tutmakta, eklem, kas ve damar duvarları için çok önemli olan destek bağ dokusunun iki kritik proteini olan kollagen ve elastinin güçlenmesine destek sağlamaktadır.¹⁹⁶

Ellagic asit, kuvvetli bir antioksidan, antikanserojen etkiye sahip bir fenolik asit olup, antinflamatuar ve antimutagenik etkisinin de olduğu belirtilmiştir.¹⁹⁹ Bu maddenin bitkilerde doğal şekilde bulunduğu düşünülmemektedir. Ellagitaninlerin bazı kimyasal işlemler geçirmesi sonucunda ellagic asit oluşmaktadır. Ellagic asitin bir hücre tarafından algılanması ve kullanılabilmesi için uygun bir formda bulunması gereklidir. Bu form şeker molekülleri ile birleşmesi sonucunda sağlanmaktadır. Bütün meyve ve sebzeler içerisinde en fazla kırmızı ve siyah ahudutda bulunan ellagic asit vücutta kansere neden olan kimyasalları inaktif hale getirerek bir antikanserojen etki göstermektedir²⁰⁰(Şekil 2.12).²⁰¹



Şekil 2.12. Ellagitaninlerin hidrolizasyonu

Ellagic asitin antikanserojen etkileri konusunda birçok çalışma mevcuttur. Yapılan çalışmalarda özellikle kırmızı ahudutlarından elde edilen ellagic asitin bazı kanser tiplerinde kanserli hücrelerin gelişmesini engellediği belirtilmektedir.²⁰⁰ Yine çalışmaların

birinde ellagic asit ile DNA arasında kovalent bağlar saptanmış olup bu nedenle DNA'nın maskelenerek kanserojen madde ile bağlanmasının engellendiği belirtilmiştir.¹⁹² Bir diğer çalışmada ise ellagic asitin serbest oksijen radikallerinin ve kanserojenlerin metabolitlerini süpürerek kanser başlangıcını engellediği belirlenmiştir.²⁰² Ellagic asitin DNA'da oksidatif hasarın büyük bir bölümünü engelleyerek kanser gelişimini büyük ölçüde durdurduğu yönündeki bu bilgiler artmaktadır. Laboratuvar çalışmalarına göre ellagic asit,²⁰⁰

1. Serumda kansere sebep olan kimyasalların temizlenmesini sağlar.
2. Hücresel DNA'da kanserojenlerin bağlanmasını önler.
3. Yüksek oranda yıkıcı serbest oksijen radikallerini temizler veya bağlar böylece antioksidan görevi görür.
4. Kanser hücrelerini yok eder
5. Yıkıcı kanser hücrelerine karşı immun sistemi uyarır.

Ellagic asitin, farelerin kemik iliği hücrelerinde, radyasyon, H₂O₂ ve mitomisin C'nin neden olduğu sitogenetik hasarı azalttığı belirlenmiştir. Yine rat karaciğer DNA'sında 2-nitropropan tarafından 8-hidroksi guanozin oluşumunun ellagic asit tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir.¹⁸⁵

Ellagic asitin, insanlarda düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, kuersetin, kafeik asit, kateşin ve siyanidin kullanılmıştır. Çalışma sonucunda ellagic asitin önemli antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.¹⁸⁷ Hatta oksidatif strese karşı ellagic asitin vitamin E'den daha iyi koruduğu rapor edilmiştir.¹⁸⁵

Alüminyum ile oksidatif strese maruz bırakılan sıçanların, karaciğerinde oluşan oksidatif hasara karşı ellagic asitin koruyucu etki potansiyeline sahip olduğu

kaydedilmiştir.¹⁸⁴ Bunun yanı sıra ellagic asitin yaşlanmayı geciktirici etkiside belirlenmiştir.²⁰⁰ Ellagic asitin, DNA replikasyonunda, kopyalama, rekombinasyon, hücre çoğalması ve farklılaşmasında önemli olan enzimlerin çalışmasını önleyerek tümör hücresinin gelişimini engellediği bildirilmiştir.²⁰³

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmanın tüm deneysel içerikli uygulamaları ve işlem basamakları Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı ve Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Grupları

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu'nun 27.04.2011 tarih ve B.30.2.ATA.0.A1./285 sayılı yazısında belirtilen Etik Kurul Raporunun 2011.2.1/18 nolu kararı ile deneysel uygulamalara başlandı.

Araştırmada, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Araştırma Merkezinden temin edilen, yaklaşık 200-250 gr ağırlığında, 20 adet yetişkin, Sprague-Dawley cinsi dişi ratlar kullanıldı (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Araştırmada kullanılan Sprague Dawley cinsi rat

Uygulamalar süresince etik kurul şartlarının sağlanmasına özen gösterildi. Sıçanlar araştırma merkezinde 21 ± 2 °C’ deki üretim kafeslerinde barındırıldı ve standart pellet tipi yemle *ad libitum* olarak beslendi.

Çalışmada kullanılan 20 rat her grupta 5 adet olmak üzere toplam 4 gruba ayrıldı. Kısaca deney grupları ve uygulamalar şu şekilde oluşturuldu.

Kontrol: Bu gruptaki gebe hayvanlara gebelik boyunca ve doğum sonrası 15. güne kadar 0,5 ml intraperitoneal (i.p.) izotonik serum uygulandı ve çalışmanın sonunda karşılaştırmada kullanılmak üzere yavrularının böbrek dokuları alındı.

Nikotin: Bu gruptaki gebe hayvanlara gebelik boyunca ve doğum sonrası 15. güne kadar i.p. nikotin (5 mg/kg) uygulaması yapıldı.

Ellagic asit: Bu gruptaki gebe hayvanlara gebelik ve doğum sonrası 15. güne kadar i.p. yol ile 60 mg/kg konsantrasyonda ellagic asit uygulaması yapıldı.

Nikotin + Ellagic asit: Bu gruptaki gebe hayvanlara gebelik ve doğum sonrası 15. güne kadar i.p. ile (5 mg / kg) nikotin ile birlikte (60 mg/kg) konsantrasyonda ellagic asit uygulaması yapıldı.

Ratlar deneysel uygulamalara başlamadan önce bireysel kafeslere alınarak 7 gün boyunca ortama alışmaları sağlandı. Yedinci günün sonunda nikotin gruplarındaki ratlara nikotin uygulamalarına başlandı. Nikotin uygulamasının 30. Gününde ratların gebe kalması için her kafese 1 adet erkek rat bırakıldı. Her gün ratlara çiftleşme kontrolü yapılarak vaginal tıkaçın görüldüğü gün gebeliğin birinci günü kabul edildi. Deney protokolünde belirlenen uygulama doğrultusunda doğumu takip eden 15.günün sonunda bütün

gruplardaki yavrular eter anestezisi altında ötenazi edilerek böbrek dokuları alındı. Böbreğin birisi biyokimyasal analizler için alınarak -80 °C'de donduruldu. Diğer böbrek ise histopatolojik incelemeler için % 10 tamponlu formaldehit solusyona alındı.

3.2. Biyokimsayal Analizler

Alınan böbrek dokusu önce izotonik çözeltide yıkandı kurutuldu ve hassas terazide tartılarak analizler için -80 °C'de saklandı. Daha sonra dondurucudan çıkarılan doku örnekleri tüpe kondu ve üzerine tartılan ağırlığın 10 katı kadar Tris tamponu (50 Mm, 5 nM pH = 7,8 6,057 gr Tris + 500 ml distile su) eklenerek homojenizatörde parçalandı. Daha sonra +4 °C buzdolabına konuldu. Vorteksleme yapıldıktan sonra ultrasonikatörde 10 sn aralıklarla 30 sn'de ses dalgalarıyla hücre membranı parçalandı ve süpernatantı alınarak endorf tüplerine konuldu. Daha sonra, 16000 devirde 30 dk santifürj yapıldı ve 5000 µl mikropipetle tekrar süpernatantı alınarak küçük endoforlara konuldu. Böbrek dokusundan elde edilen süpernatantlarda (MDA), (GSH), (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD) ve (NO) tayinleri yapıldı.

3.2.1. Malondialdehid (MDA) Analizi

Lipit peroksidasyon ürünü olan MDA, oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Ölçümün prensibi, MDA ile tiyobarbutirik asidin etkileşimi sonucu oluşan pembe renkli bileşiğin 532 nm'de absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır.²⁰⁴

Kullanılan Reaktifler:

1. Sodyum dodesil sülfat (SDS) (% 8.1'lik çözeltisi) = 8.1 gr SDS bir miktar saf suda çözünür ve hacim 100 mL'ye tamamlanır.

2. % 20'lik asetik asit çözeltisi = 100 mL %100'lük asetik asitten alınarak üzerine 400 mL distile su katılır ve iyice karıştırılır.

3. % 0.9'luk tiyobarbitürik asit (TBA) = 4,5 gr TBA alınarak 500 mL distile suda çözünür. (Çalışma günü taze olarak hazırlanmalıdır.)

4. 1/15 piridin/1-bütanol karışımı = 15 mL 1-bütanole 1 mL piridin eklenerek hazırlanır.

5. 200 μM 'lık stok standart çözeltisi = 1,1,3,3-tetraetoksipropandan 25 μL alınıp 500 mL saf suda karıştırılarak çözünür. Taze hazırlanmalıdır. Seri dilüsyonla stok standarttan 200 (direkt stoğun kendisi kullanılır), 100, 50, 25, 12, 6, 3 ve 1,5 μM 'lık standartlar hazırlanır.

Deneyin yapılışı: Malondialdehid'in aktivitesi, Ohkawa ve ark. (1979)'ın tarif ettiği metod modifiye edilerek tayin edildi.²⁰⁵

Tablo 3.1. Malondialdehid aktivitesi için kullanılan reaktif miktarı

	Numune tüpü	Standart tüpü	Kör tüpü
SDS	200 μL	200 μL	200 μL
Asetik asit	1500 μL	1500 μL	1500 μL
TBA	1500 μL	1500 μL	1500 μL
Numune	200 μL	-	-
Standart	-	200 μL	-
Distile su	700 μL	700 μL	900 μL

Vorteksle karıştırdıktan sonra, sıcaklığı 95 °C'olan su banyosunda 1 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon bittikten sonra tüpler, fazlar karıştırılmadan, çeşme suyu altında

soğutuldu. Her bir tüpün üste kalan pembe renkli süpernatandan 600 µL alınarak karşılık gelen ependorfa aktarıldı. Her bir ependorfa aşağıdaki pipetlemeler yapıldı.

Tablo 3.1.1. Malondialdehid aktivitesi için kullanılan pipetleme miktarı

	Numune tüpü	Standart tüpü	Kör tüpü
Saf su	150 µL	150 µL	150 µL
Piridin / n-bütanol	750 µL	750 µL	750 µL

Ependorf içeriği iyice vortekslendi, 4000 devirde 10 dakika santrifüjlendi. Fazlar karıştırılmadan üst fazdan 200 µL alınarak mikropate okuyucuda 532 nm’de standart ve numunelerin absorbansı okundu ve standartlara karşı numunelerin konsantrasyonları kaydedildi. Konsantrasyon µmol/L olarak ifade edildi.

3.2.2. Total Glutatyon (GSH) Analizi

Kullanılan Reaktifler:

A- 1mM 5-5’Dithio 2 Nitrobenzoik asit (DTNB) (M.A = 396,3 gr/mol) = 0,011 gr DTNB alarak 28 mL distile suda çözüldü.

B- 1 mM NADPH = 0,0082 gr NADPH tartılarak 10 mL distile suda çözüldü.

C- 100 mM Na-Fosfat tamponu (pH = 7,5) = 0,213 gr NaH₂PO₄.2H₂O + 1,563 gr Na₂HPO₄.2H₂O + 0,038 gr EDTA disodyum tuzu alarak bir miktar suda çözüldü sonra hacmi 100 mL’ye tamamlandı.

D- GSH stok = 0,0306 gr okside GSH alınarak 1Lt’de çözüldü.

E- % 5’lik metafosforik asit = 5 gr metafosforik asit alınarak bir miktar distile su içinde çözümlenerek hacmi 100 mL’ye tamamlanır.

Karışım: A'dan 2,8 ml, B'den 3,75 ml, C'den 5,85 ml alınarak üzerine 1 kutu glutatyon redüktaz eklenir.

Deneyin yapılışı: Total Glutatyon'un aktivitesi, Tietz (1969) ve Fairbans ve ark.(1999)'nın tarif ettiği metod modifiye edilerek tayin edildi.^{206,207} Stok standarttan 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 16 µm konsantrasyonlarda hazırlandı. Numuneler eşit hacimde % 5'lik metafosforik asitle mumamele edilip, santrifüj edildi. Mikroplate aşağıdaki pipetlemeler yapıldı.

Tablo 3.2. Total glutatyon aktivitesi için kullanılan reaktif miktarı

	Numune	Standart	Kör
Süpernatant	25µL	-	-
Standart	-	25 µL	-
GSH kokteyl	125 µL	125 µL	125 µL
Distile su	-	-	25 µL

Numunelere ait süpernatantlar analizde kullanıldı. Numunelere ait mikroplate 405 nm'de 2 dk okutuldu. Standart grafiğe karşı elde edilen numune konsantrasyonları kaydedildi.

3.2.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Analizi

Glutatyon peroksidaz, H₂O₂ varlığında redükte (GSH) okside glutatyona (GSSG) dönüşümünü katalizler. Bu reaksiyon ile oluşan (GSSG) , NADPH'ın indirgeyici substrat olarak kullanıldığı GR reaksiyonu ile tekrar GSH'a dönüşür. Bu reaksiyonlar esnasında NADPH'ın NADP'ye yükseltgenmesi ile oluşan absorbans azalışı Mikroplate Reader'de 340 nm'de 6 okutma yapılarak GSH-Px aktivitesi hesaplandı.²⁰⁸

Kullanılan Reaktifler:

1- Fosfat tamponu (50 mM, pH = 7) = 0,988 gr Na₂HPO₄.2H₂O + 0,379 gr KH₂PO₄ + 0,062 gr EDTA + 0,011 gr NaNO₃ tartılarak karışım 90 mL distile su'da çözüldü, hacmi 100 mL' ye tamamlandı ve pH = 7'ye ayarlandı.

2- Kosubstrat = 0,008 gr NADPH + 0,016 gr GSH redüktaz + 100 µL GSH (redükte glutatyon) alınarak 10 mL distile suda çözüldü.

3- %30'luk H₂O₂ çözeltisi = 50 µL H₂O₂ alıp 5 mL distile suda çözüldü ve bu çözeltiden de 50 µL alındı. 5 mL GSH-Px tamponla karıştırılarak 5 dk inkübasyona bırakıldı.

Deneyin yapılışı: Glutatyon peroksidaz'ın aktivitesi, Paglia ve ark. (1967)'nin tarif ettiği metod modifiye edilerek tayin edildi.²⁰⁹

Tablo 3.3. Glutatyon peroksidaz aktivitesi için kullanılan reaktif miktarı

	Kör tüp	Numune tüpü
Modifiye GSH-Px tamponu	150 µL	150 µL
Ko-Substrat	50 µL	50 µL
Numune	-	25 µL
Distile su	25 µL	-
5 dk 37 °C'de inkübasyon		
H ₂ O ₂ (2 mM)	25 µL	25 µL

Hesaplamalar:

$$\text{GSH-Px (IU/L)} = (\Delta\text{Abs/dk}) \times 10/6,22.10^{-3}$$

$$\text{Spesifik aktivite (IU/gr Hb)} = [(\Delta\text{Abs/dk}) \times 10 \times 51/6,22. 10^{-3}]/(\text{gr/dL Hb})$$

3.2.4. Superoksit Dismutaz (SOD) Analizi

Xanthine oksidaz aracılığıyla üretilen O₂⁻ radikalinin reaksiyon ortamında nitroblue tetrazolium (NBT) indirgenmesinin numunede bulunan SOD enzimi tarafından

engellenmesi prensibine dayanır.²⁰⁸ NBT'nin indirgenmesi ile 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans veren mor renkli formazan oluşur. Superoksit dismutaz aktivitesinin büyüklüğü oluşan formazanın absorbansı ile ters orantılıdır.

Kullanılan Reaktifler:

A) Assay reaktifi:

1. Xanthine (0,3mM) = 0,00913 gr xanthine 200 mL distile suda çözülür. 1M'lık NaOH'dan bir damla çözmek için kullanılır.
2. EDTA (0,6 mM) = 0,023 gr EDTA di sodyum tuzu 100 mL distile suda çözülür.
3. Nitroblue tetrazolium = 0,0123 gr NBT 100 mL distile suda çözülür. Renkli şişede saklanır.
4. Na₂CO₃ (0,4 M) = 2,544 gr Na₂CO₃ 60 mL distile suda çözülür. Günlük taze hazırlanmalıdır.
5. Bovine serum albumin (BSA) (1 gr/L) = 0,030 gr Bovine serum albumin 30 mL distile suda çözülür.

Hazırlanan bu beş reaktif +4 °C'de saklanır. Deneyden hemen önce renkli bir şişede 20 mL Xanthine + 10 mL EDTA + 10 mL NBT + 6 mL Na₂CO₃ + 3 mL BSA bu beş reaktif birleştirilir ve iyice karıştırılır.

B) Xanthine oksidaz (167 U/L) = 50 µL xanthine oksidaz alıp 600 µL 2M (NH₄)₂SO₄ ile dilüe edilmeli ve taze hazırlanmalıdır.

C) (NH₄)₂SO₄ (2M) = 2,643 gr (NH₄)₂SO₄ 10 mL distile suda çözülür.

Deneyin yapılışı: Superoksit dismutaz aktivitesi, Sun ve ark. (1988)'nin tarif ettiği metod modifiye edilerek tayin edildi.²¹⁰

Tablo 3.4. Süperoksit dismutaz aktivitesi için kullanılan reaktif miktarı

	Numune	Kör tüpü
Distile su	40 mL	50 mL
Numune	10 mL	-
Xanthine oksidaz	10 mL	10 mL
Assay reaktifi	200 µL	200 µL
Vorteksle 25 °C'de 20 dk inkübe edildi.		

Enzimi 1 dk arayla tüplere katıp 20 dk sonunda oluşan renkli kompleksin absorbensları elisa mikroplate readerde 560 nm de havaya karşı okutuldu.

Hesaplama : 1U = % 50'lik NBT inhibisyonu

$$\% \text{ inhibisyon} = \% (A_{KÖR} - A_{Numune}) / A_{KÖR}$$

$$\text{SOD (U/mL)} = \% \text{ inhibisyon} / (50 \times 0,01)$$

3.2.5. Nitrik Oksit (NO) Analizi

Kısa ömürlü olan NO radikali hızla NO_2^- ve NO_3^- 'e okside olmaktadır. Bu nedenle NO miktarı belirlenirken NO_2^- ve NO_3^- miktarları belirlenmektedir. NO_2^- 'nin Griess reaktifi ile etkileşmesi sonucu oluşan rengin absorbensının belirlenmesi oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Nitrat, nitrat redüktazla NO_2^- 'ye indirgendikten sonra ölçülmektedir.²⁰⁸

Kullanılan Reaktifler:

1. ZnSO_4 = 30 gr tartılarak bir miktar distile suda çözülerek hacmi 100 mL ye tamamlanır.

2. Griess reaktifi = 0,5 gr sülfanilamid + 12,5 gr meta-fosforik asit + 0,050 gr N-1 Naphyletilendiamin bir miktar distile suda çözülerek son hacim 500 mL ye tamamlanır.

3. 0,008 gr NADPH + 0,001 gr FADH + 1 kutu nitrat redüktaz karışımı 100 mL distile su içinde çözüldü.

4. Meta-fosforik asit = 25 gr tartılıp hacmi 1 L' ye tamamlanır.

5. 0,69 gr NaNO₂ tartılarak hacmi 50 mL distile su ile tamamlanır. Bu çözeltiden 20 µl alarak 9980 µl distile su ilave edilir. Bunun konsantrasyonu 200 mM dır.

