

TC
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BENZO(A)PİREN UYGULANAN SIÇANLARIN BAZI DOKULARINDA
ADRENOMEDULLİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ARZU DOĞRU

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİMDALI

MALATYA
TEMMUZ 2007

Tezin Başlığı: Benzo(A)Piren Uygulanan Sıçanların Bazı Dokularında Adrenomedullin Etkisinin Araştırılması

Tezi Hazırlayan : Arzu DOĞRU

Sınav Tarihi : 13.07.2007

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Akdeniz Üniversitesi



Prof. Dr. Murat ÖZMEN

İnönü Üniversitesi



Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ

İnönü Üniversitesi



Doç Dr. İsmet YILMAZ

İnönü Üniversitesi



Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL

İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Ali ŞAHİN
Enstitü Müdürü

Onur Sözü

Doktora Tezi olarak sunduğum “Benzo(a)piren Uygulanan Sıçanların Bazı Dokularında Adrenomedullin Etkisinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.



Arzu DOĞRU

ÖZET

Doktora Tezi

BENZO(A)PİREN UYGULANAN SIÇANLARIN BAZI DOKULARINDA ADRENOMEDULLİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Arzu DOĞRU

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

106 + x sayfa

2007

Danışman: Prof.Dr. Muhittin YÜREKLİ

Adrenomedullin (AdM), C-terminali amidlenmiş 52-amino asitlik halkasal yapıli peptid olup ilk kez insan feokromasitomadan izole edilmiştir. AdM dolaşımdaki bir hormon gibi rol alıp, çoklu biyolojik aktivitelerini parakrin ve otokrin tarzda başlatmaktadır. Son zamanlarda AdM'nin antioksidan özellikler gösterdiği ve hücreleri oksidatif hasardan koruduğu rapor edilmiştir.

Çevresel kirleticiler olan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar), canlılarda oksidatif strese yol açarlar. Benzo(a)piren (B(a)P) gibi PAH'ların bazıları canlılarda karsinogenik etkiler göstermektedir. Hava, su, toprak ve besinlerde bulunan B(a)P canlılar için oksidatif stres kaynağıdır.

Bu çalışmada, B(a)P'a maruz kalan sıçanların kalp, böbrekler, karaciğer ve akciğer dokularında AdM'nin antioksidan sistem üzerine etkisi araştırıldı. Wistar ırkı 30 erkek sıçan kontrol, yağ, AdM, B(a)P, ve B(a)P+AdM grubu şeklinde 5 deney grubuna ayrıldı. B(a)P mısır yağında çözöldü ve intraperitoneal olarak 50 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde tek dozda enjekte edildi. Yağ grubundaki hayvanlara da 50 mg/kg v.a. mısır yağı enjekte edildi. AdM uygulanan hayvanlara 7. ve 8. haftalarda olmak üzere (2 µg/kg v.a.) dozda iki hafta boyunca i.p, enjeksiyon yapıldı. Sıçan dokularında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri ve toplam glutatyon ve malondialdehit (MDA) seviyeleri belirlendi. Dokularda ayrıca nitrik oksit (NO) ve AdM seviyelerin ölçümü ile histolojik incelemeler yapıldı.

Çalışma sonunda B(a)P uygulaması genel olarak antioksidan enzim aktivitelerini azaltmış ve histopatolojik değişikliklere yol açmıştır. B(a)P+AdM uygulama gruplarında ise genel olarak antioksidan sistemde düzelme gözlenirken histopatolojik olarak kalp ve böbrek dokularında normale yakın görünömler elde edilmiş, ancak karaciğer ve akciğer dokularında B(a)P zararlı etkisini göstermeye devam etmiştir. Çalışmada B(a)P uygulama gruplarındaki AdM seviyelerinde artış tespit edilmiştir.

Sonuçlar bir bütün olarak değerlendirildiğinde AdM uygulamasının biyokimyasal ve histolojik parametreler üzerine hem yararlı hem de zararlı etkileri olduğu söylenebilir. Bu farklı deneysel sonuçlar doku özgülüğü, AdM uygulaması süresi ve konsantrasyonundan dolayı olabilir.

ANAHTAR KELİMELELER: Adrenomedullin, Benzo(a)piren, Nitrik oksit, Oksidatif stres

ABSTRACT

Ph.D.Thesis

THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF ADRENOMEDULLIN ON THE BENZO(A)PYRENE TREATED RATS IN SOME RAT TISSUES

Inonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

106 + x pages

2007

Supervisor: Prof.Dr. Muhittin YÜREKLİ

Adrenomedullin (AdM), a 52-amino acid ringed-structure peptide with C-terminal amidation, was originally isolated from human pheochromocytoma. AdM acts as a circulating hormone as well as elicits multiple biological activities in a paracrine or autocrine manner. Recently, it has been reported that AdM may possess antioxidant properties and protects cells from oxidative damage.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), environmental contaminants, cause oxidative stress in organisms. Some PAHs such as B(a)P cause carcinogenic effects in organisms. B(a)P, found in air, water, soil and food, is a oxidative stress source for organisms.

In this study, the effect of AdM administration was investigated on the antioxidant system in the heart, kidneys, liver and lungs of rats exposed to B(a)P. Thirty male Wistar rats were randomly assigned to one of five groups: control group, oil group, AdM group, B(a)P group, B(a)P+AdM group. B(a)P was dissolved in corn oil and a single 50 mg/kg body weight dose injected intraperitoneally. Oil group animals received 50 mg/kg b.w. corn oil only. In AdM-treated group animals received intraperitoneal (i.p.) injection of AdM (2 µg/kg body weight) for two week during 7th and 8th weeks. The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and the level of total glutathione and malondialdehyde (MDA) were determined in the tissues of rats. Also, nitric oxide (NO) and AdM levels and histological examinations in the tissues were determined.

In this study, B(a)P treatment generally decreased antioxidant enzyme activities and caused histological changes. B(a)P+AdM treatment generally restored antioxidant system and cause ameliorative effects in histopathological parameters in kidneys and heart, but no beneficial effects observed in liver and lungs. In the B(a)P administrated groups AdM levels were increased.

When the results are taken together adrenomedullin treatment has both ameliorative and deleterious effects on biochemical and histological parameters. These different experimental results may be due to tissue specificity, treatment of AdM concentration and duration.

KEYWORDS: Adrenomedullin, Benzo(a)pyrene, Nitric oxide, Oxidative stress

TEŞEKKÜR

Tez haline getirdiğim bu çalışmanın proje aşamasından itibaren bilgi birikimi ve deneyimlerini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ'ye,

Doktora tez çalışmam süresince bölüm imkanlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Murat ÖZMEN'e,

Çalışmalarında kimya bölümündeki laboratuvar imkanlarından faydalanabilmemi sağlayan Doç. Dr. İsmet YILMAZ'a, Dr. Burhan ATEŞ'e ve Ali ERDOĞAN'a,

Çalışmamın histolojik incelemelerinde yardımcı olan Prof. Dr. Mukaddes EŞREFOĞLU ve Dr. Mehmet GÜL'e,

Bu çalışmanın yürütülmesinde proje desteğinden dolayı İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (BAP 2004/19),

Tez çalışmamdaki tüm desteklerinden dolayı hayat arkadaşım Dr. M. İlker DOĞRU'ya

Tez aşamasındaki stresli anlarımı bana unutturan biricik oğlum Cankat DOĞRU'ya

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Benzo(a)piren.....	5
1.2. Serbest Radikaller.....	8
1.2.1. Oksijen ve oksijen radikalleri.....	9
1.3. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	12
1.3.1. Süperoksit dismutaz (SOD).....	14
1.3.2. Katalaz (CAT).....	15
1.3.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px).....	15
1.3.4. Glutasyon redüktaz (GR).....	15
1.3.5. Glutasyon (GSH).....	16
1.4. Nitrik Oksit ve Reaktif Nitrojen Türleri.....	16
1.5. Adrenomedullin (AdM).....	22
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	30
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	40
3.1. Deneylerde Kullanılan Sıçanlar.....	40
3.1.1. Benzo(a)piren uygulaması.....	40
3.1.2. Yağ uygulaması.....	40
3.1.3. Adrenomedullin uygulaması.....	40
3.1.4. Benzo(a)piren+Adrenomedullin uygulaması.....	41
3.2. Organların Alınması.....	41
3.2.1. Kalp, böbrek, akciğer ve karaciğer dokularının alınması ve homojenizasyonu.....	41
3.3. Toplam Protein Ölçümü.....	42
3.3.1. Toplam Protein Tayini.....	42
3.4. Enzim Aktivite Tayinleri.....	43
3.4.1. Süperoksit dismutaz aktivite tayini.....	43
3.4.2. Katalaz aktivite tayini.....	45
3.4.3. Se-Bağımlı glutasyon peroksidaz aktivite tayini.....	45
3.5. Toplam Glutasyon Miktarının Belirlenmesi.....	46
3.6. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi.....	47
3.7. Dokulardaki NO Konsantrasyonunun Tayini.....	48
3.8. Dokulardaki Adrenomedullin Seviyelerinin Tayini.....	49
3.9. Histopatolojik İnceleme.....	50
3.10. İstatistiksel Yöntem.....	50
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	51
4.1. Lipid Peroksidasyonu.....	52
4.2. Enzim Aktivitelerindeki Değişimler.....	55
4.2.1. SOD enzim aktivitesi.....	55
4.2.2. Katalaz enzim aktivitesi.....	58
4.2.3. GSH-Px enzim aktivitesi.....	61
4.3. Toplam Glutasyon Miktarı.....	64

.4.4.	NO Konsantrasyonu.....	66
4.5.	Adrenomedullin Seviyesi.....	68
4.6.	Histopatolojik Değişimler.....	71
4.6.1.	Kalp dokusu.....	71
4.6.2.	Böbrek dokusu.....	74
4.6.3.	Karaciğer dokusu.....	77
4.6.4.	Akciğer dokusu.....	80
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	85
6.	KAYNAKLAR.....	99
	ÖZGEÇMİŞ.....	106

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACTH	Adrenokortikotropik Hormon
AHH	Aril Hidrokarbon Hidroksilaz
AhR	Aril Hidrokarbon Reseptörü
AdM	Adrenomedullin
ANP	Artiyal Natriüretik Peptid
Arnt	AhR Nükleer Translokator
ATSDR	Toksik Maddeler ve Hastalık Kayıt Kurumu
AVP	Arjinin Vazopressin
B(a)P	Benzo(a)piren
BH ₄	Tetrahidrobiopterin
BPDE	Benzo(a)piren 7,8 diol-9,10-epoksid
BSA	Bovin Serum Albumin
cAMP	Siklik-Adenozin Monofosfat
CAT	Katalaz
cGMP	Siklik Guanidin Mono Fosfat
CGRP	Kalsitonin Gen İlişkili Peptid
Cu	Bakır
Co	Kobalt
DAN	2,3-Diaminonaftalin
DNA	Deoksi Nükleik Asit
DTNB	5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)
EDRF	Endotelyum Bağımlı Gevşetici Faktör
EH	Epoksit Hidroksilaz
EPA	Çevre Koruma Kurumu
ET-1	Endotelin-1
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
Fe	Demir
Fe ^{IV}	Ferril Demir
FMN	Flavin Mononükleotid
Fe ^V	Perferril Demir
FMN	Flavin Mononükleotid
GSH	Redükte Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GSSG	Okside Glutasyon
GST	Glutasyon-S-transferaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GTP	Guanidin Tri Fosfat
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HOCl	Hipoklorit
Hg	Civa
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu
L [•]	Lipid Radikali
LH	Yağ Asidi
LOO [•]	Lipit Peroksi Radikali
LOOH	Lipit Peroksit
MDA	Malondialdehit
Mn	Mangan

MPO	Myeloperoksidaz
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
Ni	Nikel
NO	Nitrik Oksit
NO ⁻	Nitrosil iyonu
NO ⁺	Nitrozonyum iyonu
NO ₂	Nitrojen Dioksit
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
N ₂ O ₃	Dinitrojen trioksit
N ₂ O ₄	Dinitrojen teroksit
NBT	Nitroblue Tetrazoliumu
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NTP	Ulusal Toksikoloji Programı
PAC	Polisiklik Aromatik Bileşikler
PAH	Poliaromatik Hidrokarbon
PAMP	Proadrenomedullin N-terminal 20 Peptid
PNA	Polinüklear Aromatikler
pO ₂	Oksijen Basıncı
RNA	Ribonükleik Asit
RNOT	Reaktif Nitrojen Oksit Türleri
ROO [•]	Peroksi Radikali
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
-SH	Tiyol Grubu
-SH	Sülfidril Grubu
SOD	Süperoksit Dismutaz
O ₂ ^{•-}	Süperoksit Radikali
¹ O ₂	Tekil Oksijen
O ₃	Ozon
OH [•]	Hidroksil Radikali
ONOO ⁻	Peroksinitrit
ONOOH	Peroksinitroz Asit
TBA	Tiobarbiturik Asit
TCA	Trikloroasetik Asit
TNB	5-thro-2-nitrobenzoat
VSCM	Vasküler Düz Kas Hücreleri
XO	Ksantin-Ksantin Oksidaz
Zn	Çinko

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	P450 1A'nın indüksiyon metabolizması.....	4
Şekil 1.2.	Benzo(a)piren'in kimyasal yapısı.....	5
Şekli 1.3.	B(a)P'in, benzo(a)piren 7,8 diol-9,10-epoksid (BPDE) olan karsinojen forma dönüşüm yolu.....	7
Şekil 1.4.	Benzo(a)piren'in DNA'ya bağlanması	8
Şekil 1.5.	Serbest oksijen radikallerinin hücreye verdikleri zararların şematik gösterilmesi	10
Şekil 1.6.	Lipid peroksidasyonuna yol açan reaktif türlerin oluşumu.....	11
Şekil 1.7.	Serbest radikallere karşı hücresel savunma sistemlerinin şematik olarak gösterilmesi.....	13
Şekil 1.8.	Nitrik oksit sentaz tarafından katalizlenen arjinin amino asitinden nitrik oksitin sentez basamakları.....	17
Şekil 1.9.	NO sentezi ve kofaktörleri.....	18
Şekil 1.10.	Peroksinitritin şekillenmesi ve aktivitesi.....	20
Şekil 1.11.	Hidrofobik kompartmanlardaki NO reaksiyonları.....	21
Şekil 1.12.	Adrenomüdülin geninin moleküler yapısı.....	24
Şekil 1.13.	AdM'nin reseptör kompozisyonu ve hücre içi sinyal yolu.....	25
Şekil 1.14.	AdM'nin biyolojik görevleri.....	27
Şekil 4.1.	Kalp dokusundaki MDA seviyesindeki değişimler.....	53
Şekil 4.2.	Böbrek dokusundaki MDA seviyesindeki değişimler.....	54
Şekil 4.3.	Karaciğer dokusundaki MDA seviyesindeki değişimler.....	54
Şekil 4.4.	Akciğer dokusundaki MDA seviyesindeki değişimler.....	55
Şekil 4.5.	Kalp dokusundaki SOD enzim aktivitelerindeki değişimler.....	56
Şekil 4.6.	Böbrek dokusundaki SOD enzim aktivitelerindeki değişimler.....	57
Şekil 4.7.	Karaciğer dokusundaki SOD enzim aktivitelerindeki değişimler.....	57
Şekil 4.8.	Akciğer dokusundaki SOD enzim aktivitelerindeki değişimler.....	58
Şekil 4.9.	Kalp dokusundaki CAT enzim aktivitelerindeki değişimler.....	59
Şekil 4.10.	Böbrek dokusundaki CAT enzim aktivitelerindeki değişimler.....	60
Şekil 4.11.	Karaciğer dokusundaki CAT enzim aktivitelerindeki değişimler.....	60
Şekil 4.12.	Akciğer dokusundaki CAT enzim aktivitelerindeki değişimler.....	61
Şekil 4.13.	Kalp dokusundaki GSH-Px enzim aktivitelerindeki değişimler.....	62
Şekil 4.14.	Böbrek dokusundaki GSH-Px enzim aktivitelerindeki değişimler...	62
Şekil 4.15.	Karaciğer dokusundaki GSH-Px enzim aktivitelerindeki değişimler.....	63
Şekil 4.16.	Akciğer dokusundaki GSH-Px enzim aktivitelerindeki değişimler..	63
Şekil 4.17.	Kalp dokusundaki toplam glutatyon seviyesindeki değişimler.....	64
Şekil 4.18.	Böbrek dokusundaki toplam Glutatyon seviyesindeki değişimler....	65
Şekil 4.19.	Karaciğer dokusundaki toplam Glutatyon seviyesindeki değişimler	65
Şekil 4.20.	Akciğer dokusundaki toplam Glutatyon seviyesindeki değişimler...	66
Şekil 4.21.	Kalp dokusundaki Nitrit Oksit konsantrasyonundaki değişimler.....	67
Şekil 4.22.	Böbrek dokusundaki Nitrit Oksit konsantrasyonundaki değişimler.	68
Şekil 4.23.	Kalp dokusundaki AdM seviyesindeki değişimler.....	69
Şekil 4.24.	Böbrek dokusundaki AdM seviyesindeki değişimler.....	70
Şekil 4.25.	Karaciğer dokusundaki AdM seviyesindeki değişimler.....	70
Şekil 4.26.	Akciğer dokusundaki AdM seviyesindeki değişimler.....	71
Şekil 4.27.	Kontrol grubu kalp dokusu.....	72
Şekil 4.28.	AdM uygulama grubu kalp dokusu.....	73
Şekil 4.29.	B(a)P uygulama grubu kalp dokusu.....	73

Şekil 4.30.	B(a)P+AdM uygulama grubu kalp dokusu.....	74
Şekil 4.31.	Kontrol grubu böbrek dokusu	75
Şekil 4.32.	AdM uygulama grubu böbrek dokusu.....	75
Şekil 4.33.	B(a)P uygulama grubu böbrek dokusu 1.....	76
Şekil 4.34.	B(a)P uygulama grubu böbrek dokusu 2.....	76
Şekil 4.35.	B(a)P+AdM uygulama grubu böbrek dokusu.....	77
Şekil 4.36.	Kontrol grubu karaciğer dokusu	78
Şekil 4.37.	AdM uygulama grubu karaciğer dokusu.....	78
Şekil 4.38.	B(a)P uygulama grubu karaciğer dokusu.....	79
Şekil 4.39.	B(a)P+AdM uygulama karaciğer dokusu.....	79
Şekil 4.40.	Kontrol grubu akciğer dokusu 1.....	80
Şekli 4.41.	Kontrol grubu akciğer dokusu 2.....	81
Şekil 4.42.	AdM uygulama grubu akciğer dokusu 1.....	81
Şekil 4.43.	AdM uygulama grubu akciğer dokusu 2.....	82
Şekil 4.44.	B(a)P uygulama grubu akciğer dokusu 1.....	82
Şekil 4.45.	B(a)P uygulama grubu akciğer dokusu 2.....	83
Şekil 4.46.	B(a)P+AdM uygulama grubu akciğer dokusu 1.....	83
Şekil 4.47.	B(a)P+AdM uygulama grubu akciğer dokusu 2.....	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Karsinojenik ve karsinojenik olmayan PAH'lar.....	2
Çizelge 1.2.	AdM ve homoloji gösterdiği peptidlerin amino asit sekansları.....	23
Çizelge 1.3.	İnsan ve Sıçan AdM Peptid Sekansları.....	24
Çizelge 3.1.	SOD aktivite tayininde kullanılan çözelti miktarları.....	44
Çizelge 3.2.	Glutasyon miktarı tayininde kullanılan çözelti miktarları	47
Çizelge 3.3.	NO miktarı tayininde kullanılan çözelti miktarları	49
Çizelge 4.1.	Adrenomedullin ve B(a)P uygulamasına bağlı olarak biyokimyasal parametrelerdeki değişimler.....	51- 52
Çizelge 4.2.	Adrenomedullin ve B(a)P uygulamasına bağlı olarak NO konsantrasyonundaki değişimler.....	66
Çizelge 4.3.	Adrenomedullin ve B(a)P uygulamasına bağlı olarak AdM seviyelerindeki değişimler.....	68

1. GİRİŞ

Modern insanın yaşam biçimi ve çevre kirliliğinden kaynaklanan sorunlar, insan sağlığını önemli boyutlarda tehdit edici düzeylere ulaşmıştır. Yediğimiz, içtiğimiz, kullandığımız ve günlük yaşam çevremizde sıkça maruz kaldığımız çoğu madde, insan sağlığına zararlıdır. Kuşkusuz bu tür zararlı maddelerin başında "kimyasal maddeler" gelmektedir. Teknolojik ve bilimsel gelişmeler, kısa bir süre önce zararsız kabul edilen birçok kimyasal maddenin, başta kanser olmak üzere bazı ölümcül hastalıklara, geriye dönüşsüz tahribatlara veya ciddi genetik bozulmalara neden olduğunu ortaya koymuştur. Maalesef söz konusu zararlı kimyasalların listesi her geçen gün biraz daha uzamaktadır [1].

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar) kömür, petrol, gaz, odun ve sigara dumanında ve mangalda pişirilen etler gibi organik maddelerin tamamlanmamış yanma sürecinde şekillenen, karbon ve hidrojen atomlarının oluşturduğu 2 veya daha fazla kaynaşmış aromatik zincir içeren, doğal ve aynı zamanda her yerde bulunan çeşitli organik bileşikler sınıfıdır [2-5]. PAH'lar polinükleer aromatikler (PNA) ya da polisiklik aromatik bileşikler (PAC) olarak da isimlendirilirler [2]. Molekül ağırlığı en düşük olan PAH naftalindir ($C_{10}H_8$) [6].

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar renksiz, beyaz veya sarı-yeşil renkli, katı maddelerdir [7]. PAH'lar nispeten yüksek erime ($66-439^{\circ}C$) ve kaynama ($96-218^{\circ}C$) noktalarına sahip olan, oda sıcaklığında katı maddelerdir. Sudaki çözünürlükleri çok azdır ve molekül ağırlığının artmasına bağlı olarak sudaki çözünürlükleri azalır. Genel olarak daha küçük PAH'ların ağır olanlara göre suda çözünürlükleri daha fazladır. Bu nedenle biyolojik sistemler için molekül ağırlığı küçük PAH'ların etkileri daha fazladır. Bununla birlikte PAH'lar organik materyaller ve partiküllere yüksek ilgi gösterirler, oldukça lipofiliktirler ve bundan dolayı çoğu organik çözücülerde çözünebilirler. Özellikle molekül ağırlığı yüksek olan PAH'ların uçuculuğu çok azdır [3, 8].

Toplum sağlığı ve hava kirliliği için PAH'ların önemi, deney hayvanlarında kansere neden olan çevredeki havada biriken partiküllerin organik ekstratlarının keşfedilmesi ile 1942'de fark edilmiştir [9,10].

Lipofilik yapılarından dolayı PAH'lar besinsel transferler boyunca biyolojik biyomagnifikasyon için yüksek bir potansiyele sahiptirler. PAH'ların aynı zamanda akut olarak toksik etkiler gösterdikleri ve/veya mutajenik, teratojenik ya da karsinojenik özellikleri bilinmektedir. PAH'ların moleküler boyutundaki artmaya bağlı olarak

çevredeki kalıcılığı artmaktadır. Buna ilave olarak en az dört beş benzen halkalı bazı örneklerde PAH'ların genotoksitesitesi de artar. Örneğin; beş halkalı molekül olan benzo(a)piren'in toprak ve sedimentlerdeki yarı ömrü 229 günden 1400 güne kadar değişim gösterirken, üç halkalı penantreninin sedimentlerdeki yarı ömrü 16 günden 126 güne kadar değişim gösterebilir [11].

Lipofilik özellikte olması nedeniyle PAH'lar akciğer, gastrointestinal sistem ve deri epitelyumu boyunca absorbe edilirler. Absorbe edildikten sonra kan dolaşımı ile bütün iç organlara yayılırlar. PAH'ların metabolizması karmaşıktır. Absorpsiyon; partiküllerin büyüklüğünden etkilenebilir. Absorpsiyondan sonra PAH'lar dokulara yayılır ki bu dokular, kimyasal olarak reaktif araçlara faz I metabolik enzimleri ile biyotransforme olur. İlk adımda PAH'lar epoksit, fenol ve dihidrodiol'lerin şekillenmesi için oksitlenirler (faz I metabolitleri). İkinci adımda bu metabolitler faz II enzimleri tarafından glutatyon, sülfat ya da glukoronik asitler ile konjuge olurlar. Böylece çok daha polar bir yapı kazanırlar ve suda çözünebilen metabolitler haline gelirler. Bu yol ile metabolize olan çoğu PAH etkinliğini kaybeder. Bununla birlikte bunların bazıları DNA'ya bağlanan türleri aktive ederek kanseri başlatabilirler. PAH'ların karsinojenik etki gösterip göstermeyecekleri sadece PAH'ların metabolik reaksiyonlarına ve PAH'lara bağlı değildir, aynı zamanda bu maddelere maruz kalan kişinin genetik yapısı ile de ilişkilidir. PAH metabolitleri ve onların konjugatları vücuttan idrar ve dışkı yolu ile hemen uzaklaştırılır. PAH'lar temel olarak feçes ile dışarıya atılırlar, sadece yaklaşık %10'u idrar ile dışarıya atılır [6, 8].

PAH'ların çoğu zararsız veya orta derecede toksik maddelerdir. Ancak bazıları karsinojeniklerdir. Çizelge 1. 1.'de karsinojenik ve karsinojenik olmayan PAH'lar gösterilmiştir [12].

Çizelge 1.1. Karsinojenik ve karsinojenik olmayan PAH'lar [12]

Karsinojenik PAH'lar	Karsinojenik olmayan PAH'lar	Karsinojenik olan ancak çevrede bulunma ihtimali olmayan PAH'lar
Benz(a)antren	Fenantren	Dibenz(a,h)akridin
Benzo(b)fluorantren	Piren	Dibenz(a,j)akridin
Benzo(j)fluorantren	Asenaften	7H-Dibenzo(c,g)karbazol
Benzo(k)fluorantren	Asenaften	Dibenzo(a,e)piren
Benzo(a)piren	Antrazen	Dibenzo(a,h)piren
Indeno(1,2,3-cd)piren	Benzo(e)piren	Dibenzo(a,i)piren
Dibenz(a,h)antrazen	Benzo(g,h,i)perilen	Dibenzo(a,l)piren
Krisen	Fluoranten	5-Metilkrisen
	Fluoren	
	Naftalin	
	2-Metil Naftalin	

PAH'ların bir takım toksik etkilere neden oldukları gösterilmiştir. Çeşitli PAH'ların yüksek seviyede ve tek dozda, kemirgenler için öldürücü oldukları gösterilmiştir. Diğer taraftan PAH'lara mesleki şartlardan dolayı; kısa süreli maruz kalmanın öldürücü olduğuna dair bir veri yoktur. Çevresel PAH'lar mesleki maruz kalmaya göre daha az seviyede olduklarından kısa süreli çevresel PAH'lara maruz kalma ölüme yol açmaz. Diğer taraftan PAH'lara mesleki olarak maruz kalmanın; gözlerde irritasyona, ışığa karşı duyarlılığa, dermatid gibi deri toksisitelerine neden oldukları bildirilmiştir. Ekstrem çevresel şartlar bu etkileri daha fazla tetiklemektedir [13].

İnsanlarda polisiklik aromatik maddelerin akut etkileriyle ilgili yeterli bilgi mevcut değildir. Hayvan çalışmalarında çeşitli PAH'lara akut olarak oral maruz kalma sonucunda akciğer ağırlığında azalma ve gastrointestinal tümör mukozalarındaki enzimlerde değişiklik rapor edilmiştir [6].

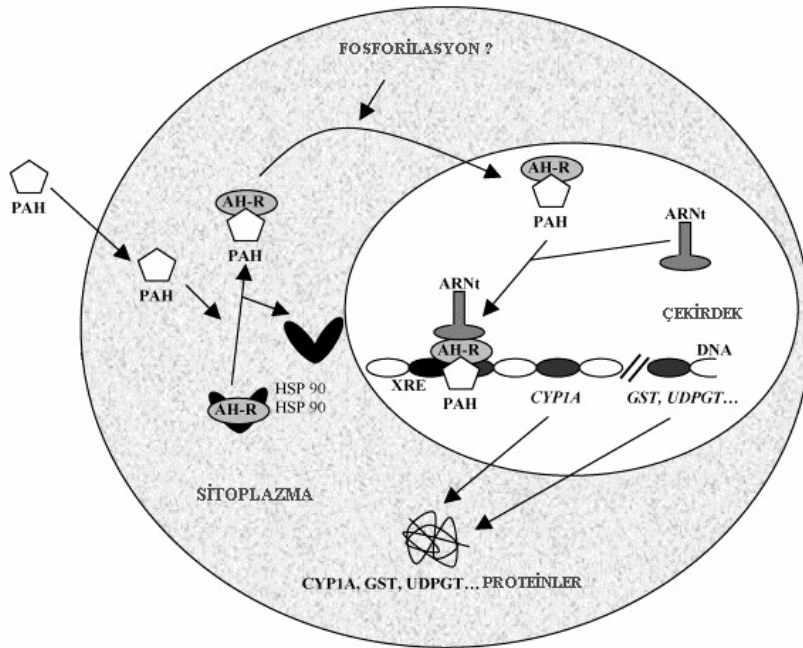
PAH'lar böbreklerde, karaciğerde ve yağda depolanır. PAH'lara uzun süreli maruz kalma (kronik) kanser, katarakt, böbrek ve karaciğerde hasar ve sarılığa neden olabilir [12].

PAH'larla ilişkilendirilen sağlık hasarı Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu (International Agency for Research on Cancer, IARC), Çevre Koruma Kurumu (Environmental Protection Agency, EPA), Ulusal Toksikoloji Programı (The National Toxicology Program, NTP) ve Toksik Maddeler ve Hastalık Kayıt Kurumu (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR) gibi farklı sağlık ve çevre koruma temsilcilikleri tarafından defalarca değerlendirilmiştir [6].

Karsinojenik PAH'ların biyolojik sistemlere etkileri ile ilgili pek çok çalışma vardır. Buna karşın karsinojenik olmayan PAH'ların etki mekanizmaları ile ilgili araştırma sayısı daha azdır. Bu çalışmalarda oksidatif stresi, immün sistemi, endokrin düzenlemeyi ve gelişimi etkilediğine dair bilgiler mevcuttur. Karsinojenik PAH'lar hücre faz I ve faz II sistemleri ile metabolize edilirler. Bu sistemler genellikle tüm omurgalılarda mevcuttur. Farklı PAH'ların karsinojenik etkileri, reaktif epoksitleri oluşturan faz I enzimlerine olan eğilimi ile birliktedir. Reaktif epoksitler faz II yolu ile detoksifiye edilebilir veya DNA gibi diğer hücre bileşenlerine bağlanırlar [3]. Karsinojenik PAH'ların kemirgenlerde immün sistemi baskıladığı rapor edilmiştir. Bu nedenle; PAH'ların önemli bir toksik sonucu immünojik baskılanma olabilir. Genotoksik olarak kabul edilen PAH'ların kendileri genotoksik olmayabilirler. Bunların öncelikle aril hidrokarbon hidroksilaz (AHH) sistemi tarafından metabolize edilmeleri

gerekir. Bunun sonucunda diol epoksitler oluşur ve bunlar da DNA adduct'ları oluşturmak üzere DNA ile etkileşerek genotoksik hasarı indüklerler. Genotoksik olay karsinojenik süreçte gerekli bir basamak olarak varsayılır ve çeşitli gelişimsel toksisitede rol oynar [13].

Düzlemsel aromatik hidrokarbonlar hücre içi aril hidrokarbon reseptörü (Ah-R) aracılığı ile sitokrom P450 1A proteinlerinin induksiyonunu tetikler. İmmunofilin XAP2 (aynı zamanda AIP veya ARA9 olarak da adlandırılır) denilen sitoplazmadaki AhR rezidüleri, ısı şok protein 90 (hsp90) moleküler kaperonları ile bir kompleks halinde bulunur. Sitoplazmada bir PAH'a bağlandıktan sonra reseptör (AhR) çekirdeğe geçer ve AhR nükeer translokator (arnt) ile dimerize olur. AhR -arnt heterodimeri hedef genlerde bulunan spesifik ksenobiyotik cevap elementlerine bağlanır. Bu hedef genler arasında en iyi karakterize edileni sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) genidir. (Şekil 1.1) [14].



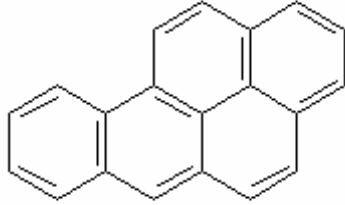
Şekil 1.1. P450 1A'nın induksiyon metabolizması [14]

Özgül PAH ve PAH içeren karışımların tümör oluşumu ve karsinojenez konusunda deney hayvanlarında birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak insanlarla ilgili çalışma sayısı oldukça azdır. Bu çalışmalar sonucunda özgül PAH'ların bazılarının karsinojen oldukları bazılarının ise karsinojen olmadıkları bildirilmiştir. Buna ilaveten çeşitli PAH'ları içeren kompleks karışımların hem insanlar hem de deney hayvanlarında karsinojen oldukları daha iyi vurgulanmıştır. Bu verilere bakarak hem uluslararası kanser araştırma kurumu (IARC) hem de Çevre Koruma Kurumu (USEPA) çeşitli

PAH'ların hayvanlar için ve bazı zengin PAH karışımlarının insanlar için karsinojenik olduğunu bildirmiştir. Örneğin; benzo(a)piren USEPA tarafından büyük bir olasılıkla insan karsinojeni (Grup B2), IARC tarafından muhtemelen insan karsinojeni (Grup 2A) şeklinde sınıflandırılmıştır [13].

1.1. Benzo(a)piren

Benzo(a)piren (B(a)P); kimyasal formülü $C_{20}H_{12}$, moleküler ağırlığı 252.31 g/mol, kaynama noktası 495 °C, erime noktası 179 °C, yoğunluğu 1.24 g/cm³ olan, sarı renkli, kokusuz, mutajenik ve yüksek karsinojenik özellik gösteren bir polisiklik aromatik hidrokarbondur [15]. Benzo(a)piren pratik olarak suda çözünmez; alkol ve metanolde kısmen çözünür ama benzen, tolüen ve ksilende çözünür [16].



Şekil 1.2. Benzo(a)piren'in kimyasal yapısı [15]

B(a)P fosil yakıtların tam olarak yanmaması sonucu meydana gelir ve havada, içme sularında, yeraltı sularında, atık sularda ve ızgarada pişen yiyeceklerde bulunur. B(a)P ilk olarak havaya salınır sonra fotooksidasyon ile atmosferden yayılır, daha sonra toprakta ve suda kuru olarak çöker. B(a)P için tahmin edilen yarı ömürler; atmosferde 1-6 saat, suda 1-8 saat, sedimentlerde 5-10 yıl, toprakta 14-16 aydan daha fazladır [16].

B(a)P'nin insan ve hayvanlarda deri, akciğer, meme, özafagus, pankreas, mide, kolon, safra kesesi, prostat ve servikal kanserlere neden olan ajan olduğu gösterilmiştir. İnsanların B(a)P'a; besinlerle 0.12-2.8 µg/kişi/gün dozda maruz kaldığı bildirilmiştir. B(a)P ile kontamine olmuş besinlerin sürekli alınımı çeşitli organlarda kanser riskini önemli oranda arttırmaktadır [17].

Hayvan çalışmaları B(a)P'a soluma yoluyla maruz kalmanın solunum sistemi tümörü ve B(a)P'a oral yolla maruz kalmanın mide tümörü, lösemi ve akciğer tümörlerine sebep olduğu bildirilmiştir. Son toksikoloji ve epidemiyolojik çalışmalara göre gebeliğin kritik safhalarında PAH'lara maruz kalma yavrulamayı ve gelişim etkilerini baskılayıcı sonuçlara neden olabilir. Hayvan çalışmaları B(a)P'a oral yolla maruz kalmanın tekrar hamile kalmayı ve fertilitede azalmaya neden olduğu

gösterilmiştir. Aynı zamanda, B(a)P'a oral yolla maruz kalmanın hayvanlarda bir defada doğan yavru sayısını azalttığı ve doğan yavruların vücut ağırlıklarında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir [6].

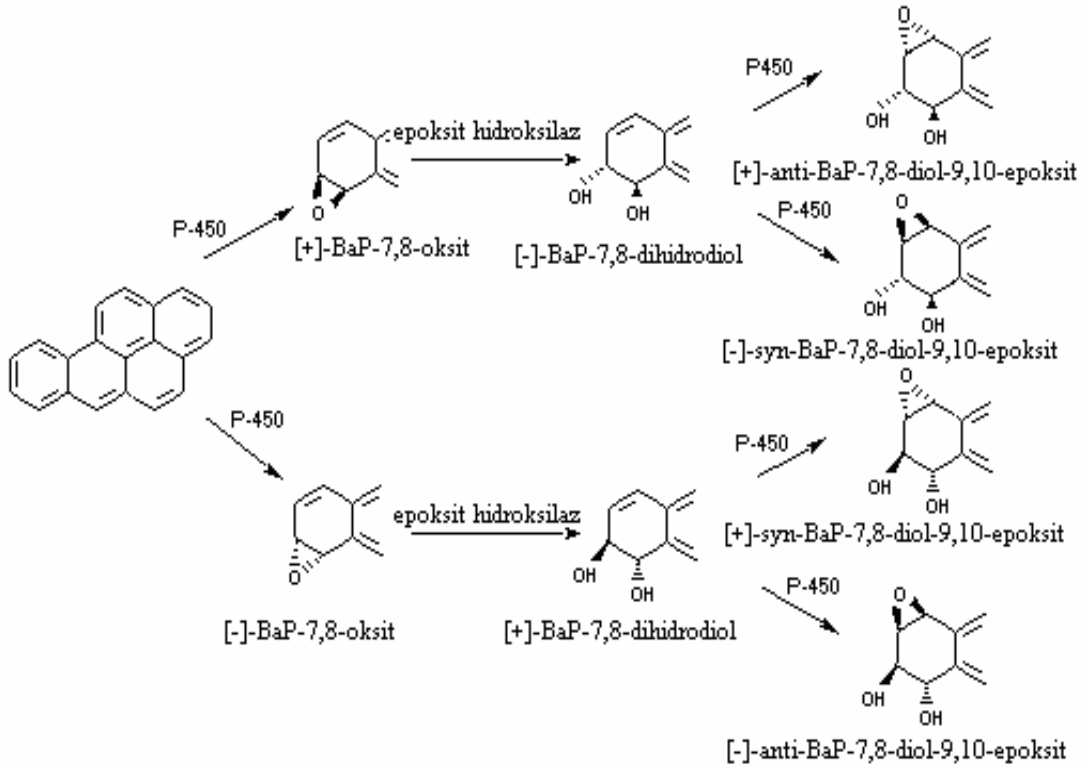
B(a)P'a mesleki maruz kalmanın seviyesi endüstriyel aktiviteler ve mesleklerdeki farklılara göre 0.1'den 48 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 'e kadar değişir. Sigara içicilerinde, B(a)P seviyesi maruz kalma sigaranın dumanı ciğerlere çekildiğinde; 0.5 mg/100 sigaradan, 7.8 mg/ 100 sigaraya kadar değişim gösterir ve sigaradan çıkan dumandan geldiğinde; 2.5 mg/100 sigara'dan 19.9 mg/100 sigaraya kadar değişim gösterir. Pasif sigara içicilerindeki B(a)P seviyesi 2.8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 'den 0.76 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 'e kadar değişim gösterir [6].

Bazı yiyecek türlerindeki B(a)P seviyelerinin 0.09 mg/kg'dan 30 mg/kg'a kadar olduğu rapor edilirken özellikle mangalda pişirilen etlerde yüksek miktarlarda B(a)P bulunması nedeniyle (8 mg/kg) toplam PAH'ların beslenmeyle ilgili girdinin hemen hemen 2 mg/kg-besin olduğu tahmin edilmektedir. Sudaki miktar 13 mg/L B(a)P'a kadar değişebilir [6].

Besinlerde, çalışma ortamlarında ve çevrede bulunabilen çevresel kirleticiler B(a)P, sitokrom P450 ve epoksit hidroksilaz enzimleri tarafından metabolik aktivasyona ihtiyaç duyan bir prokarsinojendir [18, 19]. B(a)P biyolojik sistemlerde mutajenik ve karsinojenik etkilerini göstermeden önce reaktif ara ürünleri oluşturmak için metabolik aktivasyona uğrar. B(a)P'ın mutajenik ve karsinojenik etkisinin karışık fonksiyonlu oksidazlar aracılığıyla ortaya çıktığı kabul edilir. Bu süreç sonunda karsinojenik B(a)P-diolepoksitler oluşur ve bunlar hücrel makro moleküllere bağlanırlar. Bu bağlanma sonucunda B(a)P mutajenik ve karsinojenik etkiler göstermektedir. Buna ilaveten; B(a)P'ın radikal katyonik formları hem metabolizma hem de metabolik aktivasyonda işe karışabilir. Bu durum tümör başlangıcının mekanizmasında anahtar rol oynayan DNA adduct'larının oluşmasına yol açar [18]. Eğer DNA adduct'ları, DNA replikasyonundan önce tamir edilmezler ise nükleotid değişimlerine, nükleotid eksilmelerine ve kromozomların yeniden düzenlenmesine yol açarlar. Eğer bu mutasyonlar transkripsiyon ve translasyona uğrarlarsa protein yapısının ve fonksiyonunun değişimine ve sonunda kansere yol açacaklardır [17].

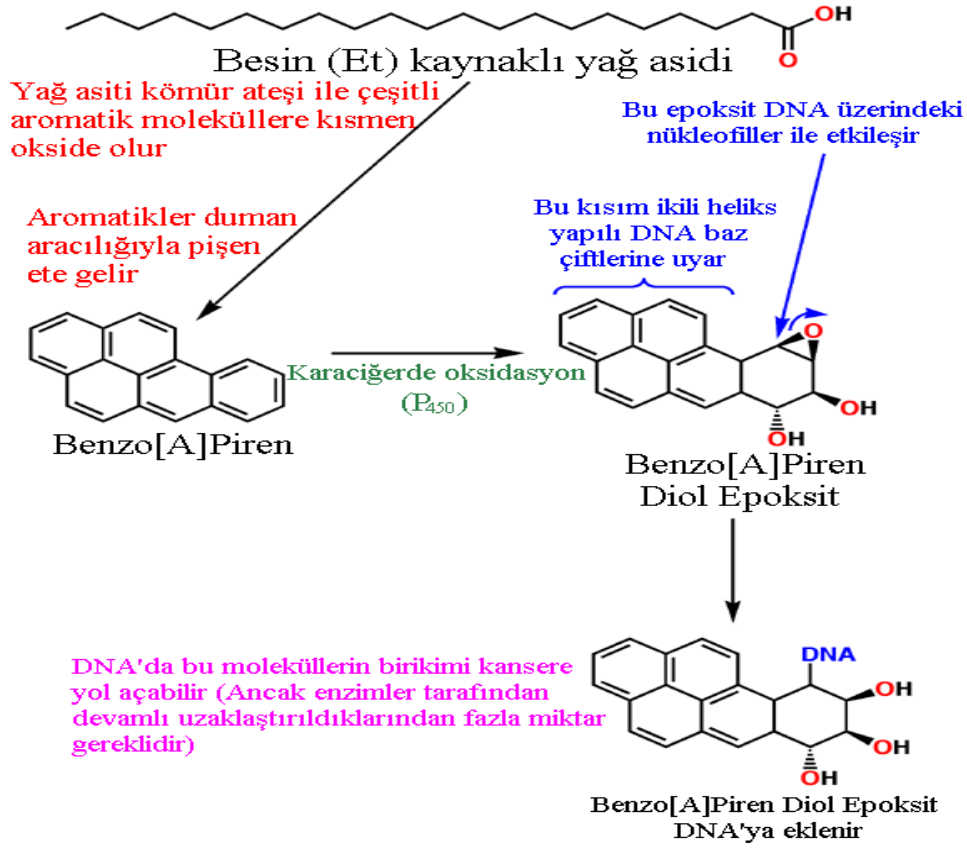
B(a)P'ın metabolizması karmaşıktır ve son olarak, benzo(a)piren 7,8 diol-9,10-epoksit olarak adlandırılan karsinojen formuna dönüşür. B(a)P metabolik olarak aktive edilir ve nihai karsinojen form üç enzimatik reaksiyonda şekillenir. İlk adım sitokrom P450 enzimleri tarafından katalizlenir ve bu adımda

(+/-)-benzo(a)piren-7,8-oksit oluşur. İkinci adım epoksit hidroksilaz (EH) enzimi tarafından katalizlenir ve ilk adımda oluşan ürün (+/-)-benzo(a)piren-7,8 dihidrodiol'e dönüşür. Son olarak sitokrom P450 enzimleri tarafından katalizlenen reaksiyon sonucunda 7,8-diol-9,10-epoksit'in dört izomerinden biri oluşur (Şekil 1.3). Bu oluşan izomerlerin en önemlisi (7R,8S)-dihidroksi-(9S,10R)-epoksi-7,8,9,10-tetrahidrobenzo(a)pirendir (BPDE). BPDE guanidin rezidüelerinden DNA'ya bağlanan nihai karsinojendir [8, 15, 16, 20]. BPDE, B(a)P'ın oldukça reaktif bir metabolitidir ve hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde mutasyon ve sitotoksik etkilere sebep olur [16].



Şekli 1.3. B(a)P'ın, benzo(a)piren 7,8 diol-9,10-epoksid (BPDE) olan karsinojen forma dönüşüm yolu [8]

PAH'ların metabolik aktivasyonu sonucu ortaya çıkan diol epoksitler DNA'ya kovalent olarak bağlanırlar. Aktive edilmiş PAH'ların DNA'ya bağlanmasının karsinojenik etki için gerekli olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda PAH'lara maruz kalan maden işçileri ve sigara içicilerindeki PAH seviyeleri ve PAH-DNA adduct'ları arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir [21].



Şekli 1.4. Benzo(a)pirenin DNA'ya bağlanması

B(a)P'ın dört enantiyometrik diol epoksitlerinden biri olan B(a)P diol epoksit-2 (BDPE-2), yeni doğmuş farelere intraperitoneal enjeksiyon ile uygulanmış ve farelerdeki akciğer kanserinin indüksiyonunda saf hidrokarbonlardan daha etkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte B(a)P uygulamasından sonra metabolik olarak şekillenen ve uygulanmadan sonra DNA'ya bağlandığı gösterilen BPDE-2'nin fare derisine tekrarlı topikal olarak uygulanması epidermal tümörlerin oluşumunda B(a)P'dan daha etkilidir [22].

PAH'ların metabolizmaları boyunca reaktif oksijen türleri (ROT) oluşabilir. Biyolojik sistemlerde ROT'ların en önemli etkileri protein oksidasyonu, enzim inaktivasyonu ve DNA hasarıdır [23].

1.2. Serbest Radikaller

Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak reaktif oksijen türleri (ROT) meydana gelmektedir. Başta mitokondriyal elektron transportu olmak üzere ksenobiyotik metabolizması, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve

degradasyon reaksiyonlarında ROT oluşmakta ve prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllere zarar vermektedir [24].

Bir serbest radikal üç yol ile ortaya çıkabilir: [25]

1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar. Böylece bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır.
2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşur. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birinde kalır.
3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.

1.2.1. Oksijen ve oksijen radikalleri

Yaşamak için oksijene mutlak suretle gereksinim duyan aerobik canlılar oksijeni solunumda son elektron alıcısı olarak kullanırlar. Zorunlu anaerobik canlılar moleküler oksijenin varlığına tolerans gösteremezler. Fakültatif anaeroblar ise oksijenli ortamda yaşayabilseler bile ya oksijeni hiç kullanmazlar veya oksijeni sınırlı bir düzeye kadar kullanırlar fakat hiçbir zaman oksido-redüksiyon tepkimelerinde oksijeni son elektron alıcısı olarak kullanmazlar [26].

Moleküler oksijen dış yörüngesinde iki adet eşleşmemiş elektron içerir ve her bir atomu bir çift elektron kabul edebilir. Bu nedenle moleküler oksijen oldukça kuvvetli bir ajandır [27].

Vücudumuzda ve çevremizde sadece oksijenin değil, diğer atom merkezli radikaller de oluşabilir [28]. Ancak serbest radikallerin çoğu reaktif oksijen ürünleri olup bunların en önemlileri; süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), tekil oksijen (1O_2), hipoklorit ($HOCl$) ve peroksi radikalidir ($ROO^{\cdot}$) [29].

Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit radikali, bakırlı bir enzim olan Süperoksit Dismutaz (SOD) aracılığıyla hidrojen peroksit ve oksijene çevrilir [30].

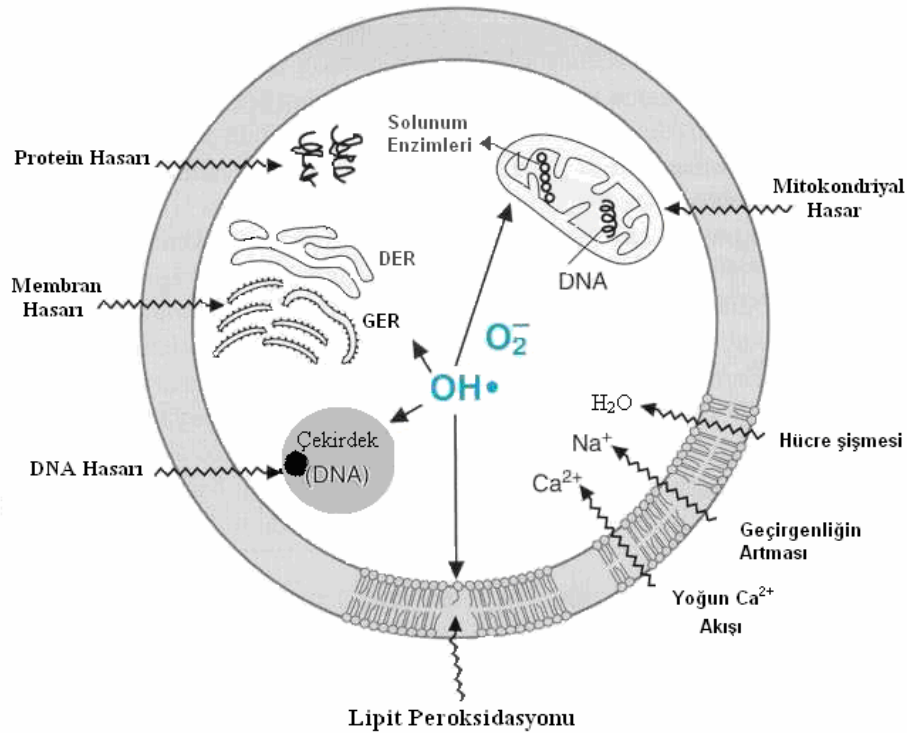
Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilen hidroksil radikali canlılarda farklı mekanizmalar ile oluşabilir [28, 31]. $OH^{\cdot}$ radikali bir yağ asidinin (LH) metilen molekülünden hidrojen molekülü kopararak lipid radikali ($L^{\cdot}$) oluşturur. Oluşan lipid

radikaline oksijen ilavesi ile lipid peroksi radikali ($\text{LOO}^\cdot$) ve lipid peroksit (LOOH) oluşur [32].

Mitokondrideki oksijenli solunumda olduğu gibi birçok anabolik ve katabolik işlemler sırasındaki reaksiyonlarda moleküler düzeyde elektron kaçışları olur ve bu sırada reaktif oksijen türleri oluşur [33].

Başta mitokondriyal solunum zinciri olmak üzere fizyolojik şartlarda gerçekleşen pek çok hücrel süreç, serbest oksijen türlerinin oluşumuna yol açmaktadır. Aromatik hidrokarbonlar gibi çevresel faktörler ya doğrudan ya da intraselüler metabolizma ve detoksifikasyon sırasında radikallere dönüşerek, serbest oksijen türlerinin düzeylerini etkilemektedirler [34].

İntersellüler ortamda oluşan serbest radikaller, intrasellüler komponentlerle reaksiyona girebilmek için membranı geçmek zorundadırlar. Serbest radikaller hücrede lipid, protein, DNA ve karbonhidrat gibi önemli hücrel yapı ve bileşiklere etki edebilir [35]. Serbest radikaller, hücre membranının stabilizasyonunu ortadan kaldırarak, hızlı hücre ve doku bozulmalarına neden olurlar (Şekil 1.5) [36].



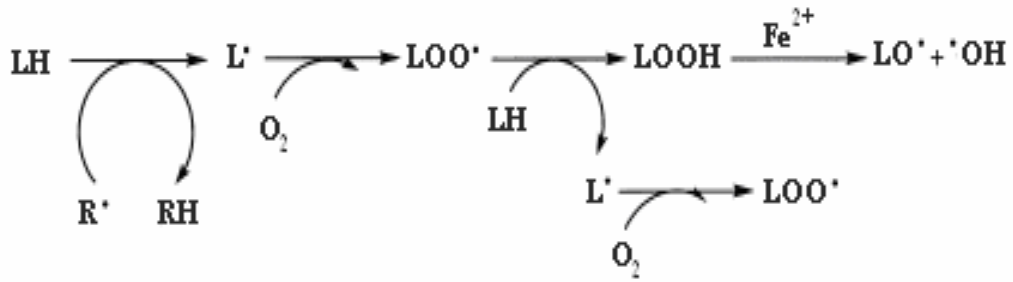
Şekil 1.5. Serbest oksijen radikallerinin hücreye verdikleri zararların şematik gösterilmesi [37]

Plazma membranında bulunan polidoymamış yağ asitleri, fosfolipitler, glikolipitler, gliserit ve steroller serbest radikallerin en genel hedefleri arasında yer alır. Özellikle polidoymamış yağ asitleri serbest radikallerle yüksek reaksiyona girme hızına sahiptirler [25]. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden en önemlisi polidoymamış yağ

asitlerinin oksidasyonudur [29]. Polidoymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı “lipit peroksidasyonu” olarak bilinir. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ($L^{\bullet}$) ve lipid peroksi radikallerinin ($LOO^{\bullet}$) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROT’ların) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir [37].

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli oksiteyici bir radikalin membran yapısında bulunan polidoymamış yağ asidi zincirindeki metilen gruplarından bir hidrojen atomu uzaklaştırması ile başlamaktadır [38]. Reaksiyon geride kalan karbon atomunun üzerindeki paylaşılmamış elektronda devam etmektedir [39].

Reaksiyon şöyle gerçekleşmektedir: Yağ asidinin (LH) veya hedef polidoymamış yağ asitlerinin okside edici $R^{\bullet}$ radikali ile oksidasyona uğraması ile yağ asidi radikali ($L^{\bullet}$) oluşur. Buna hızlı bir şekilde oksijen katılmasıyla yağ asidi peroksi radikali ($LOO^{\bullet}$) meydana gelir. Oluşan bu peoksi radikali zincir tepkimelerinin ara ürünüdür ve bu radikal diğer bir yağ asidini (LH) etkileyerek zincir reaksiyonunu başlatır. Bu arada oluşan lipit hidroperoksit ($LOOH$) yıkılarak daha tehlikeli radikaller oluşur (Şekil 1.6) [31, 40].



Şekil 1.6. Lipid peroksidasyonuna yol açan reaktif türlerin oluşumu [40]

Lipid peroksidasyonunu başlatan başlıca radikal, hidroksil radikalidir. Lipid peroksidasyonu membran yapı ve bütünlüğünün bozulması, oluşan serbest radikallerin çeşitli hücre bileşenleri üzerine etkisi ve son ürünlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden olmaktadır [38]

Lipid peroksidasyonu son ürünlerinden birisi malondialdehit (MDA)’dır [38]. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Bu da deformasyon, iyon transformu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir [26]. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde malondialdehit (MDA) ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır [37].

Serbest radikaller proteinleri oksitleyerek, onların oksidatif modifikasyonlarında rol oynayabilirler ve aromatik aminoasitlere, sisteine ve disülfid bağlarına (S-S) saldırırlar. Bu durum immünoglobulinler, albumin ve kollojeni kapsayan çeşitli ekstraselüler proteinlerin konformasyonel bütünlüğünü ciddi olarak etkilemektedir ve sonuçta birçok fizyolojik bozukluk ve hastalıkların sebebi veya gelişiminden sorumlu olmaktadır [41].

Nükleik asitler serbest radikaller için önemli hedeflerden biridir. Nükleotidlerin serbest radikallerle etkileşimleri sonucunda DNA zincirinde kırılma ve mutasyonlar oluşabilir. DNA hasarının büyüklüğü, radikallerin belli bir bölgeyi etkilemesi ve DNA hasarı sonucu aktive olan polimeraz enzimi ile reaksiyona girerek DNA'nın serbest radikal ile etkileşimi hücre ölümüne yol açar [31].

Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da, tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir [24].

DNA hasarında en tehlikeli radikal hidroksil radikalidir. Hidroksil radikali özellikle DNA üzerindeki guanin bazına etki ederek DNA'da mutasyonlara yol açar. Süperoksit radikali ve hidrojen peroksit DNA üzerine direkt etki edemezler ama hidroksil radikali oluşumuna neden olarak DNA'da hasara yol açarlar [31].

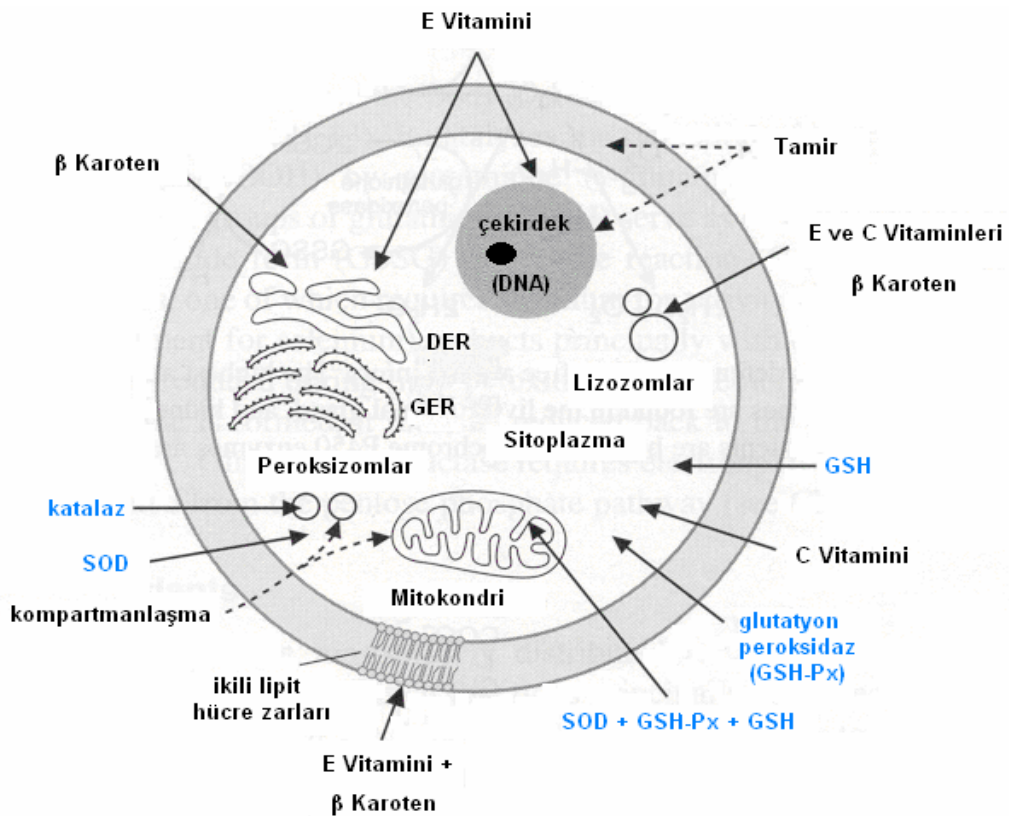
Serbest radikaller, karbonhidrat üstünde özellikle polisakkarit depolimerizasyonu ve monosakkarit otooksidasyonu yolu ile etki gösterirler. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzaloaldehytler meydana gelir. Bunlar diabetes ve sigara içimi ile ilgili kronik hastalıklar gibi patolojik işlevlerde önemli rol oynarlar. Bu olay glukoz dışında diğer redüktan monosakkaritler için de geçerlidir. Okzaloaldehytler, DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve çapraz bağlar oluşturabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar [26].

1.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikaller potansiyel olarak toksik oldukları için organizmalar bunları etkisiz hale getirmek amacıyla savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Bunlar kısaca "antioksidanlar" şeklinde adlandırılır (Şekil 1.7.) [42]. Antioksidanlar, hem direkt hem de dolaylı olarak ksenobiyotiklerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir [30].

ROT'ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar “antioksidan savunma sistemleri” olarak bilinirler. Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirilirler. Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. “Oksidatif stres” olarak adlandırılan bu durum özetle; serbest radikal oluşum hızı ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır [25].

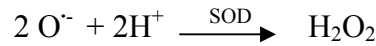
Bir antioksidan diğer antioksidanları tetikleyebilir. Bu işlem “antioksidan ağı” olarak adlandırılır. İyi bir antioksidan, serbest radikalleri belirli bir şekilde ortadan kaldırır, redoks metallerini tutar, antioksidan ağı içerisinde diğer antioksidanları tetikler, gen ifadesinde pozitif etkiye sahiptir, organizmada kolayca emilir ve membran ve/veya sulu ortamlarda fonksiyoneldir [32].



Şekil 1.7. Serbest radikallere karşı hücresel savunma sistemlerinin şematik gösterilmesi [37]

1.3.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD) hücre içi kuvvetli bir antioksidan enzimdir (EC 1.15.1.1.) [32]. SOD, bir radikal üzerine direkt olarak etki eden tek enzimdir. Hidrojen iyonunu kullanarak oksijen üretir. SOD, süperoksit radikalının ($O_2^{\cdot-}$) daha az reaktif olan H_2O_2 'ye indirgenmesini katalize eder [42].



SOD'un dinükleer Cu, Zn ya da mononükleer Fe, Mn veya Ni kofaktörleri içeren dört farklı sınıfı tanımlanmıştır. Fe-SOD ve Mn-SOD homoloji gösterirler ve aktif bölgelerinde aynı metal çelatlama rezidüelere ve üç boyutlu yapısal homolojiye sahiptirler [43].

Fe-SOD genellikle bakterilerde, mavi yeşil alglerde ve bazı bitkilerde bulunur. Ökaryotlarda çok ender bulunduğundan prokaryotlara özgün olduğu söylenebilir [26].

Mn-SOD, mayaların ve diğer bütün ökaryotların mitokondriyal matrikslerinde yerleşmiştir ve sitoplazmada sentez edilmektedir [26]. Mn-SOD, her bir subünitesinde bir mangan atomu içeren bir homotetramerdir. Süperoksitin dismutasyonu iki adımda sağlanır bu süreçte Mn, Mn (III)'den Mn (II) ve tekrar Mn (III)'e döner [43].

Cu, Zn-SOD, ökaryotik hücrelerde sitozol, nükleer membran ve mitokondri intermembran boşluğunda ve eritrositlerde bulunur. Prokaryotlarda çok ender bulunur [36]. Enzimin etkinliği için Cu kesinlikle gerekli iken, Zn'nin yerine Co^{2+} , Hg^{2+} veya Cd^{2+} geçebilir [31].

EC-SOD, heparin ve heparin sülfat gibi glikozaminoglikanlara affinite gösteren bakır ve çinko içeren bir glikoproteindir. Dokuların interstikal alanlarında ve aynı zamanda ekstraselüler sıvılarda bulunur [43]. Ekstraselüler boşluk, EC-SOD antioksidan enzimi tarafından oksidatif strese korunur. Bu enzim plasenta, böbrek, akciğerler, kalp ve kan damarlarını içeren dokularda yüksek oranda ifade edilir. EC-SOD karboksil ucunda bir heparin bağlayıcı domain içerir. Bu domain enzimin süperoksit anyonunu süpürdüğü ekstraselüler matrikse yerleşmesini sağlar. EC-SOD heparin bağlayıcı domain preotolitik ayrılma ile uzaklaştırılabilir [44].

Ni-SOD, *Streptomyces sp.*'nin sitozolik kısımlarından saflaştırılmıştır. Amino asit kompozisyonu demir, mangan ve çinko-bakır SOD'lardan farklıdır [43].

İnsanda SOD'un üç farklı izoenzimi bulunmaktadır: sitozolik Cu, Zn-SOD, mitokondriyal Mn-SOD ve ekstraselüler SOD (EC-SOD) [43].

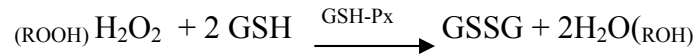
1.3.2. Katalaz (CAT)

Katalaz (EC 1.11.1.6) birçok aerobik organizmada bulunur [26]. Esas olarak peroksizomlarda lokalize olmuştur [32]. Katalaz tetramerik yapıya sahiptir ve dört tane ferrihem grubu ihtiva eder [31]. Karaciğer ve eritrositler katalazın en yüksek aktiviteye sahip olduğu organlardır [32]. Katalaz H₂O₂ ile reaksiyona girerek moleküler oksijen ve suyu oluşturur [43].



1.3.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidazın selenyum Se-bağımlı (GSH-Px, EC 1.11.1.19) ve selenyum bağımsız olmak üzere iki izoformu vardır. Aşırı düzeylerde H₂O₂ varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG, glutasyon disülfid) dönüşümünü katalize eder. Bu arada H₂O₂ de suya dönüştürülerek detoksifiye olur. [32].

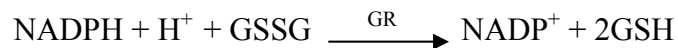


GST (Glutasyon-S-transferaz; GST, EC 2.5.1.18), glutasyonun tiyol (-SH) grupları ile alkilasyon ajanlarının reaksiyonunu katalize ederek onların elektrofilik alanlarını yok eder. Lipit peroksitlere (ROOH) karşı GST'ler Se-bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi gösterirler. Bu iki enzimin alt ünite sayıları ve katalitik mekanizmaları farklıdır. GSH-Px karaciğerde en yüksek; kalp, akciğer ve beyinde orta; kasta ise düşük düzeyde aktivite gösterir. [32].



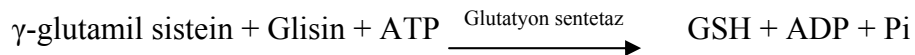
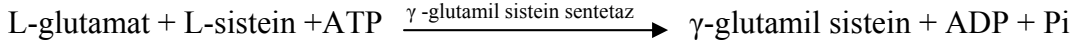
1.3.4. Glutasyon redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz (EC 1.6.4.2), okside glutatyonu (GSSG) redükte formuna (GSH) tekrar döndürür. Bu reaksiyon NADPH + H⁺ bağımlı olarak gerçekleştirilir [26, 31].



1.3.5. Glutatyon (GSH)

Redükte glutatyon (GSH); glutamik asit, sistein ve glisin içeren bir tripeptit olup, aktif bir sülfidril (-SH) grubuna sahiptir. Vücuttaki GSH'nun büyük bölümü karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç duyulmadan iki aşamada sentezlenebilen bir tripeptittir [45].



Vücutta enzimatik olmayan önemli bir antioksidan olan GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. En önemli görevi, enzim ve proteinlerin tiyol gruplarının (-SH) indirgenmesi ile redükte formlarının yeterli düzeylerde kontrolünü sağlamaktır. Tiyol grubuna sahip birçok enzim düşük hızda fakat okside olarak ya da O₂'nin direkt etkisiyle hızla aktivitelerini yitirirler. İşte GSH kendisi okside olup tiyol gruplarını tekrar indirgeyerek bunların aktivasyonunu sağlar. Özellikle H₂O₂'nin elimine edilmesinde de GSH'nın oksitlenebilirliğinden faydalanılır [45].

1.4. Nitrik Oksit ve Reaktif Nitrojen Türleri

Nitrik oksit (NO) ve NO metabolitlerini içeren yoğun araştırmalar literatürde yeni bir terim olan Reaktif Nitrojen Oksit Türleri (RNOT) terimini ortaya çıkarmıştır. RNOT'lar için kullanılan katı kimyasal kriterler gerçekte farklı ve birbirine zıt özellikler taşıyan, çeşitli bileşikleri içerisine almaktadır. ROT'lar gibi RNOT'lar da çoklu biyolojik etkilere sebep olan, daha kararlı türlerin şekillenmesi için biyolojik olarak oluşan serbest radikallerin etkileşiminden ortaya çıkmaktadır. Biyolojik sistemlerde bütün RNOT'ların öncül kaynağı NO'dur [46].

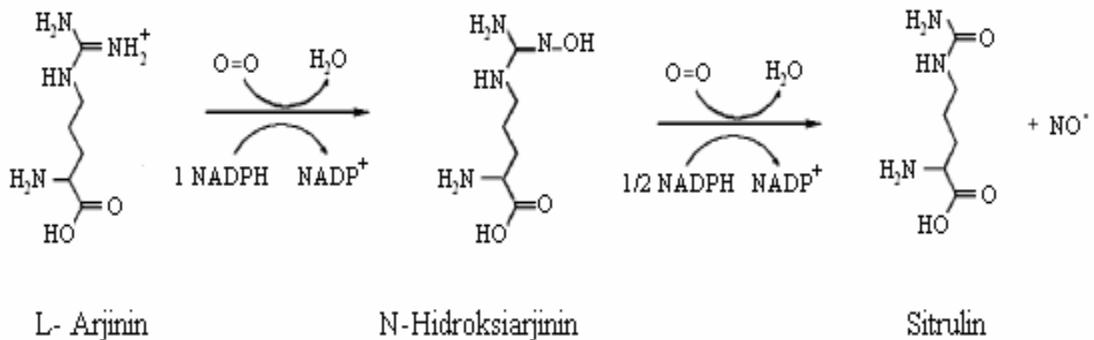
Kaynağını NO'dan alan başlıca reaktif türler; Nitrosil iyonu (NO⁻), Nitrozonyum iyonu (NO⁺), Dinitrojen trioksit (N₂O₃), Dinitrojen teroksit (N₂O₄) ve peroksinitrit'tir (ONOO⁻) [47].

NO, 1772 yılında Joseph Priestly tarafından *in vivo* şartlarda 6-10 saniye yarı ömre sahip olan renksiz bir gaz olarak keşfedildi. 1980 yılında Furchgott, endotelium damarlarında, asetilkolin tarafından uyarıma cevapta, entotelium hücrelerinin ürettiği

endotelium bağımlı gevşetici faktörü (EDRF'yi) keşfetti. 1987'de birbirlerinden bağımsız olarak Furchgott vd. ve Ignarro vd. EDRF'nin NO olduğunu kanıtladılar. Bir yıl sonra Moncada, NO'nun L-arjinin amino asitinden sentezlendiğini gösterdi. Bunun öncesinde Murad nitrovasodilatörlerin vasküler dokulardan salındıklarında dokulardaki cGMP'yi arttırmak için Guanilat Siklaz'ların salındığını göstermişti. 1992'de Science dergisinde NO yılın molekülü olarak açıklandı. 1998 yılında Furchgott, Ignarro ve Murad NO'nun keşfinden dolayı fizyoloji ve tıp alanlarında Nobel ödülü kazandılar [48].

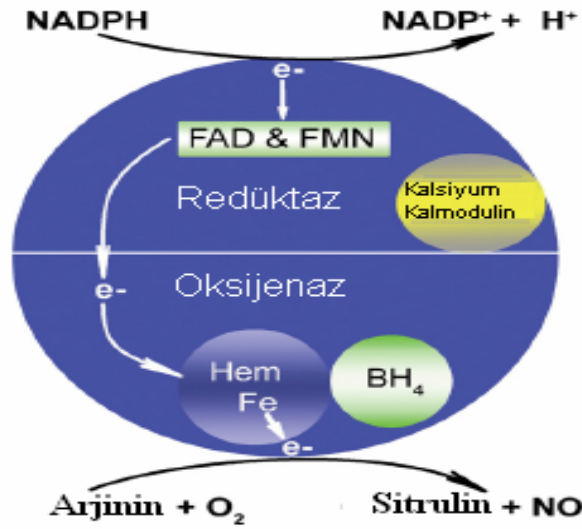
Nitrik oksit hücrel patofizyolojide önemli bir rol oynayan, atmosferik şartlarda gaz olan kararsız, reaktif, serbest radikal bir gazdır [26, 49-51]. NO, bir gaz olmasına rağmen biyolojik şartlar altında etkisini biyolojik sıvılarda çözünerek göstermektedir [52]. NO, doğada bulunan moleküller arasında moleküler ağırlığı en küçük olan moleküllerden birisidir. NO'nun molekül ağırlığının küçük, lipofilik yapıda ve yüksüz olması reseptörlere bağımlı olmadan membranlardan kolayca diffüze olmasını sağlamaktadır [53]. NO diğer serbest radikaller gibi çok kısa yarılanma süresine sahip olup birkaç saniye içinde daha kararlı yapıda olan nitrit (NO_2^-) ve nitrate (NO_3^-) oksitlenir. Biyolojik sıvılardaki NO_2^- ve NO_3^- *in vivo* ve *in vitro* olarak ölçülebilir ve bu da NO üretiminin göstergesi olarak kullanılmaktadır [54].

NO güncel olarak çok yönlü araştırmalara konu olan ve başlıca endotel hücresi, makrofaj, nöron ve düz kas hücrelerinde nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığı ile L-arjinin'den sentez edilen biyolojik bir aracı moleküldür [55]. Nitrik oksidin arjininden sentezi iki basamakta gerçekleşir. Tepkimenin ilk basamağında arjininin guanido nitrojeni (N^{G}) hidroksillenerek N^{G} -Hidroksi arjinin (N-OH-Arjinin) oluşur. Enzime sıkı bağlı olan ara ürün ikinci aşamada sitrulin ve nitrik okside çevrilir (Şekil 1.8) [47, 56].



Şekil 1.8. Nitrik oksit sentaz tarafından katalizlenen arjinin amino asitinden nitrik oksitin sentez basamakları [56]

Bu reaksiyon için oksijen, Nikotinamid adenin dinükleotid (NADPH) ve kofaktörler olarak; Flavin adenin dinükleotid (FAD), Flavin mononükleotid (FMN), tetrahidrobiopterin (BH₄), kalmodulin ve demir protoporfirin IX'a ihtiyaç duyulur (Şekil 1.9) [48, 57, 58].



Şekil 1.9. NO sentezi ve kofaktörleri [58]

Nitrik oksitin biyolojik rolü oldukça ilginçtir. NO; damar genişlemesi ve nörotransmitter olarak sinyal molekül, patogenezdaki yıkımda bir toksin, oksidasyon ve nitrasyonunda bir öncül molekül ve potansiyel bir antioksidan olarak rol oynar. Bununla birlikte, farklı kimyası ve biyolojik aktivitesi bazen çelişkilidir. Bu şartlar hiçbir yerde oksidatif stresekinden daha etkili değildir [59].