Deneyin yapılışı: Nitrik oksit'in aktivitesi, Moshage ve ark. (1995) ve Bories ve ark. (1995)'in tarif ettiği metod modifiye edilerek tayin edildi.^{211,212}

Tablo 3.5. Nitrik oksit aktivitesi için kullanılan reaktif miktarı

Numune Tüpü			
Numune	100 µL		
Distile su	400 µL		
NADPH+FADH+1 kutu nitrat redüktaz	500 µL		
Karanlıkta 37 °C'de 20 dk inkübe edildi.			
Çinko sülfat	50 µL		
1000 devirde 15 dk santrifüj edildi.			
	Numune	Numune Körü	Standart
Standart	-	-	125 µL
Süpernatant	125 µL	125 µL	-
Gries reaktif	125 µL	-	125 µL
Metafosforik asit	-	125 µL	-
10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi			
540 nm okutuldu.			

Standart, numune ve numune körlerinin absorbansı okundu, standart grafiğe karşı numune ve numune körlerinin konsantrasyonu kaydedildi. Numune ve numune körü arasındaki fark nitrik oksit aktivitesinde kullanıldı.

3.2.6. Protein Tayini

Kullanılan Reaktifler:

A- Renk reaktifi (Commassie blue brilant G-250) = 50 mL mutlak etanolde 100 gr Commassie blue brilant G-250 çözünür. Buna % 85'lik 100 ml ortafosforik asit ilave edilir. Hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlanır.

B- Stok standart = 1 mL de 1 mg olacak şekilde hazırlanır. Bunun için 10 mg BSA 10 mL suda çözünür.

Deneyin yapılışı : Protein tayini, Bradford ve ark. (1976)'nın tarif ettiği metoda göre tayin edildi.²¹³ Numuneler distile su ile 10 kat seyreltildi. Stok standarttan 20, 40, 80, 100, 120, 140, 160, 180 ve 200 mg/mL konsantrasyonlarda standart dilüsyonlar hazırlandı. Numune, standart ve körden 200 µl alınarak mikropate pipetlendi. 595 nm dalga boyunda absorbanslar okunarak standart grafiğe karşı konsantrasyonlar kaydedildi.

Tablo 3.6. Protein tayini için kullanılan reaktif miktarı

	Numune	Standart	Kör
Dilüe numune	100 µl	-	-
Standart	-	100 µl	-
Distile su	-	-	100 µl
Renk reaktifi	5000 µl	5000 µl	5000 µl
10 dk inkübasyon			

3.3. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve bu kimyasalların temin edildiği firmalar Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.7. Kullanılan kimyasallar ve bu kimyasalların temin edildiği firmalar

Kimyasal madde	Firma
Nikotin	Sigma
Ellagic Asit	Sigma
Eter	AK Kimya A.Ş
Glutasyon, redükte form	Sigma-Aldrich
Glutasyon, okside form	Sigma
Glutasyon redüktaz	Sigma
NADPH, tetrasodyum salt, redükte form	Sigma
Etilen diamintetraasetik, di sodyum tuzu	Sigma
Meta-fosforik asit	Sigma
Bovine serum albumin	Sigma
Xanthine	Sigma
Tiyobarbitürik asit	Sigma
Xanthine oksidaz	Sigma

Commassie blue brilant G-250	Merck
Nitroblue tetrazolium	Sigma
5,5 Dithio 2 Nitrobenzoik asit	Fluka
Sülfanil amid	Merck
Çinko sülfat	Merck
Hidrojen peroksit	Merck
Tris tamponu	Merck
Sodyum nitrit	Merck
Sodyum hidrojen fosfat di hidrat	Merck
Potasyum di hidrojen fosfat	Merck
Sodyum nitrat	Merck
Sodyum dodesil sülfat	Merck
Asetik asit	Sigma-Aldrich
Flavin adenin dinükleotit	Sigma
N-1 Naphthtyletilendamin	Merck
Potasyum nitrat	Sigma
1,1,3,3-tetraetoksi-propan	Sigma
Sodyum klorür	Merck
Sodyum karbonat	Merck
Piridin	Merck
Ortho-Phosphorsaure % 85'lik reints	Merck
1-Bütanol	Sigma-Aldrich

3.4. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Çalışmada kullanılan cihaz ve bu cihazların temin edildiği firmalar (Tablo 2) gösterilmiştir.

Tablo 3.8. Kullanılan cihaz ve bu cihazların temin edildiği firmalar

Cihaz veya alet	Firma ve/veya ülke
Makas	Stainless steel Oluşum 11-346
Pens	Stainless
Erlen (1000 mL)	Bomex
pH metre	Istek 730 P, Korea
Mikropipet	Fischer
Santrifüj	Hettich Zentrifügen Rotofix 32, Germany; MSE Mikro centaur Sanyo, U.K.
Mikrosantrifüj	Sanyo, UK
Hassas terazi	Sartorius AG, Germany
Mikroplate okuyucu	Bio-tek PowerWave XS, The USA
Manyetik karıştırıcı	1. Fisher, USA 2. Yellowline MSH basic, Germany
Su banyosu	1 Kotterman, Germany

Vorteks	Heidolph Reax Top, Germany
Homojenizatör	Castaloy-R
Saf su cihazı	Mes mp minipure Su Arıtma Sistemleri, Türkiye
Derin dondurucular	1. Sanyo Ultra Low Temperature Freezer MDF-U281, Japan 2. Uğur USS 374 DTKL, Türkiye
Ultrasonikatör	Misonix
Otomatik pipet (çeşitli tür ve hacim)	Multikanallı finnpipette Labsystems; Tranferpette brand, Germany; Ependorf research physio Care concept; Exelpette, elkay; medispec-plus

3.5. Histolojik Çalışmalar

Böbreklerden alınan doku örnekleri histokimyasal ve immunohistokimyasal değerlendirmeler için %10'luk tamponlu formaldehit solusyonunda 48 saat süreyle tespit edildi. Bu dokular dereceli alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra paraplastla bloklandı. Organın histolojik yapısını ve oluşan histopatolojik değişiklikleri belirlemek için bloklardan alınan 5-6 mikronluk seri kesitlere Crossman tarafından modifiye edilen Mallory'nin üçlü boyaması yapıldı. Böbrek dokusundaki apoptotik ve antiapoptotik enzim aktivitesini belirlemek için ise streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimyasal yöntemi uygulandı.²¹⁴

Immunohistokimyasal boyamalar için deparafinize edilen kesitler suya kadar getirilerek %3'lük H₂O₂ (70 cc metanol, 27 cc PBS, 3 cc H₂O₂) ile endojen peroksidazlar bloke edildi. PBS ile yıkandıktan sonra nonspesifik reaksiyonların engellenmesi için bovine serum albumin uygulandı. Bu kesitler, apoptotik immunoreaksiyonlar için Bax (Abcam, ab7977, sulandırma:1/50), antiapoptotik immunoreaksiyonlar için ise Bcl-2 (Abbiotec 250555, sulandırma:1/100) primer antikolarıyla 1'er saat inkube edilerek PBS ile yıkandı. Daha sonra, LSAB (DAKO) kit içerisinde bulunan biotinlenmiş sekonder antikor ile 30 dakika inkubasyon ve PBS ile yıkama işlemini takiben Streptavidin-HRP ile 30 dakika muamele edildi. Bu dokulardaki antikor kalıntıları PBS ile 3-5 kez yıkılarak giderildikten

sonra antijen+antikor kompleksinin görünür hale getirilmesi için 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) kromojen maddesi (1 tablet + 30 cc tris + 10 µl H₂O₂) ile 10 dakika boyanarak PBS ile tekrar yıkama işlemi yapıldı. Dokunun zemin görüntüsünün elde edilmesi için Harris'in hematoksileni ile çekirdek boyamaları 3-4 dakika süreyle uygulanarak takiben PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Bu aşamadan sonra 96 ve absol alkolden geçirilen dokular ksilolde bekletilerek parlaklaşması sağlandı ve entellan ile yapıştırma işlemi gerçekleştirildi. Işık mikroskopik incelemelerde kahverengi reaksiyon veren alanlar pozitif olarak değerlendirildi. Bu alanların değerlendirmelerinde immunopozitif hücelere rastlanılmamış ise - ; az ise +; orta derecede ise ++; çok yoğun ise +++ ile skorlama işlemi belirlendi.²¹⁵

3.6.İstatistiksel Analiz

Çalışmamız sonucunda elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar ortalama (X) ve standart sapma (SD) şeklinde verildi. Verilerin istatistiksel değerlendirmesi, SPSS 17 istatistik programın'da anlamlılık sınırı p<0,05 alınarak yapıldı. Verilerin değerlendirilmesinde Varyans analizi Duncan testi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1.Vücut Ağırlığı ve Makroskobik Bulgular

Sunulan çalışmada genel olarak gruplardaki ratların gebe bırakılma sürelerine bakıldığında nikotin grubundaki dişi ratlarda gebelik oluşturma süresi dikkat çekici bir şekilde diğer gruplara oranla oldukça uzun bir zamana yayıldı.

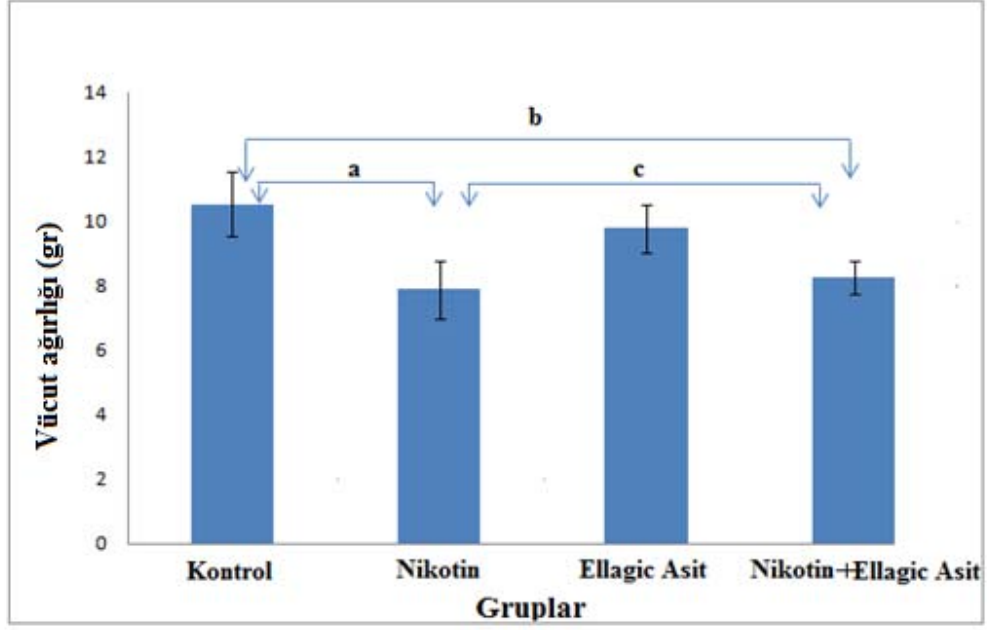
Böbrekler, karın boşluğunda ve bel omurlarına yakın, anatomik olarak olması gereken yerlerdeydi. Böbreklerin rengi ve kıvamı normaldi. Çevre dokulara yapışma veya üzerinde tümör benzeri herhangi bir patolojik durum görülmedi.

Doğum sonrası yavruların ortalama vücut ağırlıklarına bakıldığında, nikotin verilen gruba ait yavruların ortalama vücut ağırlıklarının kontrol grubuna oranla düşük olduğu belirlendi ($p<0,05$). Ellagic asit verilen gruba ait yavruların ortalama vücut ağırlığının kontrol grubuna benzer olduğu gözlemlendi. Nikotin+Ellagic asit verilen gruba ait yavruların vücut ağırlığına bakıldığında ise değerlerde bir iyileşme olduğu görülse'de hem nikotin hem'de kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olduğu görüldü ($p<0,05$). (Tablo 4.1 ve Şekil 14).

Bütün gruplara ait yavruların böbrek ağırlıklarına bakıldığında ise gruplar arasında önemli bir farklılığın olmadığı görüldü ($p>0,05$). (Tablo 4.1 ve Şekil 14).

Tablo 4.1. Ortalama vücut ve böbrek ağırlıkları

Gruplar	Böbrek Sayısı	Böbrek Ağırlığı ($\bar{X}\pm SD$)	Vücut Ağırlığı ($\bar{X}\pm SD$)
Kontrol	18	0,70 \pm 0,10	10,53 \pm 1,0
Nikotin	18	0,60 \pm 0,08	7,89 \pm 0,90 ^a
Ellagic asit	18	0,68 \pm 0,10	9,79 \pm 0,75
Nikotin + Ellagic asit	18	0,65 \pm 0,10	8,25 \pm 0,50 ^{bc}



Şekil 4.14. Ortalama vücut ağırlıkları

a: Kontrol ile Nikotin, b: Kontrol ile Nikotin + Ellagic asit, c: Nikotin ile Nikotin + Ellagic asit gruplarına ait yavruların ortalama vücut ağırlıklarının kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak farklı olduğu görüldü ($p<0,05$).

4.2. Biyokimyasal Bulgular

4.2.1. Malondialdehid (MDA)

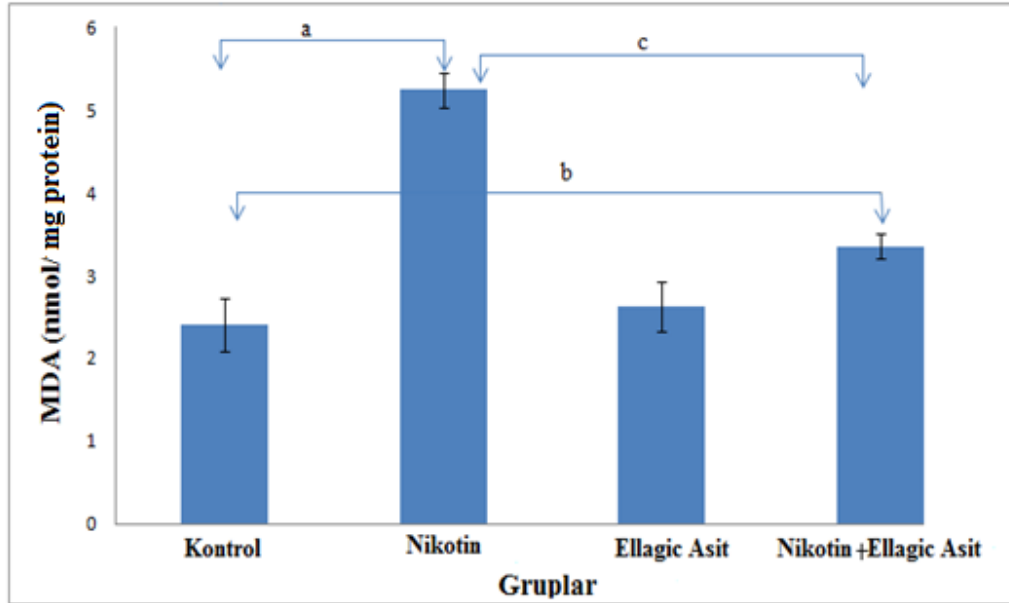
Sunulan çalışmada Kontrol, Nikotin, Ellagic asit ve Nikotin + Ellagic asit gruplarına ait MDA değerleri sırasıyla $2,40 \pm 0,32$, $5,25 \pm 0,21$, $2,63 \pm 0,30$ ve $3,35 \pm 0,15$ olarak tespit edildi (Tablo 4.2 ve Şekil 4.15).

Nikotin ve Nikotin + Ellagic asit gruplarına ait MDA değerleri kontrol grubuyla karşılaştırıldıklarında yüksek olduğu ve bu yükselmenin istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edildi ($p<0,05$).

Nikotin ile Nikotin + Ellagic asit grubuna ait MDA değerleri karşılaştırıldığında Nikotin + Ellagic asit grubunda bir azalmanın olduğu ve bu azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edildi ($p<0,05$).

Tablo 4.2. Gruplar arasındaki malondialdehid değerleri

Gruplar	n	MDA (nmol/mg protein)
Kontrol	9	2,40 ± 0,32
Nikotin	9	5,25 ± 0,21 ^a
Ellagic asit	9	2,63 ± 0,30
Nikotin + Ellagic asit	9	3,35 ± 0,15 ^{bc}



şekil 4.15. Malondialdehidin gruplar arasındaki dağılımı

a: Kontrol ile Nikotin, b: Kontrol ile Nikotin + Ellagic asit, c: Nikotin ile Nikotin + Ellagic asit gruplarına ait MDA değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

4.2.2. Total glutatyon (GSH)

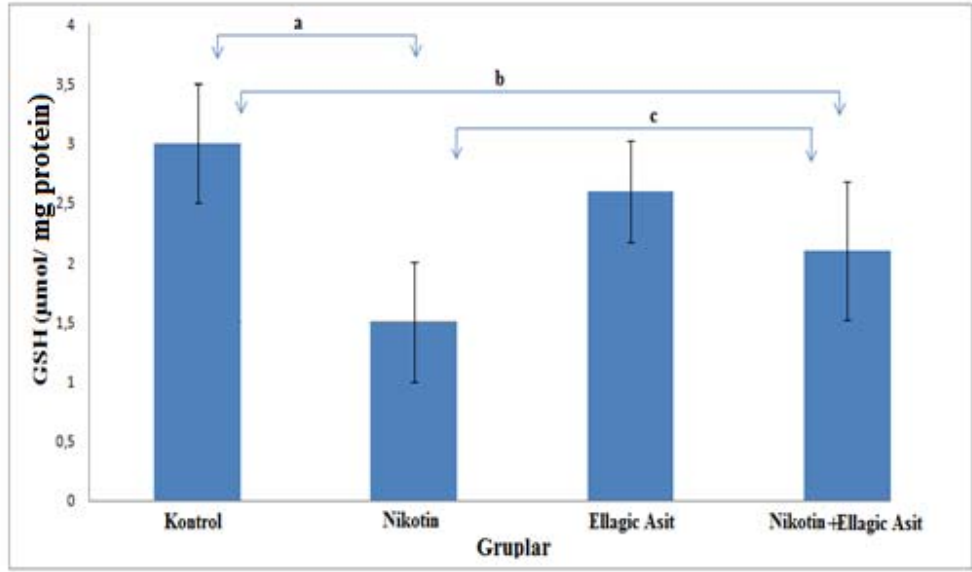
Sunulan çalışmada Kontrol, Nikotin, Ellagic asit ve Nikotin + Ellagic asit gruplarına ait GSH değerleri sırasıyla $3,00 \pm 0,50$, $1,50 \pm 0,50$, $2,60 \pm 0,43$, ve $2,10 \pm 0,58$ olarak tespit edildi (Tablo 4.3 ve Şekil 4.16).

Nikotin ve Nikotin + Ellagic asit gruplarına ait GSH değerleri kontrol grubuna ait GSH değerleriyle karşılaştırıldığında GSH düzeyinde bir azalmanın olduğu ve bu azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edildi ($p < 0,05$).

Nikotin ile Nikotin + Ellagic asit gruplarına ait GSH düzeyleri karşılaştırıldığında ise GSH düzeyinde bir artışın olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edildi ($p < 0,05$).

Tablo 4.3. Gruplar arasındaki total glutatyon değerleri

Gruplar	n	GSH ($\mu\text{mol/mg protein}$)
Kontrol	9	$3,00 \pm 0,50$
Nikotin	9	$1,50 \pm 0,50^a$
Ellagic asit	9	$2,60 \pm 0,43$
Nikotin + Ellagic asit	9	$2,10 \pm 0,58^{bc}$



Şekil 4.16. Total glutatyonun gruplar arasındaki dağılımı

a: Kontrol ile Nikotin, b: Kontrol ile Nikotin + Ellagic asit, c: Nikotin ile Nikotin + Ellagic asit grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

4.2.3. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)

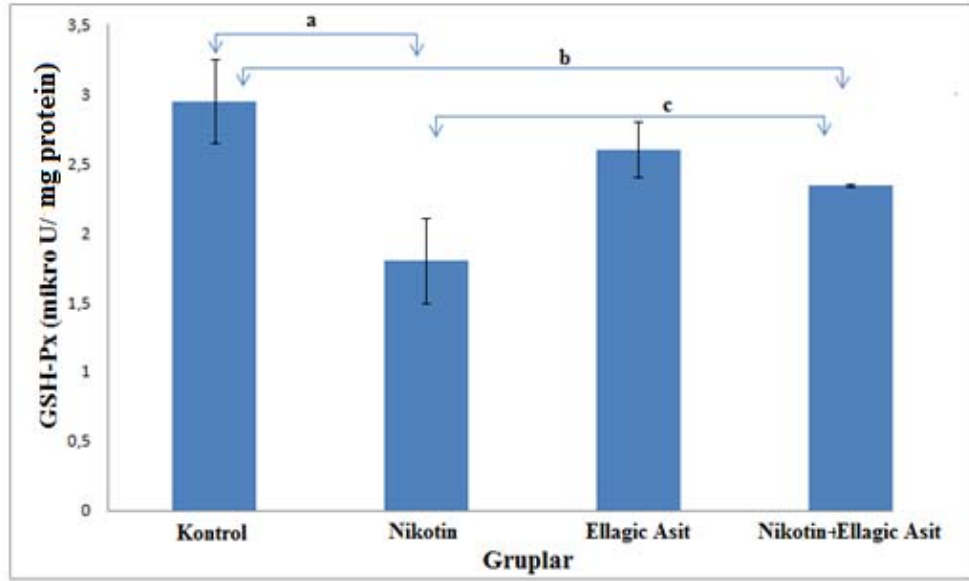
Sunulan çalışmada Kontrol, Nikotin, Ellagic asit ve Nikotin+Ellagic asit gruplarına ait GSH-Px değerleri sırasıyla $2,95 \pm 0,30$, $1,80 \pm 0,31$, $2,60 \pm 0,20$ ve $2,34 \pm 1,10$ olarak tespit edildi (Tablo 4.4 ve Şekil 4.17).

Nikotin ve Nikotin + Ellagic asit gruplarına ait GSH-Px değerleri kontrol grubuna ait GSH-Px değeriyle karşılaştırıldığında GSH-Px düzeylerinin önemli oranda azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edildi ($p<0,05$).

Nikotin ile Nikotin + Ellagic asit gruplarına ait GSH-Px düzeyleri karşılaştırıldığında, GSH-Px düzeylerinde önemli bir artış olduğu ve bunun istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edildi ($p<0,05$).

Tablo 4.4. Gruplar arasındaki glutatyon peroksidaz değerleri

Gruplar	n	GSH-Px (mikroU/mg protein)
Kontrol	9	2,95 ± 0,30
Nikotin	9	1,80 ± 0,31 ^a
Ellagic asit	9	2,60 ± 0,20
Nikotin + Ellagic asit	9	2,34 ± 0,10 ^{bc}



Şekil 4.17. Glutatyon peroksidazın gruplar arasındaki dağılımı

a: Kontrol ile Nikotin, b: Kontrol ile Nikotin + Ellagic asit, c: Nikotin ve Nikotin + Ellagic asit grupları arasında farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$).

4.2.4. Süperoksit dismutaz (SOD)

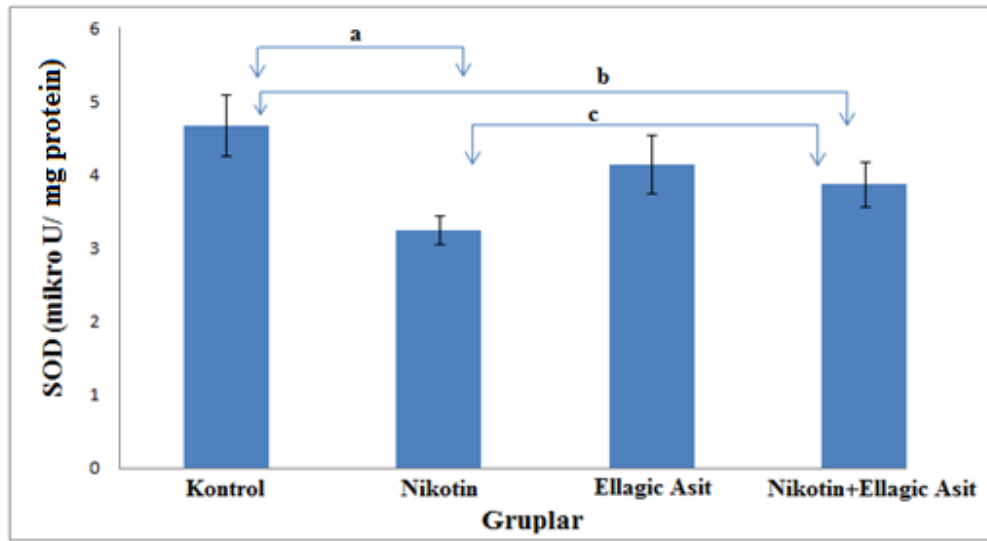
Sunulan çalışmada Kontrol, Nikotin, Ellagic asit ve Nikotin + Ellagic asit gruplarına ait SOD değerleri sırasıyla $4,68 \pm 0,41$, $3,25 \pm 0,20$, $4,15 \pm 0,40$ ve $3,88 \pm 0,31$ olarak tespit edildi (Tablo 4.5 ve Şekil 4.18).

Nikotin ve Nikotin + Ellagic asit gruplarına ait SOD değerleri kontrol gruplarına ait SOD değerleriyle karşılaştırıldığında SOD düzeylerinin önemli oranda azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edildi ($p<0,05$).

Nikotin ile Nikotin + Ellagic asit gruplarına ait SOD düzeyleri karşılaştırıldığında SOD düzeylerinde önemli bir artış olduğu ve bunun yine istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edildi ($p<0,05$).

Tablo 4.5. Gruplar arasındaki süperoksit dismutaz değerleri

Gruplar	n	SOD (mikroU/mg protein)
Kontrol	9	4,68 ± 0,41
Nikotin	9	3,25 ± 0,20 ^a
Ellagic asit	9	4,15 ± 0,40
Nikotin + Ellagic asit	9	3,88 ± 0,31 ^{bc}



Şekil 4.18. Süperoksit dismutazın gruplar arasındaki dağılımı

a: Kontrol ile Nikotin, b: Kontrol ile Nikotin + Ellagic asit, c: Nikotin + Nikotin + Ellagic asit grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

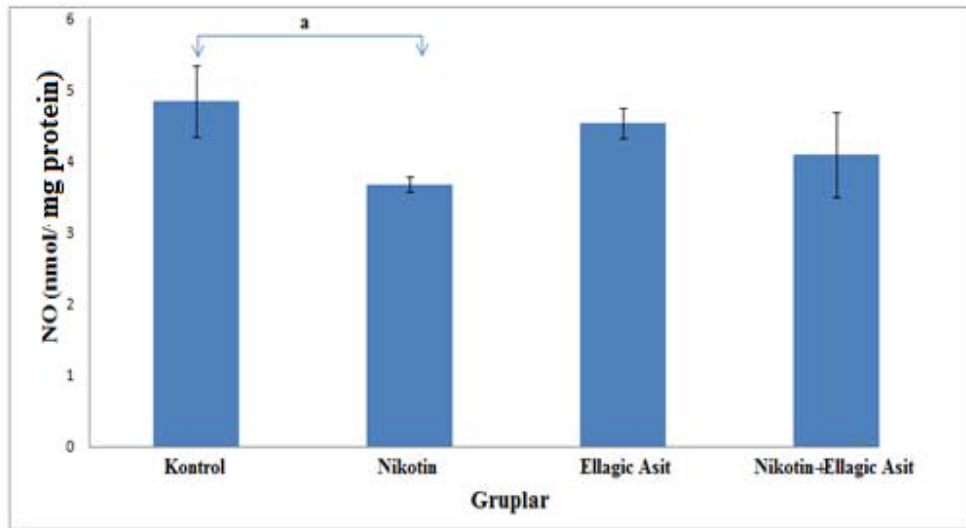
4.2.5. Nitrik oksit (NO)

Sunulan çalışmada Kontrol, Nikotin, Ellagic asit ve Nikotin + Ellagic asit gruplarına ait NO değerleri sırasıyla $3,68 \pm 0,40$, $4,85 \pm 0,50^a$, $4,53 \pm 0,51$ ve $4,10 \pm 0,60$ olarak tespit edildi (Tablo 4.6 ve Şekil 4.19).

Nitrik oksit düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel bir farklılığın sadece kontrol ve nikotin grupları arasında olduğu tesbit edildi ($p < 0.05$).

Tablo 4.6. Gruplar arasındaki nitrik oksit değerleri

Gruplar	n	NO (nmol/ mg protein)
Kontrol	9	$3,68 \pm 0,40$
Nikotin	9	$4,85 \pm 0,50^a$
Ellagic asit	9	$4,53 \pm 0,51$
Nikotin + Ellagic asit	9	$4,10 \pm 0,60$



Şekil 4.19. Nitrik oksitin gruplar arasındaki dağılımı

a: Kontrol ile Nikotin grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

Tablo.4.7. Bütün gruplara ait biyokimyasal analiz sonuçları						
Gruplar	n	MDA (nmol/mg protein)	GSH (µmol/mg protein)	GSH-Px (mikroU/mg protein)	SOD (mikroU/mg protein)	NO (nmol/mg protein)
Kontrol	9	2,40 ± 0,32	3,00 ± 0,50	2,95 ± 0,30	4,68 ± 0,41	3,68 ± 0,40
Nikotin	9	5,25 ± 0,21 ^a	1,50 ± 0,50 ^a	1,80 ± 0,31 ^a	3,25 ± 0,20 ^a	4,85 ± 0,50 ^a
Ellagic asit	9	2,63 ± 0,30	2,60 ± 0,43	2,60 ± 0,20	4,15 ± 0,40	4,53 ± 0,51
Nikotin+Ellagic asit	9	3,35 ± 0,15 ^{bc}	2,10 ± 0,58 ^{bc}	2,34 ± 0,10 ^{bc}	3,88 ± 0,31 ^{bc}	4,10 ± 0,60

4.3. Histopatolojik Bulgular

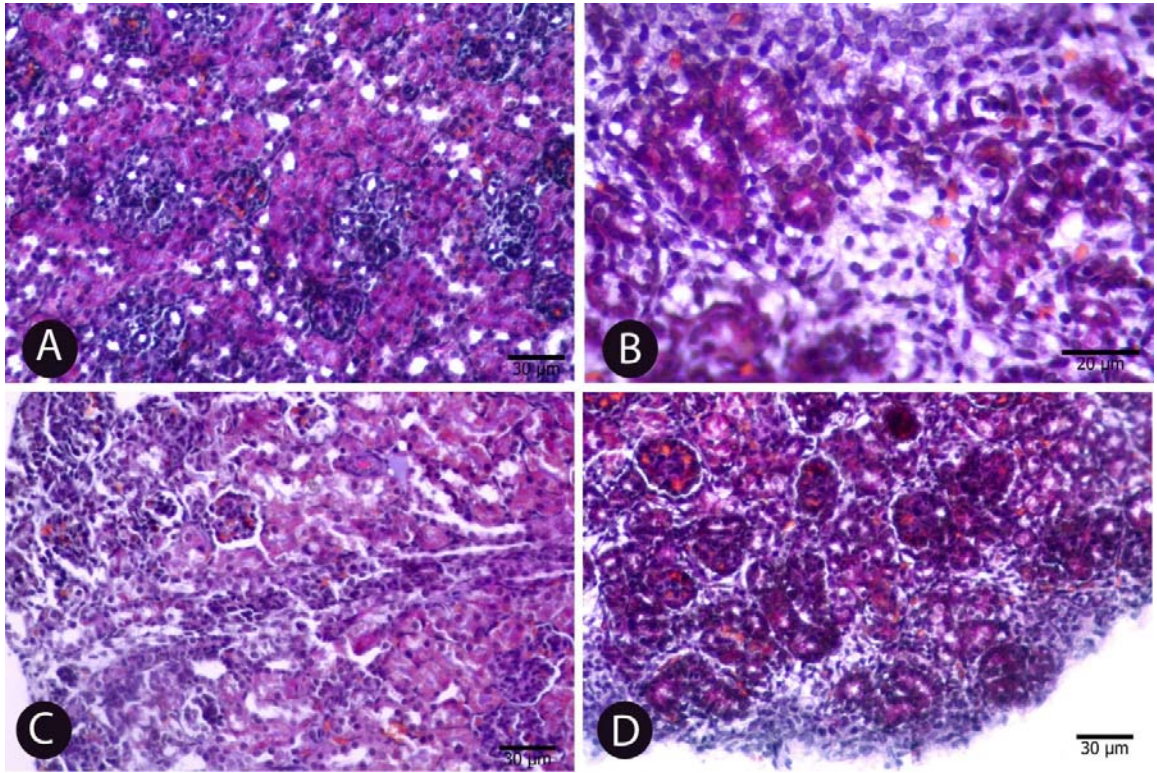
Çalışmamızda, nikotinin histopatolojik etkilerine karşı ellagic asitin koruyucu rolü histokimyasal ve immunohistokimyasal metotlarla [apoptotik (Bax) (Şekil 20 A-D) ve antiapoptotik (Bcl-x_L)](Şekil 21 E-H) belirlendi. Histokimyasal incelemelerde, kontrol ve ellagic asit grubuna ait böbrek dokularının korteks ve medullasında bulunan histolojik yapıların normal gelişim seyrinde oldukları belirlendi. Kortekste, gelişimini hemen hemen tamamlamış glomerulusların, proksimal ve distal tubullerin (Şekil 20 A, C), medulla bölgesinde ise toplayıcı borucukların belirgin bir şekilde ayırt edildiği tespit edildi.

Tablo 4.8. Böbreklerde apoptotik Bax ve antiapoptotik Bcl-2 immunopozitif alanların semikantitatif değerlendirilmesi

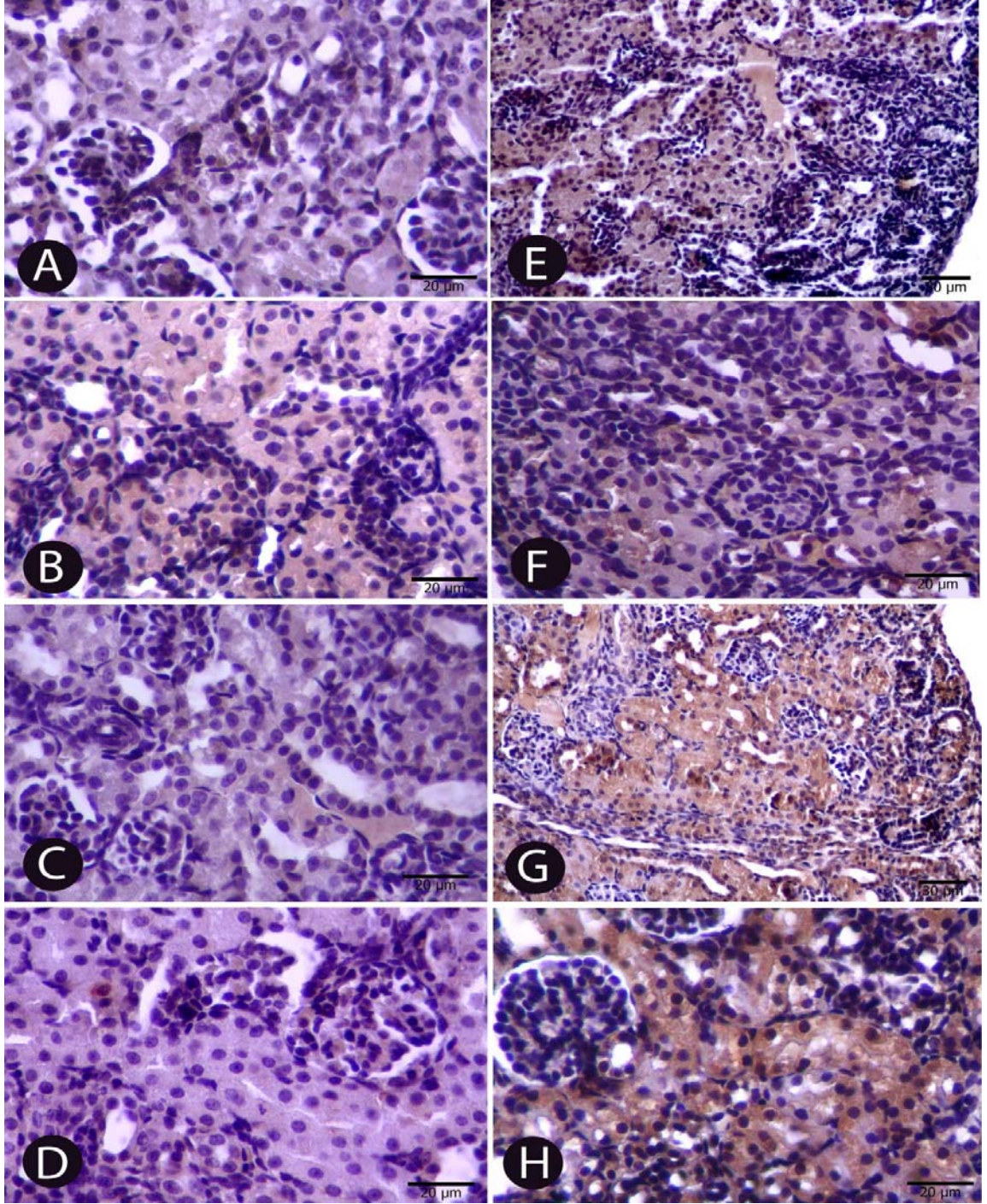
Gruplar	Bax	Bcl-2
Kontrol	+	+
Nikotin	++	-/+
Ellagic asit	+	+++
Nikotin + Ellagic asit	+	++

İmmunhistokimyasal boyamalarda, kontrol (Şekil 21 A) ve ellagic asit (Şekil 21 C) grubunda apoptotik Bax pozitif alanların nadiren görüldüğü, antiapoptotik Bcl-x_L reaksiyonunun ise kontrol grubunda orta derecede (Şekil 21 E), ellagic asit grubunda ise çok yoğun olarak boyandığı belirlendi (Şekil 21 G). Nikotin uygulanan gruba ait böbrek dokusu incelendiğinde ise glomerulus ve bowman kapsülü gelişiminin henüz tamamlanmadığı, proksimal tubul yoğunluğunun kontrol grubuna göre az sayıda olduğu, tubuler aralıklarda mezenşimal yıldız şekilli hücrelerin varlığı gözlemlendi (Şekil 20 B). İmmunhistokimyasal boyamalarda ise apoptotik Bax pozitif alanların (Şekil 21 B) ve antiapoptotik Bcl-x_L reaksiyonunun orta derecede görüldüğü belirlendi (Şekil 21 F). Ellagic

asit uygulaması yapılan nikotinli gruplarda, özellikle proksimal tubul ve glomerulus yapılarının belirgin bir şekilde oluştuğu tespit edildi. Diğer yandan bu gruptaki hayvanların böbreklerinde az da olsa henüz gelişimini tamamlamamış mezenşimal hücrelerinin varlığı da saptandı (Şekil 20 D). İmmunohistokimyasal boyamalarda apoptotik Bax pozitif alanların nadiren görüldüğü (Şekil 21 D), antiapoptotik Bcl-x_L reaksiyonunun ise yoğun derecede boyandığı belirlendi (Şekil 21 H).



Şekil 4.20. **A:** Kontrol grubu, **B:** Nikotin grubu, **C:** Ellagic asit grubu, **D:** Nikotin + ellagic asit grubu. Mallory'nin Üçlü boyaması.