NO, oksijen radikalleri ile tepkimeye girerek veya oksijenli ortamda oksitlenerek, kendisinden çok daha reaktif türlerin oluşumuna neden olur. Oksijen radikallerinin fazla yapımının neden olduğu oksidatif stresi, nitrik oksitin reaktif türlerinden kaynaklanan toksik etkilerden ayırmak mümkün olmadığından nitrostatif stresten de ayırmak da imkansızdır. Bu bakımdan oksidatif hasar, süperoksitten kaynaklanan radikaller ile nitrik oksitin reaktif türlerinin neden olduğu hasarların bir toplamıdır [26].

NO; hücrelerdeki moleküler hedeflerle etkileştiğinde hem ökaryotik hem de prokaryotik hücreler için sitostatik veya sitotoksik özellik gösterebilir. NO için hücre içi hedefler; metal ve tiyol içeren proteinler, demir-sülfür kompleksleri, oksijen ve diğer serbest radikallerdir [52]. Radikal olarak reaktivitesi düşük olan nitrik oksit metal içeren

merkezler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girer [26]. Hücre içi hedefler; plazma membranında, mitokondride ve çekirdekte bulunan taşıyıcı ve sinyal proteinleri engellerler. Mitokondri elektron transportunun inhibisyonu enerjin tükenmesine sebep olur. Hücre içi enzimler inhibe olurlar. NO aracılığıyla çekirdekte oluşan hasar; DNA zincir kırıklarını, amino asit transisyonunu ve DNA sentezinin hız sınırlayıcı basamağı olan ribonükleotid redüktazın inhibisyonunu içerir. DNA sentezinin, hücresel gen transkripsiyonunun baskılanması ve enerji tüketimi NO aracılıklı sitotoksitenin biyokimyasal temelini oluşturur. NO aynı zamanda hem hücre içi hem de hücre dışı diğer moleküllerle sitotoksik bileşikler oluşturmak üzere reaksiyona girer. NO'nun hücre içi ve hücre dışı diğer moleküllerle reaksiyonları birçok biyomolekülün oksidasyonuna, nitrasyonuna (NO₂ ilavesi), nitrozasyonuna (NO⁺ ilavesi) ve nitrozilasyonuna (NO ilavesi) neden olur [60].

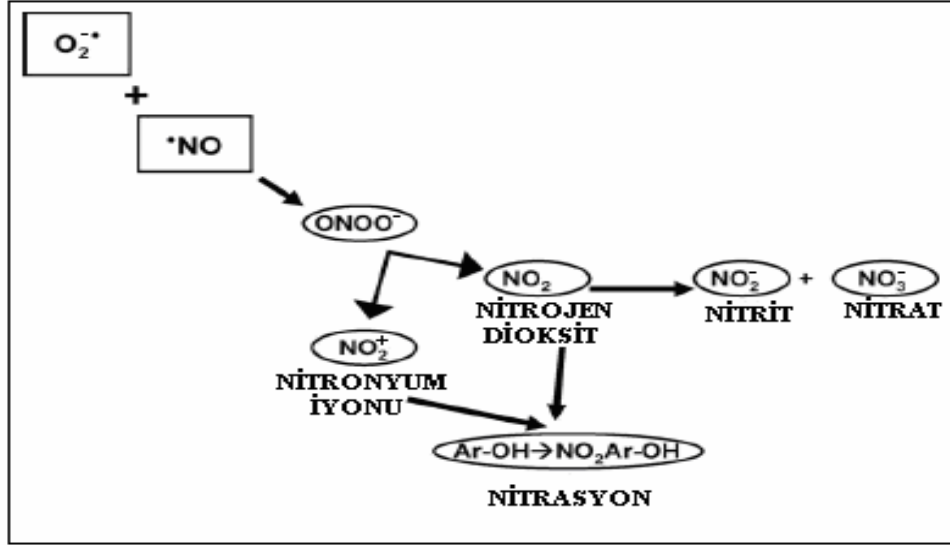
NO, proteinlerin ADP-ribolasyonuna neden olur. ADP-riboz amino asit akseptörlerine kovalent olarak bağlanır. NO; insan nötrofillerindeki G-aktinin ADP-ribolizasyonunu ilerletir ve aktin polimerizasyonunu ve nötrofiller, endotelial hücreler ve kondrositlerde adhezyonu inhibe eder [61].

Endotel hücreler, makrofajlar, nötrofiller ve düz has hücreleri başta olmak üzere birçok hücre türü aynı anda hem süperoksit radikali hem de NO üretebilirler [47].

Nitrik oksit ve süperoksit enzimatik mekanizmalarla sürekli ve önemli derişimlerde üretilen radikallerdir. Ayrıca bu iki radikal biyolojik sistemlerde tanıdığımız diğer bütün önemli radikaller ile radikal yapıda olmayan reaktif türlerin oluşumunu başlatabilecek özelliktedirler [26].

Reaktiviteleri az olan nitrik oksit ve süperoksit birbirleri ile tepkimeye girerek radikal bir kimyasal tür olmayan, fakat reaktivitesi çok yüksek olan peroksinitriti (ONOO⁻) oluştururlar [47]. Peroksinitrit diğer biyomolekülleri okside edici ve nitratlayıcı yeteneğe sahiptir. Fizyolojik pH'da peroksinitrit, peroksinitroz asit (ONOOH) formunda bulunur. Peroksinitritin son ürünleri olan nitrat ve nitrite dönüştürülerek idrarla atılır [52].





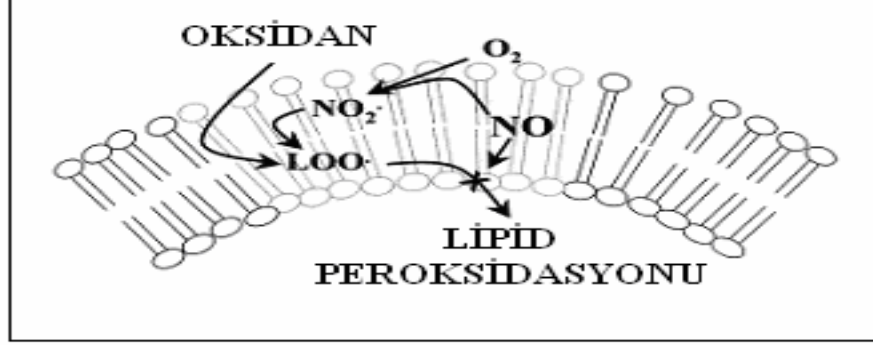
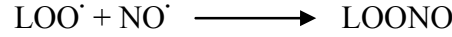
Şekil 1.10. Peroksinitritin şekillenmesi ve aktivitesi [62]

Biyolojik koşullarda üretilen $O_2^{\cdot-}$ radikalleri SOD enzimi tarafından H_2O_2 'ye çevrilirler. Fakat peroksinitrit oluşum hızı, SOD tarafından katalizlenen tepkimenin 3–5 katı kadardır. Bu nedenle fizyolojik koşullarda peroksinitrit oluşumu kaçınılmazdır [47].

NO, oksijen ve süperoksit varlığında reaktif nitrojen oksit türlerine dönüştürülür. Bu nedenle NO'nun toksik olduğu düşünülmektedir. Ancak NO aynı zamanda, çeşitli biyolojik sistemlerde oksidatif hasarı azaltıcı etkiler de göstermektedir. NO'nun kimyasından kaynaklanan zararlı etkiler yüksek NO konsantrasyonundaki şartlar için sınırlıdır. NO'nun antioksidan etkisi, düşük NO konsantrasyonlarındaki etkilerinin bir sonucudur [63]. Düşük konsantrasyondaki NO, hücre içi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu azaltabilir, ancak NO'nun yüksek konsantrasyonu sonucu peroksinitritin şekillenmesi yoluyla oksidatif hasarı arttırabilir. Peroksinitrit ve onun radikal türevleri serbest tiyollerle okside edebilir, lipid peroksidasyonunu ve protein hasarını ilerletebilir. $ONOO^-$ tiyollerle reaksiyona girerek S-Nitrosotiyollerin şekillenmesini sağlar, böylece damar gevşemesi ve trombosit agregasyonunun inhisyonu gibi etkileri uyarır. Bu reaksiyon NO'nun oksidatif stresin etkisini hafifletmesini sağlayarak hücre için koruyucu bir yol olarak kullanılabilir [64]. NO, oksidatif stresin etkisini oksidanları temizleyerek, peroksidaz reaksiyonunu engelleyerek ve süperoksit tarafından oluşturulan redükleyici ajanların temizlenmesiyle azaltabilir [63].

NO ve oksijen arasındaki reaksiyon, hidrofobik fazda, NO'nun daha fazla çözünebilir olmasından dolayı 8-10 kat daha hızlıdır. Hidrofobik kompartmanlardaki yüksek NO konsantrasyonunda, NO oksijen ile reaksiyona girerek dinitrojen trioksit (N_2O_3), dinitrojen tetroksit (N_2O_4) ve nitrojen dioksit (NO_2)'i içeren aracı moleküllerin oluşmasına neden olur. Bu aracı moleküller lipid peroksi radikalleri ($LOO^{\cdot}$) tarafından

lipid peroksidasyonunu başlatma yeteneğinde iken NO tek başına lipitlerle etkileştiğinde lipid peroksidasyonunu inhibe eder (Şekil 1.11) [65].



Şekil 1.11. Hidrofobik kompartmanlardaki NO reaksiyonları [65]

Zincir sonlanması, aynı zamanda hem endotel hücrelerindeki hem de makrofajlardaki düşük yoğunluktaki lipoproteinlerin oksidasyonunu engeller. Lipid oksidasyonunun bir türüne aracılık eden lipoksijenaz enzimi NO tarafından inhibe edilir. Bu nedenle lipid peroksidasyonunun sonlandırılması NO'nun en önemli antioksidan özelliklerinden biridir [63].

Oksijenden kaynaklanan reaktif oksijen radikallerinin canlılardaki toksik etkilerini önleyen enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalar aynı zamanda organizmayı reaktif nitrojen oksit türlerine karşı da koruyucu fonksiyonlar gösterirler. Glutasyon, askorbik asit, ürik asit, tokoferoller, protein tiyoller nitrojen oksit türleri ile tepkimeye girip oksitlenirken, aslında reaktif nitrojen oksitlerine karşı diğer hücresel molekülleri de korurlar. Bu antioksidan bileşiklerin en etkin olanı glutasyon olup, tepkimeleri sonunda nitrozo glutasyon ve oksitlenmiş glutasyon (GSSG) oluşur. Reaktif oksijen türlerine karşı enzimatik oksidan sistemi oluşturan bir grup enzimde reaktif nitrojen oksit türlerine karşı koruyucu fonksiyonlar gösterirler. Bu koruyucu mekanizmaların başlıcaları şunlardır [47]:

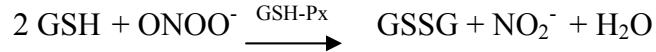
1) Hidrojen peroksidin yıkımını katalizleyen katalaz enzimi reaktif nitrojen oksit türlerinin oluşumunu da engeller. Çünkü H_2O_2 tarafından oksitlenen hemoproteinlerin hem-demiri nitritten nitratlayıcı ve oksitleyici türlerin oluşumuna neden olur.

2) SOD enzimi nitrosil iyonlarının dismutasyonunu katalizleyerek, reaktif bir tür olan nitrosili çok daha az reaktif olan NO'ya oksitler. SOD enzimi ortamdaki süper oksitlerin derişimini de azalttığından, reaktif nitrojen oksit türlerinden olan peroksinitrit oluşumunu da önleyici etkilere sahiptir.

3) Oksihemoglobin adeta bir enzim gibi nitrik oksiti nitrata oksitleyerek reaktif nitrojen oksit türlerin oluşumunu önler.

4) Nitrik oksit sentezini katalizleyen NOS enzimlerinin, özellikle eNOS ve nNOS enzimlerinin aktivitesi kontrol altındadır. Bu sayede aşırı NO sentezine bağlı olarak oluşabilecek reaktif nitrojen oksit türlerinin sentezi önlenir.

5) Hidrojen peroksit yıkımını katalizleyen glutatyon peroksidaz enzimi, peroksinitritin yıkımını da katalizler.



6) Fe (III) kompleksleri, nitriti nitronyum iyonuna oksitleyerek nitrasyon tepkimelerine neden olabilirler. Bakır iyonları da nitrozotiyollerin hızlı bozulumunu katalizleyerek hızlı ve yüksek derişimde NO salınımına ve neticede nitrozatif strese neden olurlar. Bu nedenle metal iyonunu bağlayıcı proteinler (transferin, ferritin, seruloplazmin gibi) reaktif nitrojen oksit türlerine karşı bir koruma mekanizması oluştururlar.

1.5. Adrenomedullin (AdM)

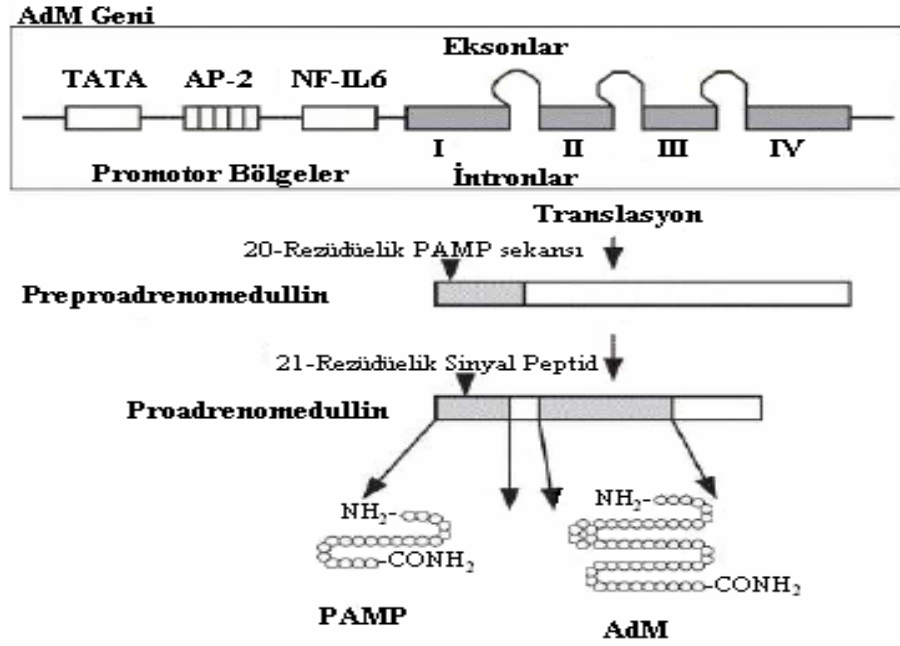
Yeni bir düzenleyici peptid olarak Adrenomedullin (AdM); 1993 yılında, Japon bilim adamları tarafından bazı peptidlerin trombosit siklik-adenozin monofosfat (cAMP) düzeylerine etkisi araştırılırken feokromositoma (adrenal medulla tümörü) hücrelerinden elde edilmiştir [66]. İnsan AdM'si 52 amino asitten oluşan, 16. ve 21. rezidüleri arasında tek bir disülfid bağı ile bağlanan ve karboksi terminalinde aminlenmiş tirozin bulunan bir peptiddir. İlk olarak adrenal medullada bulunduğu için "adrenomedullin" olarak isimlendirilen bu peptid kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP) ve amilin ile homoloji gösterdiğinden CGRP/amilin peptid ailesine eklenmiştir [67, 68]. 2004 yılında iki farklı gruptaki bilim adamları bu peptit ailesine ait olan adrenomedullin-2 (AdM-2) veya intermedin adı verilen yeni bir peptidi tanımladılar. AdM protein sekansı CGRP ile %24, amilin ile %22 ve AdM-2 ile %34 homoloji göstermektedir. AdM ve homoloji gösterdiği peptidlerin amino asit sekansları Çizelge 1.2'de verilmiştir [68].

Çizelge 1.2. AdM ve homoloji gösterdiği peptidlerin amino asit sekansları [68]

PAMP	ARLDVASEFRKKWNKWALSR
CGRP	ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNNF-VPTNVGSKA-F
Amilin	KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGAIL-SSTNVGSNT-Y
İntermedin	TQAQLLRVGCVLGTCQ VQNLSHRLWQLMGPAQRQDSAPVDPSSPHSY
İnsan AdM	YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNV-APRSKISPQGY
Sıçan AdM	YRQSMN--QGSRSTGCRFGTCTMQKLAHQIYQFTDKDKDGM-APRNKISPQGY

İnsan AdM geni 11. kromozomda yerleşmiştir, 4 ekson ve 3 intron bölgesi içerir. AdM, 185 amino asitten oluşmuş, 21. amino asidine bağlı N-terminaline sahip büyük bir prekursor molekül “preproadrenomedullin” sentezlenir. Kalan 21 N-terminal sinyal peptidi ayrılır ve 164 aminoasit içeren proadrenomedullin (proADM) peptidi oluşur. ProAdM’den immatür ve inaktif AdM (AdM-Gly) ve eş zamanlı plazmada AdM-Gly’den enzimatik amidasyon ile AdM meydana gelir. ProAdM’nin N-terminal bölgesinde amidasyon sinyalinin bulunduğu proadrenomedullin N-terminal 20 peptid (PAMP) oluşur ki PAMP biyolojik olarak aktif bir peptid olmasına rağmen AdM’den daha az etkilidir. AdM’yi 4. ekson, PAMP’ı ise 2. ve 3. eksonlar kodlar (Şekil 1.12) [69].

AdM geninin 5' ucunda; TATA, CAAT ve GC kutuları ve aynı zamanda aktivatör protein-2 (AP-2) ve cAMP ile düzenlenen indükleyici regülatör proteinler için bağlanma bölgeleri vardır [70]. Adrenomedullin geninde TATA, CAAT ve GC içeren alanlar transkripsiyonda rol oynar. Örneğin TATA bölgesi RNA polimeraz II'ye bağlanır. Ayrıca gen iki ardışık alan nükleer faktör-interlökin6 (NF-IL6) ve aktivatör protein-2 (AP-2) nükleotidlerinde içerir. AP-2 bağlanma alanları protein kinaz-C ve cAMP aktivasyonunda rol oynar. NF-IL6 bölgesi ise akut faz proteinlerinin bağlandığı bölgedir. IL1 α ve β , TNF α ve β gibi sitokinler ve lipopolisakkaridler ile AdM üretiminin uyarılması NF-IL6 bölgesine bağlıdır. Böylece inflamasyon ve infeksiyöz bölgelerde kan akımı artışını sağlar [69] (Şekil 1.12.).



Şekil 1.12. Adrenomedullin geninin moleküler yapısı [69]

Sıçan AdM'si 50 amino asit içerir. İnsan AdM'si ile karşılaştırıldığında 2 amino asit eksik ve 6 amino asidin yerleri farklıdır. Çizelge 1.3'de insan ve sıçan AdM amino asit dizilimleri gösterilmiştir [67, 71].

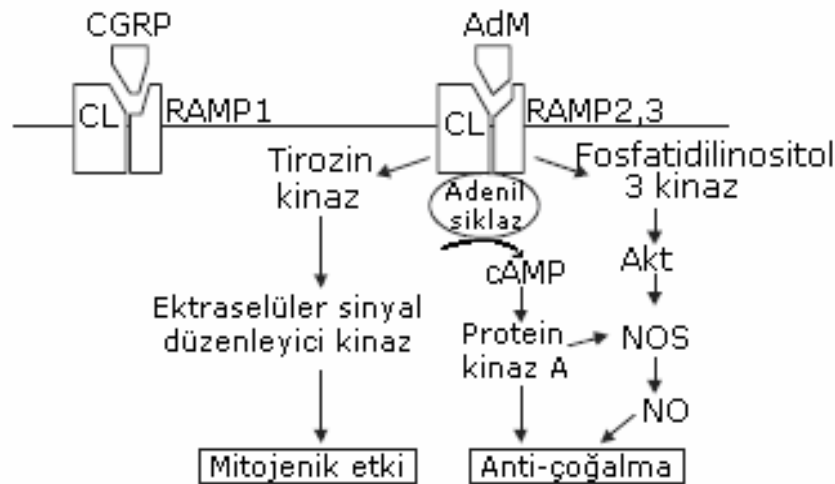
Çizelge 1.3. İnsan ve Sıçan AdM Peptid Sekansları. Kırmızı yazılı olan amino asitler insan amino asit dizilimindeki değişikliği, (-) ile belirtilenler de ise eksik olan amino asitleri göstermektedir [71]

Tür	Peptid sekansı
İnsan	H ₂ N-YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGY-CONH ₂
Sıçan	H ₂ N-YRQSMN- - QGSRSFGCRFGTCTMQKLAHQIYQFTDKDKDGMAPRNKISPQGY-CONH ₂

Etkili bir vasodilatör peptid olan AdM, normal adrenal medullada, kalpte, akciğerde, böbreklerde, plazmada, idrarda ve adipoz dokularda bulunmaktadır [72, 73]. Temel olarak vasküler endotelial hücreler, vasküler düz kas hücreleri ve makrofajlar tarafından üretilmesine rağmen AdM aynı zamanda fibroblastlar, adipositler ve kardiyak miyositler tarafından da üretilir [73]. Ek olarak çoğu tümör hücrelerinde de AdM geni veya sentezi gösterilmiştir. Bu yüzden pikomolar seviyesinde vücuttaki tüm dokularda miktarı ölçülebilir fakat dokunun kanlanma derecesine göre dokular arasındaki AdM miktarında farklılık olabilir. Plazma AdM'nin %85'i inaktif ve immatür AdM'dir ve plazmada adrenomedullin bağlayıcı protein-1'e (AMBP-1) bağlanır. Plazmaya ek olarak idrar, süt, beyin omurilik sıvısı (BOS), tükürük, amnion

sıvısı, ter ve umbilikal vende de ölçülebilir. BOS adrenomedullini plazmaya göre düşüktür. Gebelerde yapılan bir çalışmada plazma AdM düzeyi yükselirken BOS düzeyinde değişiklik olmamıştır. Bu da iki kompartmandaki adrenomedullin regülasyonunun birbirinden bağımsız olduğunu göstermektedir. İdrar ve ter içinde plazmadan daha yüksek konsantrasyonda olması böbrek ve deride AdM üretimini göstermektedir. Hemen her dokuda bulunması çoklu biyolojik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir [69].

AdM biyolojik aktiviteleri için kalsitonin benzeri reseptör (CL) ve spesifik reseptör aktivitesini modifiye eden proteine (RAMP) ihtiyaç duyar. RAMP ailesi üç üyeden oluşur: RAMP1, 2 ve 3. RAMP2 ve RAMP3 sırasıyla AdM1 ve AdM2 olarak da adlandırılmaktadır [68, 74]. Günümüzde AdM'nin biyolojik etkisini CGRP üzerinden ve spesifik AdM reseptörleri (AdM1, AdM2) aracılığı ile gösterdiği bilinmektedir. AdM1 ve AdM2 reseptörlerinde meydana gelen konformasyonel değişiklik sonucunda guanilat siklaz, adenil siklaz ve protein kinaz A uyarılır ve sonuçta intraselüler cAMP seviyesi artar. cAMP artışı hücre içi kalsiyum miktarının yükselmesi ile sonuçlanır [75]. İlk çalışmalar AdM'nin ikinci haberci olduğunu göstermiştir. Ancak Şekil 1.13'de gösterildiği gibi, AdM aynı zamanda cGMP'yi arttırmak suretiyle NO sentezini artırır. Ayrıca NO sentezi, cAMP yoluyla protein kinaz A'nın aktivasyonu ile artırılır. AdM'nin aynı zamanda endotelial NOS'un uyarılmasının sonucunda fosfatidilinositol 3-kinaz ve Akt fosforilasyonunu ortaya çıkardığı gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda AdM'nin protein tirozin kinaz aktivasyonu yoluyla ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazı uyardığını ve bu suretle hücrenin mitojenik evresini düzenleyebildiği rapor edilmiştir [68].



Şekil 1.13. AdM'nin reseptör kompozisyonu ve hücre içi sinyal yolu [68]

AdM; damar genişletici, bronşiyal genişletici, tuz ve su dengesini düzenleyici, nörotransmitter, büyüme faktörü, hormon salınımını düzenleyici, anjiogenik molekül ve antimikrobiyal molekül olarak görev yapan çok fonksiyonlu bir peptiddir [73, 74]. Bunlara ilave olarak tümör biyolojisinde AdM'nin farklı etkiler gösterdiği rapor edilmiştir [71].

AdM ve PAMP intravenöz olarak uygulandığında, çevresel damarlarda etkili bir hipotensif etkiyi ortaya çıkarır. AdM ve PAMP'ın damar gevşemesini sağlaması sonucunda vasküler düz kas kontraksiyonu engellenerek çevresel damar basıncını azalır ve bununla birlikte kan akışı artar [71]. Adrenomedullin damar genişletici etkisini hem cAMP'nin doğrudan artışı yoluyla hem de NO bağımlı mekanizma ile göstermektedir [75-77].

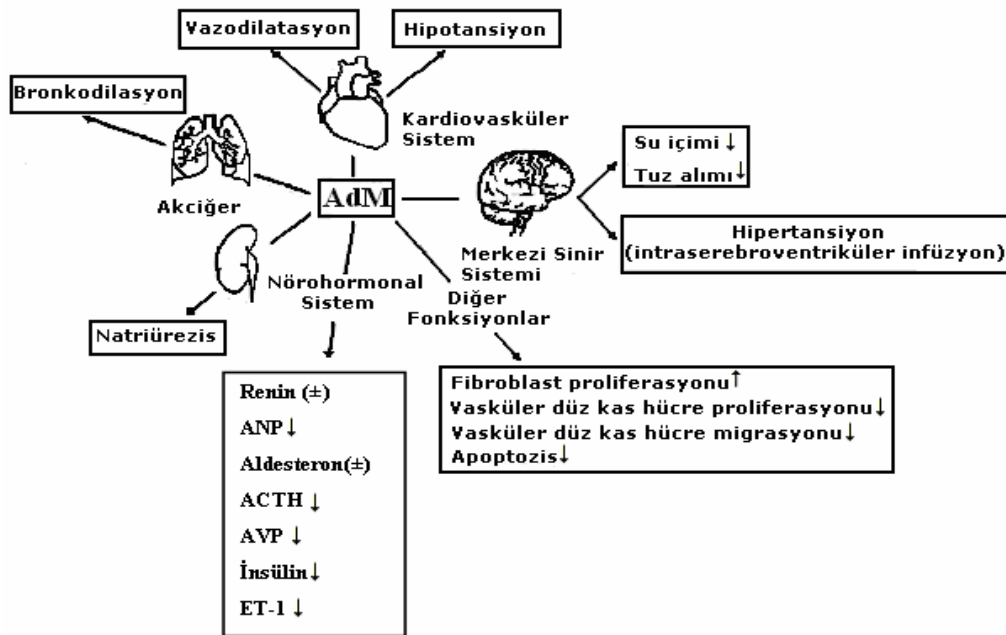
AdM, histamin veya asetilkolin'in sebep olduğu bronşiyal kasılmayı inhibe eder. AdM'nin gevşetici cevabı, pulmoner hipertansiyonlu hastaların pulmoner sirkülasyonlarında koruyucu bir rol oynayabilir. Ayrıca AdM akciğerde anti-inflamatör bir role sahip olabilir. Özellikle akciğerlerde inflammatör sürecin bir kısmı olan kemotaksizle cavapta makrofajlar nötrofilleri etkileyen kimyasallar salarlar. AdM doza bağımlı olarak lipopolisakkaritlere cevap olan nötrofilleri etkileyen kimyasalların salınımını alveolar makrofajlarda önemli derecede inhibe eder [67].

Intraserobroventriküler olarak AdM'nin uygulanması su alımını ve tuz iştahını inhibe eder. Buna ilaveten, endojen AdM'nin inaktivasyonu su ve sodyum alımını artırır. Uyanık sıçanlarda AdM'nin merkezi sinir sistemine enjeksiyonu idrar çıktısını ve sodyum ve potasyum boşaltımını artırır. Ancak periferik hipotensif etkilere zıt olarak merkezi olarak uygulanan AdM simpatik sinir sistemini uyararak kan basıncını ve kalp atım hızını artırır [70]. AdM'nin elektrolit dengesi ve bronşiyal gevşeme üzerine etkisi bu düzenleyici peptidin nörotransmitter veya nöromodülatör özelliklerini göstermektedir [71].

AdM; tümör çoğalmasını, anjiogenezisi ve apoptozisin inhibisyonunu teşvik ederek karsinogenez ve tümör gelişiminde işe karışmaktadır [74]. AdM hücre tipine bağlı olarak hücre çoğalmasını hem uyarıcı hem de inhibe edici etkiler göstermektedir. AdM; fibroblastlarda, keratinositlerde, endotelial hücrelerde, osteoblastlarda ve birçok tümör hücresinde hücre çoğalmasını uyarır. Hemen hemen bütün tümör hücrelerinde çalışılmış olan AdM önemli bir tümör büyüme faktörü olabileceği önerilmektedir. Bunlara ilave olarak AdM anjiogenik özelliklerinden dolayı tümör anjiogenezini ilerletebilir. Buna karşın vasküler düz kas hücreleri, mesanşial hücreler, glial hücreler

ve glial hücre tümörleri gibi bazı hücre tiplerinde büyüme üzerine AdM'nin inhibe edici etkisi birçok çalışmada gösterilmiştir [70]. AdM anjiogenezin güçlü bir uyarıcısıdır, normal vasküler gelişim için sekresyonuna ihtiyaç vardır. Fakat aşırı salınımı ya tümör gelişiminin sebebi ya da sonucu olabilir [69].

AdM'nin en önemli görevlerinden biri diğer hormonların salınımını düzenleme yeteneğidir [71]. AdM; ACTH salınımını doza bağımlı olarak inhibe eder, arjinin-vazopressin ve oksitosin salınımını düzenler, büyüme hormonu salınımını artırır ve aldosteron salınımını uyarır veya inhibe eder [67, 71, 73]. Renin-anjiotensin-aldosteron sisteminde yer alan anjiotensin II'nin hem sentezini hem de etkisini inhibe eder [69]. Yapılan birçok çalışmada AdM'nin renin salınımını arttırdığı gösterilmiştir. AdM renin salınımını düzenlemede ve renin gen ifadesinin düzenlenmesinde otokrin ve/veya parakrin uyarıcı bir faktör olarak rol oynayabilir. Tavşanlara insan AdM'sinin uygulanmasıyla doza bağlı olarak plazmadaki norepinefrin miktarının arttığı ve bunun sonucunda arteriyal kan basıncının azaldığı gösterilmiştir. Neonatal kardiomisit kültüründeki AdM, doza bağlı olarak cAMP birikimini artırır ve atrial natriüretik peptid (ANP) gen ifadesini ve salınımını inhibe eder. Diğer taraftan insanlarda 60 dakika için 0.1 µg/kg/dak. atrial natriüretik peptidin infüzyonu idrar ve kan basıncında düşürücü etkiye ilave olarak dolaşımdaki AdM'nin 4 kat artmasına neden olur [78]. Oral glukoz alımını takiben AdM, insülin salınımını erteleyerek veya azaltarak düzenler [69].



Şekil 1.14. AdM'nin biyolojik görevleri [78] ANP: Atrial natriüretik peptid, ACTH: Adrenokortikotropik Hormon, AVP: Arjinin Vazopressin, ET-1: Endotelin-1.

AdM pek çok koruyucu doku ve sıvılarda bulunmaktadır. Bu durum AdM'nin mikrobiyal kolonizasyona karşı savunmada rol alabileceğini önermektedir. AdM ve mRNA'sı organizmayı dış ortama karşı koruyan epitel hücrelerde (deri, hava yolları, sindirim kanalı, kornea v.s.) ve koruyucu salgılarda (tükürük, ter, süt v.s.) bulunmaktadır. [71]. Adrenomedullin sistemik ve lokal inflamasyon ve sepsis sırasında plazmada yüksek düzeylere ulaşır. Bu multifonksiyonel peptidin artışı enfeksiyon sırasında tamamen inflamasyonu yansıtır, hem hormon hem de sitokin gibi davranır, aynı zamanda bölgesel kan akımı, lökosit göçünü, elektrolit dengesini kardiyak performansını ve glukoz alımını kontrol eder. Çoğu çalışmada AdM'nin inflamasyon boyunca sitokinler gibi inflamatuvar araçlar ile hem NO-bağımlı hem de NO-bağımsız mekanizmalar ile üretilmesi hem tedavinin devam etmesi hem de hemostazisin yeniden düzenlenmesinde başarılı bir role sahip olduğundan bahsedilmektedir. Fakat bazı olgularda ise hasar ve enfeksiyon cevabı patolojik hasarla sonuçlanabilir. Normalde sepsis ve septik şok sırasında NO-bağımlı mekanizmayla mikroorganizma saldırısına karşı etkili değildir. Fakat kardiyovasküler sistemin direkt etkilenmesi ve yaygın oksidatif hasar nedeniyle nitrojen metabolitlerinin üretilmesi sonucunda AdM ortaya çıkar. Sepsisin ilerleme basamağında AdM ve adrenomedullin bağlayıcı proteinin sepsis sırasında beraber verilmesi ilerlemeyi engeller [69].

Endotel hücrelerde H_2O_2 'den kaynaklanan oksidatif stres AdM transkripsiyonunu ve AdM ifadesinin artmasını başlatır. AdM ifadesindeki artış anjiyotensin-II ile uyarılan hücre içi reaktif oksijen türlerinin oluşumunun AdM tarafından direkt bloke edilmesiyle (cAMP bağımlı tarzda) koruyucu bir rol yapabilir [73].

AdM'nin pulmoner yol ile de atıldığı rapor edilmiştir. İmmünoreaktif AdM insanda çeşitli dokularda ölçülmüş, plazmada AdM konsantrasyonunun aorttaki miktarının, pulmoner arterdekinden belirgin olarak daha az olduğu bulunmuştur. Yeni doğan iki haftalık domuz yavrularında sağ ve sol artiumlara aynı dozda insan AdM'si verilmiş, sol atriuma verilen AdM'den sonra sistemik ortalama arter basıncı ve ortalama pulmoner arter basıncında belirgin düşme bulunmuştur. Bununla beraber, aynı miktar AdM sağ atriuma verildiğinde ortalama pulmoner arter basıncında belirgin bir düşme olmasına rağmen sistemik arter basıncında önemli değişiklikler bulunamamıştır. Bu da AdM'nin sistemik damar genişletici özelliğinin pulmoner sirkülasyonda ilk geçiş eliminasyonuna uğradığını bildirilmiştir [78, 79]. Muhtemelen akut miyokard

enfarktüsü sırasında plazma ve idrarda birbirine paralel yükselmesiyle beraber idrarda 15 kat yüksek saptanması üzerine vücuttan idrar yoluyla da atıldığı önerilmiştir [69].

Literatür verilerine göre benzo(a)piren uygulaması ile yapılan pek çok sayıda çalışma olmasına rağmen son yıllarda keşfedilen ve çok yönlü etkisi olduğu bilinen AdM ile birlikte yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Çalışmamızda, karsinojenik etkileri olduğu bilinen benzo(a)piren uygulamasından sonra adrenomedullin verilen sıçanların bazı dokularında biyokimyasal ve histolojik değişimler araştırılmıştır. Kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer dokularında antioksidan sisteme ait toplam glutatyon miktarı, MDA düzeyleri, SOD, CAT, GSH-Px enzim aktiviteleri ayrıca; NO ve AdM düzeyleri ölçülmüştür. Benzo(a)piren uygulamasından sonra AdM'nin biyokimyasal ve histolojik yönden telafi edici ve/veya koruyucu etkisinin değerlendirilmesi çalışmanın amacını oluşturmaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Yaşadığımız çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar sonucunda sürekli olarak devam eden bir radikal yapımı vardır [32, 40]. Besinlerde, çalışma ortamlarında ve çevrede bulunabilen B(a)P, organik materyallerin tamamlanmamış yanması sonucunda oluşmaktadır [21]. Çevresel faktörler, vücuda alınan çeşitli kimyasal bileşikler, çeşitli enfeksiyonlar, doku travmaları gibi patolojik durumlar vücutta radikal yapımında artışa neden olurlar. Düşük derişimdeki radikal yapımının etkileri çok uzun bir süreç sonunda örneğin yaşlanma sonunda görülürken; yüksek derişimde ve yaygın radikal yapımının etkileri kısa sürede ve ciddi bir patolojik durum olarak karşımıza çıkabilir. Hayvan deneylerinde karsinogen olduğu gösterilen B(a)P’ın da içinde bulunduğu PAH’ların metabolize olmaları sırasında ROT’lar oluşabilir [27]. Oluşan bu reaktif türler hücrel koşullarda ciddi miktar ve çeşitlilikte radikal üretilmesine neden olabilmektedir. Radikal üretimi organizmaya zarar verici boyutlara ulaştığında birçok patolojik durum ortaya çıkmaktadır. Literatür araştırmalarımızda B(a)P’ın neden olduğu oksidatif stres ile ilgili sınırlı sayıda çalışma olduğu saptanmıştır. Bu çalışmaların bir kısmı aşağıda özetlenmiştir.

Kim ve Lee 1997 yılında, oksidatif hasarı incelemek amacıyla dişi Sprague-Dawley sıçanlarda bir çalışmada yapmışlardır. Bu çalışmada araştırmacılar hayvanlara oral olarak 75 mg/sıçan olacak şekilde mısır yağında çözülerek hazırlanan B(a)P uygulanmış ve 0, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saat sonra hayvanlar kurifiye edilerek karaciğer, böbrek ve akciğer dokularındaki SOD ve CAT enzim aktivitelerini ölçmüşlerdir. Çalışmanın sonucunda, karaciğer dokusundaki SOD enzim aktivitesinin uygulamadan 6 saat sonra önemli derecede azaldığını ve 24. saate kadar düşük seviyede devam ettiğini 24 saat sonra kontrol gruplarına göre SOD enzim aktivitesinde artma olduğunu, böbrek dokusunda 72. saate kadar SOD aktivitesinde azalma olduğunu ve 72. saatten sonra SOD aktivitesinin arttığı, akciğer dokusundaki SOD enzim aktivitesinde ise önemli bir değişikliğin olmadığı gösterilmiştir. Karaciğer dokusunda CAT enzim aktivitesinin uygulamadan 6 saat sonra önemli derecede düşüş olduğu ancak hemen kontrol seviyesine geri yükseldiği, böbrek dokusundaki CAT enzim aktivitesi uygulamadan 12 saat sonra azaldığı ve 96. saatte kontrole yakın bir seviyeye yükseldiği rapor edilirken akciğer dokusundaki CAT enzim aktivitesinde önemli bir değişikliğin olmadığı gösterilmiştir [80].

Kim vd. 2000 yılında erkek Sprague-Dawley sıçanlarla yaptıkları çalışmada mısır yağında çözülerek hazırlanmış olan B(a)P'dan her bir sıçan için 20 mg olacak şekilde hayvanlara intraperitoneal olarak enjeksiyon yapmışlardır. Araştırmacılar uygulamadan 0, 3, 6, 12, 24, 48 ve 96 saat sonra hayvanları eter ile öldürerek serumda lipid peroksidasyonunu, eritrositlerde SOD ve CAT enzim aktivitelerini ölçmüşlerdir. Araştırmacılar çalışmalarının sonunda ilk 6 saatte MDA seviyelerinde önemli bir değişiklik olmadığını ancak 12. saatten itibaren MDA seviyelerinde kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak önemli derecede artış olduğunu bildirmişlerdir. SOD ve CAT aktiviteleri için yapılan ölçümlerde B(a)P uygulamasından 6 saat sonra enzim aktivitelerinin kontrol gruplarına göre eritrositlerde istatistiksel olarak önemli derecede arttığını 24. saatte en yüksek seviyeye ulaştığını ve 96. saatte kontrol seviyesine düştüğünü göstermişlerdir [18].

Garçon vd. 2001 yılında insan akciğer hücrelerinde (A549) bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada Fe₂O₃, B(a)P ve pireni ayrı ayrı ve birlikte uygulamışlar ve MDA, SOD GSH-Px, GR, redükte glutatyon (GSH) ve okside glutatyon (GSSG) parametrelerini araştırmışlardır. Bu çalışmada artan GSSG/GSH oranını tespit etmişlerdir. Sadece B(a)P uygulaması insan hücrelerinde oksidatif hasarı ve sadece piren uygulaması da serbest radikaller ile indüklenen hasarı indüklememiştir. Ancak kombine uygulamalar hem enzimatik (SOD ve GR aktivitelerinde artış) hem de enzimatik olmayan (GSSG/GSH oranında artış, α -tokorol azalması) antioksidan savunmada hasara yol açmış ve buna bağlı olarak da MDA seviyeleri de artmıştır. Araştırmacılar bunun nedeninin artan Fe₂O₃ alınımı ile birlikte daha fazla PAH alınmasının gerçekleştiği ve dolayısıyla kombine uygulamanın ayrı ayrı uygulamalara göre daha zararlı olduğunu bildirmişlerdir [81].

Mendikute vd. 2002 yılında yayınladıkları bir çalışmada B(a)P uygulamasının bir deniz canlısı olan *Mytilus galloprovincialis*'in hemositlerindeki oksijen radikallerinin üretimini ve aktin filamentlerinin tahribini incelemişlerdir. Araştırmacılar *in vitro* olarak 10 mg/mL ve üzerindeki dozlarda B(a)P'a maruz kalmanın midye hemositlerinde özellikle süperoksit anyonu gibi ROT'ların miktarını arttırdığını göstermişlerdir. Oldukça reaktif moleküller olan ROT'lar moleküllerin sülfidril gruplarıyla reaksiyona girmektedir. Bunun sonucunda da endositoz ve hemositlerdeki aktin hücre iskeletinin bütünlüğü üzerine B(a)P'ın zararlı etkileri olduğu çalışmada rapor edilmiştir. Araştırmacılar; B(a)P'ın bu etkilerini ya direkt olarak hücre iskelet proteinlerinin ROT ile indüklenen hasarı ile veya Ca homeostazisinde rol alan

proteinlerin hasarı nedeniyle dolaylı olarak meydana getirdiğini çalışmada bildirmişlerdir [23].

Hanachi vd. 2003 yılında *Mus musculus* farelerinin karaciğer ve böbrek dokularındaki GST ve GSH-Px üzerinde B(a)P'in etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar üç uygulama grubuna haftada 1 kez 200mg/kg dozda i.p. yolla B(a)P uygulaması yapmışlardır. Grup 1, 2 ve 3 sırasıyla 2, 4 ve 8 haftalık uygulamadan sonra sakrifiye edilerek karaciğer ve böbrek dokularında GST ve GSH-Px seviyeleri ölçmüşlerdir. P. Hanachi ve arkadaşları, GST aktivitesinin hem karaciğer hem de böbrek dokularında 2 haftalık uygulama grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede arttığını, ancak GST aktivitesinin 8 haftalık uygulama grubunda istatistiksel olarak önemli derecede azaldığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar GSH-Px aktivitesinin karaciğer dokusunda 4 haftalık uygulama grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede arttığını ancak böbrek dokusunda istatistiksel olarak önemli bir değişikliğin olmadığını rapor etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada 4 haftalık uygulamadan sonra karaciğer dokusunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında morfolojik olarak farklılıklar görüldüğü ve genel olarak nodüllerin oluştuğu, böbrek dokusunda ise uygulama sonrasında bol miktarda lenfositlerin olduğu ve medullada inflamasyon olduğu gösterilmiştir [82].

Badary vd. 2003 yılında yaptıkları çalışmada erkek Wistar albino fareleri 4 gruba ayırmışlardır. Araştırmacılar I. ve II. gruptaki hayvanlara 18 günlük normal diyet, III. ve IV gruptaki hayvanlara 18 günlük düşük protein içeren diyet uygulamışlardır. Ayrıca II. ve IV. gruptaki hayvanlara üç günde bir olmak üzere 15 günlük periyot boyunca i.p. olarak 10 mg/kg B(a)P enjekte ederek hayvanların karaciğer, akciğer ve mide dokularındaki SOD, GSH ve lipid peroksidasyonundaki değişimleri incelemişlerdir. Çalışma sonunda farelerin karaciğer, akciğer ve mide dokularındaki SOD enzim aktivitesindeki artışın kontrole göre istatistiksel olarak önemsiz olduğu buna karşın GSH seviyelerindeki artışların istatistiksel olarak önemli düzeyde oldukları bildirilmiştir. Araştırmacılar karaciğer dokusunda ölçülen lipid peroksidasyonundaki artışın kontrole göre istatistiksel olarak önemli iken akciğer ve mide dokularında ölçülen lipid peroksidasyonundaki değişimlerin ise önemsiz olduğunu rapor etmişlerdir [83].

Selvendiren vd. 2004 yılında, sağlıklı erkek Swiss albino farelere mısır yağında çözülerek hazırlanmış olan B(a)P'dan 50 mg/kg v.a. dozda, 4 hafta süresince haftada 2 defa oral yolla uygulama yaparak hayvanlarda akciğer kanseri oluşturmuşlardır.

Araştırmacılar çalışmalarının sonucunda lipid peroksidasyonunda istatistiksel olarak önemli bir artma ve SOD, CAT, GSH-Px ve GSH düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir azalmanın olduğunu rapor etmişlerdir [84].

Pan, Ren ve Liu'nin 2006 yılında yapmış oldukları bir araştırmada deniz tarağı *Chlamys farreri*'ye 0.5 µg/L, 1.0 µg/L, 10 µg/L ve 50 µg/L olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda B(a)P uygulamışlardır. Araştırmacılar deniz tarağının hemolenflerinde SOD, GSH-Px ve lipid peroksidasyonunu çalışmışlar ve çalışmanın sonucunda, 0.5 µg/L ve 1.0 µg/L olan konsantrasyonlarda SOD aktivitesinin kontrole göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğunu 10 µg/L ve 50 µg/L ise başlangıçta arttığını ancak daha sonra kontrolden daha düşük seviyeye azaldığını bildirmişlerdir. Çalışmada GSH-Px aktivitesinin tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak önemli derecede arttığı bildirilirken, lipid peroksidasyonun 0.5 µg/L'lik konsantrasyon hariç diğerlerinde istatistiksel olarak önemli derecede arttığı bildirilmiştir [85].

Romesh ve Knuckles tarafından 2006 yılında yapılan başka bir çalışmada farklı dozlarda B(a)P'a maruz kalmanın B(a)P-DNA adduct'larının oluşumundaki etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada dişi ve erkek F-344 sıçanlara düşük (5mg/kg), orta (50mg/kg) ve yüksek (100mg/kg) dozlarda B(a)P hayvanlara besin ile verilmiştir. Uygulamadan sonra denekler 30, 60 ve 90. günlerde kurban edilerek akciğer ve karaciğer dokularındaki B(a)P-DNA adduct'ları ince tabaka kromatografisi ile analiz edilmiştir. Düşük ve orta dozda B(a)P'a maruz kalan hayvanların dokularındaki DNA adduct seviyelerinin önemli derecede maruz kalma ile ilişkili olduğu, ancak yüksek dozda B(a)P'a maruz kalan hayvanların dokularındaki DNA adduct seviyelerinin doğrusal olmadığı bildirilmiştir. Benzer olarak orta veya yüksek dozlarda kısmi DNA adduct'ların varlığı, düşük dozda ölçülenden önemli derecede daha yüksek olduğu araştırma sonucunda bildirilmiştir [17].

Samarth vd. 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada Swiss albino farelere subkutan enjeksiyon ile 0.5 mg tek doz B(a)P uygulamışlardır. Uygulama sonucunda araştırmacılar tarafından akciğer ve karaciğer dokularında GSH, SOD ve CAT enzim aktivitelerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azaldığı, lipid peroksidasyonunun arttığı bildirilmiştir. Ayrıca, araştırmacılar hayvanların vücut ağırlıklarının ve akciğer dokularının ağırlığında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azaldığını ve uygulama yapılan hayvanların %67.92'sinde akciğer adenomasi gözlemlendiğini rapor etmişlerdir [86].

Saunders vd. 2006 yılında yaptıkları çalışmada F-344 sıçanlarında B(a)P ile indüklenen akut nörotoksisitede oksidatif stresin etkilerini beyin dokusunda araştırmışlardır. Araştırmacılar tek dozda gavaj yolu ile 25-200 mg/kg v.a. B(a)P uygulamasıyla sıçanlarda SOD, CAT GSH-Px enzim aktiviteleri ve MDA seviyelerini çalışmışlardır. B(a)P uygulamasından 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saat sonra deney hayvanları sakrifiye edilmiştir. B(a)P uygulamasına bağlı olarak çalışmadaki tüm antioksidan enzimlerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde azalma, MDA seviyelerinde ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artış bildirmişlerdir. Araştırmacılar B(a)P ile indüklenen akut nöro-davranışsal toksisitede, beyin antioksidan sisteminin inhibisyonundan dolayı kaynaklanan oksidatif stresin rolü olabileceğini ileri sürmüşlerdir [87].

Park S.Y. ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada 0,1 μ M, 1 μ M, 4 μ M ve 10 μ M 24 saat'lik B(a)P uygulamasının insan hepatoma HepG2 hücrelerindeki CAT enzim aktivitesi ve lipid peroksidasyonu üzerine etkileri araştırmışlardır. Araştırmacılar çalışmalarının sonunda CAT enzim aktivitesinin tüm konsantrasyonlar için kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığını ve lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA seviyelerinin ise 1 μ M B(a)P uygulama grubunda istatistiksel olarak önemli bir artış varken diğer gruplardaki artışın önemsiz olduğunu bildirmişlerdir [88].

Jifa vd. 2006 yılında 6, 12, 18 günlük 2-20 μ g/L B(a)P'a maruz kalan bir balık türünde (*Lateolabrax japonicus*) SOD, CAT, GPx, GST ve GSH seviyelerini karaciğer dokusunda araştırmışlardır. Araştırmacılar çalışmalarının sonunda SOD enzim aktivitesinin her iki dozda ve tüm uygulama gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığını, CAT enzim aktivitesindeki değişikliklerin istatistiksel olarak önemli olmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar tarafından GPx enzim aktivitesinde 6. gün 2 μ g/L uygulama grubundaki artışın istatistiksel olarak önemsiz olduğu ancak diğer uygulama gruplarındaki değişikliklerin istatistiksel olarak önemli olduğu bildirilmiştir. GST seviyesinin 6. günde her iki dozdaki uygulama gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir azalışın olduğu buna karşın 18. günde yapılan ölçümlerde ise istatistiksel olarak önemli düzeyde artışın olduğu bildirilmiştir. Toplam GSH miktarındaki değişimlerin ise 18. günlük uygulama gruplarındaki artışın istatistiksel olarak önemli olduğunu diğer uygulama gruplarındaki değişikliklerin önemsiz olduğu rapor edilmiştir [89].

Wang vd. 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada bir balık türüne (*Sebasticus marmoratus*) zeytinyağında çözündürülerek hazırlanan 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg ve 10 mg/kg dozlarda tek i.p. enjeksiyonla B(a)P uygulaması yapmışlardır. Araştırmacılar uygulamadan 7 gün sonra balıkları öldürerek aldıkları karaciğer dokusunda GPx, GSH ve MDA seviyelerindeki değişimi incelemişlerdir. Çalışma sonunda araştırmacılar MDA seviyelerinin tüm dozlarda kontrole oranla istatistiksel olarak önemsiz olduğunu, GPx enzim aktivitesindeki 0,5 ve 1 mg/kg dozlardaki artışların istatistiksel olarak önemli iken 5 ve 10 mg/kg dozlardaki farklar önemsiz olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar tarafından GSH seviyesindeki artışların istatistiksel olarak önemli düzeyde oldukları rapor edilmiştir [90].

Tarafımızca yapılan literatür araştırmalarında B(a)P'in neden olduğu toksisitede AdM'nin etkisi ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Ancak karsinogen olduğu bilinen bu kimyasalın uygulaması ve ROT'ların etki mekanizmalarıyla ilgili çalışmalar mevcuttur. AdM hakkındaki ilk yayın 1993 yılında Kitamura, Kangawa, Kawamoto, Ichiki, Nakamura, Matsuo ve Eto tarafından yapılmıştır. Yapılan çalışmada AdM'nin kan basıncının kontrolünde rol oynadığı ve kan dolaşımındaki miktarının ölçülebilecek düzeyde olduğundan bahsedilmiştir [69].

Son yıllarda çok fonksiyonlu bir peptit olan AdM'nin antioksidan özellik gösterebileceğine dair çalışmalar da literatürde yer almaktadır. Bununla birlikte tarafımızca yapılan literatür araştırmalarında B(a)P'in neden olduğu toksisitede AdM'nin etkisinin çalışıldığı herhangi bir bilgiye rastlanılmamıştır. Ancak B(a)P uygulaması, canlılar için bir stres faktörü olarak da değerlendirilebilir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, çeşitli stres şartlarında canlılardaki AdM seviyelerinin değişimi ile ilgili literatürde çalışmalar mevcuttur. AdM'nin vazoaktif bir peptid olarak tanımlanmasından sonra bu peptidin multifonksiyonlu özellikler göstermesi nedeniyle bilim insanlarının ilgisini çekmiş ve oldukça popüler bir çalışma konusu olmuştur AdM hakkındaki araştırmalar günümüzde de hızla devam etmektedir.

Shimosawa vd. tarafından yapılan çalışmada antiotensin-II ve tuz diyeti modeli kullanılarak, AdM^{+/-} farelerin daha ağır oksidatif strese maruz kaldıklarını gösterilmiştir. Araştırmacılar 2002 yılında yaptıkları bu çalışmada oksidatif stres belirteçleri olan izoprostan ve 8-hidroksideoksiguanozin/guanin'in (8-OHdG) idrardaki seviyelerini belirlemişlerdir, ayrıca elektron spin rezonans metodu kullanarak gerçek zaman oksidan üretimini belirlemişlerdir. Araştırma sonucunda, AdM uygulamasıyla artan oksidatif stresin azaldığı rapor edilmiştir [91].

Shimosawa vd. 2003 yılında yaptıkları çalışmada AdM yetersizliği (AdM^{+/-}) olan ve insüline duyarlı yaşlı farelerde oksidatif stres ile indüklenen değişimleri araştırmışlardır. Çalışmada; yaşlı farelerde oksidatif stresin bir markırı olan idrar izoprostan seviyelerinin kontrol (AdM^{+/+}) farelerine göre önemli düzeyde arttığı ancak AdM uygulamasına bağlı olarak idrar izoprostan seviyesinin kontrol ile aynı seviyeye geldiğini bildirmişlerdir. Bu çalışma ile araştırmacılar uzun dönem AdM yetersizliğinin oksidatif stresi arttırdığını ve AdM'nin insulin direncini indükleyerek oksidatif stresi engellediğini rapor etmişlerdir [92].

Yoshimoto vd. 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada vasküler düz kas hücrelerinde anjiotensin-II ile indüklenen ROT oluşumu üzerine AdM'nin antioksidan özelliklerini araştırmışlardır. Araştırmacılar çalışmalarının sonucunda AdM'nin hücre içi ROT oluşumunu inhibe ettiğini ve AdM'nin anjiotensin-II ile indüklenen vasküler hasarda antioksidan olarak koruyucu bir rol aldığını bildirmişlerdir [93].

Matsui vd. tarafından 2004 yılında yapılan çalışmada ROT üretimini uyarıcı kronik hipoksiya modeliyle farelerde AdM'nin koruyucu etkisini akciğerlerde araştırılmıştır. Araştırmacılar 10 haftalık erkek AdM^{+/+} ve AdM^{+/-} fareleri 3-21 gün arasında % 10'luk oksijenli ortamda barındırarak hipoksiya oluşturmuşlar ve bu hayvanlara hipoksiya süresince mikro ozmotik pompalar ile peritoneal boşluğa 30 ng/kg/saat olacak şekilde ekzojen AdM uygulamışlardır. Hipoksiya ile indüklenen pulmoner ROT üretimi yabanıl farelere göre knock-out farelerde daha fazla meydana gelmiş ve ekzojen AdM uygulaması akciğerde aşırı ROT üretimini normalize etmiştir. Araştırmacılar, hipoksiya ile indüklenen vasküler hasar modelinde AdM'nin koruyucu bir peptid olduğunu ve bu koruyucu özelliğini ROT oluşumunu baskılama ile yapabileceğini bildirmişlerdir [94].

Cao vd. 2005 yılında yaptıkları çalışmada tuza duyarlı bir sıçan türüne %8 NaCl içeren diyet uygulayarak AdM'nin antioksidan etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar tuz stresi uygulanan hayvanlara 4 hafta boyunca 1µg/saat dozda ozmotik mini pompalar ile subkutan olarak insan rekombinant AdM'si uygulamışlardır. Çalışmalarının sonucunda AdM uygulanan gruptaki hayvanların aortlarındaki süperoksit seviyelerinin azaldığı ve AdM'nin endotelial fonksiyonları geliştiren önemli antioksidan özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir [95].

Chen vd. 2005 yılında yaptıkları çalışmada AdM uygulamasının sıçan serebral endotelial hücre kültüründe oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi olduğunu bildirmişlerdir [96].

Yine 2005 yılında yapılan bir araştırmada Fujita vd. beyinde oksidatif stresin inhibisyonunda endojen adrenomedullinin etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada AdM üretimini uyarmak için AdM^{+/+} ve AdM^{+/-} farelere normal (% 0.6) ve yüksek (% 8) tuz diyeti 4 hafta uygulanmıştır. Tuz uygulamasına bağlı olarak yabancı tip farelerde beyin dokusunda AdM seviyeleri istatistiksel olarak önemli derecede artarken, knock-out farelerde artmamıştır. Çalışma sonucunda lusigenin kemiluminesens yöntem ile ölçülen ve hiperozmotik tuz ile indüklenen ROT üretimi knock-out farelerin izole hipotalamuslarında yabancı tiptekilere göre istatistiksel olarak yüksek olduğu bildirilmiştir [97].

NO; çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol alan multifonksiyonel bir moleküldür. Literatür bilgilerimize göre NO; hem antioksidan hem de pro-oksidan özelliklere sahiptir. NO'nun biyolojik rolleri konsantrasyonuna bağlıdır. Patolojik olmayan koşullarda NO konsantrasyonu nanomolar seviyede iken, oksidatif hasar durumunda mikromolar seviyededir [98, 99]. Normal biyokimyasal tepkimeler sırasında oluşan oksijen radikalleri ile çeşitli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrik oksidin derişimleri genellikle çok düşüktür. Düşük derişimdeki reaktif türler, hücrelerin antioksidan sistemleri tarafından inaktive edildiklerinden önemli toksik etkilere neden olmazlar. Ancak bu radikallerin fazla yapımları çeşitli patolojik durumlarda artabilir.

Suresh vd. 2000 yılında otomobil emisyonuna maruz kalan trafik polislerinin plazma lipid peroksitleri ve NO seviyeleri ile birlikte eritrosit lizatlarında SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırmacılar kontrol grubuna göre polislerde yüksek MDA seviyelerine karşın azalan antioksidan enzim aktiviteleri ve NO seviyeleri bildirmişlerdir. Araştırmacılar hava kirliliğine maruz kalmanın oksidatif strese neden olabileceğini bildirmişlerdir. NO'nun bronşiyal genişleme ve süperoksit anyonunu inaktive etme özelliğinden dolayı NO eksikliğinin, süperoksit radikalinin yarı ömrünün artmasına ve akciğer hasarına yol açması sonucunda oksidatif stresin meydana gelmesine katkıda bulunduğunu önermişlerdir [100].

Akciğer kanserinin oluşumunda reaktif oksijen ara ürünlerinin birikmesinin doku hasarında rolü olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle Garçon vd. 2001 yılında Sprague Dawley sıçanlarının akciğer dokusunda 3'er mg B(a)P ve Fe₂O₃'in ayrı ayrı ve birlikte intratrakiyel damlatma uygulanması sonucu oksidatif etkilerini çalışmışlardır. Kontrol grubuna fizyolojik serum veren araştırmacılar BAP ve Fe₂O₃'in birlikte ve ayrı ayrı uygulamaları sonucunda MDA seviyelerinde kontrol grubuna göre iki kat artış

bildirmişlerdir. Buna ilaveten NO seviyelerinin uygulama gruplarında ve özellikle kombine uygulama olan grupta hem iNOS mRNA ifadesinde hem de NO seviyelerinde daha da yükseldiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar kombine B(a)P ve Fe₂O₃ uygulamasının solunum kanalında tek başına B(a)P uygulamasından daha da zararlı etki gösterdiğini bildirmişlerdir [101].

Bakan vd. 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada mide kanseri olan insanların serumlarında MDA ve NO seviyelerini araştırmışlar ve bu iki parametre arasında pozitif korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar artan NO üretimi ve MDA seviyelerinin oksidan-antioksidan dengesindeki ilişki ile ilgili olabileceğini öne sürmüşlerdir [98].

Bakan vd. yaptıkları bir başka çalışmada lenfotik lösemili hastaların serumlarında antioksidan enzim ve NO seviyelerini çalışmışlardır. Araştırmacılar çalışmalarının sonucunda lösemi hastalarındaki oksidatif stresin antioksidan enzimlerde yetersizliğe neden olarak aşırı ROT ve RNOT oluşumuna yol açtığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar serum NO seviyelerinin lösemi hastalarında kontrole göre istatistiksel olarak yüksek olduğunu ve bu durumun uzun süreli dönemde DNA’da hasara yol açarak mutasyon ve kansere neden olabileceğini bildirmişlerdir [99].

Regoli vd. yaptıkları çalışmada antartik gümüş balığının doğal ortamında karşılaşabileceği doza yakın olan 0.5-5 µg/L B(a)P dozlarında uygulanan B(a)P MDA seviyesinin sadece 0.5’lik dozda önemli derecede arttığı, CAT aktivitesinde artışın ve GSH-Px aktivitesinde ise azalışın ise sadece 5 µg/L dozda kontrol grubuna göre farklı olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar artan prooksidan tehdide bu balıkların doğal olarak adapte olmasından dolayı prooksidan kimyasallara ılımlı cevap verdiklerini bildirmişlerdir [102].

Saint-Denis vd. bir solucan türü yaptıkları çalışmada çeşitli BaP uygulama dozları 50 µg-1 g/kg yapay toprak ve 1-14 günlük sürede biyokimyasal (MDA, CAT, GSH seviyeleri, GST) parametrelerdeki değişimleri araştırmışlardır. Araştırmacılar bazı doz ve uygulama gruplarında istatistiksel olarak önemli değişimler olmamakla birlikte, BaP’in serbest radikal oluşumunu teşvik edip lipid peroksidasyonunun uyurabileceğini bildirmişlerdir [103].

Wells ve arkadaşları yaptıkları çalışmada aralarında B(a)P’in da bulunduğu çeşitli teratojenik kimyasalların oksidatif hasardaki rollerini hücre kültüründe araştırmışlardır. Araştırmacılar B(a)P’in fibroblast kültür hücrelerinde DNA oksidasyonun ve mikronükleus oluşumunu başlatmada rol aldığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar

makromoleküllerin oksidatif hasarlarının ksenobiyotiklerin teratojenik mekanizmalarında rolleri olabileceğini bildirmişlerdir [104].

Herken vd. panik atak hastalarının serumlarındaki SOD enzim aktivitesi ve NO konsantrasyonunu ölçmüşler. Araştırmacılar 2006 yılında yayınladıkları makalede SOD enzim aktivitesinin azaldığını, NO konsantrasyonunun ise arttığını ancak bu değişikliklerin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli olmadıklarını rapor etmişlerdir [105].

AdM'nin 1993 yılındaki keşfinden sonra yapılan çalışmalarla çok fonksiyonlu bir peptid olduğunun ortaya çıkarılması bilim dünyasının AdM ile ilgili çalışmalarını hızlandırmıştır. Çeşitli patolojik durumlarda AdM'nin koruyucu ve telafi edici özellik gösterdiğine dair çalışmalar son yıllarda artmaktadır. Son yıllarda AdM ve NO'nun oksidatif şartlardaki etkileri ile ilgili çalışmalar literatürde yer almıştır. Bu çalışma ile B(a)P ve AdM uygulamasına bağlı olarak antioksidan enzim seviyelerindeki, lipid peroksidasyonundaki, toplam glutatyon seviyesindeki, NO ve AdM seviyelerindeki değişiklikler ve B(a)P'nin uygulanması ile AdM arasındaki etkileşim araştırılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Deneylerde Kullanılan Sıçanlar

Deneylerde İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Birimi tarafından üretilen Wistar ırkı 5-6 aylık erkek sıçanlar kullanılmıştır (n=30). Sıçanlar; Kontrol (K), Adrenomedullin (AdM), Yağ (Y), Benzo(a)piren (B(a)P), Benzo(a)piren+Adrenomedullin (B(a)P+AdM), uygulama grubu olmak üzere eşit sayıda denek içeren beş gruba ayrılmıştır. Vücut ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen sıçanlar deney gününe kadar 12 saat aydınlık/karanlık, havalandırılmalı, sabit ısı odada, özel kafeslerde barındırılmıştır. Deney süresince hayvanlara standart sıçan yemi ve içebildikleri kadar su verilmiştir.

3.1.1. Benzo(a)piren uygulaması

200 mg Benzo(a)piren 4 mL mısır yağında çözündürülmüştür. Hazırlanan B(a)P, 50 mg/kg olacak şekilde deney gruplarına intraperitoneal olarak tek dozda enjekte edilmiştir. B(a)P uygulamasından 14 hafta sonra hayvanlar sakrifiye edilerek dokuları alınmıştır.

3.1.2. Yağ uygulaması

B(a)P uygulamasına denk olacak hacimde mısır yağı hayvanlara i.p. enjeksiyon ile tek dozda enjekte edilmiştir. Yağ uygulamasından 14 hafta sonra hayvanlar sakrifiye edilerek dokuları alınmıştır.

3.1.3. Adrenomedullin uygulaması

Adrenomedullin uygulama grubuna (n=6) yedinci haftadan itibaren başlamak üzere, iki hafta süresince her gün 2 µg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde serum fizyolojik içerisinde çözündürülen AdM (Calbiochem Adrenomedullin 1-50, Rat) intraperitoneal (i.p.) enjeksiyon ile uygulanmıştır.

3.1.4. Benzo(a)piren+Adrenomedullin uygulaması

İntraperitoneal enjeksiyon ile 50 mg/kg B(a)P uygulaması yapılan deney grubuna (n=6) yedinci haftadan itibaren başlamak üzere, iki hafta boyunca her gün 2 µg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde i.p. enjeksiyon ile serum fizyolojik içerisinde çözündürülen AdM (Calbiochem Adrenomedullin 1-50, Rat) uygulanmıştır.

3.2. Organların Alınması

Sıçanları bayıltmak için anestezi madde olarak ketamin/ ksilazin hidroklorid kullanılmıştır. Sıçanlara ketamin/ ksilazin hidroklorid, 20/2 mg/kg v.a. dozda karın bölgesine enjekte edilmiş ve bayılma işlemi 3-4 dakika içinde tamamlanmıştır. Tüm uygulama ve kontrol grubu hayvanlar bayılma işleminden sonra karın bölgesinden kesilerek vücudun iç kısmı yukarı doğru göğüs kafesine kadar açılmıştır. Bu esnada organlara temas edilmemesine özen gösterilmiştir. Kalbin vena cava'sı kesilip, kalpten ve vücuttan kanı uzaklaştırmak için kalbe 20 mL %0.9'luk NaCl enjekte edilerek perfüzyon işlemi tamamlanmıştır.

3.2.1. Kalp, böbrek, akciğer ve karaciğer dokularının alınması ve homojenizasyonu

Perfüzyon işleminden sonra kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer dokuları tamamen alınmıştır. Dokular temizlenmeleri için serum fizyolojik ile tekrar perfüze edilmiş ve lipid peroksidasyonu, enzim aktiviteleri, glutatyon, nitrik oksit (NO) ve adrenomedullin (AdM) çalışmaları için dört kısma ayrılmıştır. Her bir doku örneğinin daraları alınmış deney tüplerine alınarak doku ağırlıkları kaydedilmiştir.

Enzim aktiviteleri için doku tartım işleminden sonra, 1/4 w/v oranında PBS tamponu (pH 7.4) eklendi ve buz içerisinde PVC, Kinematica, Status homojenizatörü ile tüm doku örneği parçalanıncaya kadar homojenize edilmiştir.

Lipid peroksidasyonu için doku tartım işleminden sonra, 1/4 w/v % 1.15'lik KCl çözeltisi ile homojenizasyon işlemi yapılmıştır. Homojenat örnekleri analizler yapılmıncaya kadar - 70 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

Enzim aktiviteleri, glutatyon ve protein analizleri yapılacak olan doku örnekleri homojenizasyon işlemlerinin ardından +4 °C'de, 17,000 g'de 10 dakika Ole Dich

157.MP mikrosantrifüj cihazı ile santrifüj edilerek elde edilen süpernatant örnekleri analizleri yapılncaya kadar - 70 °C’de derin dondurucuda saklanmıştır.

AdM seviyeleri için doku tartım işleminden sonra 1/4 w/v oranında PBS tamponu (pH 7.4) eklenerek buz içerisinde tüm doku örneği parçalanıncaya kadar homojenize edilmiştir. Homojenizasyon işlemlerinin ardından doku örnekleri +4 °C’de, 10,000 g’de 10 dakika ile santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant örnekleri AdM analizleri yapılncaya kadar - 70 °C’de derin dondurucuda saklanmıştır.

NO seviyeleri için doku tartım işleminden sonra 1/4 w/v oranında PBS tamponu (pH 7.4) eklenerek buz içerisinde tüm doku örneği parçalanıncaya kadar homojenize edilmiştir. Homojenizasyon işlemlerinin ardından doku örnekleri +4 °C’de, 10,000 g’de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant örnekleri NO analizleri yapılncaya kadar - 70 °C’de derin dondurucuda saklanmıştır.

3.3. Toplam Protein Ölçümü

Homojenat ve süpernatant örneklerindeki toplam protein miktarı Sigma-Aldrich firmasının Bradford ayırıcı teknik bültenindeki 96 delikli plaka ölçüm protokolü ile belirlendi [106]. Bu yöntemde standart protein olarak Bovin Serum Albumin (BSA) kullanılmıştır. Standart grafiğe göre örneklerdeki toplam protein miktarları saptanmıştır.

3.3.1. Toplam Protein Tayini

- Bradford ayırıcı kuvvetlice çalkalanıp oda sıcaklığına getirildi.
- BSA kullanılarak PBS tamponu içerisinde 0.1-1.4 mg/ml aralığında protein standartları hazırlandı.
- Protein standartlarından 5 µl alınıp 96 delikli plakanın uygun yerlerine 3 tekrarlı olarak pipetlendi. Kör için 5 µl PBS tamponu pipetlendi.
- 0.1-1.4 mg/ml aralığında olacak şekilde sulandırılan homojenat ve süpernatant örneklerinden 5 µl alınıp 96 delikli plakanın uygun yerlerine 2 tekrarlı olarak pipetlendi.
- Kullanılan her bir deliğe (kör, standartlar, bilinmeyenler) çok kanallı mikropipet kullanılarak 250 µl Bradford ayırıcı pipetlendi.

- Hazırlanan mikro plaka, mikro plaka okuyucu cihazın çalkalama yapabilen haznesinde 10 saniye boyunca çalkalandı.
- Ölçüm yapılacak olan plaka oda sıcaklığında 10 dakika aralığında inkübe edildi. İnkübasyon süresini sonunda 595 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü.
- Her bir standardın net absorbans değeri ile buna karşılık gelen protein konsantasyon değerleri kullanılarak lineer standart grafik oluşturuldu.
- Oluşturulan bu standart grafik kullanılarak, bilinmeyen örneklerin 595 nm dalga boyundaki net absorbans değerlerine karşılık gelen mg/ml protein değerleri belirlendi.

3.4. Enzim Aktivite Tayinleri

3.4.1. Süperoksit dismutaz aktivite tayini

Kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer süpernatant örneklerinde SOD enziminin aktivite tayini Sun vd. göre yapılmıştır [109]. Bu yöntem ksantin-ksantin oksidaz (XO) sisteminde üretilen süperoksit radikallerinin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgememesinin, SOD enzimi tarafından inhibisyonu temeline dayanmaktadır. Bu yöntemde 1 ünite SOD aktivitesi, NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Yöntem için gerekli olan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

- Ksantin : 0.3 mM
- EDTA : 0.5 mM
- Na₂CO₃ : 400 mM
- NBT : 150 µM
- BSA : 1 g/L
- CuCl₂ : 0.8 mM
- (NH₄)₂SO₄ : 2 M
- Ksantin oksidaz : 0.16 U/mL (2 M'lık (NH₄)₂SO₄ çözeltisi ile hazırlandı)

SOD enzim aktivitesinin tayininde kullanılacak olan reaksiyon karışımı aşağıda belirtilen çözelti oranları kullanılarak oluşturulmuştur.

- Ksantin : 40 mL
- EDTA : 20 mL
- NBT : 20 mL
- Na₂CO₃ : 12 mL
- BSA : 6 mL

SOD enzim aktivitesinin tayininde örneklerin hazırlanması aşağıda verilmiştir.

- Örnek süpernatantlar kloroform/etanol (3/5 V/V) karışımı ile 1:1 oranında karıştırılmıştır.
- Bu karışım + 4 °C’de ve 14,000 rpm’de 30 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası elde edilen süpernatandan enzim aktivitesi ve protein miktarı tayin edilmiştir

SOD enzim aktivitesinin tayininde Çizelge 3.1’de gösterilen oranlar kullanılarak ölçüm yapılmıştır.

Çizelge 3.1. SOD aktivite tayininde kullanılan çözelti miktarları

	Kör	Örnek
Reaktif karışımı	2.9 mL	2.9 mL
Örnek süpernatant	---	50 µL
Distile su	50 µL	---
Ksantin oksidaz çözeltisi	50 µL	50 µL

- Deney tüpleri oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- Süre sonunda reaksiyon 1 mL CuCl₂ pipetlenmesi ile durdurulmuştur.
- Kör ve örnek tüplerden 3’er mL alınarak distile suya karşı spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601 UV/VIS) 560 nm dalga boyunda absorbanlar okunmuştur.