Şekil 4.21. A, E: Kontrol grubu, B, F: Nikotin grubu, C,G: Ellagic asit grubu, D,H: Nikotin + ellagic asit grubu. Bax (A, B, C, D) ve Bcl-x_L (E, F, G, H) için Streptavidin-biotin peroksidaz boyama.

5. TARTIŞMA

Gerek sağlıksız gıdalar ile beslenme ve gerekse çevresel faktörler, organizmada hücrelerin yaşlanmasına, kanserli hücrelerde artışa ve mutasyonlara neden olan serbest oksijen radikallerini oluşturmaktadır.²⁰⁰ Bilindiği gibi serbest radikaller organizmada enerjetik, reaktif ve metabolik olmak üzere üç ana mekanizmayla oluşmaktadır. Bunlardan metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri yüksek derecede bir reaktiviteye sahip olmalarından dolayı hücreler oldukça şiddetli bir hasar meydana getirmektedirler.¹⁷⁶ Organizmada serbest oksijen radikallerinin bu zararlı etkilerine karşı koruyucu olarak antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır.⁸³ Hücrede intrinsik oksidasyon ve antioksidanlar arasındaki dengenin fizyolojik sınırlarda tutulması, organ ve dokuların sürdürülebilir fonksiyonları için önemlidir. Organizmada antioksidan kapasitenin yetersiz kalması, metabolik reaksiyonlar, hücreler için zararlı kılmakta ve sonuçta yaşlanma, diyabet, koroner damar hastalıkları, Alzheimer, Parkinson ve çeşitli kanser türlerinin oluşumuna zemin hazırlamaktadır.¹⁷⁶

Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu ve organizmada patolojik olayları tetikleyen, oksidatif strese katkıda bulunan önemli faktörlerden birisinin sigara içimi olduğu vurgulanmaktadır.⁶⁹ Son verilere göre dünyada yaklaşık 1.3 milyar kişi sigara içmektedir. Sigara çok yaygın ve öldürücü toplumsal toksikolojik bir olay olup sonuçları uzun süre sonra ve indirekt bir şekilde ortaya çıkmaktadır.⁵⁰ Sigara dumanı birçok oksidan ve prooksidan madde içermektedir. Bu maddeler aracılığıyla in vivo oksidatif stresi arttırabilir. Örneğin; çevresel sigara dumanı 43 bilinen kansinojen maddelerden başka binlerce zararlı kimyasal madde içerir. Sigara dumanının, en önemli major toksik bileşeni ise nikotindir. ⁶⁹ Birçok araştırmacı farklı dokularda (myokard özefagus, pankreas, beyin, akciğer, karaciğer)

yaptıkları çalışmalarda göstermişlerdir ki sigarada bulunan, oksidatif hasarlanma ve reaktif oksijen radikallerinin oluşumundan sorumlu olan birincil ajan nikotindir. Sigaranın önemli bileşeni olan nikotin, genellikle çalışmalarda, sigaraya bağlı hasarın oluşturulması için kullanılmaktadır.

Sigara ve nikotinin santral, periferik sinir sistemi, kardiyovasküler sistem, endokrin sistem üzerine toksik etkileri bilinir.⁶⁵ Sigaranın antioksidan sistemi etkileyerek dokularda yapısal hasarlar meydana getirdiği birçok çalışmada gösterilmiştir. Sigara kullanımının karaciğer, akciğer ve böbrek dokularında lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve bu organlarda oluşan serbest oksijen radikallerinin zararlı etkisine karşı antioksidan enzimlerin seviyesinin yükseldiği saptanmıştır. Yine sigara inhalasyonu sonucu karaciğerde MDA ve vitamin A düzeyi ile GSH ve GSH-Px enzim aktivitelerinin arttığı, SOD ve katalaz (CAT) aktiviteleri ile vitamin E ve Vitamin C düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir.⁷⁹ Yine uzun süreli sigara içiminin endotele bağlı koroner arterlerin vazodilasyonunda bozulmalara yol açtığı saptanmıştır.²¹⁶ Yapılan bir başka çalışmada kronik sigara içicilerinin ön kol damarlarında endotelium bağımlı vazodilatasyonun sağlıklı gruba göre azaldığı tesbit edilmiştir.²¹⁷

Nikotitle etkilenmenin sellüler oksidan-antioksidan sistemi değiştirerek hasar yaptığıyla ilgili kanıtlar da giderek artmaktadır. Nikotin, ratlarda yapılan deneylerde lipid peroksidasyonundaki artışla aterogenez oluşumu arasındaki bağlantıyı göstermektedir. Literatürde nikotine bağlı organ hasarının patofizyolojisinden lipid peroksidasyonunu sorumlu olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bildirilmiştir.²¹⁸ Memelilerde yapılan çalışmalarda nikotinin indüklediği maksimum oksidatif stres, sıçan beyinde mitokondride bulunmuştur. Nikotinin mitokondriyal solunum zincirini kırarak süperoksit ve hidrojen

peroksit oluşumunu arttırdığı saptanmıştır.⁴⁴ Nikotine maruz bırakılan sıçanların, beyin frontal korteksi incelenmiş, beyin frontal bölgelerinde sinir hücresi stoplazmasında mitokondriyalar, genişlemiş ve düzensiz granüllü endoplazmik retikulumu, mikrovillus oluşumları ve yüzey düzensizlikleri gibi dejeneratif yapısal değişiklikler gözlemlenmiştir.⁵³ Bununla birlikte nikotinin beyinde kavrama açısından önemli olduğu varsayılan beyin bölgelerinde reaktif oksijen türleri ve lipid peroksidasyonu üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır.⁴⁴

Sigara ve onun en büyük komponenti olan nikotinin gebelik ve bebek üzerine olan etkileri de oldukça fazladır. Günümüzde sigara içen kadın sayısının fazla olması ve bunu gebelik ve emzirme döneminde de devam ettiriyor olmaları nedeniyle gebelikte sigara içiminin bebekte oluşturacağı hasarları araştırmaya yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Sigara kullanmak, yalnızca annenin sağlığına zarar vermekle kalmaz, aynı zamanda gebelik ile ilgili komplikasyonların ortaya çıkmasına ve yeni doğanda ciddi sağlık problemlerine yol açar.⁷⁵ Sigara kullanan gebe kadınlarda, sigara akciğerleri daraltarak akciğerlere daha az hava girmesine neden olur, damarlar daraldığı için yüksek tansiyon ve nabız fazlalığı görülür, bulantı ve kusmalar dahada artar, tat ve koku alma duyusu azalır, iştahsızlık artar.²¹⁹ Annede gözlemlenen bu durum bebeği de olumsuz etkiler. Bebek plasenta ve kordon kanı aracılığıyla beslenmektedir. Sigara içen gebelerde yeterince beslenememekte ve gelişmemektedir.⁷⁵ Sigaranın etkili maddesi olan nikotin, hem yağda hem de suda çözünebildiği için plasentadan fetüse kolaylıkla geçer. Nikotinin plasenta damarlarında yaptığı vazokonstriksiyon da fetal oksijenlenmenin azalmasına sebep olur. Bunun sonucunda fetüse geçen besin maddeleride azaldığı için fetüste intra uterin büyüme geriliği görülür. Anne ne kadar çok sigara içiyorsa intrauterin büyüme geriliği o kadar fazla olur.²²⁰

Sigara anne sütünde bulunan Vitamin C'yi de azaltmaktadır. Gebelikte sigara içiminin perinatal mortalite ve morbiditeyi iki kat arttırdığı bildirilmiştir. Göbek kordonu ve plasentada değişiklikler, ablasyo placentae, placentae previa, abruptio placentae gibi placentae anormallikleri, dış gebelik, bebekte gelişme geriliği, doğum öncesi ve sonrası ani ölümler sigaranın etkileri arasındadır. Genel olarak sigara içen annelerin bebekleri, 100-250 gram daha düşük ağırlıkta ve 1 cm daha kısa doğmaktadırlar.⁷⁵ Yine gebelikteki sigara kullanımının çocuklarda zeka geriliğine yol açtığı' da bilinmektedir.²²⁰

Serbest oksijen radikallerinin ortadan kaldırılmasında endojen antioksidan enzimler (Glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz vb.) ve bazı vitaminler (Vitamin C, Vitamin E vb.) işlevsel olabildikleri gibi eksojen antioksidanlara (Likopen, resveretrol vb.) gerek duyulmaktadır.¹⁷⁶ Tedavi amaçlı kullanılan antioksidanlar, birçok hastalığın önlenmesinde, geciktirilmesinde ya da iyileştirilmesinde yararlı olmaktadır.

Meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunan fenolik bileşikler serbest radikalleri sınırlayıcı antioksidatif etki gösteren güçlü antioksidanlar olarak bilinmektedir. Fenolik içeriği yüksek sebze ve meyvelere dayalı diyetlerin, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi birtakım olayların görülme sıklığını azaltmada etkili olduğu ortaya konulmuştur.¹⁹¹ Bunlar içerisinde en önemlilerinden birisi hayvanlar üzerinde yapılan deneysel tümör gelişimini engellediği belirlenen ellagic asittir. Ellagic asit, kuvvetli bir antikanserojen/antimutajenik etkiye sahip bir fenolik asit olup, antibakteriyel ve antiviral etkilere sahiptir. Ayrıca yaşlanmayı geciktirici etkisinde olduğu belirlenmiştir.²⁰⁰ Yapılan çalışmalarda, ellagic asidin lipid peroksidasyonunda, E vitamininden daha fazla antioksidan etki gösterdiği saptanmıştır. Yine Ellagic asidin, DNA'da oksidatif hasarın büyük bölümünü engellediği belirtilmiştir.¹⁸⁵ Yapılan bir başka çalışmada Yüce ve arkadaşları

yüksek oranda ellagic asit içeren nar suyunun sağlıklı ratların karaciğer ve testis dokularındaki antioksidan aktivite üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda değerler kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, ratların dokularına ait lipid peroksidasyon düzeylerinde azalma gözlenirken, GSH, GSH-Px ve CAT aktivitelerinde belirgin bir artış tespit edilmiştir.¹³⁷ Yine Alp ve ark., akut malathion toksikasyonuna maruz kalan ratların akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında oluşan oksidatif strese ve doku hasarına karşı ellagic asitin önemli bir koruyucu etki gösterdiğini bildirmektedir.²²¹ İşte birkaç örnekte görüldüğü gibi son zamanlarda ellagic asit üzerine olan çalışmalar giderek artmaktadır. Bu yüzden bizde çalışmamızda kronik olarak nikotine maruz kalan gebe ratların yavrularında nikotinin oluşturacağı böbrek hasarının engellenmesinde, ellagic asidin koruyucu etkilerini incelemeyi amaçladık.

Çalışmamızda öncelikle, nikotin verilen gruptaki dişi ratların gebe bırakılma sürelerinin oldukça uzun bir zamana yayıldığı gözlemlenmiş, hatta bazı ratlarda ise gebelik oluşturulamamıştır. Bunun nedenine bakıldığında literatürlerde üç önemli neden göze çarpmaktadır; (i) Nikotinin merkezi sinir sistemini etkileyerek üreme üzerinde kilit rol oynayan GnRH hormonunun etkinliğini azalttığı, (ii) Özellikle herhangi bir maddenin yanması sonucu oluşan hidrokarbonların üremeye ilgili hormonların üretimini düzenleyen enzimlerin sentez ve yapısını bozarak bu tür bir etki gösterebileceği, (iii) Yine sigaranın içindeki bileşenlerin yumurtalıktaki hücrelerin östrojen üretimini engellediği ve bu durumun yumurtaları genetik anomalilere karşı dayanıksız hale getirerek yumurta kalitesini bozduğu ve sonuçta döllenmeyi güçleştirdiği bildirilmektedir. Ayrıca, sigara kullanımı doğal yoldan gebe kalmayı zorlaştırdığı, düşükleri hızlandırdığı ve muhtemel dış gebelik oluşumunu da artırdığıda literatürlerde ileri sürülen diğer teorilerdir²²²

Gebelik dönemi boyunca nikotine maruz kalmış ratların yeni doğan yavrularının vücut ağırlıklarında farklılıklar tespit edilmiştir. Fötal dönemde sadece nikotine maruz kalan gruba ait yavruların ortalama vücut ağırlıklarında, kontrol grubuna göre anlamlı düşüşler saptanmıştır. Kontrol grubundaki yavruların ortalama vücut ağırlığı 10,53 gr iken, nikotin grubunda ortalama ağırlığın 7,89 gr olduğu gözlemlenmiştir. Ellagic asit + nikotin verilen grupta ise ortalama vücut ağırlığının, 8,25 gr ile nikotin grubuna göre bir iyileşme gösterdiği, sadece ellagic asit verilen grupta ise ortalama vücut ağırlığının kontrol grubuna yakın olduğu belirlenmiştir.

İnsanlar üzerinde yapılan araştırmalarda nikotinin vücut ağırlıklarında azalmaya neden olması üç nedene bağlanmaktadır.²⁶ Bunlar; (i) Birçok literatürde sigaranın enerji tüketimini ve metabolizma hızını arttırdığı, (ii) Sigara içenlerde karbonhidratlı yiyeceklere karşı ilginin az olması ve bu tip kilo aldırıcı gıdaların sigara içenlerce tüketiminin az olduğu, (iii) Sigara içenlerde iştahın azaldığı ve buna bağlı olarak gıda alımının düştüğü gözlemlenmiştir. Schwartz ve ark., nikotinin hipotalamustaki nikotinic asetilkolin reseptör (nAChR)'leri doğrudan, presinaptik reseptörleri ise dolaylı yolla aktive ederek yiyecek alımı ve enerji harcanımını kontrol ettiğini bildirmektedir.²²³

Sunulan çalışmamızda da literatürlere paralel olarak nikotin verilmeye başlanmasıyla, nikotin verilen anne ratlarda günlük yem tüketiminde azalma gözlemlenmiştir. Buda yavruların normalden daha düşük ağırlıkta olmalarına sebebiyet vermiş olabilir. Ernst ve ark., nikotinin annedeki periferik nAChR uyararak kateşolamin salınımına yol açtığı ve böylece vazokonstriksiyon ve plasental kan akımında azalmaya neden olduğu, ayrıca yine Hussein ve ark., anne ve fötüs arasında düşük oksijen ve besin taşınmasına neden olarak fötal hipoksi ve sonuçta büyüme geriliği meydana getirdiğini ileri

sürülmektedir.^{224, 225} Marakoğlu ve Sezer, gebeliğin herhangi bir döneminde sigaraya maruz kalan gebeler üzerinde yaptıkları bir çalışmada düşük doğum ağırlıklı bebek doğurma oranının gebelikte sigara içenlerde, gebelikte sigara içmeyenlere oranla daha yüksek olduğunu bulmuşlardır.²²⁶ Huang ve ark., postnatal dönemde 7 gün süreyle entübasyon ile yüksek doz nikotin (6 mg/kg) uyguladıkları ratların vücut ağırlığını kontrole oranla daha düşük tespit etmişlerdir.²²⁷ Çalışmamızda anne ratların iştahlarında ve yem tüketiminde meydana gelen bu azalma ve yavrularda gözlemlediğimiz düşük vücut ağırlığı literatürlerle uyumludur. Nikotinin doğum ağırlığına etkisinin olmadığını ileri süren çalışmalarda bulunmaktadır.^{228- 230} Örneğin Murrin ve ark., yaptığı bir çalışmada nikotin, deney hayvanlarına 1,5, 4,5 ve 13,5 mg/kg dozlarda olmak üzere gebeliğin 2. ve 22. günleri arasında verilmiştir. Araştırmacı 1,5 ve 4,5 mg/kg/gün dozlarda doğan ratların doğum ve postnatal ağırlıkları arasında anlamlı bir farklılık bulamamıştır.²³¹ Düşük dozda nikotinin uterus, plasenta ve göbek kordonunda kan akımını azalttığına dair sınırlı sayıda kanıt olduğu ve bunların çoğunun kanıtlanamadığı bildirilmiştir.²³² Zaten örneklerde görüldüğü gibi nikotinin postnatal doğum ağırlığına etkileriyle ilgili sonuçlar birbirleriyle çelişmektedir.

Sastry ve ark, anne sütündeki nikotin düzeyinin plazmadan 2-3 kat daha fazla olduğunu bildirmekte ve bunun sebebinin de anne sütünün yüksek olan yağ içeriğinden ve asiditesinden kaynaklanıyor olabileceğini ileri sürmektedirler.²³³ Bir haftalıktan itibaren 16 hafta boyunca sigara dumanına maruz bırakılan ratlarla yapılan bir çalışmada, ratların canlı ağırlık, boy ve kuyruk uzunlukları ölçümleri yanında, pelvisin morfolojik ölçümleri alınmıştır. Bu değerlerin sigara dumanına maruz kalmış ratlarda olumsuz etkilendiği tespit edilmiştir. Sigaraya maruz kalan erkek ratlarda bu etkilerin dişi ratlara oranla daha fazla

olduğu görülmüştür.²³⁴ Yine yapılan çeşitli çalışmalarda; maternal sigara içiminin çocuğun postnatal dönemdeki fiziksel gelişimini olumsuz yönde etkilediği belirtilmiştir. Yine sigara içen annelerden doğan çocuklar, sigara içmeyen annelerin çocuklarıyla karşılaştırıldıklarında, sigara içenlerin çocuklarında 7 yaşında okuma yeteneğinin daha geri, 11 yaşında genel yeteneklerin 8 ay, okuma anlama yeteneğinin 9 ay, matematik testleri yeteneğinin 8 ay daha geri olduğu saptanmıştır. Bu çalışma insanlarda okuma, zihinsel faaliyetler ve problem çözme gibi karmaşık işlevlerin yapılmasını ve koordinasyonunu sağlayan beyin ve dolayısıyla sinirsel gelişimi olumsuz etkilediğini göstermektedir.²³⁵ Zaten bizde çalışmamızda nikotine maruz kalan yavru ratların, ortalama böbrek ağırlıklarını (0,60 gr) kontrol grubuna oranla (0,70 gr) daha düşük olarak tespit ettik. Ellagic asit verilen grupta ise bu değer (0,65 gr) kontrol grubundaki değere yaklaştığı görülmüştür. Buna neden olarak nikotinin uterus ile plasenta arasındaki kan akışındaki ve doku oksijenlenmesindeki azalmaya neden olması gibi birtakım olumsuz etkilerinin ellagic asit tarafından engellenmiş olabileceğini düşünüyoruz.