SOD aktivitesi tayini sonucunda örneklerde oluşan yüzde inhibisyon aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

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

3.4.2. Katalaz aktivite tayini

Kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer dokularından elde edilen süpernatant örneklerinde katalaz enziminin aktivite tayini Luck'a göre yapılmıştır [107]. Bu yöntem için gerekli olan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

- 1/15 M Na-K fosfat tamponu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$) pH 7
- Derişik (%35'lik) H_2O_2 çözeltisi

Hazırlanan Na-K-fosfat tamponunun 100 mL'sine, 160 μL derişik H_2O_2 çözeltisi pipetlenmiştir. Oluşan bu çözeltilerden 1000 μL alınıp kör olarak kullanılmıştır. Karaciğer, akciğer, kalp ve böbrek dokularında katalaz aktivitesini belirlemek için yine aynı karışımdan 1000 μL alınıp kuarz küvete pipetlenmiş ve üzerine karaciğer dokularında 5 μL , akciğer dokularında 10 μL , kalp dokularına 10 μL ve böbrek dokularında 10 μL süpernatant eklenmiştir. Küvet bir kez karıştırılıp spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601 UV/VIS) 240 nm dalga boyunda (30 sn. boyunca) absorbans değişimi okunmuştur. Elde edilen bu optik dansite farkından (ΔOD) mL'deki enzim ünite sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$C = \frac{\Delta \text{OD} \times 1 \text{ dk.} \times 1000}{0.036 \times \mu\text{L süpernatant}}$$

3.4.3. Se-Bağımlı glutatyon peroksidaz aktivite tayini

Kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer süpernatant örneklerinde Se-bağımlı GSH-Px enziminin aktivite tayini Lawrence ve Burk yöntemine göre yapılarak ölçülmüştür [108]. Bu yöntem için gerekli olan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

- 5 mM EDTA içeren 50 mM K-fosfat tamponu (KH₂PO₄-K₂HPO₄) pH 7.0
- NaN₃ (Sodyum azid) : 1 mM
- H₂O₂ : 2.5 mM
- NADPH : 2 mM
- GSH (Redükte glutatyon) : 2 mM
- GSSG Redüktaz : 5 U/mL

Kör için 1 mL tampon, 30 µL NADPH, 30 µL GSH, 30 µL NaN₃ ve 60 µL GSSG redüktaz çözeltileri kuarz küvete pipetlenmiştir. 37 °C’de 5 dk. inkübasyona bırakılan küvete 20 µL H₂O₂ pipetlenmiş ve spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601 UV/VIS) 340 nm dalga boyunda (1 dk. boyunca) absorbans değişimi okunmuştur. Kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer dokuları için 10 µL süpernatant pipetlendikten sonra kör örnekteki gibi inkübasyona bırakılmış ve 340 nm dalga boyundaki absorbans değişimi okunmuştur. Elde edilen bu optik dansite farkından mL’deki enzim aktivite tayini aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$C = \frac{\Delta OD}{6220 / \text{mL}}$$

3.5. Toplam Glutatyon Miktarının Belirlenmesi

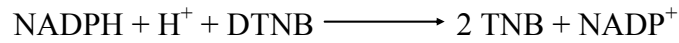
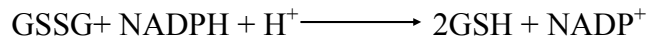
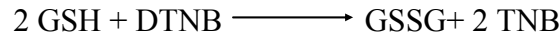
Kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer süpernatant örneklerinde toplam glutatyon miktarının tayini Akerboom yöntemine göre yapılmıştır [110]. Yöntem için gerekli olan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

- 0.1 M, potasyum fosfat tamponu pH=7
- 5,5’-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB): 1.5 mg/mL DTNB, stok tampon çözeltisiyle günlük olarak hazırlanmıştır.
- GSSH Redüktaz: Enzim konsantrasyonu 6 U/mL olacak şekilde stok tampon çözeltisiyle günlük olarak hazırlanmıştır.
- NADPH: 4 mg/mL olacak şekilde stok tampon çözeltisiyle günlük olarak hazırlanmıştır.

Çizelge 3.2. Glutasyon miktarı tayininde kullanılan çözelti miktarları

	Kör	Örnek
Tampon	1 mL	1 mL
Örnek süpernatant	---	10 µL
Distile su	10 µL	---
NADPH	50 µL	50 µL
DNTB	20 µL	20 µL
GSH Redüktaz	20 µL	20 µL

Glutasyon (GSH+GSSH) miktarı tayini için Çizelge 3.2.'de belirtilen hacimlerde çözeltilerin spektrofotometre küvetine eklenerek ve 5 dakika beklenilmiştir.



Bekleme süresinin ardından yukarıdaki reaksiyonlar sonucu oluşan TNB (5-thio-2-nitrobenzoat) miktarları 412 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Daha sonra yine 412 nm'de standart grafik çizildi ve okunan absorbans değerlerine karşılık gelen toplam glutasyon miktarı grafikten belirlenmiştir. Toplam glutasyon miktarı nmol/protein olarak hesaplanmıştır.

3.6. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi

Kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer homojenatlarında lipit peroksidasyonunun en önemli göstergesi olan MDA düzeylerinin ölçümü Buege ve Aust'a göre yapılmıştır [111]. Bu yöntem için gerekli olan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

- % 15'lik Trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi : 1 hacim
- % 0.375'lik Tiobarbiturik asit (TBA) çözeltisi : 1 hacim
- 0.25 N'lik HCl çözeltisi : 1 hacim

Lipid peroksidasyonu için gerekli olan üç çözeltinin belirtilen hacim oranlarının karıştırılmasıyla lipid peroksidasyonu analizinde kullanılacak çözelti hazırlanmıştır.

Kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer homejenatlarında MDA seviyelerinin tayini aşağıda verilmiştir.

- 10 mL’lik santrifüj tüplerine hazırlanan çözeltiden 4 mL pipetlenmiştir.
- Örnek tüplerine 1 mL homojenat pipetlenmiştir.
- Tüpler vortekslenmiştir.
- Örnekler kaynar suda (95-100 °C) 15 dk. inkübe edilmiştir.
- Örnekler bir süre oda sıcaklığında bekletildikten sonra su içerisinde soğutuldu ve 3500 rpm’de 10 dk. santrifüj edilmiştir.
- Süpernatantların 535 nm dalga boyundaki absorbansları Shimadzu UV-1601 UV/VIS spektrofotometre ile belirlenmiştir.

MDA miktarları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. MDA-TBA kompleksinin molar absorptivite katsayısı; ϵ : $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$$C = \frac{\text{OD}}{1.56 \times 10^5} \times \frac{\text{Toplam hacim}}{\text{Örnek hacmi}}$$

3.7. Dokulardaki NO Konsantrasyonunun Tayini

Kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer süpernatant örneklerindeki NO miktarı Cayman Chemical nitrit/nitrat fluorometrik ölçüm kiti kullanılarak ölçülmüştür. Kullanılan kit dokudaki nitriti nitrata çevirmek sureti ile NO’nun son ürünleri olan nitrit + nitrat seviyesini ölçmektedir.

Kitin içeriği aşağıda verilmiştir.

- Ölçüm tamponu
- Nitrat redüktaz
- Enzim kofaktörleri
- Nitrat standardı

- Nitrit standardı
- Fluorometrik ayıracılar: DAN ve NaOH

Çizelge 3.3. NO miktarı tayininde kullanılan çözelti miktarları

	Kör	Örnek
Ölçüm Tamponu	80 µL	70 µL
Örnek süpernatant	---	10 µL
Enzim Kofaktör Karışımı	10 µL	10 µL
Nitrat Redüktaz Karışımı	10 µL	10 µL
DAN ayıracı	10 µL	10 µL
NaOH	20 µL	20 µL

NO miktarı tayininde Çizelge 3.3.'de belirtilen hacimlerde çözeltiler mikro plakaya pipetlenmiş ve fluometrik mikro plaka okuyucuda (SpectraMax Gemini XS, Molecular Devices Corp, USA) eksitasyon dalga boyu 360- 365 nm ve emisyon dalga boyu 460 nm kullanılarak absorbans değerleri ölçülmüştür. NO miktarı çizilen standart grafik kullanılarak hesaplanmıştır.

3.8. Dokulardaki Adrenomedullin Seviyelerinin Tayini

Adrenomedullin düzeyleri C. Evereklioglu'na göre [112] modifiye edilerek aşağıdaki gibi ölçülmüştür:

1. Doku homojenatları +4 °C'de, 10.000 g'de 10 dakika Ole Dich 157.MP mikrosantrifüj cihazı ile santrifüj edilmiştir.
2. 20 µl süpernatant alınarak yeni ependorf tüplerine aktarılmıştır.
3. Hazırlanılan her tüp için, asetonitril ve trifloroasetik asit içeren tampon ile 1.5 mL/dak. akış hızlı çift pompalı ters-faz sistemli, C18 kolonundan geçirilerek Cecil 1100 marka HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)'de 220 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır.

3.9. Histopatolojik İnceleme

Kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer doku örnekleri % 10'luk nötral formaldehit ile fiksasyon işlemi ardından 24 saat boyunca akan çeşme suyunda yıkandıktan sonra % 70'den absolüye kadar dereceli etil alkol serileri ile dehidrate edilmişlerdir. Dehidratasyon işleminin ardından örnekler 1,5 saat ksilolde şeffaflandırılmış ve 60°C'de erimiş parafine konulmak suretiyle parafin içerisine gömülerek bloklanmıştır. Parafin bloklardan Lipshaw marka rotary mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında kesitler alınmış ve bu kesitlere histolojik inceleme için Hematoksilen-eosin (H-E) boyama yöntemiyle boyanmıştır. Hazırlanan preparatlarda Lyca DFC280 ışık mikroskobu ve Leica Q Win Görüntü Analiz Sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd.; Cambridge, U.K) ile genel histolojik yapı incelenerek fotoğrafları çekilmiştir.

3.10. İstatistiksel Yöntem

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS for Windows Version 10.0 paket programı ile yapılmıştır. Değişkenlere ilişkin veriler ortalama $\pm$ standart hata ile verilmiştir. İki'den fazla olan deney gruplarının karşılaştırmalarında tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) kullanılmıştır. Deney sonuçlarının ikili karşılaştırmalarında ise en küçük önemli fark (LSD) yöntemi kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Adrenomedullin ve benzo(a)piren'in intraperitoneal yolla uygulamasına bağlı olarak sıçanların kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer dokularında MDA seviyeleri, CAT, SOD, GSH-Px enzim aktiviteleri, toplam glutatyon seviyesi, NO miktarı, AdM seviyesi ve histopatolojik değişimler incelenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular; Çizelge 4.1, Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3.'de gösterilmiştir. Araştırma bulguları lipit peroksidasyon seviyeleri, enzim aktivitelerindeki değişimler, toplam glutatyon miktarındaki değişimler, nitrik oksit konsantrasyon seviyesindeki değişimler ve adrenomedullin seviyesindeki değişimler olmak üzere beş başlık altında verilmiştir.

Çizelge 4.1. Adrenomedullin ve B(a)P uygulamasına bağlı olarak biyokimyasal parametrelerdeki değişimler, ^a Kontrol grubuna, ^b Yağ grubuna, ^c AdM grubuna, ^d B(a)P grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,b,c,d} $p < 0.05$)

	MDA	SOD	CAT	GSH-Px	Toplam GSH
KALP	(nmol/mg p)	(U/mg p)	(U/mg p)	(U/mg p)	(nmol/ mg p)
Kontrol	0.64±0.08	83.71±1.90	36.26±2.89	29.91±1.62	7.10±0.83
Yağ	0.69±0.17	86.83±4.20	40.76±4.54	27.16±1.86	7.62±0.75
AdM	4.1±0.38 ^{a, b}	85.84±1.38	99.83±5.86 ^{a, b}	25.51±2.54	17.72±0.94 ^{a, b}
B(a)P	5.51±0.60 ^{a, b, c}	74.81±3.27 ^{a, b, c}	64.74±3.87 ^{a, b, c}	33.45±3.59	13.9±1.31 ^{a, b, c}
B(a)P+AdM	1.4±0.32 ^{c, d}	90.55±1.33 ^d	60.25±6.92 ^{a, b, c}	40.59±3.45 ^{a, b, c}	13.37±1.27 ^{a, b, c}
BÖBREK					
Kontrol	1.53±0.13	102.39±2.30	134.31±8.41	24.95±2.04	9.48±1.00
Yağ	1.55±0.13	105.16±2.70	135.72±8.48	25.6±2.49	12.12±1.59
AdM	1.58±0.16	88.68±6.21 ^{a, b}	93.02±3.66 ^{a, b}	27.42±2.42	10.48±0.84
B(a)P	1.72±0.10	103.02±1.44 ^c	85.71±5.91 ^{a, b}	22.77±1.97	10.65±0.41
B(a)P+AdM	1.31±0.10 ^d	102.87±2.92 ^c	91.34±7.21 ^{a, b}	25.56±2.93	10.55±0.93

Çizelge 4.1. (devamı)

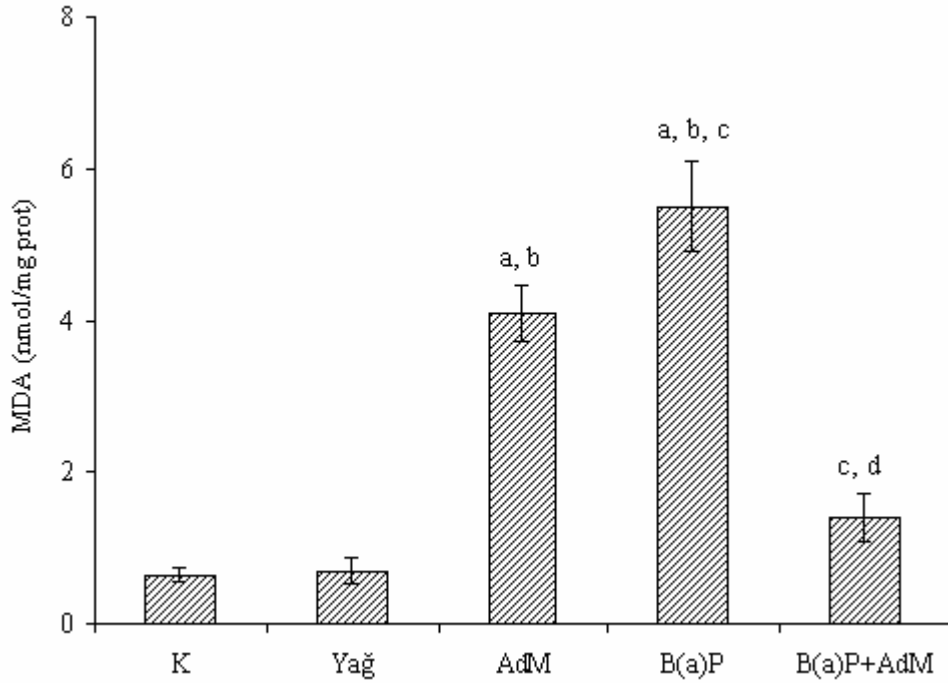
	MDA	SOD	CAT	GSH-Px	Toplam GSH
KARACİĞER	(nmol/mg p)	(U/mg p)	(U/mg p)	(U/mg p)	(nmol/ mg p)
Kontrol	0.28±0.03	113.63±3.07	83.6±5.23	26.64±1.43	6.62±0.49
Yağ	0.29±0.01	110.03±3.07	84.16±6.21	25.7±2.22	7.18±0.60
AdM	0.31±0.03	112.51±2.83	77.78±5.86	28.66±1.71	6.76±0.29
B(a)P	0.35±0.03	100.45±2.64 ^{a, b, c}	60.83±2.9 ^{a, b, c}	30.0±1.09	6.15±0.16
B(a)P+AdM	0.31±0.02	102.7±3.47 ^{a, c}	80.09±5.57 ^d	22.97±2 ^{c, d}	7.47±0.19 ^d
AKCİĞER					
Kontrol	0.50±0.03	92.69±2.37	35.53±1.73	30.72±1.56	8.61±1.05
Yağ	0.50±0.03	97.29±1.86	40.19±2.59	25.57±1.78	8.14±0.36
AdM	0.60±0.031 ^{a, b}	102.2±2.6 ^a	44.98±3.25 ^a	33.69±1.59 ^b	8.89±0.6
B(a)P	0.58±0.019	94.89±3.5 ^c	30.19±2.13 ^{b, c}	24.41±2.07 ^{a, c}	7.63±0.68
B(a)P+AdM	0.68±0.05 ^{a, b, d}	102.7±1.65 ^{a, d}	37.88±2.29 ^d	24.26±1.72 ^{a, c}	9.1±0.25

4.1. Lipit Peroksidasyonu

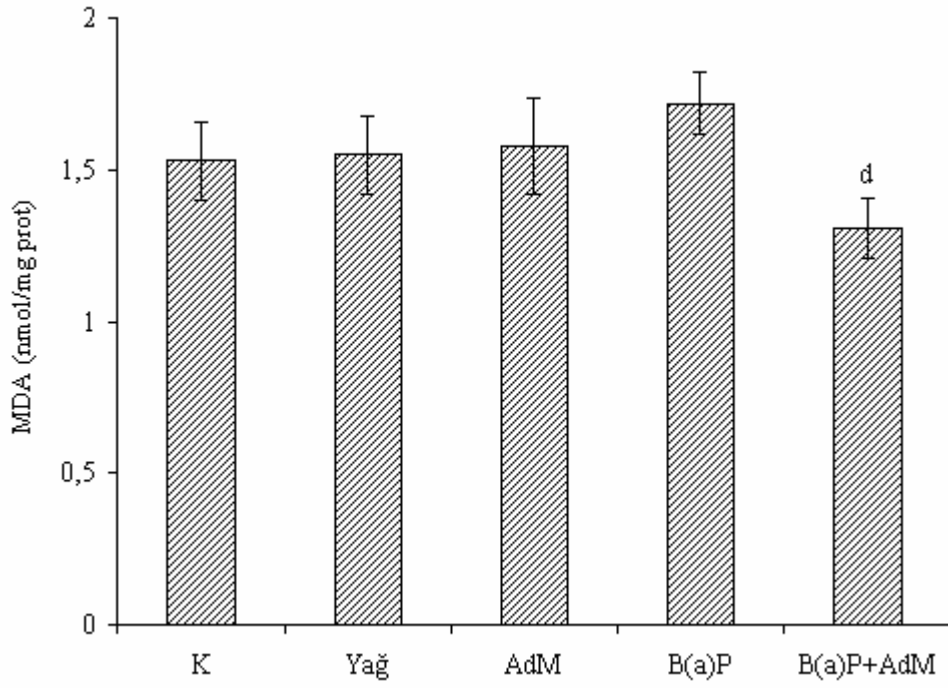
Kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer doku homojenatlarında lipit peroksidasyonunun en önemli göstergelerinden biri olan MDA düzeyleri belirlenmiştir. Tüm dokulardaki kontrol ve yağ grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak önemsiz olarak bulunmuştur.

AdM uygulama grubundaki hayvanların kalp dokularında ölçülen (4.1±0.38 nmol/mg p) MDA seviyesindeki artış kontrol (0.64±0.08 nmol/mg p) ve yağ (0.69±0.17 nmol/mg p) gruplarından istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$). B(a)P uygulama grubundaki hayvanların kalp dokularındaki MDA seviyelerindeki artış (5.51±0.6 nmol/mg p) kontrol, yağ ve AdM uygulama gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmuştur ($p<0.05$). B(a)P+AdM uygulama (1.4±0.32 nmol/mg p) grubu hayvanların kalp dokularındaki MDA seviyesi AdM ve B(a)P uygulama gruplarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmıştır ($p<0.05$). Böbrek dokusunda ise sadece B(a)P+AdM uygulama grubundaki hayvanlarda (1.31±0.1 nmol/mg p) ölçülen MDA seviyelerindeki azalış B(a)P uygulama grubuna

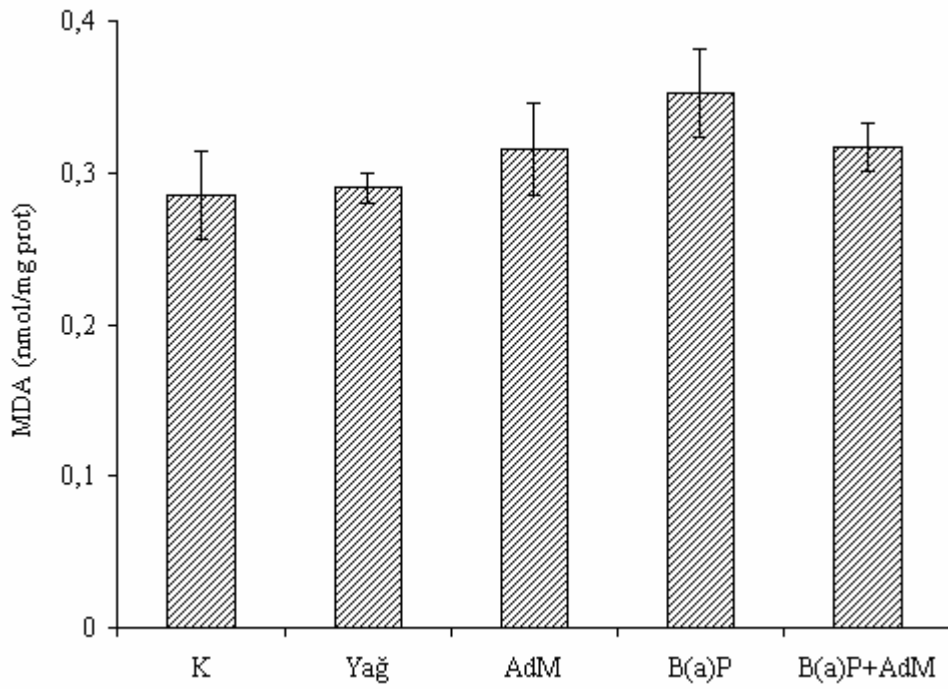
(1.72 ± 0.1 nmol/mg p) göre önemlidir ($p < 0.05$). Karaciğer dokusunda MDA seviyesi bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır. Akciğer dokusunda AdM (0.60 ± 0.03 nmol/mg p) ve B(a)P+AdM uygulama gruplarındaki artış (0.68 ± 0.04 nmol/mg p) kontrol (0.50 ± 0.02 nmol/mg p) ve yağ (0.50 ± 0.02 nmol/mg p) gruplarına göre önemlidir ($p < 0.05$). Bununla birlikte B(a)P+AdM uygulama grubundaki artış B(a)P uygulama grubuna (0.58 ± 0.0019 nmol/mg p) göre de istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer dokularında ölçülen MDA seviyesindeki değişimler Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’de verilmiştir.



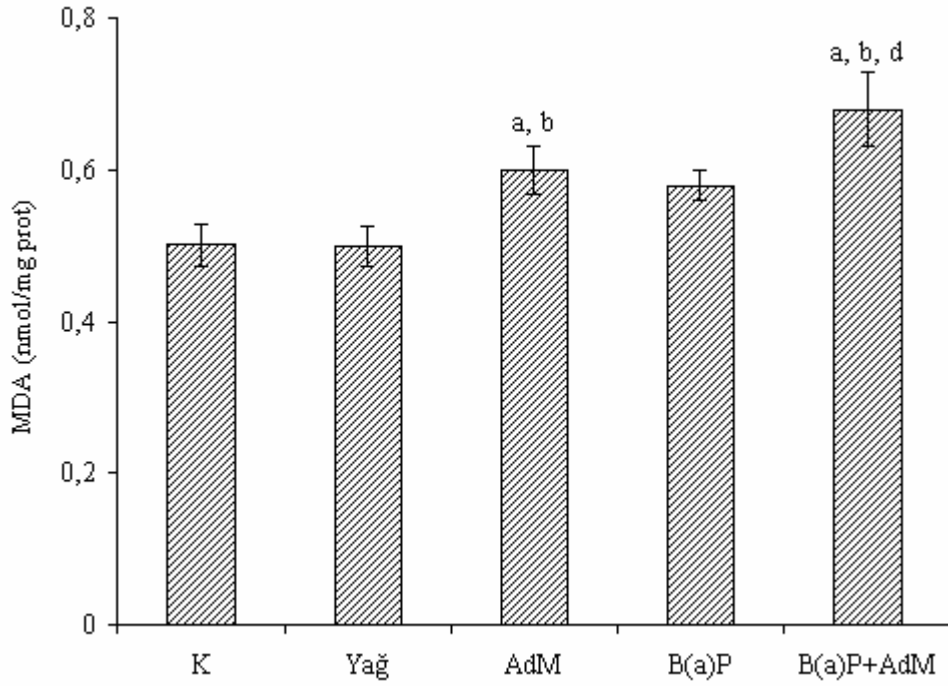
Şekil 4.1. Kalp dokusundaki MDA seviyesindeki değişimler ^a Kontrol grubuna, ^b Yağ grubuna, ^c AdM grubuna, ^d B(a)P grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,b,c,d} $p < 0.05$)



Şekil 4.2. Böbrek dokusundaki MDA seviyesindeki değişimler ^d B(a)P grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^d $p < 0.05$)



Şekil 4.3. Karaciğer dokusundaki MDA seviyesindeki değişimler



Şekil 4.4. Akciğer dokusundaki MDA seviyesindeki değişimler ^a Kontrol grubuna, ^b Yağ grubuna, ^d B(a)P grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,b,d} $p < 0.05$)

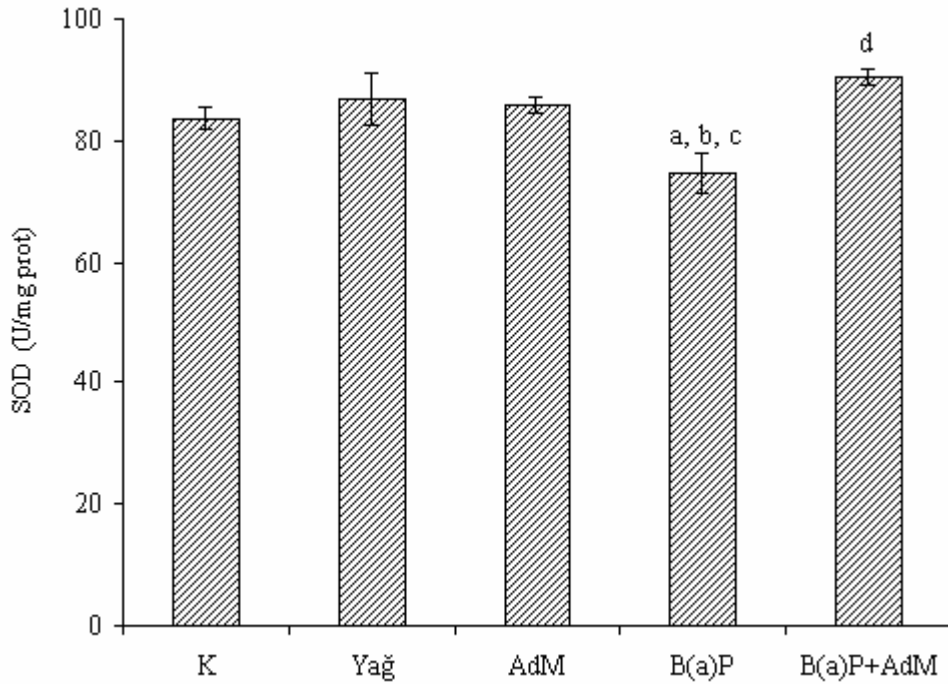
4.2. Enzim Aktivitelerindeki Değişimler

Kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer dokularında antioksidan enzim aktivitelerindeki değişim belirlenmiştir. Tüm dokulardaki kontrol ve yağ grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak önemsiz düzeyde bulunmuştur.

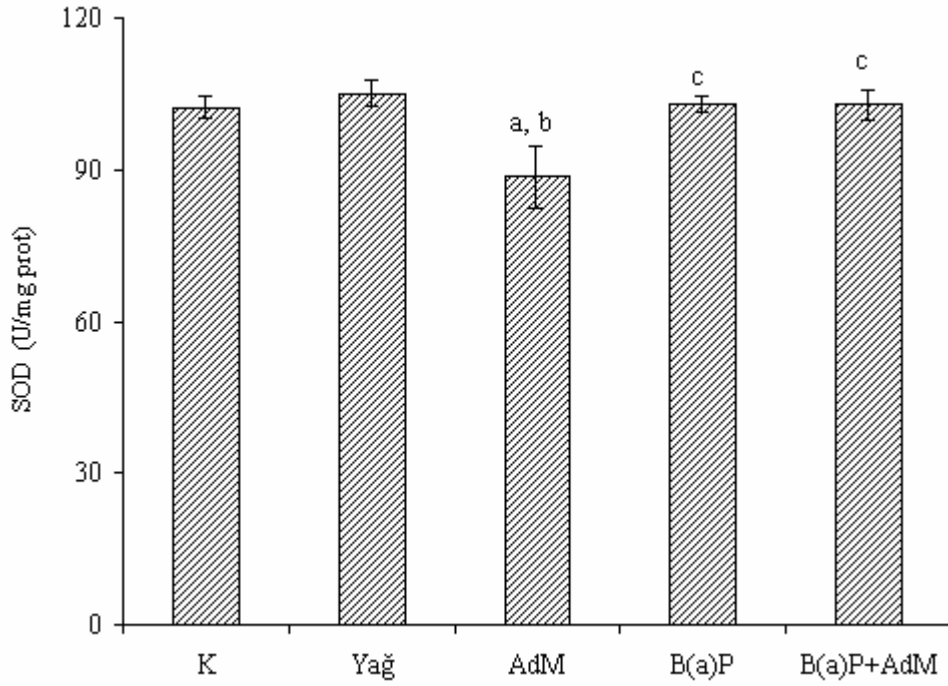
4.2.1. SOD enzim aktivitesi

Kalp dokusu SOD enzim aktivitesi bakımından değerlendirildiğinde B(a)P uygulama grubunda (74.81 ± 3.27 U/mg p) kontrol (83.71 ± 1.9 U /mg p), yağ (86.83 ± 4.2 U/mg p) ve AdM (85.84 ± 1.38 U/mg p) gruplarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde bir azalış, ayrıca B(a)P+AdM uygulama grubunda (90.55 ± 1.33 U/mg p) B(a)P uygulama grubuna (74.81 ± 3.27 U/mg p) göre istatistiksel olarak önemli bir artış vardır ($p < 0.05$). Böbrek dokusunda AdM uygulama grubundaki (88.68 ± 6.21 U/mg p) azalma kontrol (102.39 ± 2.3 U/mg p) ve yağ (105.16 ± 2.7 U/ mg p) gruplarına göre istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Yine böbrek dokusunda B(a)P (103.02 ± 1044 U/mg p) ve B(a)P+AdM (102.87 ± 2.92 U/mg p) uygulama gruplarında AdM uygulama grubuna göre

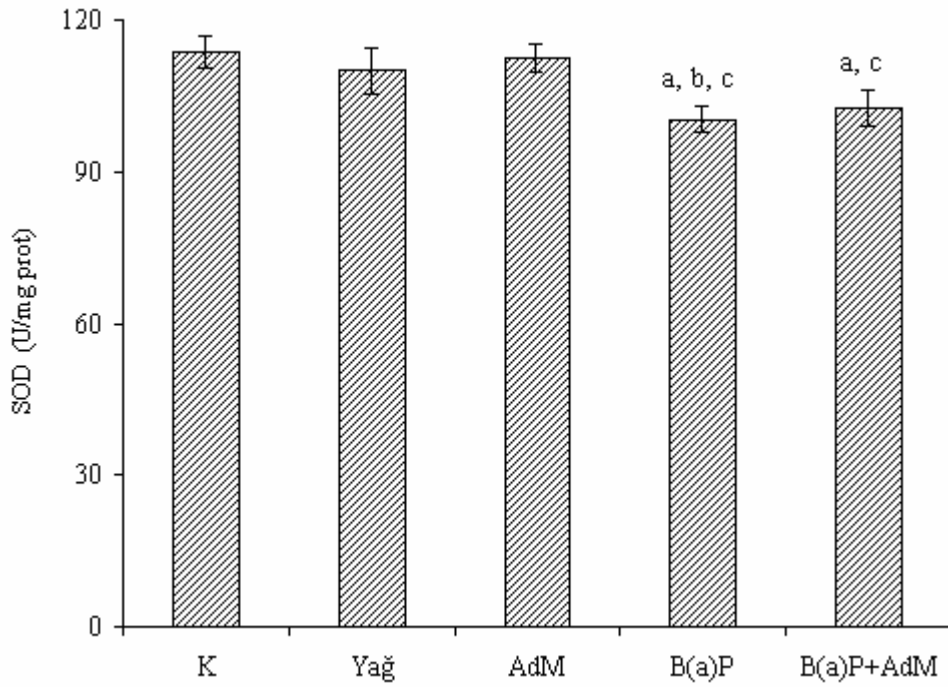
istatistiksel olarak önemli düzeyde artış olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Karaciğer dokusundaki B(a)P uygulama grubundaki (100.45 ± 2.64 U/mg p) SOD enzim aktivitesindeki azalışın kontrol (113.63 ± 3.07 U/mg p), yağ (110.03 ± 3.07 U/mg p) ve AdM (112.51 ± 2.83 U/mg p) uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemli olduğu ve B(a)P+AdM uygulama grubunda (102.7 ± 3.47 U/mg p); kontrol ve AdM uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir artış olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Akciğer dokusunda; AdM uygulama grubunda (102.2 ± 2.6 U/mg p), kontrol grubuna (92.69 ± 2.37 U/mg p) göre önemli bir artış gözlenirken; B(a)P uygulama grubunda (94.89 ± 3.5 U/mg p) AdM uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir azalmanın olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Akciğer dokusunun B(a)P+AdM uygulama grubunda (102.7 ± 1.65 U/mg p) ise kontrol ve B(a)P uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir artış vardır ($p<0.05$). AdM ve B(a)P uygulamalarına bağlı olarak kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer dokularındaki SOD enzim aktivitelerindeki değişimler Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de verilmiştir.



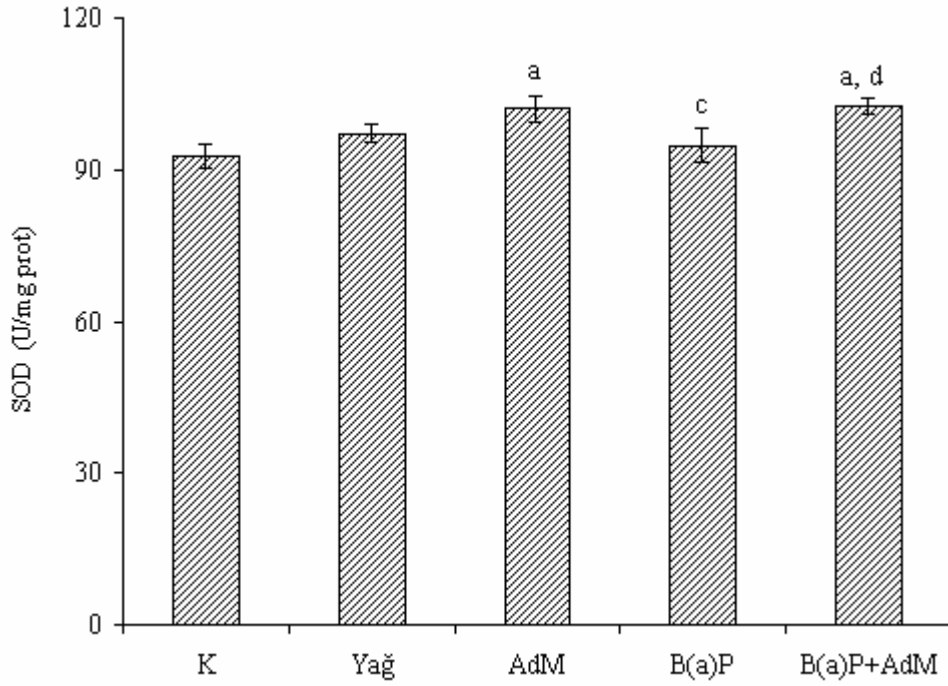
Şekil 4.5. Kalp dokusundaki SOD enzim aktivitelerindeki değişimler ^a Kontrol grubuna, ^b Yağ grubuna, ^c AdM grubuna, ^d B(a)P grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,b,c,d} $p<0.05$)



Şekil 4.6. Böbrek dokusundaki SOD enzim aktivitelerindeki değişimler ^a Kontrol grubuna, ^b Yağ grubuna, ^c AdM grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,b,c} $p < 0.05$)



Şekil 4.7. Karaciğer dokusundaki SOD enzim aktivitelerindeki değişimler ^a Kontrol grubuna, ^b Yağ grubuna, ^c AdM grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,b,c} $p < 0.05$)

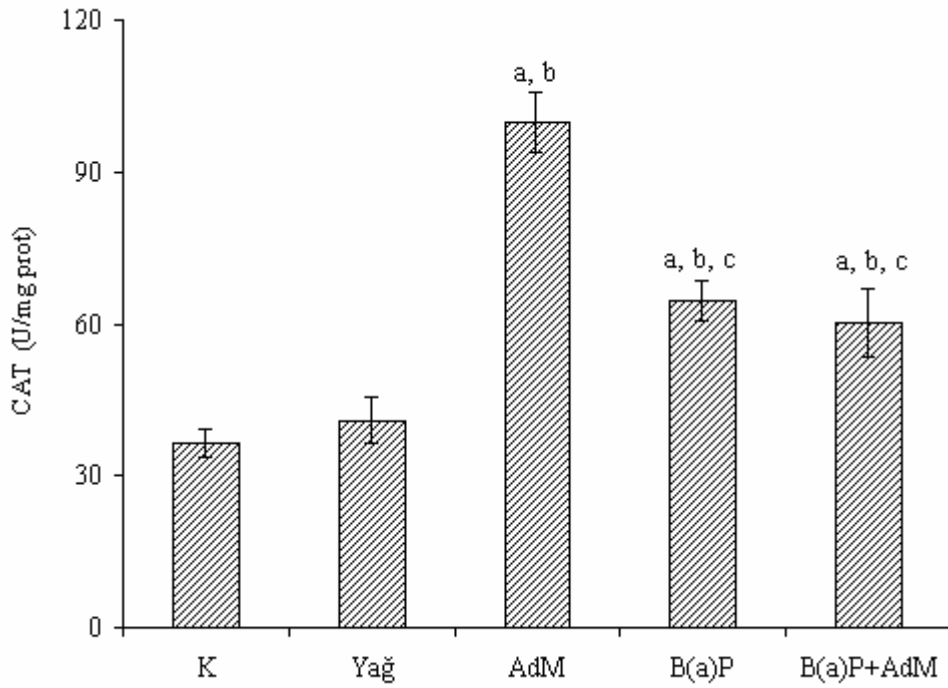


Şekil 4.8. Akciğer dokusundaki SOD enzim aktivitelerindeki değişimler ^a Kontrol grubuna, ^c AdM grubuna, ^d B(a)P grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,c,d} $p < 0.05$)

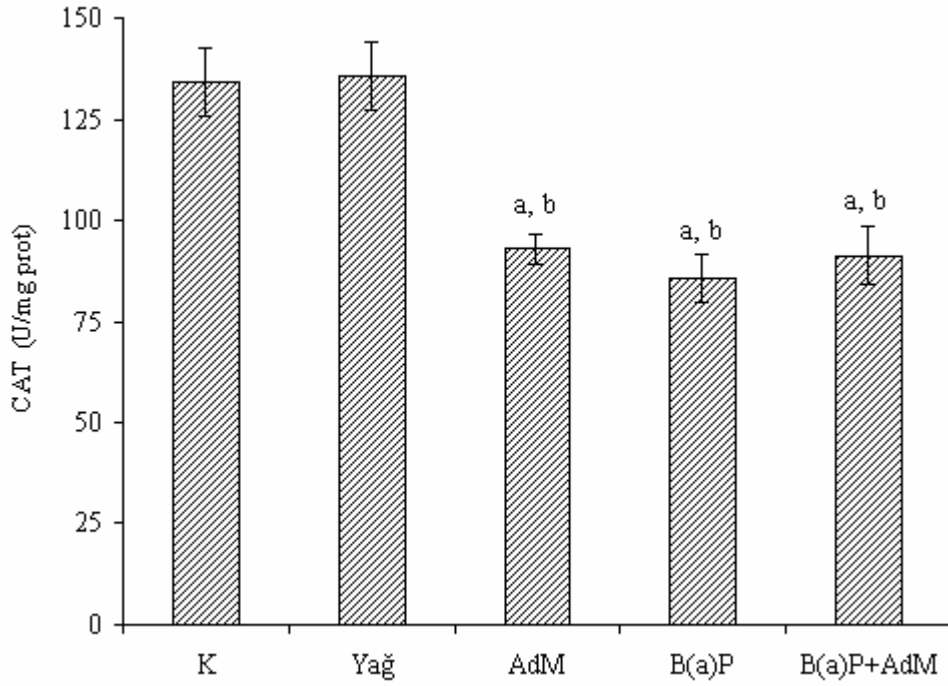
4.2.2. Katalaz enzim aktivitesi

Kalp dokusunda AdM (99.83 ± 5.86 U/mg p), B(a)P (64.74 ± 3.87 U/mg p) ve B(a)P+AdM (60.25 ± 6.92 U/mg p) uygulama grupları arasındaki katalaz enzim aktivitesindeki artış kontrol (36.26 ± 2.89 U/mg p) ve yağ (40.76 ± 4.54 U/mg p) uygulama gruplarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmuştur ($p < 0.05$). Yine kalp dokusundaki B(a)P ve B(a)P+AdM uygulama gruplarındaki azalış AdM grubundan istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Böbrek dokusundaki kontrol (134.31 ± 8.41 U/mg p) ve yağ (135.72 ± 8.48 U/mg p) gruplarına göre CAT aktivitesindeki azalış AdM (93.02 ± 3.66 U/mg p), B(a)P (85.71 ± 5.91 U/mg p) ve AdM+B(a)P (91.34 ± 7.21 U/mg p) uygulama gruplarından istatistiksel olarak önemli düzeydedir ($p < 0.05$). Karaciğer dokusundaki B(a)P uygulama grubundaki (60.83 ± 2.9 U/mg p) azalış kontrol (83.6 ± 5.23 U/mg p), yağ (84.16 ± 6.21 U/mg p) ve AdM (77.78 ± 5.86 U/mg p) uygulama gruplarından istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Ayrıca B(a)P+AdM grubundaki (80.09 ± 5.57 U/mg p) artış, B(a)P uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeydedir ($p < 0.05$). Akciğer dokusundaki

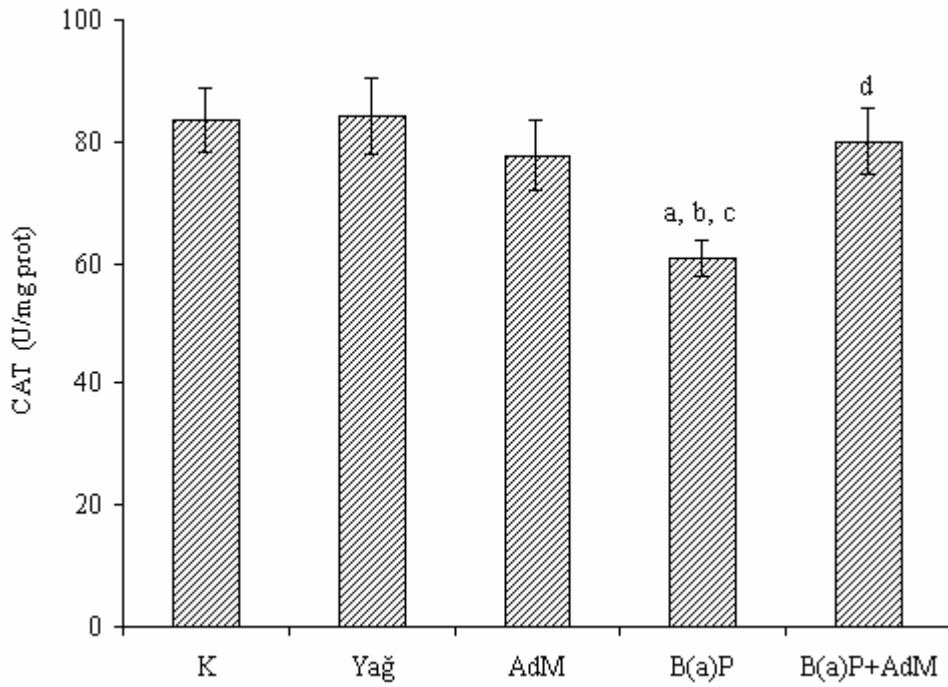
AdM uygulama grubundaki (44.98 ± 3.25 U/mg p) CAT enzim aktivitesindeki artış kontrol (35.53 ± 1.73 U/mg p) grubuna göre istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Akciğer dokusunda AdM ve B(a)P uygulamasına bağlı olarak B(a)P uygulama grubunda (30.19 ± 2.13 U/mg p) istatistiksel olarak önemli bir azalma saptanırken B(a)P+AdM uygulama grubunda (37.88 ± 2.29 U/mg p) B(a)P uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir artış kaydedilmiştir ($p < 0.05$). CAT enzim aktivitesindeki değişimler Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de verilmiştir.



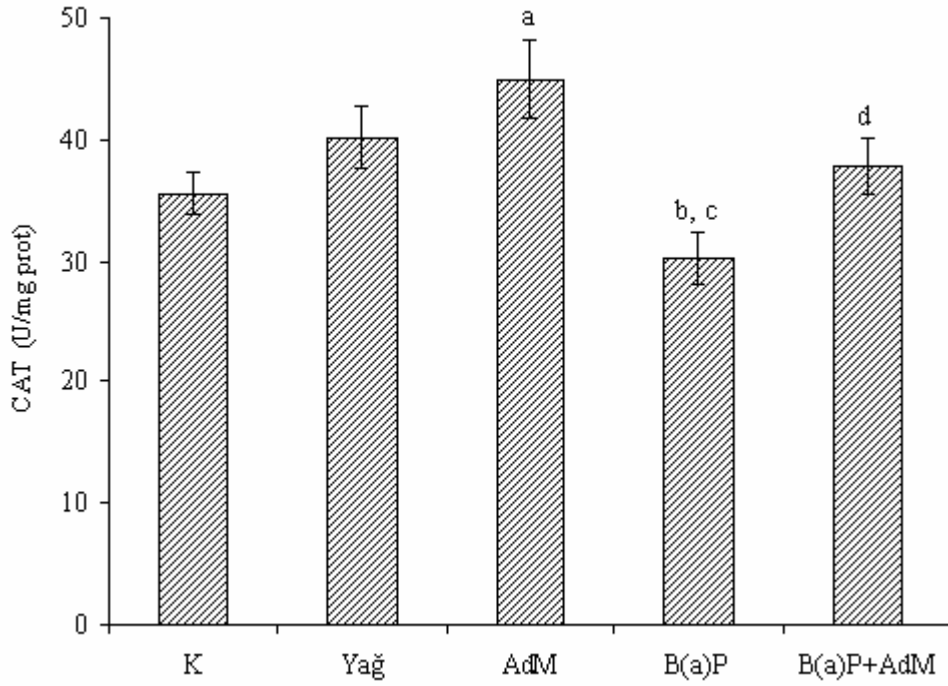
Şekil 4.9. Kalp dokusundaki CAT enzim aktivitesindeki değişimler ^a Kontrol grubuna, ^b Yağ grubuna, ^c AdM grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,b,c} $p < 0.05$)



Şekil 4.10. Böbrek dokusundaki CAT enzim aktivitelerindeki değişimler ^a Kontrol grubuna, ^b Yağ grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,b} $p < 0.05$)



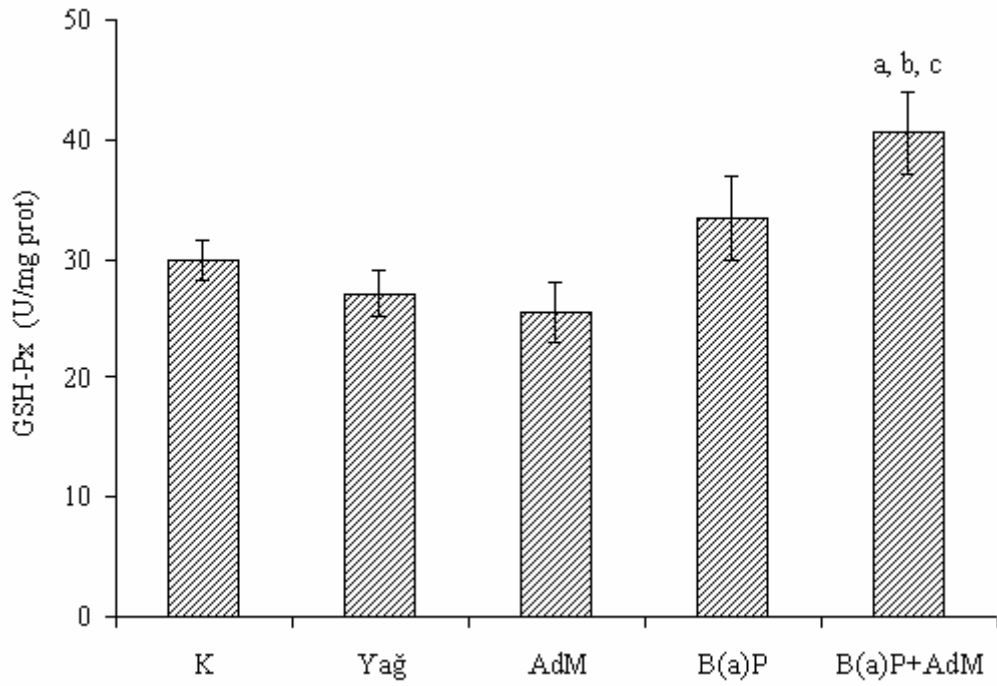
Şekil 4.11. Karaciğer dokusundaki CAT enzim aktivitelerindeki değişimler ^a Kontrol grubuna, ^b Yağ grubuna, ^c AdM grubuna, ^d B(a)P grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,b,c,d} $p < 0.05$)



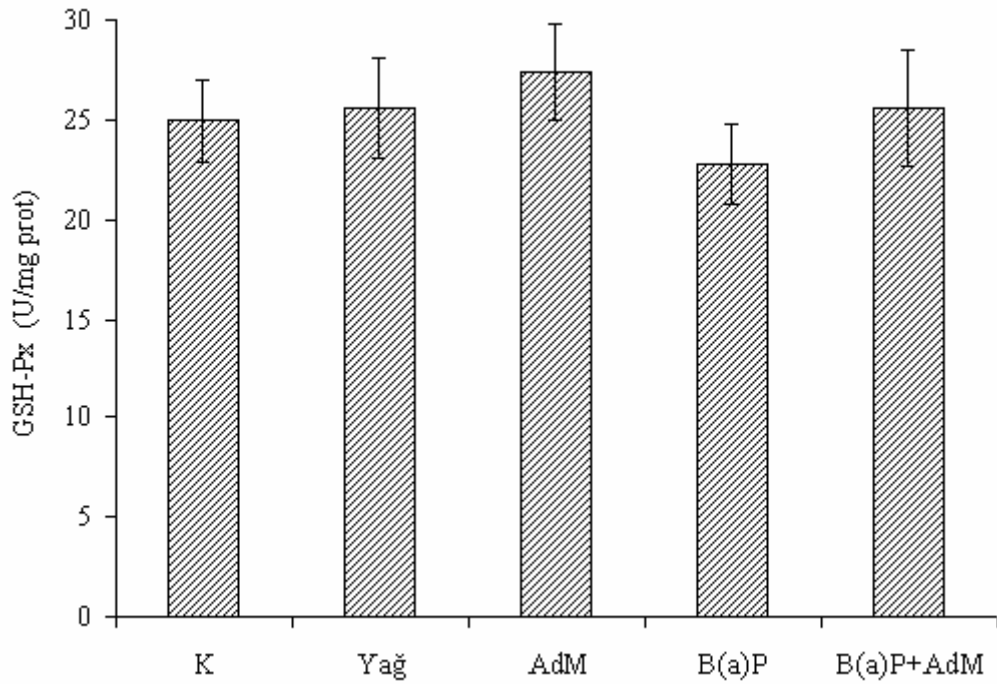
Şekil 4.12. Akciğer dokusundaki CAT enzim aktivitelerindeki değişimler ^a Kontrol grubuna, ^b Yağ grubuna, ^c AdM grubuna, ^d B(a)P grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,b,c,d} $p<0.05$)

4.2.3. GSH-Px enzim aktivitesi

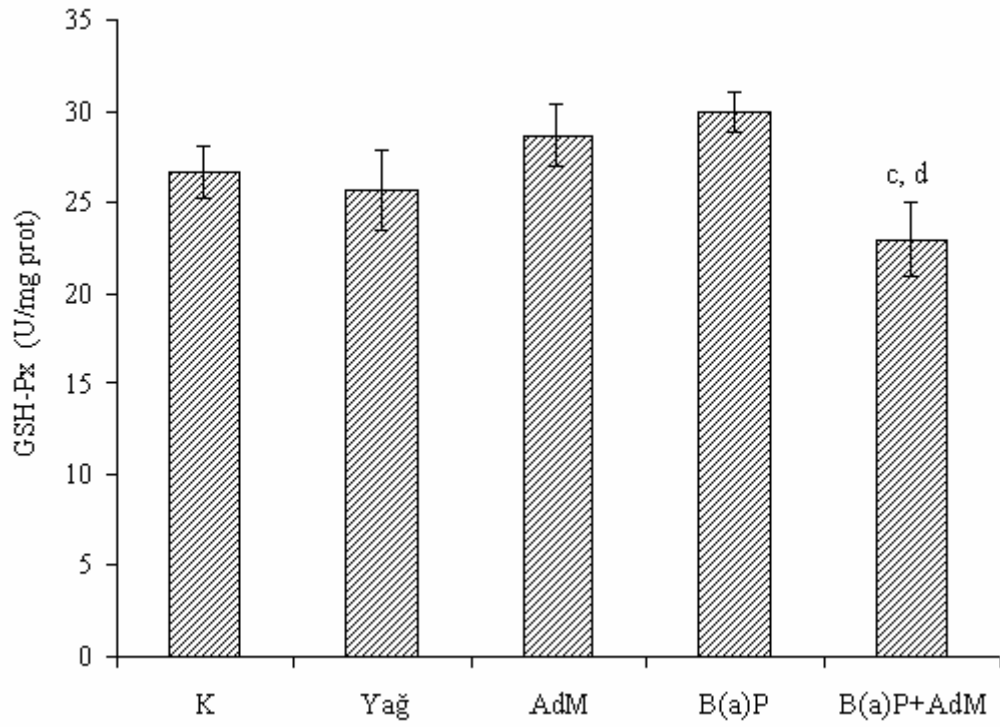
GSH-Px aktivitesindeki değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde kalp dokusunda B(a)P+AdM uygulama grubundaki (40.59 ± 3.45 U/mg p) artışın kontrol (29.91 ± 1.62 U/mg p), yağ (27.16 ± 1.86 U/mg p) ve AdM (25.51 ± 2.54 U/mg p) uygulama gruplarına göre önemli derecede olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Böbrek dokusunda ise istatistiksel olarak önemli bir değişikliğe rastlanmamıştır. Karaciğer dokusunda B(a)P+AdM uygulama grubunda (22.97 ± 2.0 U/mg p); AdM (28.66 ± 1.71 U/mg p) ve B(a)P (30.0 ± 1.09 U/mg p) uygulama gruplarına göre istatistiksel olarak önemli bir azalma vardır ($p<0.05$). Akciğer dokusundaki GSH-Px enzim aktivitesi AdM uygulama grubunda (33.69 ± 1.59 U/mg p) yağ grubuna (25.57 ± 1.78 U/mg p) göre istatistiksel olarak önemli bir artışın olduğu gözlenirken, B(a)P (24.41 ± 2.07 U/mg p) ve B(a)P+AdM (24.26 ± 1.72 U/mg p) uygulama gruplarında kontrol (30.72 ± 1.56 U/mg p) ve AdM gruplarına göre istatistiksel olarak önemli bir azalmanın olduğu kaydedilmiştir ($p<0.05$). GSH-Px enzim aktivitesindeki değişimler Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16’da verilmiştir.



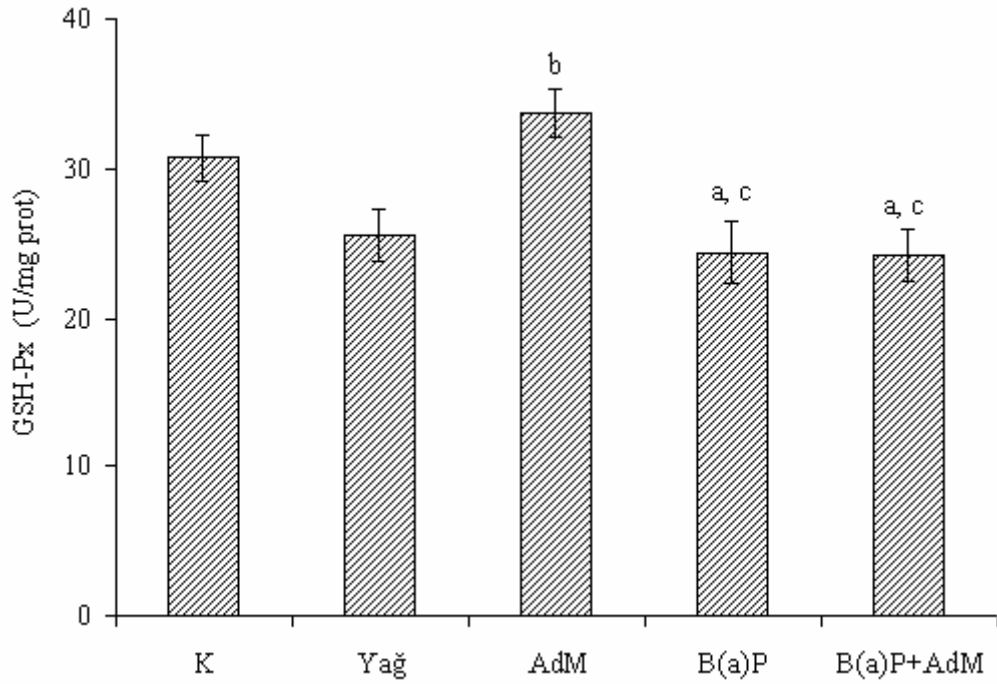
Şekil 4.13. Kalp dokusundaki GSH-Px enzim aktivitelerindeki değişimler ^a Kontrol grubuna, ^b Yağ grubuna, ^c AdM grubuna, göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,b,c} $p < 0.05$)



Şekil 4.14. Böbrek dokusundaki GSH-Px enzim aktivitelerindeki değişimler



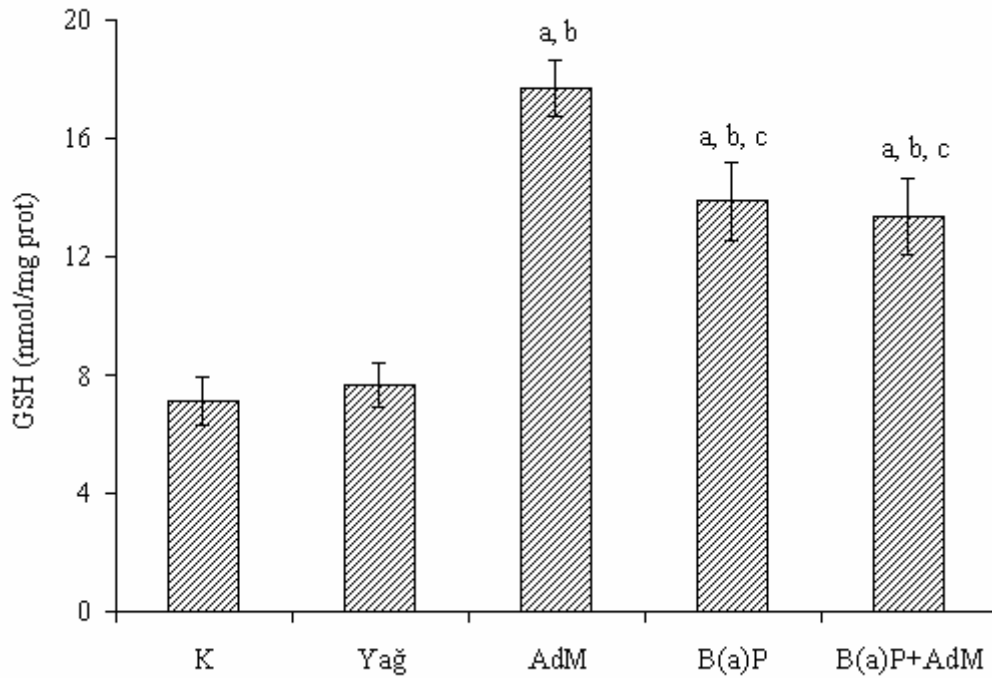
Şekil 4.15. Karaciğer dokusundaki GSH-Px enzim aktivitelerindeki değişimler ^c AdM grubuna, ^d B(a)P grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{c,d} $p < 0.05$)



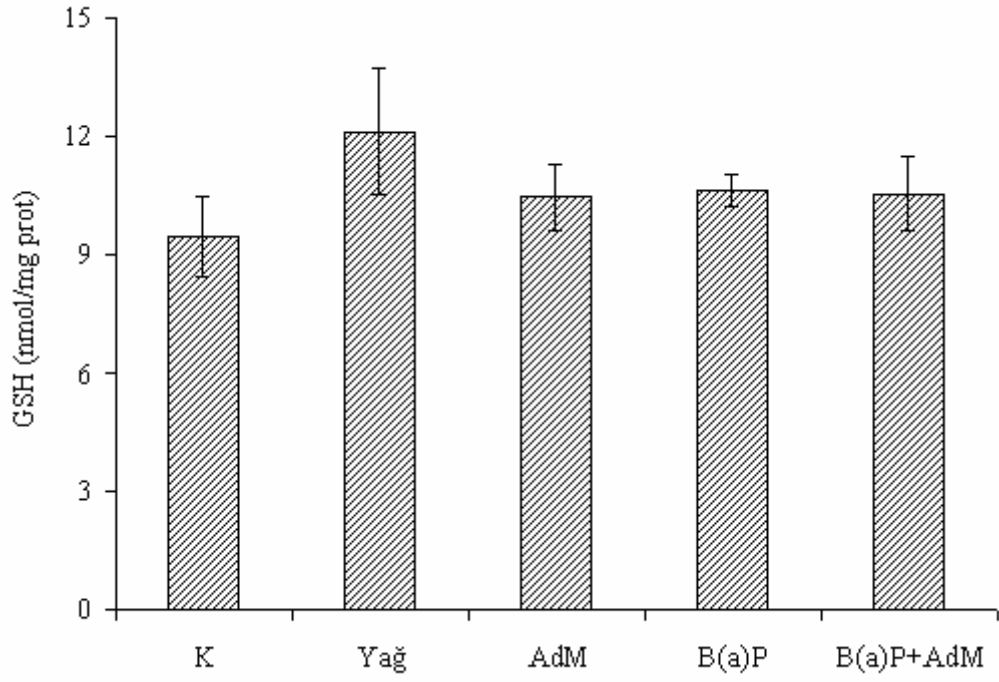
Şekil 4.16. Akciğer dokusundaki GSH-Px enzim aktivitelerindeki değişimler ^a Kontrol grubuna, ^b Yağ grubuna, ^c AdM grubuna, göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,b,c} $p < 0.05$)

4.3. Toplam Glutatyon Miktarı

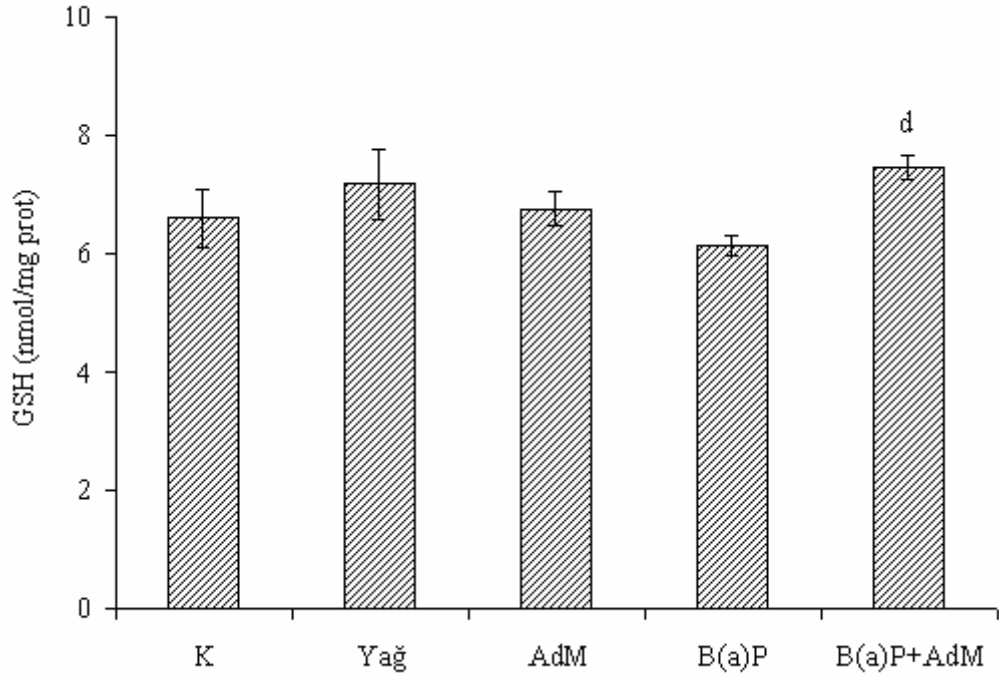
Kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer dokularında toplam GSH düzeyleri belirlenmiştir. Kalp dokusunda AdM uygulama grubunda (17.72 ± 0.94 nmol/mg p) ölçülen toplam GSH seviyesindeki artış kontrol (7.1 ± 0.83 nmol/mg p) ve yağ (7.62 ± 0.75 nmol /mg p) gruplarından istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Yine kalp dokusunda B(a)P (13.9 ± 1.31 nmol /mg p) ve B(a)P+AdM (13.37 ± 1.27 nmol /mg p) uygulama gruplarındaki değişimler kontrol, yağ gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bir artış AdM uygulama grubuyla karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak önemli bir azalış olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Uygulamalara bağlı olarak böbrek ve akciğer dokuları toplam GSH seviyeleri bakımından değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır. Karaciğer dokusunda sadece B(a)P+AdM uygulama grubundaki (7.47 ± 0.19 nmol /mg p) artış B(a)P uygulama grubuna (6.15 ± 0.16 nmol /mg p) göre istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Toplam GSH seviyesindeki değişimler Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20’de verilmiştir.



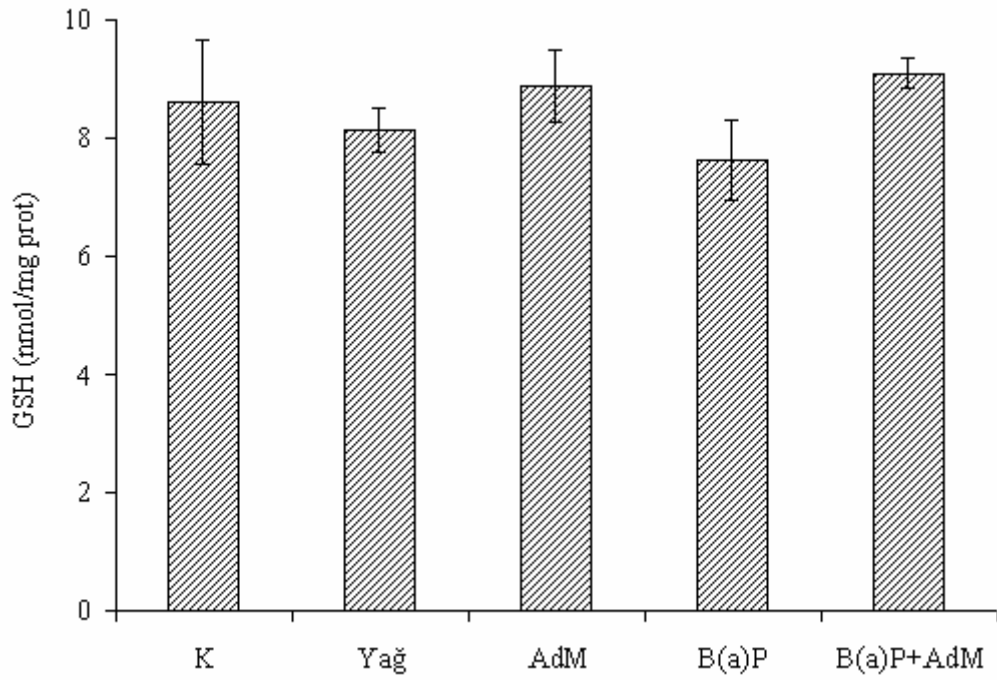
Şekil 4.17. Kalp dokusundaki toplam glutatyon seviyesindeki değişimler ^a Kontrol grubuna, ^b Yağ grubuna, ^c AdM grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,b,c} $p < 0.05$)



Şekil 4.18. Böbrek dokusundaki toplam Glutasyon seviyesindeki değişimler



Şekil 4.19. Karaciğer dokusundaki toplam Glutasyon seviyesindeki değişimler ^d B(a)P grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^d $p < 0.05$)



Şekil 4.20. Akciğer dokusundaki toplam Glutasyon seviyesindeki değişimler

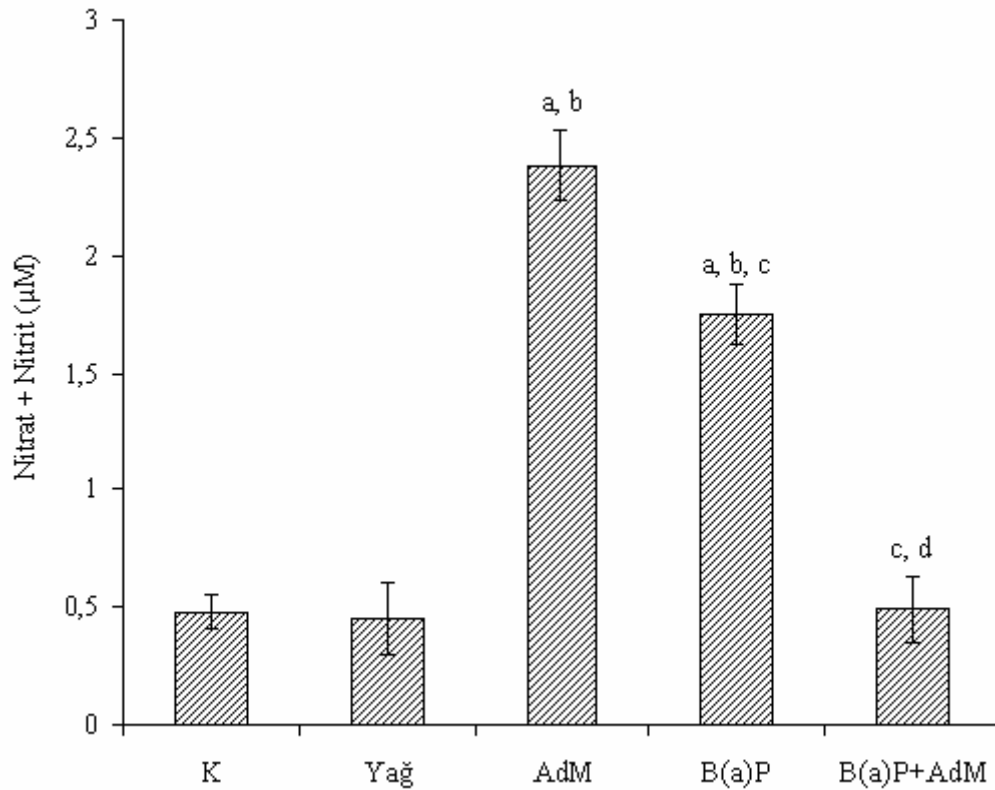
4.4. NO Konsantrasyonu

NO konsantrasyonundaki değişim ile ilgili araştırma sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

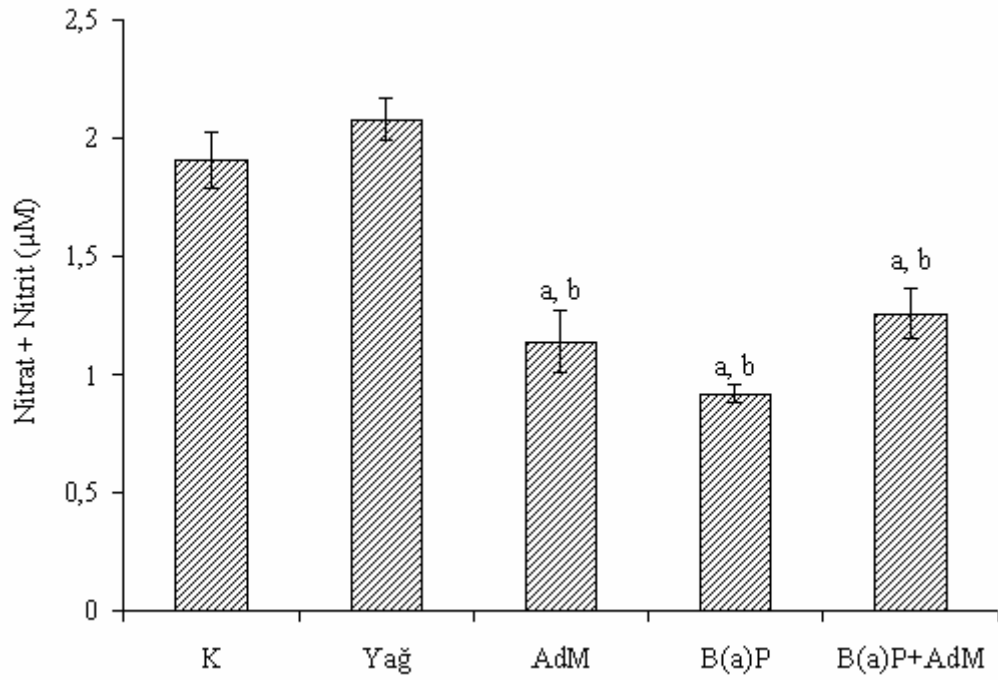
Çizelge 4.2. Adrenomedullin ve B(a)P uygulamasına bağlı olarak NO konsantrasyonundaki değişimler ^a Kontrol grubuna, ^b Yağ grubuna, ^c AdM grubuna, ^d B(a)P grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,b,c,d} $p < 0.05$)

NO					
Konsantrasyonu	Kontrol	Yağ	AdM	B(a)P	B(a)P+AdM
(μ M)					
KALP	0.47 $\pm$ 0.07	0.45 $\pm$ 0.15	2.38 $\pm$ 0.14 ^{a, b}	1.75 $\pm$ 0.12 ^{a, b, c}	0.49 $\pm$ 0.13 ^{c, d}
BÖBREK	1.91 $\pm$ 0.11	2.08 $\pm$ 0.08	1.14 $\pm$ 0.13 ^{a, b}	0.91 $\pm$ 0.03 ^{a, b}	1.26 $\pm$ 0.11 ^{a, b}
KARACİĞER	Ölçülemedi				
AKCİĞER	Ölçülemedi				

Kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer dokularında NO konsantrasyonlarındaki değişimler belirlenmiştir. Karaciğer ve akciğer dokularında NO konsantrasyonu ölçülemezken, hem kalp hem de böbrek dokularındaki kontrol ve yağ grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak önemsiz düzeyde bulunmuştur. AdM uygulama grubu hayvanların kalp dokularındaki NO konsantrasyonundaki artış ($2.38 \pm 0.14 \mu\text{M}$) kontrol ($0.47 \pm 0.07 \mu\text{M}$) ve yağ ($0.45 \pm 0.15 \mu\text{M}$) grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). B(a)P uygulama grubunda NO konsantrasyonu ($1.75 \pm 0.12 \mu\text{M}$) kontrol ve yağ gruplarına göre istatistiksel olarak artarken AdM uygulama grubuna göre istatistiksel olarak azalmıştır ($p < 0.05$). B(a)P+AdM uygulama grubundaki hayvanların kalp dokularındaki NO konsantrasyonu ($0.49 \pm 0.13 \mu\text{M}$); AdM ve B(a)P uygulama gruplarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmıştır ($p < 0.05$). Böbrek dokusundaki NO konsantrasyonları AdM ($1.14 \pm 0.13 \mu\text{M}$), B(a)P ($0.91 \pm 0.03 \mu\text{M}$) ve B(a)P+AdM ($1.26 \pm 0.11 \mu\text{M}$) uygulama gruplarındaki azalma kontrol ($1.91 \pm 0.11 \mu\text{M}$) ve yağ ($2.08 \pm 0.08 \mu\text{M}$) gruplarına göre istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Kalp ve böbrek dokularında ölçülen NO konsantrasyonundaki değişimler Şekil 4.21 ve Şekil 4.22’de verilmiştir.