Gebelik sırasında bir taraftan vücudun metabolik ihtiyaçları artarken diğer taraftan dokuların oksijen açığı da giderek artmaktadır. Dolayısıyla dokularda oksijen ihtiyacının artması oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunu da artırmaktadır.¹⁵² Biyolojik membranlarda çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sıklıkla reaktif oksijen türlerine maruz kalma sonucunda oluşur ve hücre fonksiyon değişimi veya hücre ölümü ile sonuçlanabilir.²³⁶ Lipid peroksidasyon dokularda serbest radikal veya reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan moleküllerin, hücrelerdeki fosfolipidlerin yapısında bulunan poliansatüre yağ asitleriyle etkileşime girmesi sonucu ortaya çıkan bir dizi reaksiyondur. Hücre membranlarındaki bu dejeneratif reaksiyonlar sonucunda ortaya çıkan

yan ürünler lipid peroksidasyon ürünleri olarak adlandırılmaktadır. MDA dokularda lipid peroksidasyon sonucu açığa çıkan ve lipid peroksidasyon düzeyinin tespitinde sıklıkla kullanılan bir parametredir.²³⁷ Nitrik oksit ise fizyolojik ve patolojik birçok olayda çeşitli etkilere sahip aktif bir molekül olup, süperoksit radikali ile reaksiyona girerek peroksi nitrit radikalinin oluşumuna ve sonuçta oksidatif strese neden olmaktadır.²³⁸

Sunulan bu çalışmada lipid peroksidasyon, hücre membranındaki yapıların serbest radikal hasarı sonucu ortaya çıkan MDA ve NO ölçümü ile takip edildi. Çalışmamızda nikotine maruz bırakılan gruptaki yavruların böbrek MDA düzeyi ($5,25 \pm 0,21$ nmol/mg protein) kontrol grubu ($2,40 \pm 0,32$ nmol/mg protein) ile kıyaslandığında nikotinin MDA düzeyinde önemli bir artışa neden olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.2, Şekil 4.15). Böbrek dokusundaki MDA düzeyinin kontrol grubuna göre artış göstermesi, nikotine bağlı böbrek hasarının gelişiminde lipid peroksidasyonunun rolünün bulunduğu görüşünü desteklemektedir. Nikotin + Ellajik asit verilen grupta ise ölçülen MDA değerinin ($3,35 \pm 0,15$ nmol/mg protein) nikotin verilen gruba göre azaldığı tespit edilmiştir. Bu azalmanın muhtemel nedeni, ellajik asidin nikotinin neden olduğu serbest oksijen radikalleri süpürücü etkisi olabilir. Nikotin uygulanan gruba ait böbrek NO değerindeki ($4,85 \pm 0,50$ nmol/mg protein) yükselme kontrol ($3,68 \pm 0,10$ nmol/mg protein) grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıydı. Çalışmamızda nikotin ile birlikte ellagic asit verilen gruba ait yavrularının böbrek dokularında belirlemiş olduğumuz NO düzeyi ($4,10 \pm 0,60$ nmol/mg protein) sadece nikotin alan grupla ($3,68 \pm 0,40$ nmol/mg protein) karşılaştırıldığında değerlerde rakamsal bir azalma olsa da bunun istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Bunun muhtemel nedeni olarak NO'nin böbrek dokusunda sentezinde

rol alan indükleyici nitrik oksit sentaz (iNOS)'ın ellagic asit tarafından engellenemediği düşünülmektedir.

Nikotinin direk veya indirek yollarla oksijen kaynaklı serbest radikal oluşumuna yol açtığı düşünülmektedir.²³⁹ Öncelikle nikotin, mitokondrial solunum zincirini bozarak süperoksit ve hidrojen peroksit oluşumunu artırır.²⁴⁰ Ayrıca, nikotin metabolizması sırasında sitokrom P450 monooksijenazlar oksijene ihtiyaç duymaktadırlar. Yine yüksek doz nikotinin hücre içi metabolizması sırasında sitokrom P450 enzim aktivitesi artmakta ve sonuçta serbest radikaller meydana gelmektedir.⁵⁸ Çalışmaların çoğu oksidatif strese bağlı böbrek hasarında lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA ve NO'nin artışı vurgulamaktadırlar. Gentamisin ile yapılan nefrotoksite çalışmalarında Vardı ve ark., kaffeik asit fenil esterler (CAPE)'i, Karahan ve ark.,'da lycopen'i MDA artışının engellenmesinde başarılı bir şekilde kullanmışlardır. Nakas-Icindic ve ark., gentamisin ile akut tubüler nekroz oluşturdıkları ratlarda kontrol grubuna oranla plazma NO seviyesi ve böbrek hasarını istatistiksel olarak yüksek bulmuşlardır.²⁴¹⁻²⁴³ Yine doksorubisin ile oluşturulan nefrotoksitenin engellenmesinde CAPE'nin lipit peroksidasyonu engelleme gücünü Yagmurca ve ark., değerlendirmişler, doksorubisin uygulanan ratların böbrek dokusunda NO ve MDA düzeylerini yüksek bulmuşlardır.²⁴⁴ Amrinonun koruyucu etkisini Çelik ve ark., vankomisin ile oluşturulan nefrotoksisitede değerlendirmişler ve vankomisin uygulanan grupta MDA değerlerinin arttığını gözlemlemişlerdir.²⁴⁵ Yine vankomisinle ilgili benzer sonuç Çetin ve ark., yaptıkları bir başka çalışmada da gözlemlenmiştir.²⁴⁶

Nikotin uygulaması ile yapılan pek çok çalışmada, MDA düzeylerinde artış, antioksidan enzimlerden SOD ve CAT aktivitelerinde ise azalma bildirilmiştir.²⁴⁷⁻²⁵² Sigara içenler ve içmeyenlerde lipid peroksidasyon düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmada, sigara

içenlerde plazma MDA düzeylerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Narin ve ark., gebelik ve laktasyon süresinde toplam 11 hafta nikotin uygulanan ratlarda MDA ile doku NO değerlerinde artma, miyokardiyal GSH-Px ve SOD değerlerinde azalma ve histopatolojik olarak miyokard liflerinde kalınlaşma, interstisyel ödem, disorganizasyon ve nekrozdan oluşan ağır kardiomyopati tesbit etmişlerdir.²¹⁸ Gallo ve ark., plasenta villuslarını in vitro olarak nikotine maruz bırakmışlar ve buna bağlı olarak MDA düzeylerinde anlamlı bir artışın olduğunu gözlemlemişlerdir.²⁵³ Ancak, mızrak prenatal dönemden itibaren postnatal 12. aya kadar devam eden oral yolla nikotin alımının hemolizat MDA düzeyleri ile SOD ve CAT gibi antioksidan enzim aktivitelerinde herhangi bir değişim meydana getirmediğini bildirmiştir.²⁵⁴ Literatürler arası sonuçlarda görülen bu değişiklikler nikotinin verilmiş biçimi, dozu ve süresi ile ilişkili farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir.

Daha öncede belirttiğimiz gibi endojen antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayanlar olarak ikiye ayrılmaktadır.¹³³ SOD ve GSH-Px gibi enzimler, oksijenin metabolize edildiği tüm hücrelerde serbest oksijen radikallerinin neden olacağı oksidan hasara karşı hücrenin en önemli endojen enzimatik savunma mekanizmalarını oluşturur. SOD, O₂⁻. H₂O₂'ye indirger. Hidrojen peroksit birikiminin en büyük tehlikesi organizmada savunma sistemi olmayan oldukça reaktif olan OH radikali oluşumuna sebep olmasıdır. Glutasyon peroksidaz, (GSSG) oluşumunda GSH enzimi aracılığıyla ortamda biriken H₂O₂ gibi etkin radikallerin indirgenmesini sağlar.

Antioksidan savunma sisteminin en güçlü enzimatik olmayan üyelerinden birisi olan GSH, tripeptid yapıda, karaciğer hücrelerinin sitoplazmasında sentezlenen enzimatik olmayan antioksidan bir maddedir. GSH eksikliğinde organizma oksidan saldırılara karşı duyarlı hale gelir. Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda hücrelerde serbest radikaller

sonucu oluşan oksidatif strese karşı GSH önemli bir savunma mekanizmasını oluşturmaktadır. Bu etkilerini doğrudan oksidanlara karşı hidrojen transfer ederek veya (GSH-Px) enzimi aracılığıyla (H_2O_2) suya ve oksijene dönüşümünde koenzim olarak yapmaktadır. GSH düzeyindeki azalma, hücrelerde serbest radikal hasarına karşı hassasiyeti arttırmaktadır.²³⁸ Bu enzimlerin aktiviteleri ksenobiyotiklere hafif derecede maruz kalındığında artmakta, maruziyet yüksek düzeylerde ise enzim aktivitelerinde inhibisyonlar oluşabilmektedir.²⁵⁵ Sunulan çalışmada, böbrek dokusundaki SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri ile GSH düzeyleri ölçülerek yavruların oksidatif stresten ne düzeyde etkilendiği araştırılmıştır. Yavruların böbrek dokusunda ölçülen SOD aktivitesinin kontrol grubuna ($4,68 \pm 0,41$ mikroU/mg protein) oranla sadece nikotin verilen grupta ($3,25 \pm 0,20$ mikroU/mg protein) oldukça azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) olduğu görüldü. Nikotin ile birlikte ellagic asit verilen ratların böbrek dokusundaki SOD enzim aktivitesi ($3,88 \pm 0,31$ mikroU/mg protein) ise sadece nikotin alan grupla karşılaştırıldığında ise daha yüksek olarak tespit edilmiştir.

Böbrek dokusunda GSH-Px aktivitesinin de SOD düzeylerine paralel bir şekilde arttığı ya da azaldığı tespit edilmiştir. Çünkü, ölçülen GSH-Px aktivitesi kontrol grubu ($2,95 \pm 0,30$ mikroU/mg protein) ile karşılaştırıldığında nikotinin tek başına verildiği grupta ($1,80 \pm 0,31$ mikroU/gr protein) önemli oranda azaldığı, ancak bu azalmanın ellagic asit ile birlikte nikotin verilen grupta ($2,34 \pm 0,01$ mikroU/mg protein) daha az olduğu tespit edilmiştir.

GSH sonuçları değerlendirildiğinde ise nikotin uygulanan grupta ($1,50 \pm 0,50$ μ mol/mg protein), kontrol grubuna göre ($3,00 \pm 0,58$ μ mol/mg protein) GSH değerlerindeki azalma net olarak görülmektedir. Buda böbrek dokusunda nikotine karşı oluşan

hassasiyetin bir göstergesidir. Ellagic asit + Nikotin grubunun böbrek dokusundaki GSH değerinde ($2,1 \pm 0,58 \mu\text{mol/mg protein}$) gözlemlediğimiz artış, nikotinin meydana getirmiş olduğu hassasiyete karşı ellagic asidin olumlu bir etkisinin olduğunu düşündürmektedir.

Antioksidan enzimlere ait sonuçlara bakıldığında annelerin nikotine maruz kalması yavru ratların böbrek dokusundaki antioksidan enzimlerin önemli derecede azalmasına neden olmaktadır. Ancak, nikotin alan gruplara ellagic asitin ilave edilmesiyle nikotinin neden olduğu antioksidan düzeylerdeki bu azalmanın şiddetini baskıladığı görülmüştür. Bu durum, ellagic asitin antioksidan gücüne bağlanmaktadır. Nitekim ellagic asitle yapılan pek çok oksidasyon çalışma onun antioksidan gücüne işaret etmektedir.

Ateşşahin ve ark., yaptığı çalışmada kemoterapötik bir madde olan cisplatinin böbrek dokusunda meydana getireceği hasarın engellenmesinde ellagic asitin koruyucu rolü incelenmiştir. Buna göre cisplatin verilen grupta böbrek dokusunda MDA konsantrasyonu artarken, GSH-Px ve CAT enzim aktiviteleri ise azalmıştır. Ellajik asit + Cisplatin grubunda ise bu MDA düzeyi azalırken antioksidan enzim düzeylerinde bir artış olduğu ve böylece ellagic asitin nefrotoksite ve oksidatif strese karşı koruyucu etki gösterdiğini belirlemişlerdir.²⁵⁶

Yüce ve ark., ellagic asitin oksidatif hasardan koruyucu etkilerini incelemiştir. Bunun için cyclosporine uygulanmış ratların böbrek, kalp ve karaciğer dokularında MDA aktivitesinin arttığını, GSH, GSH-Px ve CAT enzim aktivitelerinin ise azaldığı gözlenmiştir. Cyclosporine uygulanması öncesinde ellagic asit verildiğinde ise söz konusu dokularda MDA artışlarının daha az olduğu, GSH,GSH-Px,CAT enzim aktivitelerinin ise daha az düştüğü görülmüştür.²⁵⁷ Aynı araştırmacı ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada ise yine cisplatin verilerek oksidatif stres oluşturulan ratların karaciğer ve kalp

dokularında MDA aktivitesi artarken GSH, GSH-Px ve CAT enzim aktivitelerinin azaldığı, Ellajik asit+Cisplatin uygulamasında ise MDA düzeyinde azalma, antioksidan düzeylerinde ise bir artış gözlenmiştir.²⁵⁸

Bohn ve ark., cocaine ve oksijen verilen ratlarda ellagic asitin etkilerini gözlemlemiştir. Cocain verilen ratlarda GSH aktivitesinin düştüğü, sadece Cocain + Oksijen verilen grupta GSH seviyesinin değişmediği, Cocain+Ellagic asit verilen grupta ise ellagic asitin cocainin neden olduğu bu zararlı etkiyi önlediği gözlemlenmiştir.²⁵⁹

Hassoun ve ark., yaptığı çalışmaya göre 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) uygulanmış ratlarda Ellagic asit ve E vitamininin koruyucu etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak TCDD ile beraber vitamin E ve ellajik asit uygulamaları sonucunda beynin farklı bölgelerinden alınan dokularda GSH, GSH-Px SOD ve CAT gibi antioksidan enzim düzeylerinin arttığı görülmüş olup bu durum ellagic asitin vitamin E kadar etkili bir antioksidan koruma gücüne sahip olduğunu göstermektedir.²⁶⁰

Ellagic asitle ilgili yukarıda verilen çalışmaların dışında nikotinin çeşitli dokularda lipid peroksidasyon düzeylerinde oluşturduğu artış, antioksidan parametrelerde ise azalma ve bunların engellenmesine yönelik olarak çeşitli antioksidan maddelerle yapılmış pekçok çalışmalar da bulunmaktadır.

El-Sokkary ve ark., yaptığı bir çalışmada kronik nikotin uygulanan ratların akciğer ve karaciğer dokularında melatoninin koruyucu etkileri incelenmiştir. Nikotin uygulanan ratlarda (LPO)'un arttığı, GSH düzeyi ile SOD aktivitesinin azaldığı, nikotinle beraber melatonin uygulanan grupta ise LPO'nun azaldığı, GSH düzeyi ve SOD aktivitesinin ise normale döndüğü gözlenmiştir.²⁴⁹

Süleyman ve ark., nikotin verilen ratlarda *hippophae rhamnoides L.* bitkisinin etkilerini incelemek amacıyla yapmış oldukları çalışmada nikotin grubuna bitki ekstresi ve E vitamini verildiğinde MDA seviyesinin arttığı, nikotin grubuna bitki verildiğinde SOD aktivitesinin düştüğü, nikotin grubuna E vitamini verildiğinde ise GSH-px aktivitesi arttığı belirlenmiştir. Yine ratlarda eritrosit GSH-Px ve SOD enzim aktivitelerinin nikotin uygulanmasına bağlı olarak azaldığı ve bu azalmanın vitamin E ile engellendiğini bildirilmiştir.²⁶¹

Gümüştekin ve ark., nikotin uygulanan ratların beyin dokusunda MDA düzeyinin arttığını bu artışın vitamin E tarafından engellendiğini ancak *Hippophea rhamnoides* bitkisinin engelleyemediğini bildirmektedir. Aynı çalışmada GST ve GSH-Px enzim aktivite düzeylerini nikotin uygulanan gruplarda düşük olarak bulunurken, SOD aktivitesinde herhangi bir değişim tespit edilememiştir. Antioksidan enzimlerdeki düşmenin yağda eridiği ve bu yüzden beyin dokusuna rahatça geçmesinden dolayı vitamin E uygulanmasıyla azaldığı tespit edilmiştir.²⁶² Yine Gümüştekin ve ark., yaptığı bir diğer çalışmada ise nikotinin kalp kasında MDA düzeyini artırdığı, SOD ve GSH-Px düzeylerinde ise azaldığını tespit etmişlerdir. Aynı bitki ekstraktının kalp kasındaki MDA düzeyindeki artışları baskımlarken, diğer antioksidan enzi düzeylerini ise yükselttiği tespit edilmiştir.²⁶³

Erat ve ark., yaptıkları bir çalışmada ratlara i.p. olarak 0.5 mg/kg/gün dozunda nikotin uygulamışlar ve çeşitli dokulardaki GR enzim aktivite düzeylerine vitamin E nin etkilerini hem in vivo hem'de in vitro olarak incelemişlerdir. Glutatyon redüktazın in vivo aktivitesi nikotin tarafından karaciğerde % 61.5, akciğerde % 65, kalpte %70.5, mide %72.5, böbrekte % 64, testiste % 71.5 ve beyinde %11.8 oranında engellediği

gözlemlenirken, kasları etkilemediği gözlemlenmiştir. Vitamin E uygulaması ile nikotinin neden olduğu bu enzim düşüşlerinin önüne geçilirken, testis dokusundaki düşüşe herhangi bir etkisinin olmadığı görüldü.²⁶⁴ Bu çalışmadan elde edilen in vitro sonuçlarda in vivo sonuçları destekler nitelikteydi.

Şener ve ark., yaptığı bir çalışmada kronik nikotin uygulanan ratların böbrek ve mesanelerinde β -glukanın koruyucu etkisi incelenmiştir. Kronik nikotin uygulanan grupların böbrek ve mesane dokularında GSH aktivitesinin düştüğü, MDA aktivitesinin ise arttığı gözlemlenmiştir. β -Glukan verildiğinde ise GSH seviyesinin kontrol grubuna yaklaştığı ve MDA aktivitesininde azaldığı gözlemlenmiştir.²⁶⁵

Nikotinin neden olduğu fetal böbrek hasarı ile ilgili şu ana kadar yapılmış bir kaç adet çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda böbrek tubul hücrelerinde vakuolizasyon, tubuler dilatasyon, nekroz alanları, hücreler arası kanama gibi bulgular rapor edilmiştir.²⁴⁸⁻²⁶⁵ Nikotin uygulamalarının yetişkin ratlarda meydana getirdiği hasarla ilgili olarak yapılan çalışmalarda da yine benzer histolojik bulgular kaydedilmektedir.^{248, 266 - 268} Bizim histolojik verilerimiz bu çalışmalarda elde edilen bulgulardan farklı olarak korteks ve medullada gelişim yetersizliği ve henüz farklılaşmamış mezenşimal hücre toplulukları tespit edilmiştir.

Nikotin ile oluşturulan böbrek hasarlarının engellenmesinde, *Andrographis paniculata* Nee,²⁶⁹ beta glukan,²⁶⁵ hesperidin²⁷⁰ taurin^{271 -272} ve soğan yağı²⁷³ gibi bazı antioksidan maddeler kullanılmış, koruyucu ve iyileştirici rolü olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada da nikotin ile birlikte ellgic asit uygulanan gruba ait böbreklere yapılan histolojik incelemede gelişimin nikotin uygulanan gruba göre daha ileri aşamada olduğu, özellikle glomerulus ve proksimal tubullerin belirgin bir şekilde oluştuğu tespit edilmiştir.

Fizyolojik hücre ölümü olarak tarif edilen apoptozis, hem çekirdek hem de sitoplazma ile ilgilidir. Morfolojik olarak hem sitoplazmanın hem de kromatinlerin yoğunlaşması şeklinde karakterize edilir. Apoptozis, apoptotik aktivatör faktör, BAX, BAD, BID faktörleri aracılığıyla yaşam öncül proteinlerinden adaptör proteinleri uzaklaştıran mekanizmalarla aktive edilir. Apoptozise uğrayan hücreler büzülür hacminin 1/3'ünü kaybeder, plazma zarında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır.²⁷⁴⁻²⁷⁵ Apoptotik mekanizmalarda, kaspazlar (Cas-3, 8, 9 gibi), BAX ve Bcl-2 enzimleri önemli etkiye sahiptirler. BAX enzimi mitokondriyon membran geçirgenliğini artırarak sitokrom C gibi kaspaz aktivatörlerinin sitoplazmada artışına neden olurlar. Sonuçta, mitokondriyal disfonksiyon, hücre membran yapısındaki fosfolipidlerin yer değiştirmesi, apoptotik sitoplazma boğumlanmaları, kromatin yoğunlaşmaları sonucunda hücre ölümü gerçekleşmektedir. Diğer yandan, Bcl-2 ise hem antiapoptotik (Bcl-x_L, mitokondriden sitokrom c salınımını engelleyerek apoptotik aktiviteyi önler) hem de proapoptotik (Bcl-x_S) etkili bir rol oynamaktadır.

Nikotinin *in vivo* böbrek ve sidik kesesi,²⁶⁶ karaciğer,²⁷⁶ kalp,²⁷⁷ akciğer,²⁷⁸ uterus,²⁷⁹ pankreas,²⁸⁰ dokularında, *in vitro* olarak Leydig,²⁸¹ damar endotel,²⁸² akyuvar²⁸³ ve akciğer A549 epitel hücrelerinde²⁸⁴ apoptosize neden olduğuyla ilgili olarak pek çok çalışma bulunmaktadır. Ancak bazı çalışmalarda ise nikotinin apoptozisi engellediği ya da düzenlediği de bildirilmektedir. Bu tutarsızlığın nedeni nikotinin etki mekanizmasının çalışılan ilgili dokularda veya yetişkinlerde farklı bir mekanizmayla etki göstermesine bağlanılmaktadır.²⁸⁵⁻²⁸⁹ Nikotin, hücrede beş alt ünitesi olan nikotinik asetilkolin reseptörleri aracılığıyla hücre zarında bulunan ligand kapılı Ca kanallarını aktive eder²⁹⁰

Yüksek Ca düzeyi hücre içi haberleşmenin bozulması ve organellerde hasar gibi apoptotik etkilerin ortaya çıkmasına neden olur.²⁹¹ Ayrıca, nikotin serbest oksijen radikallerinin aşırı üretilmesiyle oksidatif stresin meydana gelmesine de sebep olmaktadır.²⁹² Apoptotik hücre ölümünün en önemli nedenlerinden birisinin oksidatif stres olduğu ileri sürülmektedir.²⁹³ Zhao ve Reece'in yaptıkları araştırmaya göre, nikotinin embriyonel dönemde organlarda meydana getirdiği hasarların çoğu hücre içi kalsiyum artışı sonucu oluşan oksidatif strese ve devamında apoptosize bağlanmaktadır.²⁹⁴ Sunulan çalışmada, apoptotik aktiviteyi ölçmek için yapılan BAX immun boyamalarında gruplar arasında önemli bir fark olmadığı belirlendi. Elde edilen bu sonuçlara göre nikotinin apoptotik etkisinin BAX yoluyla olmayabileceği düşünüldü. Diğer yandan, sadece ellagic asit ve nikotin + ellagic asit uygulanan gruplara ait böbrek kesitlerindeki Bcl-x_L immun reaksiyonlarının nikotin grubuna göre çok yoğun boya aldığı belirlendi. Elde edilen bu verilere göre ellagic asitin antiapoptotik etkili Bcl-x_L protein sentezinde artışa neden olduğunu ve bu sayede nikotinin böbrek dokusunda oluşturduğu apoptozisi azaltmış olabileceği düşünüldü.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, nikotin alan annelerden doğan yavru ratlarda meydana gelen nefrotoksisite mekanizmalarından birisi oksidatif hasardır. Çünkü nikotin uygulanan gebe ratların yavrularına ait böbrek dokularındaki hasarın varlığı hem biyokimyasal olarak (kontrol grubuna göre MDA ve NO düzeylerinde artış, GSH, GSH-Px ve SOD gibi antioksidan enzim düzeylerinde ise düşüş) hem de immunohistokimyasal olarak tespit edilmiştir. Ancak, ellagic asit uygulaması ile nikotinin böbrekte oluşturduğu bu oksidatif stres ve histolojik değişiklikler engellenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar ile ellagic asit içeren doğal fenolik içerikli meyve ve sebzelerin gebelik sırasında alınmasının sadece nikotin alan annelerde değil aynı zamanda gebeliğin ilerlemesiyle yükselen oksidatif stresin azaltılmasında veya vücuttaki antioksidan enzim düzeylerinin artırılmasında önemli bir rolü olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Ness RB, Grisso JA, Hirschinger N. Cocaine and tobacco use and the risk of spontaneous abortion. *New England Journal Medicine*, 1999, 340: 333-339.
2. Kline J, Levin B, Kinney A. Cigarette smoking and spontaneous abortion of known karyotype. *American Journal of Epidemiology*, 1995, 141: 417-427.
3. Armstrong BG, McDonald AD, Sloan M. Cigarette, alcohol and coffee consumption and spontaneous abortion. *American Journal of Public Health*, 1992, 82: 85-87.
4. Li CQ, Windsor RA, Perkins L. The impact on infant birth weight and gestational age of cotinine-validated smoking reduction during pregnancy. *Journal of the American Medical Association*, 1993, 269: 1519-1524.
5. Walsh RA. Effects of maternal smoking on adverse pregnancy outcomes: Examination of the criteria of causation. *Human Biology*, 1994, 66:1059-1092.
6. Milberger S, Biederman J, Faraone SV. Is maternal smoking during pregnancy a risk factor for attention deficit hyperactivity disorder in children? *American Journal Psychiatry*, 1996, 153: 1138-1142.
7. Fried PA, Watkinson B, Gray R. Differential effects on cognitive functioning in 9-to 12-year olds prenatally exposed to cigarettes and marihuana. *Neurotoxicol Teratol*, 1998, 20: 293-306.
8. Fried PA, Watkinson B, Siegel LS. Reading and language in 9- to 12- year olds prenatally exposed to cigarettes and marijuana. *Neurotoxicol Teratol*, 1997, 19: 171-183.

9. Carmichael SL, Ahluwalia IB. Correlates of postpartum relapse. Results from the pregnancy risk assessment monitoring system. *American Journal Preventive Medicine*, 2000, 19: 193-196.
10. Fingerhut LA, Kleinman JC, Kendrick JS. Smoking before, during, and after pregnancy. *American Journal of Public Health*, 1990, 80: 541-544.
11. Lambers DS, Clark KE. The maternal and fetal physiologic effects of nicotine. *Semin Perinatol*, 1996, 20(2):115-126.
12. Mercelina-Roumans PE, Schouten H, Ubachs JM, Van Wersch JW. Cotinine concentrations in plasma of smoking pregnant women and their infants. *European Journal of Clinical Chemistry Clin Biochem*, 1996, 34:525– 528.
13. Ateşşahin A, Yılmaz S, Karahan İ, Çeribası AO, Karaoğlu A. Effects of lycopene against cisplatin-induce nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology*, 2005, 212 (2-3): 116-123.
14. Başaklar CA, Sönmez K. *Langman's medikal embriyoloji*, 7.Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 1995: 260-261.
15. Özer A, Özfiliz N, Erdost H, Zık B. *Veteriner Embriyoloji*, 3.Baskı. Ankara, Nobel Yayınları, 2007:229-230.
16. Yıldırım M, Okar i, Dalçık H. *Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi*, 6.Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2002:305.
17. Hassa O, Aştı NŞ. *Embriyoloji*, Ankara, 2010: 129-132.

18. Şeftalioğlu A. *Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi*, 3.Baskı. Ankara, Tıp Teknik Yayıncılık, 1998: 330-331.
19. Dursun N. *Veteriner Anatomi II*, 12.Baskı. Ankara, Medisan Yayın Serisi, 2007: 128-134.
20. Hatipoğlu TM. *Anatomi ve Fizyoloji*, 14.Baskı. Ankara, Hatipoğlu Basım Yayım San.Tic.Ltd.Şti. 2003: 217-219.
21. Ertaş N. Tavsan Böbreklerinde Intrarenal Dolaşımın Anatomisi. Fen Bilimleri Entitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Kayseri: Erciyes Üniversitesi, 2006.
22. Akaydın Y. Hindi (*Meleagris gallopavo*) Böbreğinin Yapısı Üzerinde Işık ve Elektron Mikroskopik Çalışmalar. Sağlık Bilimleri Entitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2004
23. Bahadır A, Yıldız H. *Veteriner Anatomi Hareket Sistemi & İçorganlar*, 3.Baskı. Bursa, Ezgi Kitabevi, 2010:263.
24. Karakuş A, Aycan K, Unur E, Ülger H, Ekinci N, Ertekin T, Hacıalioğulları M, Karaca Ö. Plastik enjeksiyon yöntemiyle insan ve koyun böbreklerin'de pelvis renalis'in karşılaştırılmalı anatomisi. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2005, 14(2): 104- 110.
25. Ozan H. *Anatomi*, 2.Baskı. Ankara, Nobel Tıp Kitabevi, 2004: 293.
26. İlhan Nİ. Yetişkin ve preadölesan ratlarda intramüsküler uygulanan nikotinin ürogenital sistem üzerine etkileri. Tıp Fakültesi Üroloji Anabilimdalı.Uzmanlık Tezi, Diyarbakır: Dicle Üniversitesi, 1998.
27. Sarsılmaz M. *Anatomi*, 1.Baskı, Ankara, Nobel Yayın Dağıtım, 2009: 180.

28. Kaya S. Plastik Enjeksiyon Yöntemiyle Koyun Böbreklerinde Toplayıcı Kanalların Anatomisinin İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Entitüsü, Anatomi Anabilim Dalı.Yüksek Lisans Tezi, Kayseri: Erciyes Üniversitesi,2007.
29. Erimoğlu C. *İnsan Anatomisi*, İstanbul Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Yayınları, 2010: 258.
30. Putz R, Pabst R. *Sobotta Atlas of Human Anatomy*, 12.Edition. 1994.
31. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi*, 1.Baskı. Ankara,Güneş Kitabevi, 1997: 394-398.
32. http://www.histolojiembriyoloji.tripod.com/urinary_kidney.pdf. 25.06.2011
33. Çimen A. *Anatomi*, 6.Baskı. Bursa,Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayınları, 1996: 439-441.
34. Yaman K. *Fizyoloji*, 3.Baskı. Bursa,Vipaş A.Ş. 1999: 413-418.
35. Aktümsek A. *Anatomi ve Fizyoloji İnsan Biyolojisi*, 2.Baskı. Ankara, Nobel Yayın Dağıtım, 2004: 404-408.
36. Noyan A. *Fizyoloji*, 17.Baskı. Ankara, Meteksan, 2008: 606.
37. Solakoglu S, Aytekin Y. *Temel Histoloji Tex & Atlas*. 11.Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi , 2009: 373-376.
38. Özer A, Girgin A, Alabay B, Liman N, Özfiliz N, Gülmez N, Özcan Z, Yörük M, Erdost H, Aslan Ş, Ergün L, Zık B. *Veteriner Özel Hsitoloji*, 1.Baskı. Ankara, Nobel Yayın Dağıtım, 2008: 201.
39. http://www.biyolojisesi.net/documents/bosaltim_sistemleri.html.25.04.2012
40. Eşrefoğlu M. *Renkli Resimli Genel ve Özel Histoloji*. Malatya, Ferya Matbaacılık, 2004: 252-258.

41. Üneri Ö, Tural Ü, Memik Çakın N. Şizofreni ve sigara içimi: Biyolojik bağlantı nerede? *Türk Psikiyatri Dergisi*, 2006, 17(1): 55-64.
42. Kalaycıyan A, Serdaroğlu S. Nikotin ve deri. *Dermatose*, 2005, 3: 127-133.
43. Guan Z, Yu FW, Nordberg A. Dual Effects of nicotine on oxidative stres and neuroprotection in PC12 cells. *Neurochemistry*, 2003, 43: 243-249.
44. Doğuç DK, Cüre M, Kara Y, Sütçü R, Delibaş N. Nikotinin sıçan hipokampüsünde lipid peroksidasyonu ve nitrik oksit düzeylerine etkisi. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2008, 6(3): 81-86.
45. Karaboyacı M. β Karbolin Alkaloitler İçin Ara Ürünlerin Sentezi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, 2004.
46. Doğan G, Bircan R. Bitkisel yem hammaddelerinde bulunan antibesleyici faktörler ve balıklar üzerine etkileri. *Journal of Fisheries Sciences*, 2009, 3(4): 323-332.
47. Balabanlı C, Albayrak S, Türk M, Yüksel O. Türkiye çayır meralarında bulunan bazı zararlı bitkiler ve hayvanlar üzerindeki etkileri. *S.D.Ü. Orman Fakültesi Dergisi*, 2006, 2: 89-96.
48. Yılmaz H, Akpınar E, Yılmaz H. Peyzaj mimarlığı çalışmalarında kullanılan bazı süs bitkilerinin toksikolojik özellikleri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 2006, 1: 1302-7085.
49. Gürkök T, Parmaksız İ, Boztepe G, Kaymak E. Haşhaş (Papaver somniferum L) Bitkisinde alkaloit biyosentez mekanizması. *Journal of Biotechnology Technology*, 2010, 2: 31-45.

50. Özata Ö, Kazkayası M. Sigaranın kulak burun boğaz hastalıklarının medikal ve cerrahi tedavisi üzerine etkileri. *KBB-Forum*, 2010, 9(2): 40-46.
51. Salomon A, Marcinowski KJ, Friedland R, Zagorski MG. Nicotine inhibits amyloid formation by the β Peptide. *Biochemistry*, 1996, 35: 13568-13578.
52. Başaloğlu HK, Başaloğlu H, Turgut M, Uysal A, Yurtseven ME. Ultrastructural effects of nicotine administration on sympathetic nervous system of adrenal gland medulla in rats: A qualitative study by electron microscopy. *Ege Tıp Dergisi*, 2003, 42(3): 149-153.
53. Ergun A, Oğuz E, Güven C, Can B, Erten F, Saran Y. Nikotinin ince yapı düzeyinde sıçanlarda beyin frontal korteksine etkisi. *S.D.Ü Tıp Fakültesi Dergisi*, 2007, 14(1):5-9.
54. Uğur M. Sigara bağımlılığı ve kadın. *İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri*, 2008, 62: 127-142.
55. Schulze J, Schroder E, Kahl HFG, Richter E. Effect of nicotine on cotinine on metabolism of 4-methylnitrosamino 1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in isolated rat lung and liver. *Naunyn Schmiedeberg's Archives Pharmacol*, 1998, 357: 344-350.
56. Öztuna F. Sigaranın Hücresel Etkileri. <http://www.egitlopedi.com> 2004.
57. Julius H, Comroe J. The Pharmacological actions of nicotine. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 1960, 60: 48-51.
58. Newman MB, Arendash G, Shytle D, Bickford P, Tighe T, Sanberg PR. Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. *Life Sciences*, 2002, 71: 2807-2820.
59. Yalçın Ç. Alzheimer Hastalığında Kolinomimetik Tedavisi. *Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2001, 1-15.
60. Cabadak H. Muskarinik asetilkolin reseptörlerinin dağılımı ve ilişkili sinyal iletim yolları. *Türk Biyokimya Dergisi*, 2006, 31: 141-150.

61. Sevinçok L. Depresyonda hücre içi bozukluklar. *Klinik Psikiyatri*, 2002, 4: 57-67.
62. Dileköz E, Ercan S. Alzheimer tedavisinde muskarinik ve nikotinik reseptörleri etkileyen ilaçların yeri. *Demans Dergisi*, 2002, 2: 84-87.
63. Kumargal D. İmidacloprid Nikotin ve Antagonistlerinin Kurbağa Periferik Sinirleri Üzerine Elektrofizyolojik Etkilerinin Araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Mersin: Mersin Üniversitesi, 2007.
64. Karabekiroğlu K. Nikotinik reseptörler nükleus akumbens ve dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu. *Bulletin of Clinical Psychopharmacology*, 2008, 18: 122-129.
65. Pekmez H, Kuş İ, Çolakoğlu N, Zararsız İ, Öğütürk M, Sarsılmaz M. Sıçanlarda sigara inhalasyonu sonucu prefrontal kortekste oluşan yapısal değişiklikler üzerine kafeik asit fenetil esterinin etkisi. *E.Ü Journal of Health Sciences*, 2004, 13(3): 18-25.
66. Ortells MO, Arias HR, Molecular mechanisms of nicotine dependence. *Journal of Pediatric Biochemistry*, 2010, 75-89.
67. Lukas RJ, Ke L, Bencherif M, Eisenhour CM. Regulation by nicotine of its own receptors. *Drug Development Research*, 1996, 38: 136-48.
68. Kumargal D, Çömelekoğlu Ü, Aşkın A. The effects of nicotine and its antagonist mecamylamine on skeletal muscle of frog. *Mersin Univ Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2008, 1(3): 14-20.
69. Sütçü R, Doğuç D, Aktürk O, Altuntaş İ, Delibaş N. Subkronik nikotin uygulamasının ratlarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitelerine etkisi. *S.D.Ü Tıp Fakültesi Dergisi*, 2006, 13(3): 17-20.
70. Tuncer D. *Sigaranın Ağız ve Diş Sağlığı Üzerine Etkileri*. Sağlık Bakanlığı Yayınları, Klasmat Matbaacılık, 2008, 9-10.

71. Mero N, Van Tol A, Scheek M, Van Gent T, Labeur C, Rosseneu M, Taskinen MR. Decreased postprandial high density lipoprotein cholesterol and apolipoproteins A-I and E in normolipidemic smoking men: relations with lipid transfer proteins and LCAT activities. *Journal of Lipid Research*, 1998, 39: 1493-1502.
72. Mızrak T, Kaya FA. Sigara kullanımının periodontal dokular üzerine olan etkisi. *Dicle Tıp Dergisi*, 2005, 32: 102-107.
73. Dane NL. Ratlarda Sigara Dumanı Nikotin ve Karbonmono Oksitin Kan Nitrik Oksit ve Endotelin-1 Seviyelerine Etkileri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2003.
74. McAllister C, Caggiula AR, Knopf S, Rose C, Miller AL, Donny EC. The effects of nicotine on the immune system. *Psychoneuro Endocrinology*, 1998, 28: 175-187.
75. Kaleli S. Sigaranın Sağlık üzerine zararlı etkileri. *Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 2010, 14: 39-56.
76. Hock CE, Passmore JD. Mechanism mediating canine renal vasoconstriction induced by nicotine infusion. *Life-Sciences*, 1985, 37 (21): 1997-2003.
77. Pawlik WW, Jacobson ED, Banks RO. Action of nicotine on renal function in dogs. *Proceedings Society Biology Medicine*, 1985, 178(4): 585-590.
78. Oruç Ş. Ratlarda Hamilelik Döneminde Verilen Nikotinin Neonatal Dönemde Molar Dişler Üzerindeki Etkisi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Diyarbakır: Dicle Üniversitesi, 1996.
79. Çolakoğlu N, Ozan E, Sönmez MF, Yılmaz S, Ozan G. Sigaranın karaciğerde oluşturduğu yapısal değişiklikler üzerine melatonin ve C vitaminin etkileri. *Fırat Tıp Dergisi*, 2005, 10(3): 108-112.

80. Coşkunol H, Ersoy AM. Madde Kullanımı İle İlişkili Bozukluklar. <http://www.tubim.gov.tr>. 1997.
81. Özkaya A. Oksidatif strese maruz bırakılmış ratlara verilen biochanin A'nın serumdaki bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkisi. *Doğu Anadolu Bölge Araştırmaları*, 2008, 1-5.
82. Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 2005, 3: 30-37.
83. Yurdakul Z. Oksijen ve Canlılar. <http://www.genbilim.com.tr>. 02 Mayıs 2010.
84. Akkuş İ. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*. Selçuk Üniversitesi Yayınları, 1995.
85. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2002, 33: 110-118.
86. Gökpinar Ş, Koray T, Akçiçek E, Göksan T, Durmaz Y. Algal antioksidanlar. *E. Ü Su Ürünleri Dergisi*, 2006, 23: 85-89.
87. Tunalı NK, Özkar S. *Anorganik Kimya*. Ankara, Gazi Kitabevi, 1999: 470-494.
88. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2004, 15(1-2): 91-96.
89. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabets mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi*, 2006, 31(2): 51-56.
90. Günaydın B, Çelebi H. Genel anesteziğin serbest radikaller ve antioksidanlarla ilişkileri. *Anestezi Dergisi*, 2003, 11(2): 87-98.