Şekil 4.21. Kalp dokusundaki Nitrit Oksit konsantrasyonundaki değişimler ^a Kontrol grubuna, ^b Yağ grubuna, ^c AdM grubuna, ^d B(a)P grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,b,c,d} $p < 0.05$)



Şekil 4.22. Böbrek dokusundaki Nitrit Oksit konsantrasyonundaki değişimler ^a Kontrol grubuna, ^b Yağ grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,b} $p < 0.05$)

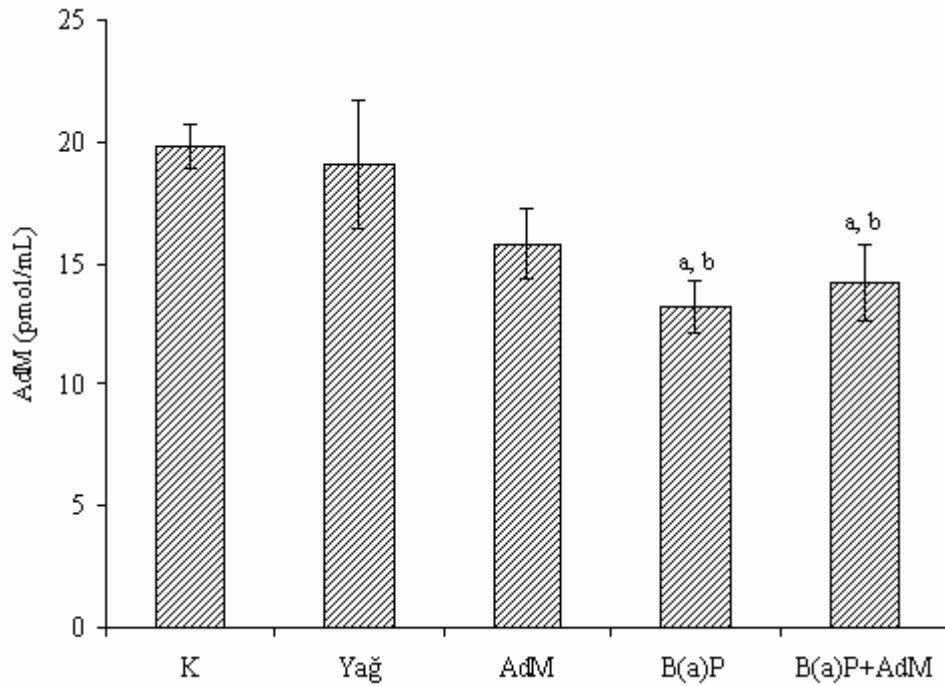
4.5. Adrenomedullin Seviyesi

AdM seviyesindeki değişimi ile ilgili araştırma bulguları Çizelge 4.3’de verilmiştir.

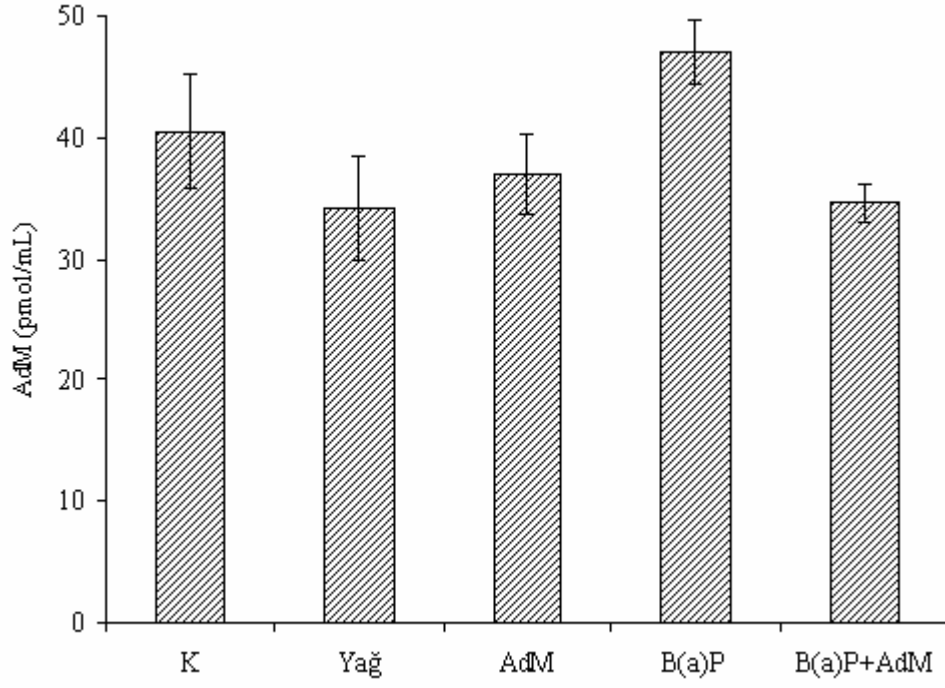
Çizelge 4.3. Adrenomedullin ve B(a)P uygulamasına bağlı olarak AdM seviyelerindeki değişimler ^a Kontrol grubuna, ^b Yağ grubuna, ^c AdM grubuna, ^d B(a)P grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,b,c,d} $p < 0.05$)

AdM Seviyeleri					
(pmol/mL)	KONTROL	YAĞ	AdM	B(a)P	B(a)P+AdM
KALP	19.84±0.91	19.08±2.63	15.82±1.43	13.23±1.05 ^{a,b}	14.22±1.55 ^{a,b}
BÖBREK	40.54±4.63	34.24±4.23	37.001±3.33	47.03±2.69	34.64±1.55
KARACİĞER	39.71±8.41	45.37±7.38	78.11±7.11 ^{a,b}	93.40±9.25 ^{a,b}	99.97±6.81 ^{a,b}
AKCİĞER	8.25±0.62	7.09±0.43	9.19±1.44	10.30±0.13	15.09±2.00 ^{a,b,c,d}

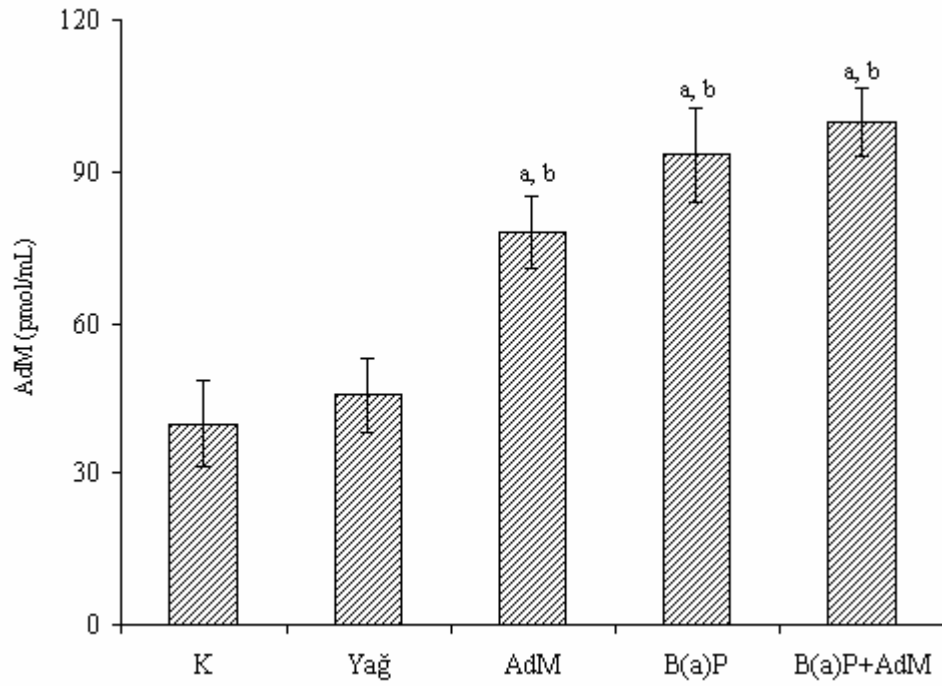
Kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer dokularında adrenomedullin seviyelerindeki değişimler Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile belirlenmiştir. Araştırma bulgularımıza göre kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer dokularındaki kontrol ve yağ gruplarındaki adrenomedullin seviyelerindeki değişimler birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemsiz düzeydedir. Kalp dokusunda B(a)P (13.23 ± 1.05 pmol/mL) ve B(a)P+AdM (14.22 ± 1.55 pmol/mL) uygulama gruplarındaki adrenomedullin seviyelerindeki azalış kontrol (19.84 ± 0.91 pmol/mL) ve yağ (19.08 ± 2.63 pmol/mL) gruplarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunurken ($p < 0.05$) böbrek dokusundaki değişimler istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Karaciğer dokusundaki adrenomedullin seviyesi AdM (78.11 ± 7.11 pmol/mL), B(a)P (93.40 ± 9.25 pmol/mL) ve B(a)P+AdM (99.97 ± 6.81 pmol/mL) uygulama gruplarında kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artmıştır ($p < 0.05$). Akciğer dokusunda ise; AdM (9.19 ± 1.44 pmol/mL) ve B(a)P (10.30 ± 0.13 pmol/mL) uygulama gruplarındaki artış, kontrol (8.25 ± 0.62 pmol/mL) ve yağ (7.09 ± 0.43 pmol/mL) gruplarına göre istatistiksel olarak önemli değilken B(a)P+AdM uygulama grubundaki (15.09 ± 2.00) artış hem kontrol ve yağ grubundan hem de AdM ve B(a)P uygulama gruplarından istatistiksel olarak önemli düzeyde saptanmıştır ($p < 0.05$). AdM seviyesindeki değişimler Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25 ve Şekil 4.26’da verilmiştir.



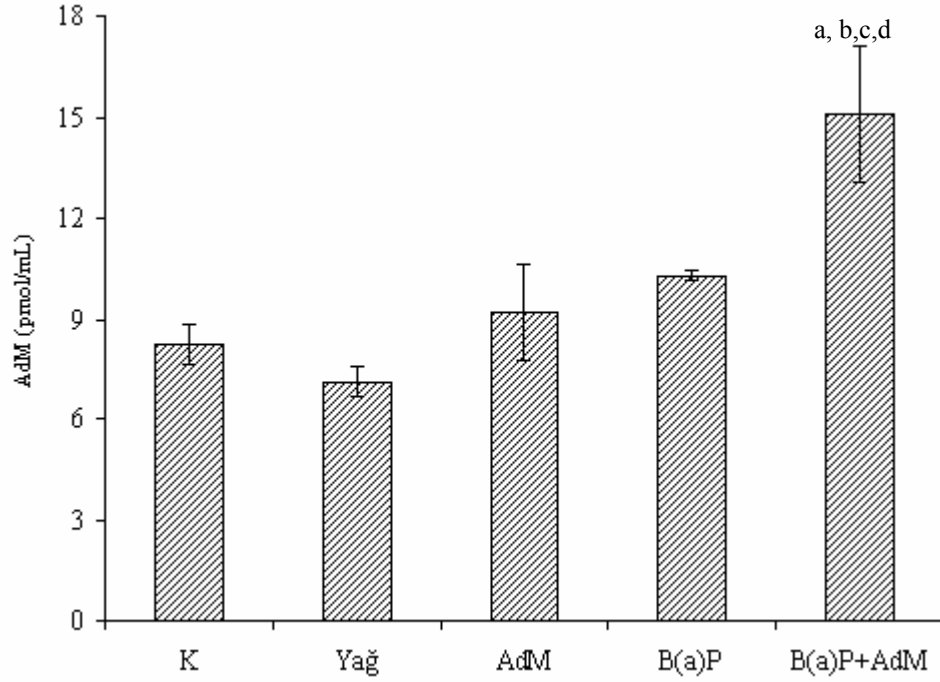
Şekil: 4.23. Kalp dokusundaki AdM seviyesindeki değişimler ^a Kontrol grubuna, ^b Yağ grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,b} $p < 0.05$)



Şekil: 4.24. Böbrek dokusundaki AdM seviyesindeki değişimler



Şekil: 4.25. Karaciğer dokusundaki AdM seviyesindeki değişimler ^a Kontrol grubuna, ^b Yağ grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,b} $p < 0.05$)



Şekil: 4.26. Akciğer dokusundaki AdM seviyesindeki değişimler ^a Kontrol grubuna, ^b Yağ grubuna, ^c AdM grubuna, ^d B(a)P grubuna göre değişimler istatistiksel olarak önemlidir (^{a,b,c,d} $p < 0.05$)

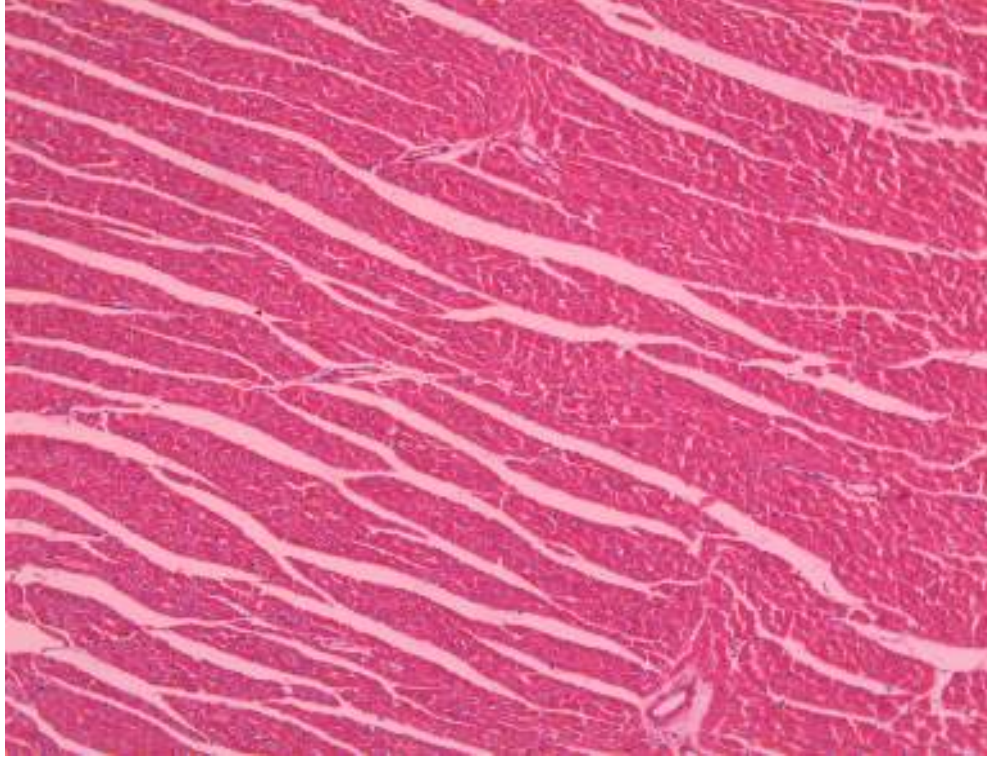
4.6. Histopatolojik Değişimler

Kalp, böbrek, karaciğer ve akciğer dokuları histopatolojik yönden incelenmiştir. Araştırma bulguları her doku için ayrı olarak verilmiştir.

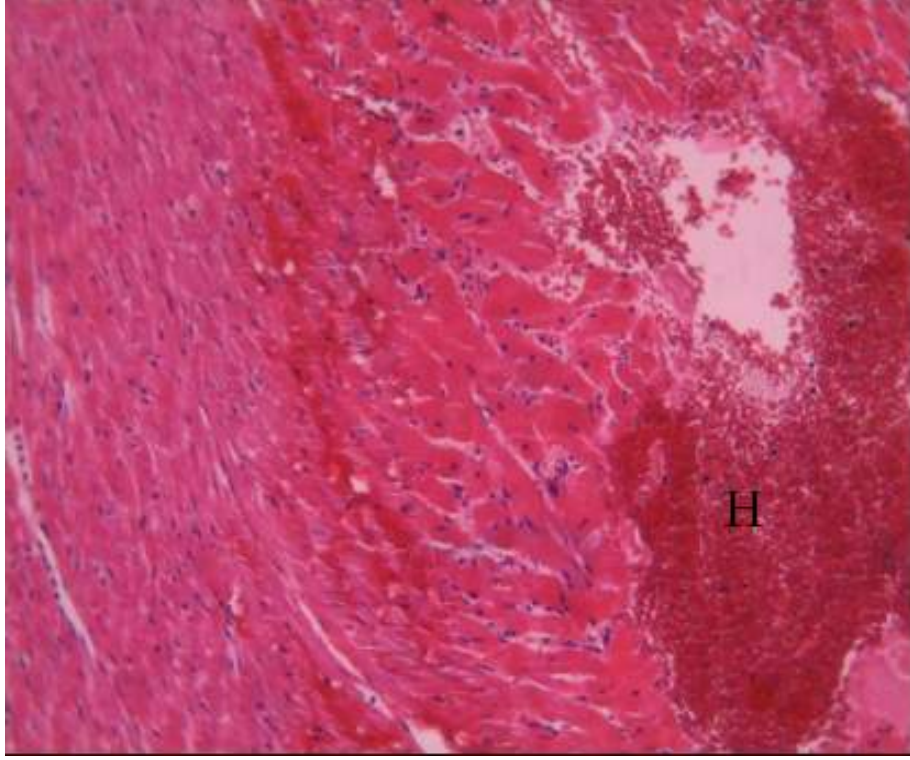
4.6.1. Kalp dokusu

Kontrol ve yağ gruplarındaki sıçanların kalp dokusu örnekleri normal histolojik yapıda gözlenmiştir (Şekil 4.27.). AdM uygulama grubundaki sıçanların kalp kesitleri genellikle normal histolojik yapıda izlenmekle birlikte miyokard tabakası içerisinde birkaç alanda değişik genişliklerde hemorajik alanlar tespit edilmiştir. Bu alanlarda yoğun olarak eritrositler izlenmiştir. Hemorajik alanların çevresindeki miyokard hücrelerinin koyu eosinofilik sitoplazmalı ve heterokromatik nükleuslu oldukları dikkati çekmiştir (Şekil 4.28.). B(a)P uygulama grubundaki sıçanların kalp kesitlerinde yaygın olarak kalp kası hücreleri arasında eritrositlerin varlığı dikkati çekmiştir. Bazı alanlarda kalp kası hücreleri arasındaki intersellüler mesafelerin genişlediği saptanmıştır. Bu alanlar içerisinde kalp kası hücrelerinin sitoplazmalarının koyu eosinofilik ve

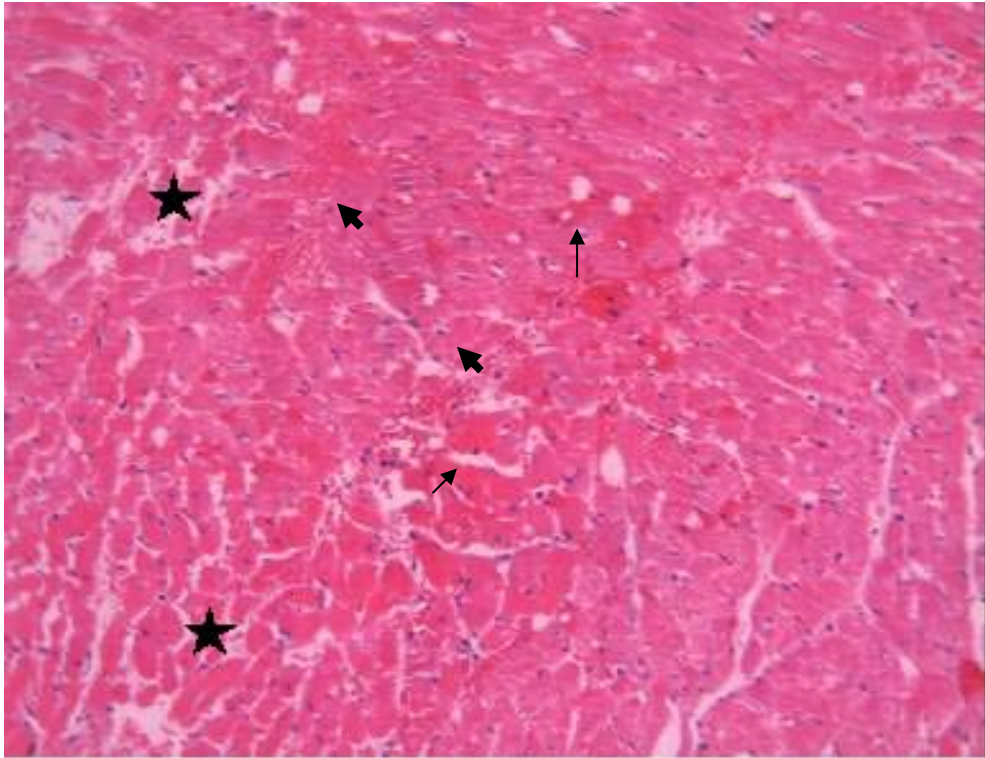
nükleuslarının heterokromatik boyandığı tespit edilmiştir. Miyokard tabakasındaki hücreler arasında değişik büyüklüklerde şeffaf vakuoler yapılar izlenmiştir (şekil 4.29.). B(a)P+AdM uygulama grubunda kalp kası kesitleri genellikle normal histolojik yapıda izlenmekle birlikte nadir olarak miyokard tabakası içerisinde  dem ve hemoraji alanları görülmüştür (şekil 4.30.).



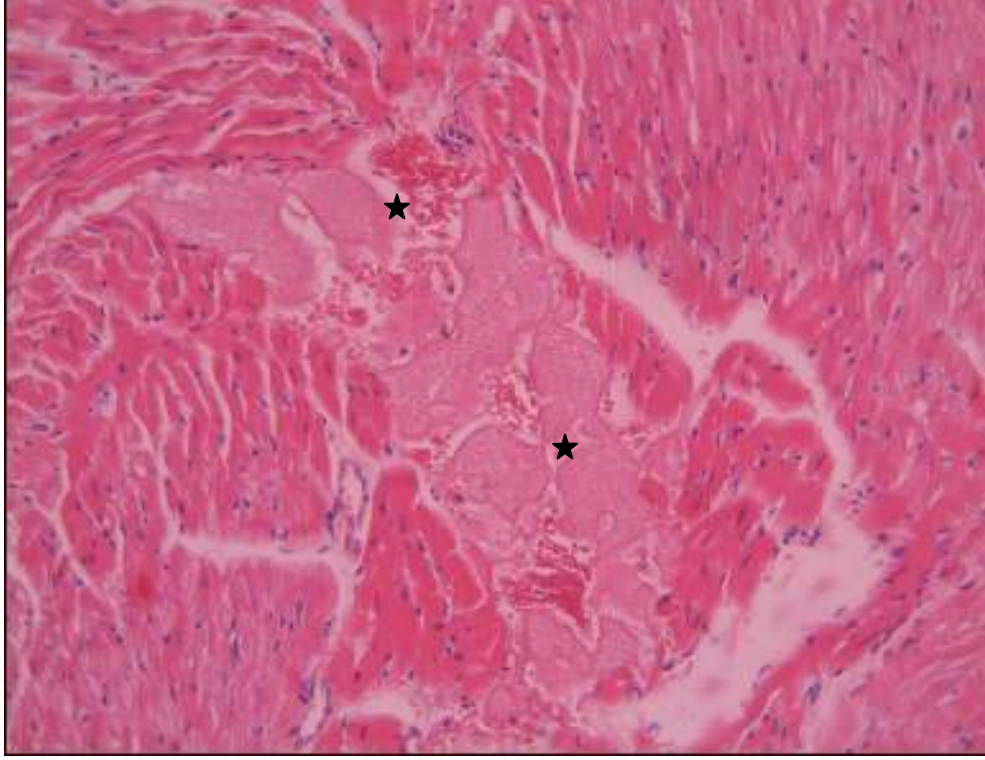
şekil 4.27. Kontrol grubu kalp dokusu: Normal histolojik görünümde miyokard tabakası, H-Ex10



Şekil 4.28. AdM uygulama grubu kalp dokusu: Miyokard tabakasında hemorajik alan (H) ve çevresinde koyu eosinofilik sitoplazmalı, heterokromatik nükleuslu kalp kası hücreleri, H-Ex20



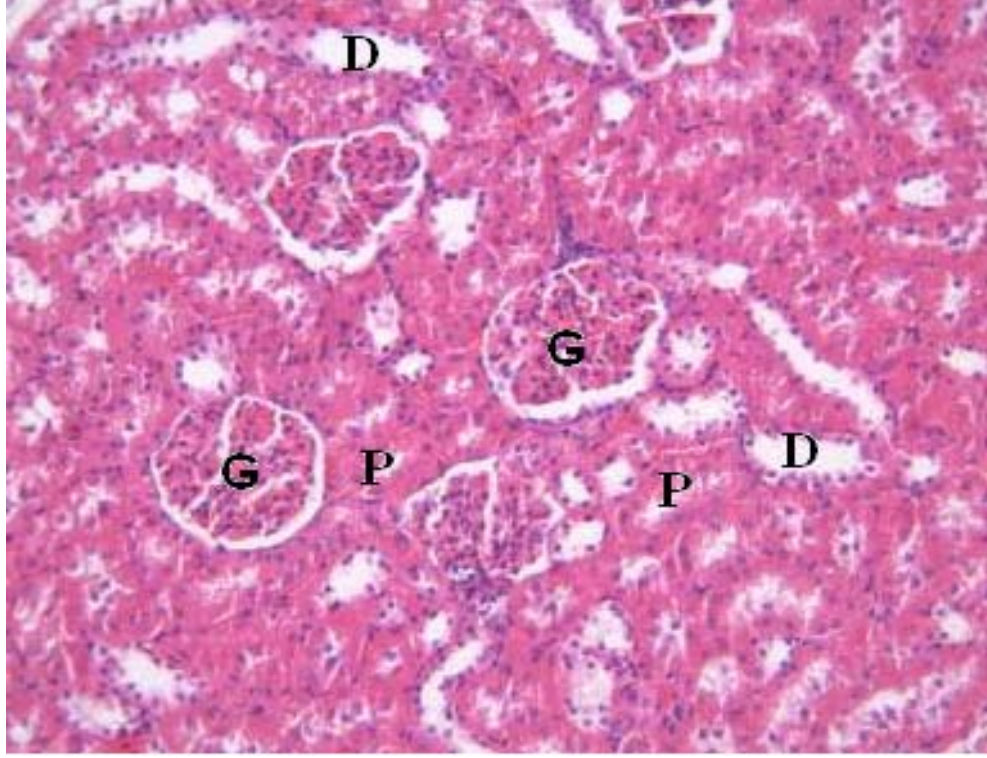
Şekil 4.29. B(a)P uygulama grubu kalp dokusu: Miyokard tabakasında intercellüler alanlarda eritrositler (→), intercellüler alanlarda genişleme (*) ve kalp kası hücrelerinde artmış sitoplazma eosinofilisi ve heterokromatik nükleus (→), H-Ex20



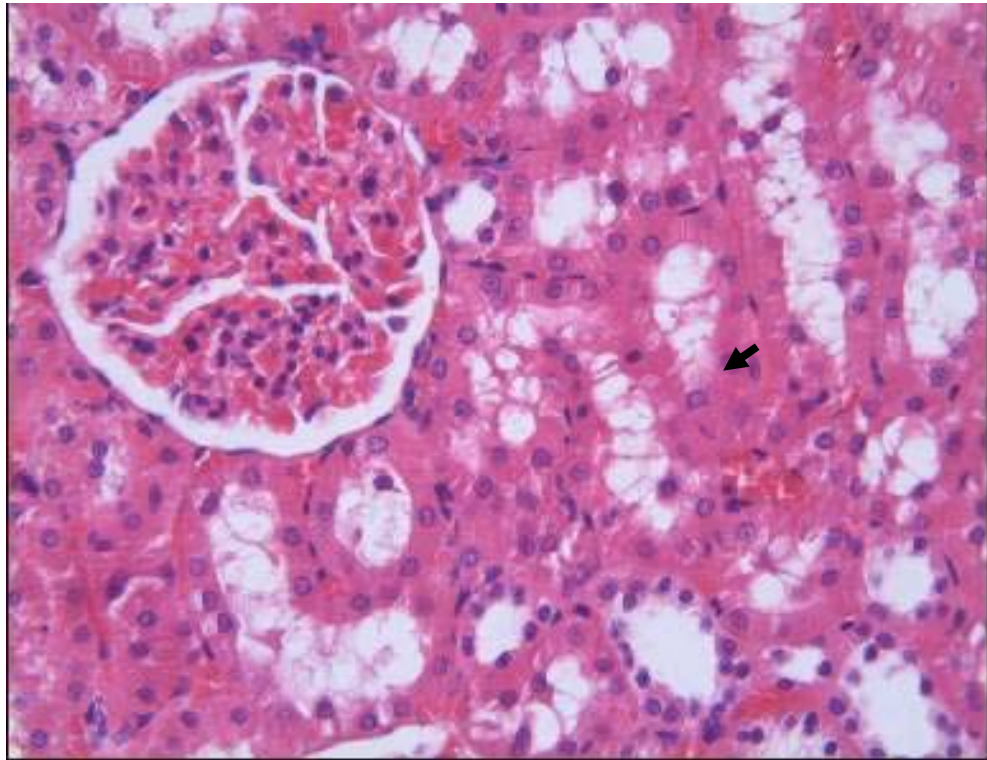
Şekil 4.30. B(a)P+AdM uygulama grubu kalp dokusu: Miyokard tabakasında ödem ve hemorajik değişiklikler (★), H-Ex20

4.6.2. Böbrek dokusu

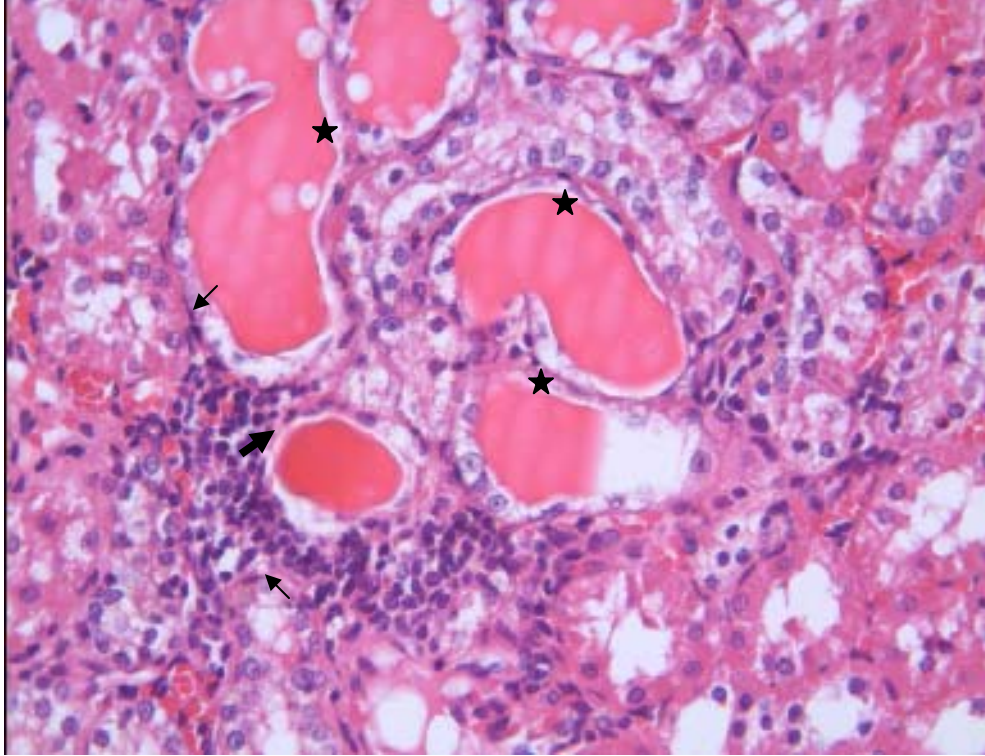
Kontrol ve yağ grubundaki sıçanların böbrek kesitleri normal histolojik yapıda izlenmiştir (Şekil 4.31.). AdM uygulama grubunda böbrek dokusu genel olarak normal histolojik yapıda izlenmiştir. Ancak bazı intertübüler alanlardaki damarlar içerisindeki konjesyon gözlenmiştir (Şekil 4.32.). B(a)P uygulama grubundaki sıçanların böbreklerinde peritübüler alanlarda yoğun infiltrasyon, tübül lümenlerinde eosinofilik boyanan materyal ve bu tübül epitellerinde dejenerasyon saptanmıştır. Peritübüler konjesyon belirgin olarak gözlenmiştir (Şekil 4.33.). Bazı glomerularda dilatasyon ve Bowman aralığında aşırı genişleme gözlenmiştir (Şekil 4.34.). B(a)P+AdM uygulama grubunda intertübüler alanlardaki konjesyon dışında böbrek kesitleri normal histolojik yapıda izlenmiştir (Şekil 4.35.).