91. Mylarappa BN, Ramadas D, Leela S. Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Polyphenol-Enriched Curry Leaf (*Murraya Koenigii* L.) Extracts. *Food Chemistry*, 2008, 106: 720-728.
92. Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Hafezi S. Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turkish Journal of Biology*, 2008, 32: 43-49.
93. Alhan CC, Şan M. Kroner kalp hastalığı tedavisinde antioksidanlar yararlı mı? *Turkiye Klinikleri Journal Cardiology*, 2002, 15: 203-213.
94. Akkaya A, Şahin Ü, Ünlü M, Uygun N, Turgut E. Kronik obstruktif akciğer hastalığı olan olgularda eritrosit SOD düzeyleri araştırılması. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 1996, 3(3): 17-19.
95. Yapar SB. Alfa Lipoik Asidin Rat Karaciğer Homojenatlarında İndüklenmiş Lipid Peroksidasyonuna Etkisi. Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Edirne: Trakya Üniversitesi, 2006.
96. Akbal F, Balkaya N. Toksik organik kirleticilerin gideriminde ileri oksidasyon teknolojileri. *Yıldız Teknik Üniversitesi Dergisi*, 2002, 4: 47-55.
97. Yılmaz F. Desfluranın Antioksidan Etkinliğinin Propofol İle Karşılaştırılması. Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reaminasyon Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, 2006.
98. Halliwell B, Gutteridge MCJ. Oxygen toxicity, oxygen radicals transition metals and disease. *Biochemistry Journal*, 1984, 219: 1-14.
99. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: What role do they play in physical activity and health? *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 72: 637-646.

100. Kojo S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stres. *Current Medicinal Chemistry*, 2004, 11: 1041-1064.
101. Jornot L, Petersen H, Junod AF. Hydrogen peroxide –induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochemistry Journal*, 1998, 335: 85-94.
102. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen MT. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*, 1993, 90: 7915-7922.
103. Ören P. Malathion'un *Oreochromis niloticus*'ta Oksidatif Stres Kaynaklı Endokrin Bozucu Etkileri. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2009.
104. Kalefetoğlu T, Emekçi Y. The Effects of drought on plants and tolerance mechanism. *G.Ü Fen Bilimleri Dergisi*, 2005, 18(4): 723-740.
105. Toros DÜ. Kronik Hemodiyaliz Hastalarında Raloksifen Kullanımının Serbest Radikal Formasyonu ve Lipid Profili Üzerine Etkisi. Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum anabilim Dalı. Tıpta Uzmanlık Tezi, Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, 2005.
106. Carr AC, Van Der Beg JJM, Winterbourn CC. Chlorination of cholesterol in cell membranes by hypochlorous acid. *Archives Biochemistry Biophys*, 1996, 332: 63-69.
107. Aruoma IO. Free radicals oxidative stres and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, 1998, 75: 200-212.
108. Kuyumcu A, Polat Düzgün A, Özmen M, Besler T. The role of nitric okside in trauma and infection. *Turkish Journal of Trauma*, 2004, 10(3): 149-159.

109. Kim AR, Zou YN, Park TH, Shim KH, Kim MS, Kim ND, Kim JD, Bae SJ, Chio JS, Chung YH. Active components from *Artemisia İwayomogi* Displaying ONOO⁻ scavenging activity. *Phytotherapy Research*, 2004, 18: 1-7.
110. Altınışık M. Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar. http://www.mustafaaltınışık.org.uk_ 27 Nisan 2010.
111. Delibaş N, Özcankaya R. Serbest Radikaller. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 1995, 2(3): 11-17.
112. Del Rio LA, Pastori MG, Palma JM, Sandalio LM, Sevilla F, Corpas FJ, Jimenez A, Lopez-Huertas E, Hernandez JA. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiol*, 1998, 116: 1195-1200.
113. Kavas Özelçi G. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri*, 1989, 9: 1-8.
114. Erden M. Serbest radikaller. *Turk Klinik Tıp Bilimleri*, 1992, 12: 201-207.
115. Pei J, Li, X. Xanthine and hypoxantine sensors based on xanthine oxidase immobilized on a CuPtCl₆ chemically modified electrode and liquid chromatography electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta*, 2000, 414: 205-229.
116. Çete S, Arslan F, Yaşar A. Investigation of antimicrobial effects aganist some microorganisms of Aloe Vera and Nerium Oleander Also examination of the effects on the xantine oxidase activity in liver tissue treated with cyclosporin. *G. U. Journal of Science*, 2005, 18 (3): 375-380.
117. Konukoğlu D. *Tus Hazırlık Biyokimya*. Nobel Tıp Kitabevleri. 2000: 427-435.
118. Ak A, Oto A. Oksijen Serbest radikalleri ve kalp hastalıkları. *Türkiye Klinikleri Kardiyoloji*, 1988, 1: 35-39.

119. Guemouri L, Artur Y, Herbert B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clinical Chemistry*, 1991, 37: 1932-1937.
120. Öncü M, Gültekin F, Karagöz E, Altuntaş İ, Delibaş N. Klorprifos-Etil tarafından oluşturulan oksidatif hasarın sıçan karaciğerine etkileri. *Turk Klinik Journal Medicine Sciences*, 2002, 22: 50-55.
121. Patat S, Akça H, Kaleli S, Karakoyun İ, Koçak A, Gültekin F. Kloroprifos-etil'in HEPG2 hücre dizilerinde hücre canlılığına etkisi ve melatonin koruyucu etkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2003, 10: 39-43.
122. Keskin D, Karsan O, Ezirmik N, Çiftçioğlu A. Tavşanlarda kırık iyileşmesi üzerine alfa-tokoferolün etkisi. *Experimental Research*, 1999, 10: 207-210.
123. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews*, 2000, 32: 307-26.
124. Kayalı R, Çakatay U. Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. *Cerrahpaşa Journal Medicine*, 2004, 35: 83-89.
125. Akpoyraz D, Durak İ. Serbest radikallerin biyolojik etkileri. *The Journal Of The Faculty Of Medicine*, 1995, 48: 253-262.
126. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging disease and oxidative stres. *Journal Biology Chemistry*, 1997, 272 (33): 20313-20316.
127. Aşıcıoğlu Y.T. Sıçanlardaki Kronik Alkolik Karaciğer Hasarına Likopenin Etkisi. Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü. Uzmanlık Tezi, İstanbul: 2005.

128. Gürer R. İdiopatik Parkinson Hastalığı Etyopatogenezinde Seruloplazminin yeri ve Proton MR Spektroskopisi İle Verifikasyonu. Göztepe Eğitim ve Araştırma hastanesi, Nöroloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul: 2005.
129. Yarsan E. Lipid peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar. *Yüüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1998, 9(1-2): 89-95.
130. Yılmaz S, Bahçecioğlu İH. Karbontetraklorür ile siroz oluşturulmuş ratlarda lipid proksidasyonu antioksidant enzim ve pirüvat kinaz aktiviteleri. *Türk Journal Veterinary Animal Sciences*, 2000, 24: 25-28.
131. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stres, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 2003, 189: 41-54.
132. Canbay E, Çelik K, Dökmetaş S, Karadayı K, Turan M, Keleştemur F, Şen M. Tiroid kanserli hastalarda değişen antioksidan enzim aktivitesi ve lipid peroksidasyonu. *C.Ü Tıp Fakültesi Dergisi*, 2003, 25(9): 151-156.
133. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim*, 2010, 5-13.
134. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reactive oxygen particles and antioxidant defence. *Office Journal of the Turkish Nephrology*, 1997, 3: 92-95.
135. Hallıwell B. Vitamin C: Antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radical Research*, 1996, 24: 439-454.
136. Ito N, Hirose M. *Advences Cancer Research*. Academic Pres Inc. 1989; 247-293.
<http://www.google.com.tr//books?Antioxidants>
137. Yüce A, Aksakal M. Ratların karaciğer ve testis dokusundaki antioksidan aktivite üzerine nar suyunun etkisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2007, 21(6): 253-256.

138. Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*, 1999, 32: 595-603.
139. Kurutaş BE. Endosulfanın fare eritrosit antioksidan sistemleri ve malondialdehit düzeyleri üzerine etkisi. *Ç.Ü Tıp Fakültesi Dergisi*, 2001, 26:14-19.
140. Gonzales R, Aurclair C, Voisin E, Gautero H, Dherny D, Boivin P. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer Research*, 1984, 44: 4137-4139.
141. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year. A historical look to the future. *Annals New York Academy of Sciences*, 2000, 136-147.
142. Weiting NI, Trelease NR, Eising R. Two temporally synthesized charge subunits interact to form the five isoforms of cottonseed (*Gossypium hirsutum*) catalase. *Biochem Journal*, 1990, 269: 233-238.
143. Kunc MC, Trelease RN. Heterogeneity of catalase in maturing and germinated cotton seeds. *Plant Physiol*, 1986, 81: 1134-1139.
144. Sayılan G. Streptozotosin İle Diyabet Geliştirilmiş Sıçanlarda L-Karnitin Protein Oksidasyonu. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Edirne: Trakya Üniversitesi, 2008.
145. Aksoy Y, Balık M, Ögüş H, Özer N. The mechanism of inhibition of human erythrocyte catalase by azide. *Turkish Journal Biology*, 2004, 28: 65-70.
146. Oral B, George AJT, Haskard DO. Prevention of hydrogen peroxide and cisplatin induced apoptosis by intracellular catalase overexpression. *Turkish Journal Biology*, 2000, 24: 685-696.

147. Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Langebartels C, Montagu MV, Inze D, Camp WV. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ Plants. *The Embo Journal*, 1997, 16: 4806-4816.
148. Benzer F, Ozan TF. Fasciola Hepatica in enfekte koyunlarda lipid peroksidasyonu antioksidant enzimler ve nitrik oksit düzeyleri. *Turkish Journal Veterinary Animal Sciences*, 2003, 27: 657-661.
149. Beck MA, Esworthy RS, Chu FF. Glutathione peroxidase protects mice from viral-induced myocarditis. *The FASEB Journal*, 1998, 12: 1143-1149.
150. Hurst R, Bao Y, Jemth P, Mannervik B, Williamson G. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases. *Biochemistry Journal*, 1998, 332: 97-100.
151. Ulusu G, Erat M, Çiftçi M, Şakiroğlu H, Bakan E. Purification and characterization of glutathione reductase from sheep liver. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences*, 2005, 29: 1109-1117.
152. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive Oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, 31(11): 1287-1317.
153. Demir H, Erat M, Şakiroğlu H. In Vivo Effects of some antibiotics on glutathione reductase obtained from chicken liver. *Turkish Journal Veterinary Animal Sciences*, 2006, 30: 513-519.
154. Stocker R, Glazer AN, Ames BN. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Medical Sciences*, 1987, 84: 5918-5922.
155. Şener G, Şehirli AÖ, Şatıroğlu H, Uysal MK, Yeğen BÇ. Melatonin prevents oxidative kidney damage in a rat model of thermal injury. *Life Sciences*, 2002, 2977-2985.

156. Çam H. Sıçanlarda aspirin ile uyarılan gastritin önlenmesinde kafeik asit fenetil esterinin etkinliğinin araştırılması. Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, 2007.
157. Erolçay H. Kan kaybı sonrası sıvı tedavisi. *İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi*, 1997, 269-276.
158. Güneş H. Sitokinlerin hücre döngüsü üzerine etkileri. *Turkish Journal. Of Biology*, 1999, 23: 283-292.
159. Günel E, Çağlayan O, Çağlayan F. Serum D-lactate Levels as a Predictor of Intestinal Ischemia-reperfusion Injury. *Pediatric Surgery International*, 1998, 14(1-2): 59-61.
160. Durmuş AS, Ünsaldı E. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve kırık iyileşmesi. *Doğu Anadolu Bölge Araştırmaları*, 2005, 20-27.
161. Can A, Özçelik B, Güneş G. Meyve sebzelerin antioksidan kapasiteleri. http://www.agaclar.net/forum/pratik-bilgiler_06-01-2006.
162. Pamuk F. *Biyokimya*. . Ankara, Gazi Kitapevi Tic. Ltd. Şti, 2000: 129-146.
163. Telefoncu A. *Tıp ve Fen Bilimleri İçin Biyokimya*. Kırıkkaleli, Sermet Matbaası Arkadaş Tıp Kitapları, 1992: 255-263.
164. Gürbüz Y, Kamalak A, Çiçek T, Sakarya M. Doğal karotenoid kaynakları ve yumurta sarı rengi. <http://4uzbk.sdu.edu.tr> 05 Ağustos 2010.
165. Murray KR, Granner DK, Mayes PA, Radwell V. *Hücre dışı ve hücre içi iletişimin biyokimyası*. In Dikmen N, Özgünen T, eds. *Harper Biyokimya*. Nobel Tıp Kitapevleri, 2004: 639-642.

166. Kurumlu Z, Çelebi CR. Yara İyileşmesi ve Beslenme. <http://www.dermaneturk.com>. 05 Ağustos 2010.
167. Salman E, Bayraktaroğlu M, Doğan OV, Yörkoğlu Y, Yücel E, Kösebalaban Ş, Özer N. Askorbik asitin serbest oksijen radikal temizleyicisi olarak açık kalp cerrahisinde kullanımı. *GDK Cerrahi Dergisi*, 1994, 2: 216-220.
168. Kundak AA, Erbaş H, Gülen Ş, Dökmeci G, Çelik H, Özcan T. C ve E vitaminlerinin kronik olarak alkolle beslenen sıçanlarda beyin dokusu arjinaz aktivitesi, ornitin ve üre düzeylerine etkileri. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2007, 24(1): 49-55.
169. Carr A, Frei B. Does Vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *The FASEB Journal*, 1999, 13:1007-1023.
170. Üstündal MK, Karaca L, Türköz Y, Testereci H, Kuş S, Paşaoğlu H. *Biyokimya*. Malatya, Medipress Matbaacılık Ltd. Şti. 2003.
171. Yüce A, Aksakal M. Ratlarda homosisteinin oksidan ve antioksidan sistem ile koroner damarlarda oluşturduğu değişiklikler üzerine E vitaminin etkisi. *F. Ü Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2006, 20(3): 189-197.
172. Keha E, Küfrevioğlu İ. *Biyokimya*. Erzurum, Aktif Yayınevi, Bakanlar Matbaacılık Ltd. Şti. 2000; 212-251.
173. Önenç S, Açıkgöz Z. Aromatik bitkilerin hayvansal ürünlerde antioksidan etkileri. *Hayvansal Üretim*, 2005, 46(1): 50-55.
174. Akbayır N. Mide Kanseri ve diyet arasındaki ilişkiler. *Güncel Gastroloji*, 2004, 8: 241-247.
175. Yeşilbağ D. Kanatlı beslenmesinde doğal ve sentetik antioksidanların kullanımı. *Uludağ University Journal of Faculty. Veterinary Medicine.*, 2009, 2: 55-59.

176. Yılmaz İ. Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres. İnönü Üniversitesi *Tıp Fakültesi Dergisi*, 2010,17(2): 143-153.
177. Köken T, Kahraman A, Serteser M, Gökçe Ç. Hemodiyaliz ve oksidatif stres. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 2004, 5: 9-13.
178. Sevim S, Ünal Ö, Tamer L, Doğu O, Özge A. Can serum levels of copper and zinc distinguish alzheimers patients from normal subjects. *Journal of Neurological Sciences*, 2007, 24(3): 197-205.
179. Orhan Z, Köksal N, Gökırmak M, Hacıevliyagil SŞ, Hasanoğlu HC, Mehmet N, Yıldırım Z. KOAH Akut alevlenmesinde oksidatif stres ve tedavinin oksidan-antioksidan denge üzerine etkisi. *Solunum Hastalıkları*, 2003, 14: 5-10.
180. Halifeoğlu İ, Karataş F, Çolak R, Canatan H, Telo S. Tip 2 Diyabetik hastalarda tedavi öncesi ve tedavi sonrası oksidan ve antioksidan durum. *Fırat Tıp Dergisi*, 2005, 10(3):117-122.
181. Tekcan M. Oksidatif stres-antioksidan sistemler ve testis. *İnfertilite*, 131-136.
182. Yapışlar H, Aydoğan S, Aşcıoğlu Ö. Behçet hastalığında artan oksidatif stresin eritrosit deformabilitesi üzerine olan etkisi. *Erciyes Tıp Dergisi*, 2006, 28(4): 197-204.
183. Çakatay U, Kayalı R. Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 2006, 37: 162-167.
184. Özkaya A, Çelik S, Yüce A, Şahin Z, Yılmaz Ö. The effect of ellagic asit on some biochemical parameters in the liver of rats aganist oxidative stress induced by aluminum. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2010, 16(2):263-268.

185. Priyadasina-Indira K, Khopde S.M, Kumar S, Mohan H. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 2002, 50:2200-2206.
186. Bala I, Bhardwaj V, Hariharan S, Ravi-Kumar MNV. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *Journal of Farmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 40: 206-210.
187. Meyer AS, Heinonen M, Frenkel EN. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*, 1998, 61: 71-75.
188. Çam M, Hışıl Y. Basınçlı Solvent Ekstraksiyonu ve Uygulamaları. *Gıda Teknolojisi Dergisi*, 2006, 3: 79-86.
189. Kafkas E, Bozdoğan A, Burgut A, Türemiş N, Kargı S, Cabaroğlu T. Bazı üzümü meyvelerde toplam fenol ve antosiyanin içerikleri. <http://www.uzumsu.com/incele-makaleler=305> 2006.
190. Özdemir F, Topuz A, Şahin H, Gölükçü M. Andız pekmezinin fenolik madde içeriği ve fonksiyonel gıda olarak önemi. <http://www.kışhazırlıkları.blogspot.com> 2005.
191. Gök V, Kayacıer A, Telli R. Hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı antioksidanlar. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2006, 2: 35-40.
192. Huetz P, Mavaddat N, Mavri J. Reaction between ellagic acid and an ultimate carcinogen. *Journal Chemistry Information Modeling*, 2005, 45:1564-1570.
193. Özkaya A. Oksidatif Strese Maruz Kalan Ratların Bazı Biyokimyasal Parametrelerine Hesperetin ve Ellagik Asidin Etkisi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, 2007.

194. Çelik F. Çay (*Camellia sinensis*); İçeriği, sağlık üzerindeki koruyucu etkisi ve önerilen tüketimi. *Türkiye Klinikleri Journal Medicine Sciences*, 2006, 26: 642-648.
195. Karakurt H, Aslantaş R. Bitki renk maddelerinin oluşum ve değişim fizyolojisi. *Alatarım*, 2008, 7(2): 34-41.
196. Yıldız D. S. Enoant ve sağlık üzerine etkileri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2007, 1: 65-70.
197. Kamiloğlu Ö. Üzümlerde antosiyaninler ve biyosentezi. *Alatarım*, 2007, 6(1): 47-52.
198. Yılmaz E. İspir Şeker Fasülyesinden Elde Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2007.
199. Seeram NP, Lee R, Heber, D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum L.*) juice. *Clinica Chimica*, 2004, 348: 63-68.
200. Pehlivan M, Güleryüz M. Ahududu ve böğürtlenlerin insan sağlığı açısından önemi. *Bahçe*, 2004, 33(2):51-57.
201. Uzuner S. Nar Suyunda Farklı Üretim ve Depolama Koşullarında Ellajik Asit ve Toplam Antioksidan Aktivitelerindeki Değişimler. Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2008.
202. Khanduja KL, Gandhi RK, Pathania V, Syal N. Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. *Food And Chemical Toxicology*, 1999, 37: 313-318.

203. Devipriya N, Srinivasan M, Sudheer A, Menon VP. Effect of ellagic acid a natural polyphenol on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance a drug dose dependent study. *Singapore Medicine. Journal*, 2007, 48(4):311.
204. Karakoç A. Paraoksonaz Polimorfizmleri İletip 2 Diabetin Makro Ve Mikrovasküler Komplikasyonları Arasındaki İlişkinin Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilimdalı. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2008.
205. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbutric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 1979, 95:351-358.
206. Tietz F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione:Applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*, 1969, 27:502-522.
207. Fairbans VF, Klee GG. *Biochemical aspects of hematology*. İn:CoA.Burtis and E.R.Ashwood, Editors, Tietz Textbook of clinical Chemistry, Saunders, Philadelphia. 1999: 1991-2106.
208. Alp HH. Hiper ve Hipotiroidili Hastalarda Homosistein S-Adenozilmetiyonin ve Antioksidan Düzeyleri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilimdalı. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2005.
209. Donald EP, Valentina WN. Studies on the quantitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine*, 1967, (70): 158-169.
210. Sun Yi, Oberley LW, Ying Li. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 1988, 34(3):497-500.

211. Moshage H, Kok B, Huizange JR. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation. *Clinical Chemistry*, 1995, 41:892-896.
212. Bories P.N, Bories C. Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clinical. Chemistry*, 1995, 41(6):904-907.
213. Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye. *Binding Analytical Biochemistry.*, 1976, 72:248.
214. Çakalağaoğlu F. Doku takibi. *Aegean Pathology Journal*, 2005, 2: 29–34.
215. Çayır K, Karadeniz A, Şimşek N, Yıldırım A, Yıldırım S, Karakuş E, Kısa F, Kara A, Akkoyun HT, Şengül E. The pomegranate seed extract attenuates chemotherapy-induced acute nephrotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Journal of Medicinal Food*, 2011, 14(10):1254-1262.
216. Zeiher AM, Schachinger V, Minners J. Long –term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial function. *Circulation*, 1995, 1094-1100.
217. Heitzer T, Just H, Münzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation*, 1996, 96: 6-9.
218. Narin F, Yavaşcan S, Narin N, Akgün H, Baykan A, Üzüm K, Saraymen R. Yeni doğan ratlarda nikotin ile oluşturulan miyokardiyal hasarın biyokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirilmesi. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2006, 4(2): 49-57.
219. Kublay G, Terzioğlu F, Karatay G. *Gebelik ve Sigara*. 1. Baskı. Ankara, Klasmat Matbaacılık, 2008: 8-9.
220. Cimete G. Gebelikte madde kullanımının anne, fetus ve yenidoğan üzerine etkisi. *Atatürk Üniversitesi Hemşirelik Yüksek Okulu Dergisi*, 2002, 5(1): 68-77.

221. Alp H, Aytekin İ, Atakişi O, Ogün M. Ratlarda akut malathonin toksisitesinin neden olduğu oksidatif stres üzerine kafeik asit fenetil ester ve ellajik asitin etkileri. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*. 2011, 6(2): 117-124.
222. <http://www.unimedsaglik.com/erkeksagligi.htm>.12.12.2011
223. Schwartz MW, Woods SC, Porte JD, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*, 2000, 404 (6778): 661– 671.
224. Ernst M, Moolchan ET, Robinson ML.. Behavioral and neural consequences of prenatal exposure to nicotine. *Journal of American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 2001, 40 (6): 630– 641.
225. Hussein J, Farkas S, MacKinnon Y, Ariano R, Sitar D, Hasan S. Nicotine dose-concentration relationship and pregnancy outcomes in rat: Biologic plausibility and implications for future research. *Toxicology and Pharmacology*, 2007, 218: 1-10.
226. Marakoğlu K, Sezer E. Sivas'ta gebelikte sigara kullanımı. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2003, 25(4): 157-164.
227. Huang L, Hsiao S, Trzeciakowski J, Frye G, Winzer-Serhan U. Chronic nicotine induces growth retardation in neonatal rat pups. *Life Sciences*, 2006, 78:1483-1493.
228. Abreu-Villaca Y, Seidler FJ, Slotkin T. Does prenatal nicotine exposure sensitize the brain to nicotine-induced neurotoxicity in adolescence? *Neuropsychopharmacology*, 2004, 29 (8): 1440– 1450.
229. Chen WJ., Kelly R.B. Effect of prenatal or perinatal nicotine exposure on neonatal thyroid status and offspring growth in rats. *Life Science*, 2005, 76(11): 1249– 1258.

230. Vaglenova J, Birru S, Pandiella NM., Breese CR. An assessment of the long-term developmental and behavioral teratogenicity of prenatal nicotine exposure. *Behavioral Brain Research*, 2004, 150 (1–2): 159– 170.
231. Murrin L, Ferrer J, Zeng W, Haley N. Nicotine administration to rats: methodological considerations. *Life Science*, 1987, 40: 1699-1708.
232. Benowitz NL, Dempsey DA. Pharmacotherapy for smoking cessation during pregnancy. *Nicotine Tobacco Research*, 2004, 6(2): 189-202.
233. Sastry BVR., Chance MB., Hemontolor ME., Goddijn-Wessel TAW. Formation and retention of cotinine during placental transfer of nicotine in human placental cotyledon. *Pharmacol*, 1998, 57:104-116.
234. Kara E, Alpak H. Gelişme Dönemindeki Ratlarda Sigaranın Pelvis Morfometrisi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.
235. Kökçü A. Gebelik ve maternal sigara içimi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1988, 5(1): 99-105.
236. Armutcu F, Gürel A, Söğüt S. İn vitro şartlarda asetonun eritrosit membranı üzerine hemolitik etkileri. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 2004, 2(2): 17-20.
237. De Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of Free Radical Damage: Applications in Experimental Animals and in Humans. *Free Radical Biology Medicine*, 1999, 26: 202-226.
238. Karapehlivan M, Kart A, Yaman H, Atakişi E, Yapar K. Kazlarda Nigella Sativa (çörek Otu) tohumu uygulamasının plazma nitrik oksit, malondialdehit ve tam kan glutatyon düzeyleri üzerine etkisi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimler Dergisi*, 2011, 6(1):55-61.

239. Ryrfeldt A, Bannenberg G, Moldeus P. Free radicals and lung disease. *British Medical Bulletin*, 1993, 49(3): 588-603.
240. Zhi-Zhong G, Wen-Feng Y, Agneta N. Dual effects of nicotine on oxidative stress and neuroprotection in PC12 cells. *Neurochemistry International*, 2003, 43: 243-49.
241. Vardı N, Parlakpınar H, Öztürk F, Acet A. Gentamicin-induced nephrotoxicity and protective effect of caffeic acid phenethyl ester in rats. *Fundamental Clinical Pharmacology*, 2005, 19(2):173-177.
242. Karahan I, Atessahin A, Yılmaz S, Çeribası A.O, Sakin F. Protective effect of lycopene on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. *Toxicology*, 2005, 215:198-204.
243. Nakas-Icindic E, Avdagic N, Mijanovic M, Prasovic S, Zaciragic A, Hadzovic A, Tahirovic G. Nitric oxide in gentamicin-induced acute tubular necrosis in rats. *Bosnian Journal Basic Science*, 2005, 5(5):70-74.
244. Yagmurca M, Erdogan H, Iraz M, Songur A, Uçar M, Fadilloğlu E. Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent against doxorubicin nephrotoxicity in rats. *Clinical Chemistry Acta*, 2004, 348(1-2):27-34.
245. Çelik I, Cihangiroğlu M, İlhan N, Akpolat N, Akbulut HH. Protective effects of different antioxidants and aminone on vancomycin-induced nephrotoxicity. *Basic Clinical Pharmacology Toxicology*, 2005, 97(5):325-332.
246. Çetin H, Olgar S, Öktem F, Çiris M, Uz E, Aslan Ç and Özgüner F. Novel evidence suggesting an anti-oxidant property for erythropoietin on vancomycin-induced nephrotoxicity in a rat model. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 2007, 10:1440-1681.

247. Chattopadhyay K, Chattopadhyay BD. Effect of nicotine on lipid profile peroxidation antioxidant enzymes in female rats with restricted dietary protein. *Indian Journal Research Medicine*, 2008, 127: 571-576.
248. Özokutan B.H, Özkan U. K, Sarı İ, İnanç F, Gürdür E, Kılıç M. Effect of maternal nicotine exposure during lactation on breast-fed rat pups. *Biology of Neonate*, 2005, 88: 113-117.
249. El-Sokkary GH, Cuzzocrea S, Reither RJ. Effect of chronic nicotine administration on the rat lung and liver beneficial role of melatonin. *Toxicology*, 2007, 239: 60-67.
250. Kim SH, Kim JS, Shin HS, Keen CL. Influence of smoking on markers of oxidative stress and serum mineral concentrations in teenage girls in Korea. *Nutrition*, 2003, 19: 240-243.
251. Hilbert J, Mohsenin V. Adaptation of lung antioxidants to cigarette smoking in humans. *Chest*, 1996, 110: 916-200.
252. Hulea SA, Olinescu R, Nita S. Cigarette smoking causes biochemical changes in blood that are suggestive of oxidative stress: a case control study. *Journal Environ Pathol Toxicol Oncol*, 1995, 14: 173-180.
253. Gallo C, Renzi P, Laizzo S, Laizzo A, Piacente S, Festa M, Caputo M, Tecce F, Capasso A. Potential therapeutic effects of vitamin E and C on placental oxidative stress induced by nicotine an in vitro evidence. *The Open Biochemistry Journal*, 2010, 4:77-82.
254. Mızrak S. Pre-postnatal Nikotin Maruziyetinin Sıçanda Oksidan Stres ve Antioksidan Savunma Parametrelerine Etkisi. Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı. İzmir: . Ege Üniversitesi, 2010.

255. İlhan N. Deneysel olarak Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan koblarda oksidan ve antioksidan sistemin incelenmesi. Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilimdalı. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, 1998.
256. Ateşşahin A, Çeribaşı A, Yüce A, Balmus Ö, Çikim G. Role of ellagic acid aganist cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stres in rats. *Basic Clinical Pharmacology Toxicology*, 2006, 100: 121-126.
257. Yüce A, Ateşşahin A, Çeribaşı O. Amelioration of cyclosporine a-induced renal hepatic and cardiac damages by ellagic acid in rats. *Basic Clinical Pharmacology Toxicology*, 2008, 103: 186-191.
258. Yüce A, Ateşşahin A, Çeribaşı O, Aksakal M. Ellagic acid prevents cisplatin-induced oxidative stres in liver and heart tissue of rats. *Basic Clinical Pharmacology Toxicology*, 2007, 101:345-349.
259. Bohn A, Forsyth CS, Stoner GD, Reed DJ, Frank A. Effect of cocaine 95% oxygen and ellagic acid on the development and antioxidant status of cultured rat embryos. *Toxicology Letters*, 1998, 95: 15-21.
260. Hassoun EA, Vodhanel J, Holden D, Abushaban A. The effects of ellagic acid and vitamin E succinate on antioxidant enzymes activites and glutathione levels in different brain regions of rat after subchronic exposure to TCDD. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2006, 69: 381-393.
261. Süleyman H, Gümüştekin K, Taysı S, Keleş S, Öztasan N, Aktaş Ö, Altınkaynak K, Timur H, Akçay F, Akar S, Dane Ş, Gül M. Benefical effects of hippophae rhamnoides L. On nicotine induced oxidative stres in rat blood compared with vitamin E. *Biology Phamacutical Bulletin*, 2002, 25(9): 1133-1136.

262. Gümüştetin K, Altınkayak K, Timur H, Taysi S, Öztasan N, Polat F, Akçay F, Süleyman H, Dane Ş, Gül M. Vitamin E but rat Hippophea rhammoides L. prevented nicotine-induced oxidative stres in rat brain. *Human&Experimental Toxicology*, 2003, 22: 425-431.
263. Gümüştetin K, Taysi S, Alp H, Aktaş Ö, Öztasan N, Akçay F, Süleyman H, Akar S, Dane Ş, Gül M. Vitamin E and Hippophae rhamnoides L. Extract Reduce Nicotine-Induced Oxidative Stres in Rat Heart. *Cell Biochemistry and Function*, 2010, 28: 329-333.
264. Erat M, Çiftçi M, Gümüştetin K, Gül M. Effects of nicotine and vitamin E on glutathione reductase activitiy in some rats tissues in vivo and in vitro. *European journal of Pharmacology*, 2007, 554: 92-97.
265. Şener G, Toklu H, Çetinel S. B-Glucan protectsaganist chronic nicotine induced oxidative damage in rat kidney bladder. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2007, 23: 25-32.
266. Şener G, Şehirli Ö, İpçi Y, Çetinel Ş, Çıkler E, Gedik N. Chronic nicotine toxicitiy is prevended by aqueous garlic extract. *Plants Food for Human Nutrition*, 2005, 60: 77-86.
267. Suudher AR, Devipriya N, Vishwanathan P, Menon VP. Dose- response effect of ferulic acid aganist nicotine-induced tissue damage and altered lipid levels in experimental rats; a pathohistological evaluation. *Fundamental Clinical Pharmacology*, 2008, 22: 557-567.
268. Hua P, Wenguang F, Ji S, Rajj L, Jaimes EA. Nicotine worsens the severity of nephropathy in diabetic mice; implications fort the progression of kidney disease in smokers. *American Journal Physiol Renal Physiol*, 2010, 299: 32-39.

269. Neogy S, Das S, Mahapatra KS, Mandal N, Roy S. Amelioratory effect andrographis paniculata nees on liver, kidney, heart, lung and spleen during nicotine induced oxidative stres. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2008, 25: 321-328.
270. Balakrishnan A, Menon VP. Effect of hesperidin on nicotine toxicitiy and histopathological studies. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2007, 17: 233-239.
271. Şener G, Şehirli Ö, İpçi Y, Çetinel Ş, Çikler E, Gedik N, Alican İ. Protective effects of taurine aganist nicotine induced oxidative damage of rat urinary bladder and kidney. *Pharmacology*, 2005, 74: 37-44.
272. Şener G, Şehirli Ö, İpçi Y, Çetinel Ş, Çikler E, Gedik N, Alican İ. Taurine treatment protects aganist chronic nicotine –induced oxidative changes. *Blackwell Publishing Fundamental Clinical Pharmacology*, 2005, 19: 155-164.
273. Helen A, Krishnakumar K, Vijayammal PL, Augusti KT. Antioxidant effect of Onion Oil (*Allium cepa* Linn). on the damages induced by nicotine in rats as compared to alpha-tocopherol. *Toxicology Letters*, 2000, 116: 61-68.
274. Görür A. Hepatosellüler Karsinomda Apoptozis Mekanizması ve Bazı Benzimidazol Türevlerinin Hepatosellüler Karsinom Üzerine Etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Biyokimya Ana Bilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Mersin: Mersin Üniversitesi, 2010.
275. Söylemez F. Ülserli Hastaların Gastrik Epitelyum Hücrelerinde Epidermal Büyüme Faktörünün Apoptozis İle İlişkili Genlerin Ekspresyonu Üzerine Etkisinin İn–Vitro Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı. Doktora Tezi, Mersin: Mersin Üniversitesi, 2010.
276. Valenca SS, Gouveia L, Pimenta W, Cristóvão Porto L. effects of oral nicotine on rat liver stereology. *International Journal of Morphology*, 2008, 6(4):1013-1022.

277. Demiralay R, Gürsan N, Erdem H. The effects of erdosteine, N-acetylcysteine and vitamin E on nicotine-induced apoptosis of cardiac cells. *Journal Applied Toxicol*, 2007, 27(3):247-54.
278. Demiralay R, Gursan N, Erdem H. The effects of erdosteine, N-acetylcysteine, and vitamin E on nicotine-induced apoptosis of pulmonary cells. *Toxicology*, 2006, 219:197–207.
279. Patil SR, Ravindra R, Patil SR, Londonkar R, Patil SB. Nicotine induced ovarian and uterine changes in albino mice. *Indian Journal of Physiol Pharmacol*, 1998, 42: 503-8.
280. Holloway AC, Lim GE, Petrik JJ, Foster WG, Morrison KM, Gerstein HC. Fetal and neonatal exposure to nicotine in Wistar rats results in increased beta cell apoptosis at birth and postnatal endocrine and metabolic changes associated with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2005, 48:2661–2666.
281. Kim KH, Joo KJ, Park HJ, Kwon CH, Jang MH, Kim CJ. Nicotine induces apoptosis in TM3 mouse leydig cells. *Fertil Steril*, 2005, 83 (1):1093–1099.
282. Villablanca AC. Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro. *Journal Applied Physiol*, 1998, 84:2089–2098.
283. Mariggio MA, Guida L, Laforgia A, Santacroce R, Curci E, Montemurro P, Fumarulo R. Nicotine effects on polymorphonuclear cell apoptosis and lipopolysaccharide-induced monocyte functions. A possible role in periodontal disease? *Journal Periodontal Research*, 2001, 36: 32–39.
284. Ramage L, Jones AC, Whelan CJ. Induction of apoptosis with tobacco smoke and related products in A549 lung epithelial cells in vitro. *Journal Inflammation*, 2006, 3:3.

285. Aoshiba K, Nagai A, Yasui S, Konno K. Nicotine prolongs neutrophil survival by suppressing apoptosis. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 1996, 127:186–194.
286. Garrido R, King-Pospisil K, Son KW, Hennig B, Toborek M. Nicotine upregulates nerve growth factor expression and prevents apoptosis of cultured spinal cord neurons. *Neurosci Research*, 2003, 47: 349–355.
287. Hakki A, Friedman H, Pross S. Nicotine modulation of apoptosis in human coronary artery endothelial cells. *International Immunopharmacol*, 2002, 2:1403–1409.
288. Hejmadi MV, Dajas-Bailador F, Barns SM, Jones B, Wonnacott S. Neuroprotection by nicotine against hypoxia-induced apoptosis in cortical cultures involves activation of multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Molecular Cellular Neuroscience*, 2003, 24:779–786.
289. Liu Q, Zhao B. Nicotine attenuates beta-amyloid peptide-induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures. *British Journal Pharmacology*, 2004, 141:746–754.
290. Leonart S, Bertrand D. Neuronal nicotinic receptors: from structure to function. *Nicotine & Tobacco Research*, 2001, 3(3): 203-223.
291. Orrenius S, Zhivotovski B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Molecular Cellular Biology*, 2003, 4: 552-565.
292. Ermak G, Davies K. Calcium and Oxidative Stress: from Cell Death. *Molecular Immunology*, 2001, 38:713-721.
293. Yeşilkaya E. Endokrin bozucular. *Journal of Current Pediatrics*, 2008, 6:76-82.

294. Zhao Z, Reece E. Nicotine-induced embryonic malformations mediated by apoptosis from increasing intracellular calcium and oxidative stress. *Birth Defects Research*, 2005, 74:383-391.


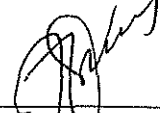
ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	Hurrem Turan AKKOYUN
Doğum Tarihi	20.03.1981
Doğum Yeri	Diyarbakır
Medeni Hali	Bekar
Uyruğu	T.C
Adres	Atatürk üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji ABD 25100 ERZURUM
Tel	0507 749 56 43 -0442 231 5546
Fax	
Email	TURANAKKOYUN@hotmail.com
EĞİTİM	
Lise	Doğanşehir Lisesi (1998)
Lisans	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi (2000-2004)
Yüksek Lisans	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Genel Biyoloji AD (2005-2007)
Doktora	Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji AD (2008-2012)
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	(ÜDS:60,00 2010 Sonbahar)

“2011. 2.1/18 “SAĞLIK BİLİMLERİ ETİK KURUL KARARI 27.04.2011

2.1/ 18- Enstitümüz Veteriner Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Hürrem Turan AKKOYUN’ un “ Fötal Dönemde Nikotine Maruz Kalan Sıçanlarda Oluşan Böbrek Hasarının Engellenmesinde Elajik Asitin Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi ” tez konusu görüşüldü;

İlgilinin tez konusunun etik değerlere uygun olduğu mevcudun oybirliği ile,

ADI SOYADI	GÖREVİ	İMZA
Prof.Dr.Türkan PASİNLİOĞLU	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkanı	
Prof. Dr. Funda BAYINDIR	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkan Yardımcısı	
Prof. Dr. İsmail CEYLAN	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof. Dr. Mustafa ATASEVER	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof. Dr. Zekeriya AKTÜRK	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof. Dr. H. İnci GÜL	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Doç. Dr. Hakan USLU	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Doç.Dr. Abdulkadir YILDIRIM	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Yrd. Doç. Dr. İlhan ŞEN	Raportör	