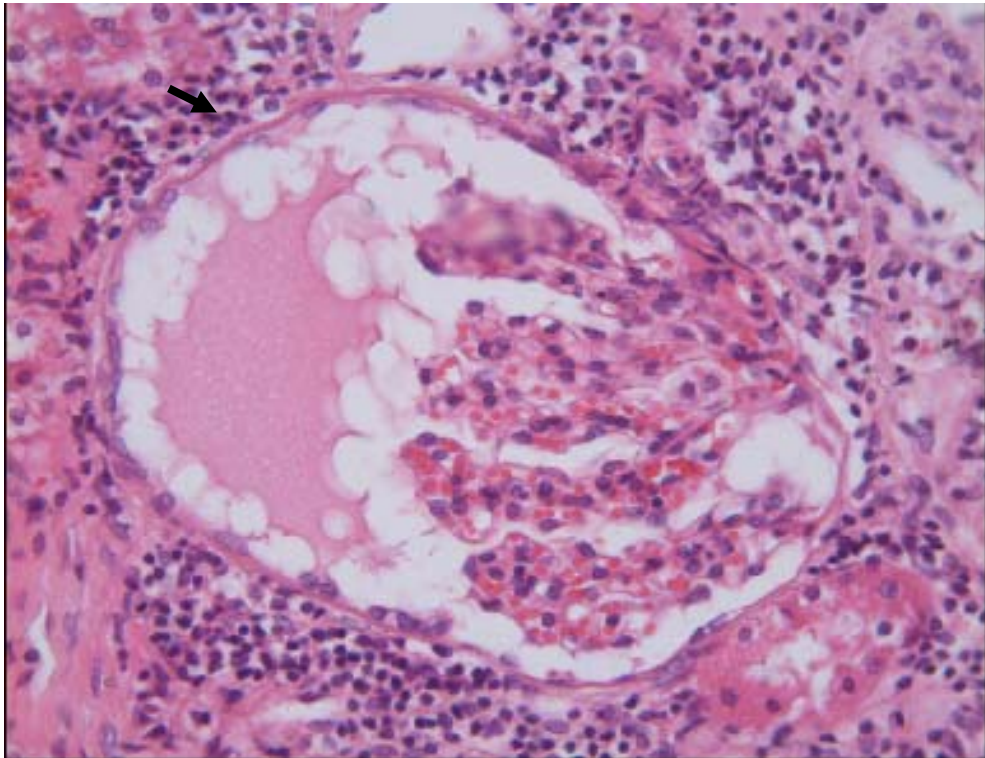
Şekil 4.31. Kontrol grubu böbrek dokusu: Normal histolojik yapıda böbrek. Glomerul (G), distal tubül (D), proksimal tubül (P), H-Ex20



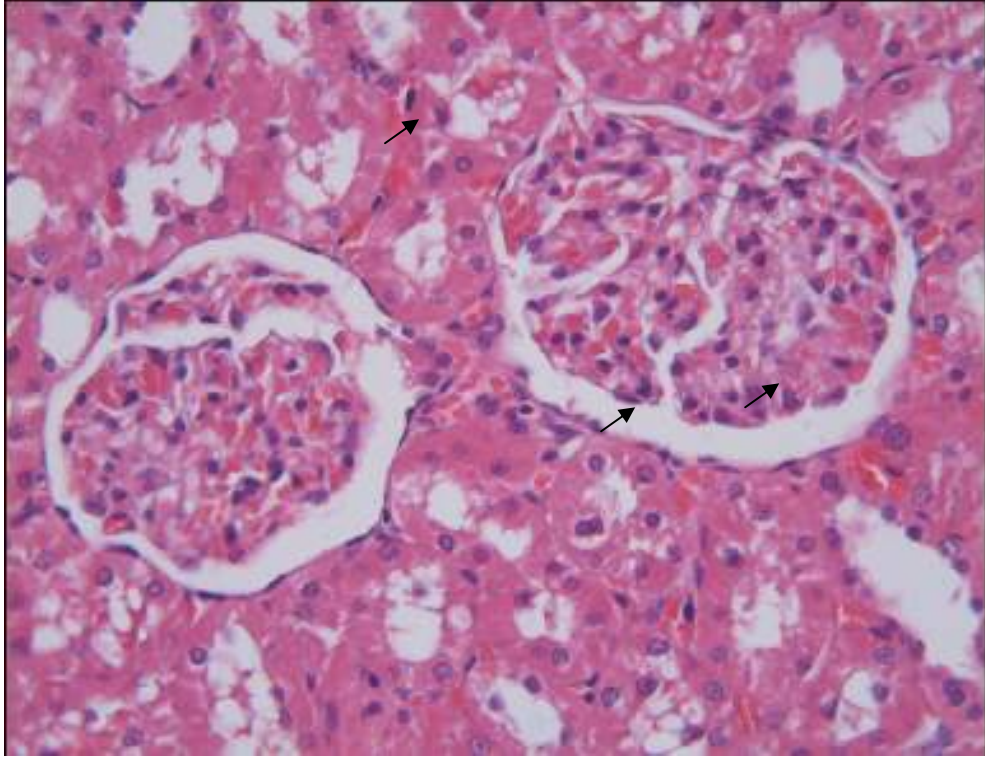
Şekil 4.32. AdM uygulama grubu böbrek dokusu: Normal histolojik yapıda tübüller ve glomerul. İntertubuler alanda damar içerisinde konjesyon (→), H-Ex40



Şekil 4.33. B(a)P uygulama grubu böbrek dokusu 1: Peritübüler infiltrasyon (↗) ve konjesyon (→). Tubül lümeninde eosinofilik materyal birikimi ve tubül epitelinde dejenerasyon (★), H-Ex40



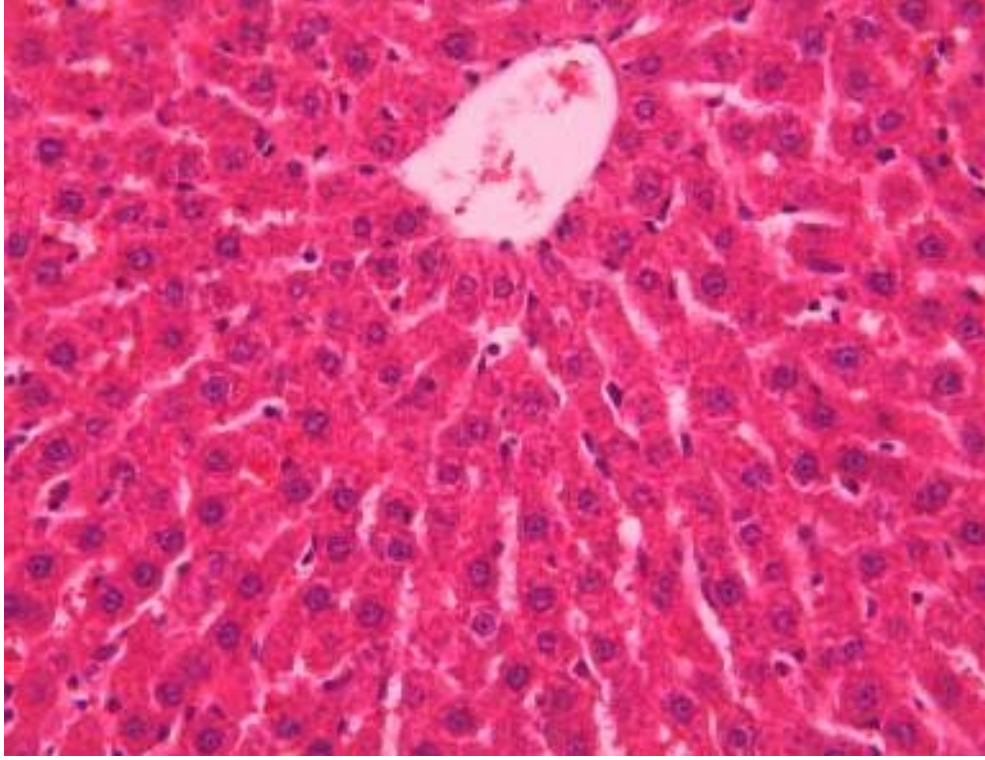
Şekil 4.34. B(a)P uygulama grubu böbrek dokusu 2: Glomerul dilatasyonu ve Bowman aralığında aşırı genişleme. Yaygın infiltrasyon (↗), H-Ex40



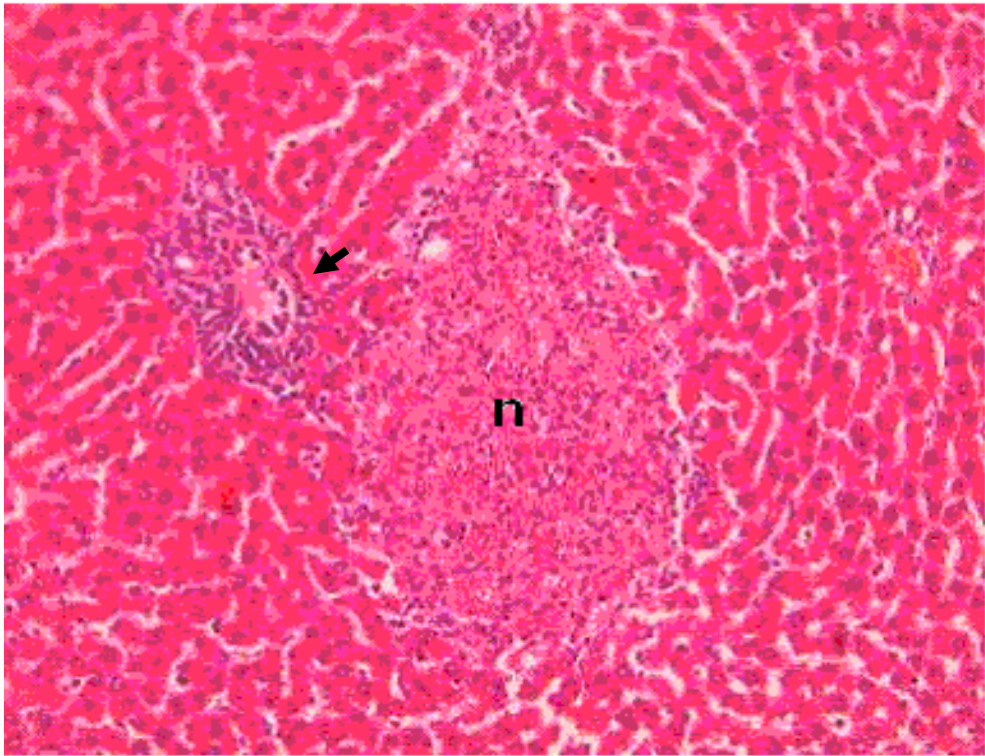
Şekil 4.35. B(a)P+AdM uygulama grubu böbrek dokusu: Peritübüler alanlarda konjesyon (→), normal tübüler yapılar ve glomeruller, H-Ex40

4.6.3. Karaciğer dokusu

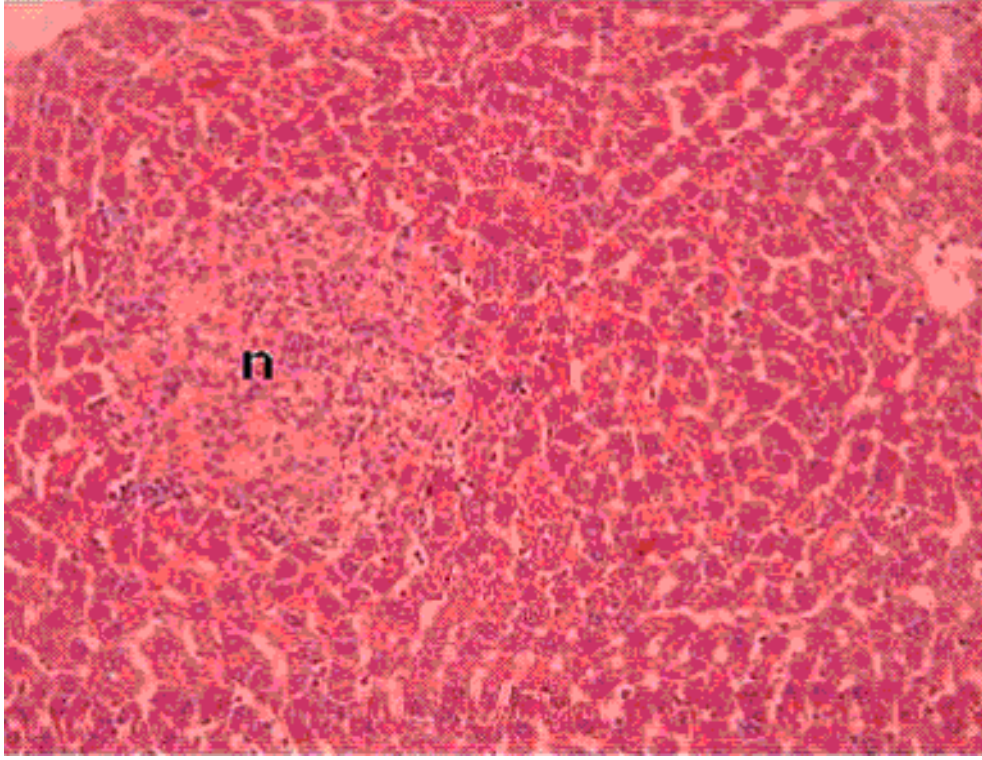
Kontrol ve yağ gruplarındaki sıçanların karaciğer dokuları normal histolojik yapıda gözlen gözlenmiştir (Şekil 4.36.). AdM uygulama grubundaki sıçanların karaciğer örneklerinde yapılan histolojik incelemede hepatositlerin normal ışınsal diziliminin bozulduğu saptanmıştır. Portal alanlarda infiltrasyon ve yer yer farklı genişliklerde parankimal nekroz alanları gözlenmiştir (Şekil 4.37.). B(a)P uygulama grubundaki sıçanların karaciğer kesitlerinde parankimada farklı büyüklüklerde nekroz alanları belirgin olarak gözlenmiştir. Bazı portal alanlarda ve yer parankimada infiltrasyonun mevcut olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.38.). B(a)P+AdM uygulama grubundaki sıçanların karaciğer kesitlerinde yaygın olarak koyu eosinofilik sitoplazmalı ve heterokromatik nükleuslu hepatositler izlenmiştir. Ayrıca parankimada yer yer nekroz alanları saptanmıştır (Şekil 4.39.).



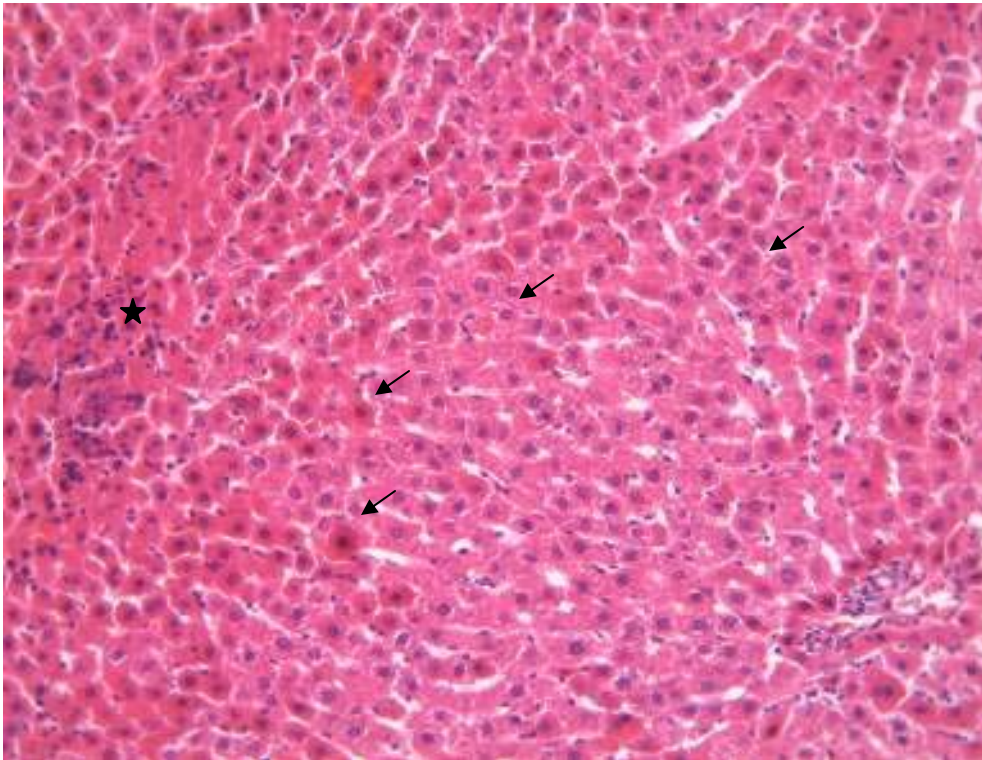
Şekil 4.36. Kontrol grubu karaciğer dokusu: Normal histolojik yapıda karaciğer, H-E x40



Şekil 4.37. AdM uygulama grubu karaciğer dokusu: Parankimal nekroz alanı (**n**) ve periportal alanda infiltrasyon (→), H-Ex20



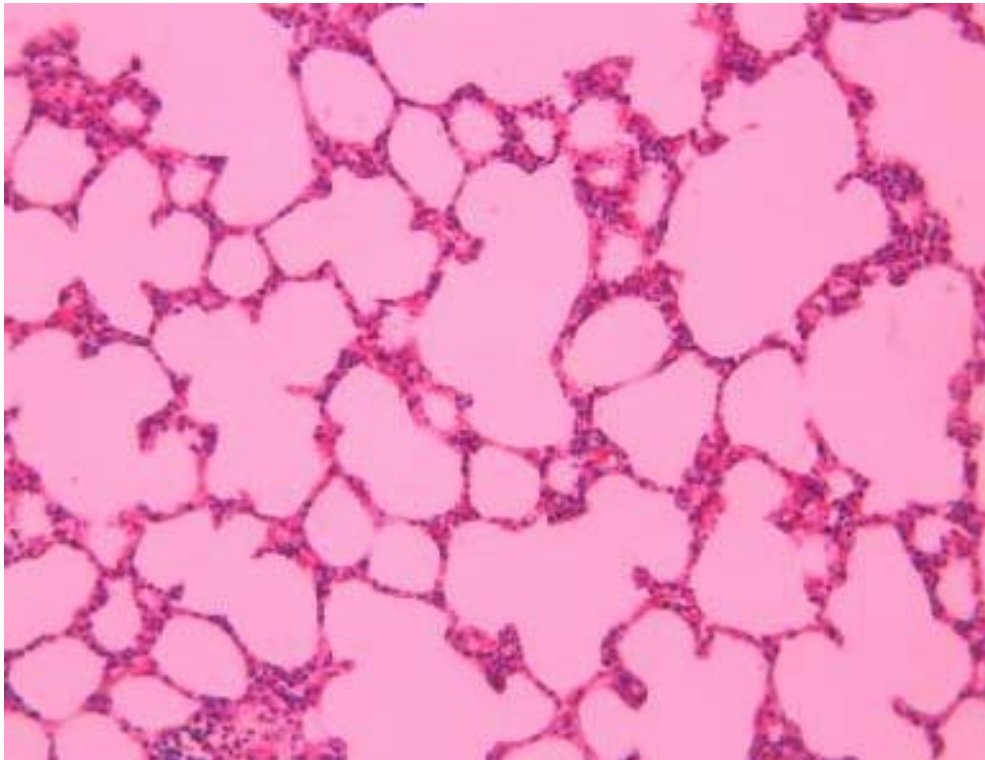
Şekil 4.38. B(a)P uygulama grubu karaciğer dokusu: Parankimal nekroz alanı (n), H-Ex20



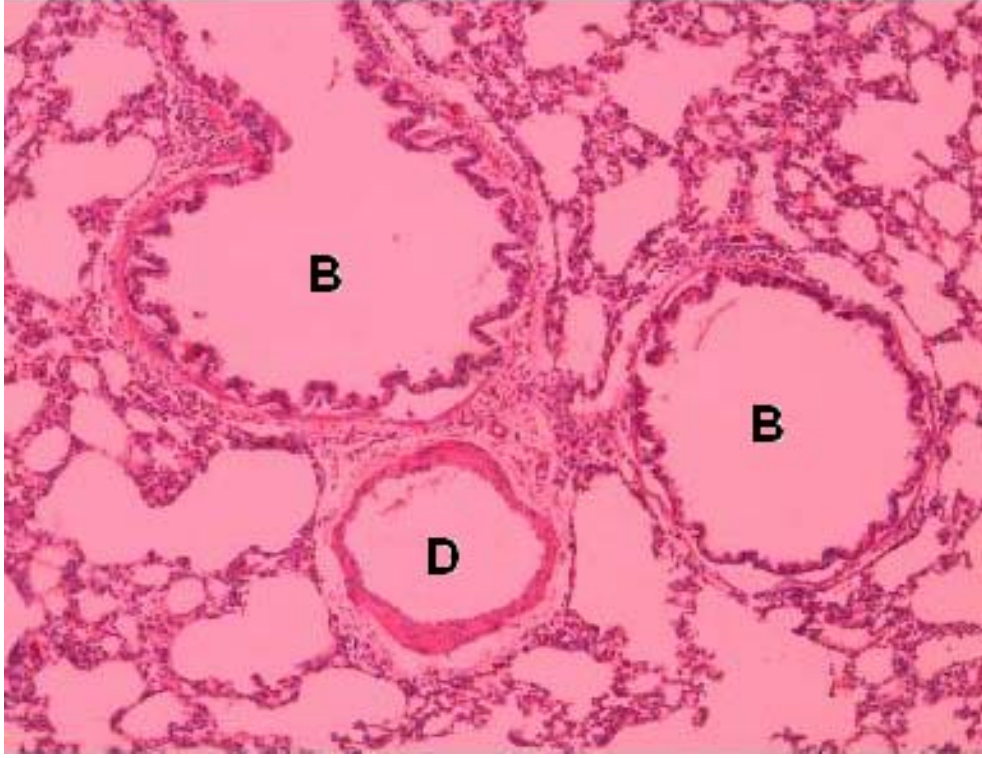
Şekil 4. 39. B(a)P+AdM uygulama karaciğer dokusu: Koyu eosinofilik sitoplazmalı ve heterokromatik nukleuslu hepatositler (→) ve nekroz (★), H-Ex20

4.6.4. Akciğer dokusu

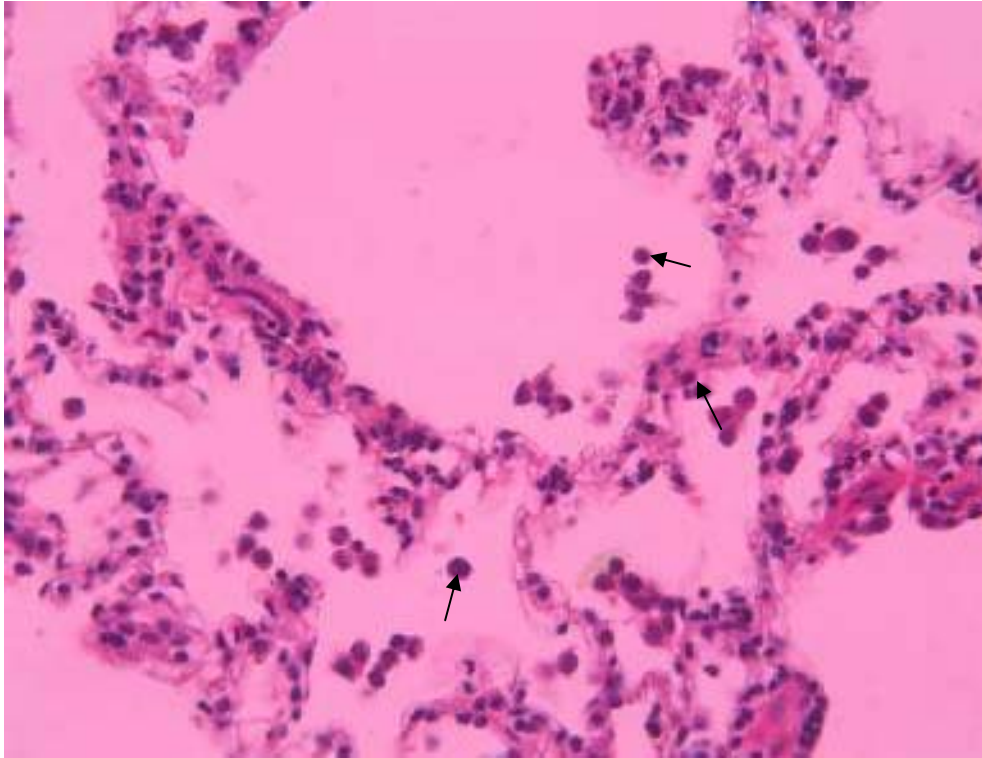
Kontrol ve yağ gruplarındaki sıçanların akciğerleri bronş, bronşiol ve alveol düzeyinde normal histolojik yapıda izlenmiştir (Şekil 4.40, Şekil 4.41). AdM uygulama grubundaki sıçanların akciğerlerinde alveoller içinde çok sayıda serbest alveolar makrofajlar görülmüştür (Şekil 4.42.). Akciğer parankiması içindeki damarlar çevresinde yoğunlaşan infiltrasyon alanları dikkati çekmiştir (Şekil 4.43.). B(a)P uygulama grubundaki sıçanların akciğer dokularının histolojik incelenmesinde bazı bronş epitellerinde dejenerasyon ve çevrelerindeki geniş alanlarda yoğun infiltrasyon mevcuttur. Parankimada alveoler alanlarda yoğun hemoraji ile birlikte alveollerin eritrositler ile dolu olduğu saptanmıştır (Şekil 4.44.). Ayrıca interalveolar septumlarda kalınlaşma ve alveollerin büyük ölçüde kaybolduğu alanlar mevcuttur (Şekil 4.45.). B(a)P+AdM uygulama grubundaki sıçanların akciğer kesitlerinde alveoller içinde çok sayıda alveolar makrofaj saptanmıştır (Şekil 4.46.). Perivasküler alanlarda, bronş ve bronşiollerin çevresinde yoğun infiltrasyon dikkati çekmiştir (Şekil 4.47.).



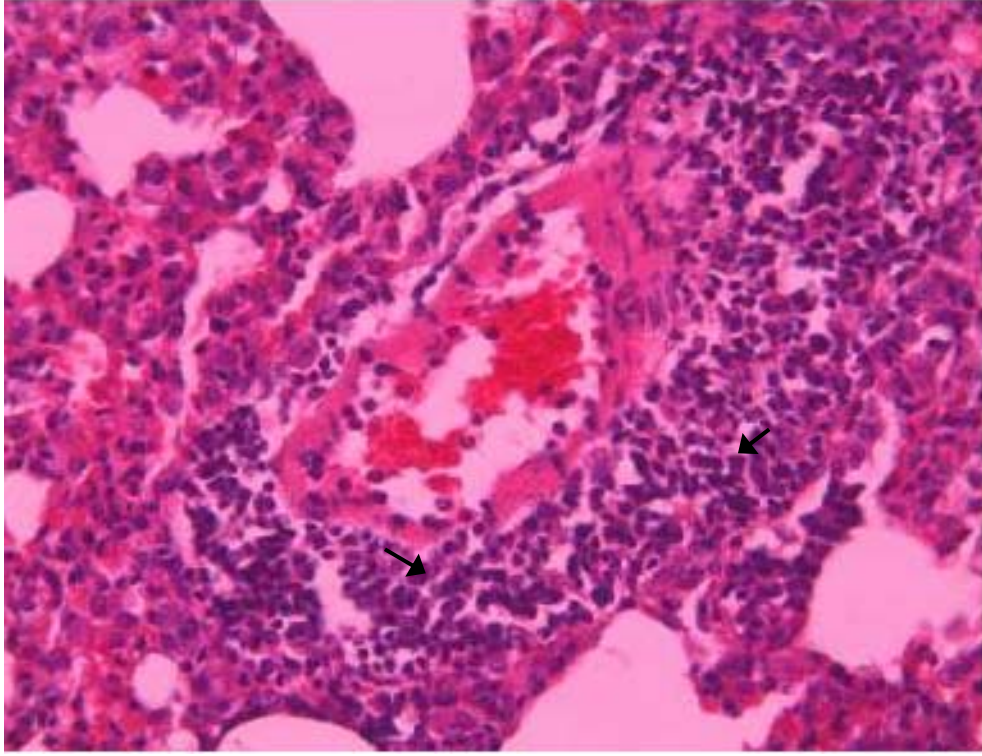
Şekil 4.40. Kontrol grubu akciğer dokusu 1: Normal histolojik yapıda alveoller, H-Ex20



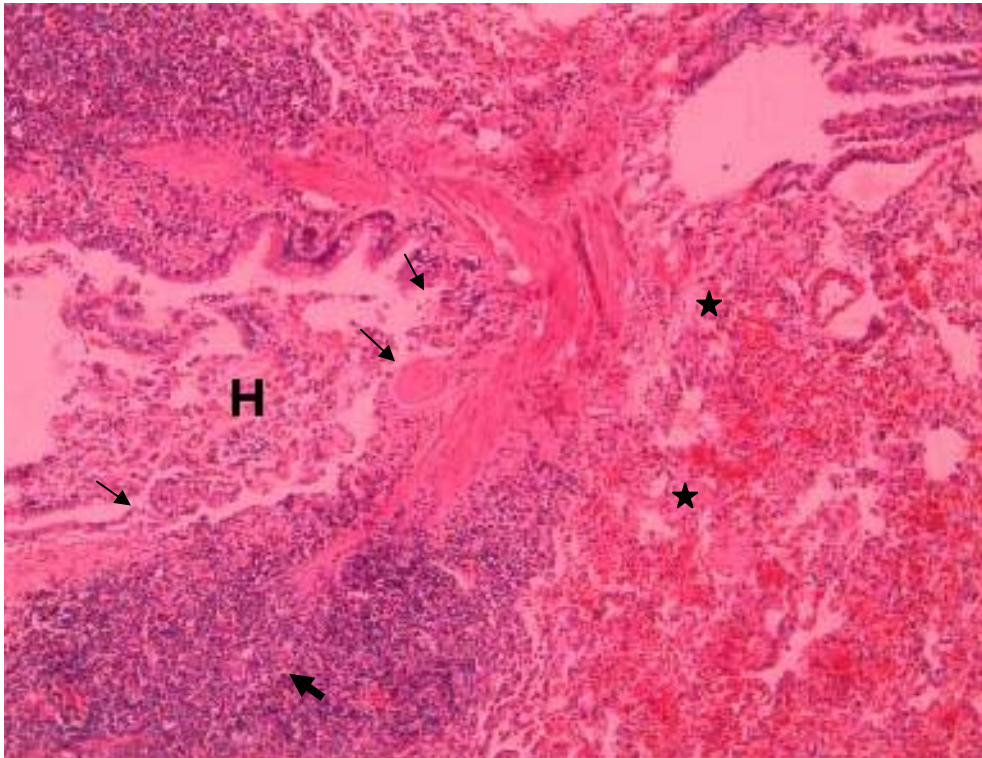
Şekli 4.41. Kontrol grubu akciğer dokusu 2: Normal histolojik yapıda bronşioler (B), alveoller ve damar (D), H-Ex10



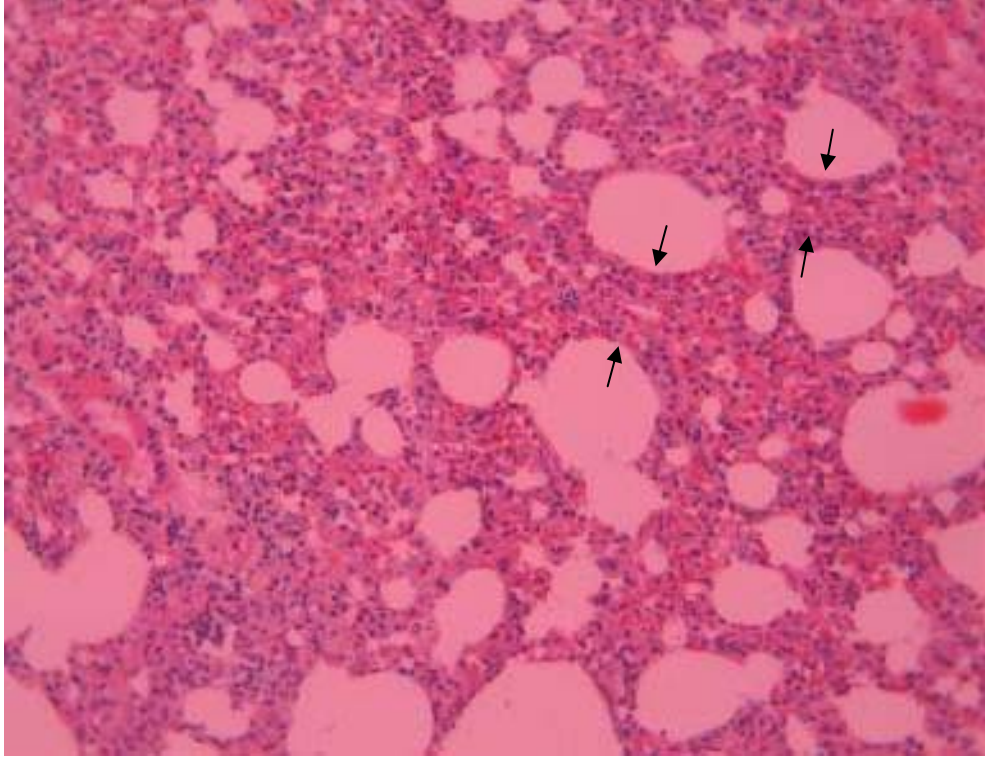
Şekil 4.42. AdM uygulama grubu akciğer dokusu 1: Alveoller içerisinde alveoller makrofajlar (→), H-Ex40



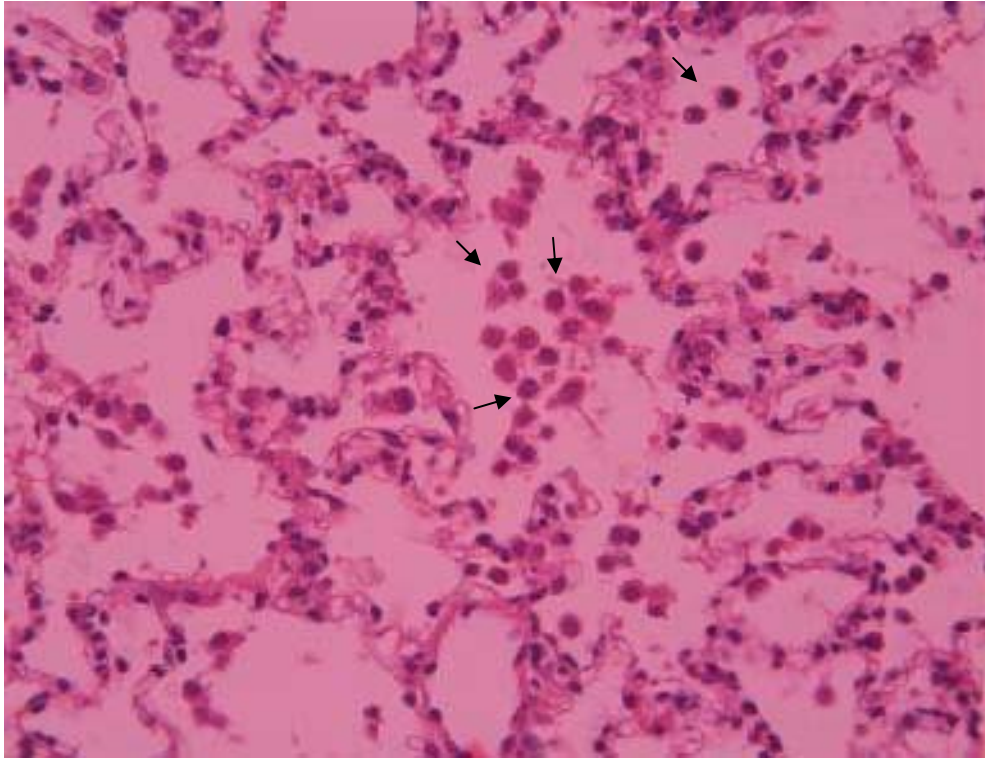
Şekil 4.43. AdM uygulama grubu akciğer dokusu 2: Perivasküler alanda yoğun infiltrasyon (→), H-Ex20



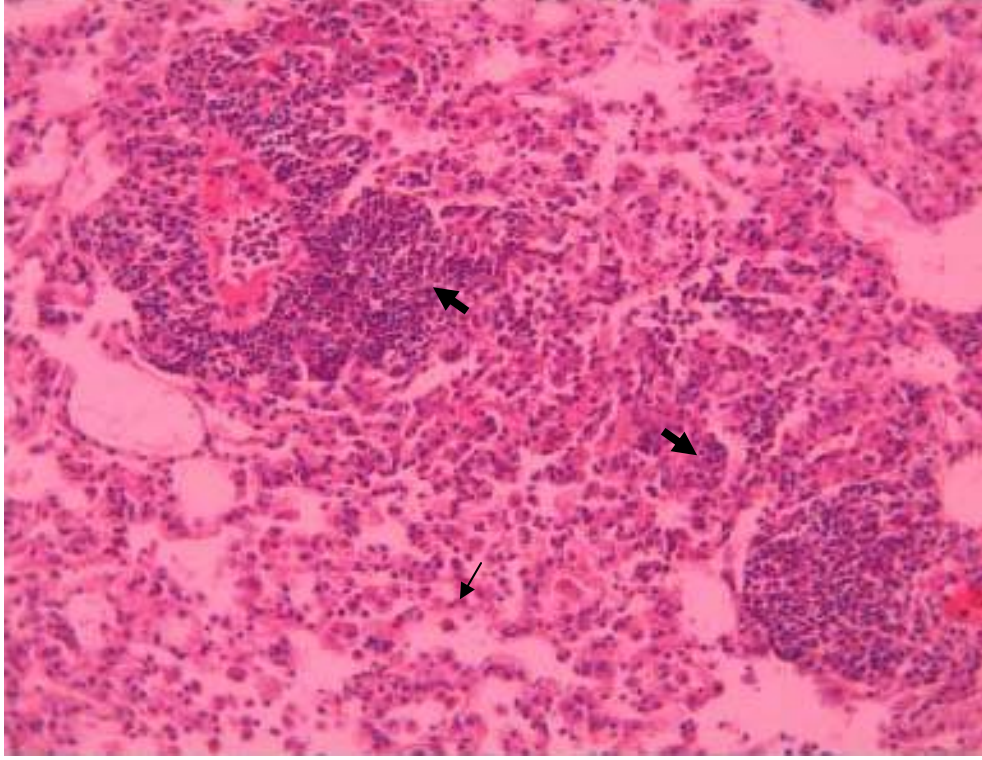
Şekil 4.44. B(a)P uygulama grubu akciğer dokusu 1: Bronş epitelinde dejenerasyon (→), lümende dejenere hücreler (H) ve çevresinde yoğun infiltrasyon (→), Alveoler alanlarda yoğun hemoraji (★). H-E x10



Şekil 4.45. B(a)P uygulama grubu akciğer dokusu 2: İnteralveolar septumlarda kalınlaşma (↔), H-Ex20



Şekil 4.46. B(a)P+AdM uygulama grubu akciğer dokusu 1: Alveoller içinde çok sayıda alveolar makrofaj (→), H-Ex40



Şekil 4.47. B(a)P+AdM uygulama grubu akciğer dokusu 2: Perivasküler alanlarda yoğun infiltrasyon (→), alveoller içinde çok sayıda alveolar makrofaj (→), H-Ex20

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Poliaromatik hidrokarbonlar (PAH'lar) insanlarda önemli derecede kansere neden olduğu kabul edilen ve hemen hemen her yerde bulunan çevresel ajanlardır. Kimyasal olarak inert olmalarına rağmen memeli hücrelerinde metabolik olarak aktivasyona uğrayarak diol-epoksitlere dönüştürler. Diol-epoksitler DNA'yı da içeren hücresel makromoleküllere kovalent olarak bağlanırlar, böylece DNA'da replikasyon hatalarına ve mutasyonlara neden olarak kanser sürecini başlatabilirler. PAH'lar arasında yer alan benzo(a)piren bu açıdan oldukça yaygın olarak çalışılmıştır. B(a)P yapay olarak imal edilen veya endüstride kullanılan bir madde değildir, ancak organik materyallerin yanma sürecinde oluşarak çevreye yayılır [88]. Fosil yakıtların tam olarak yanmaması sonucu meydana gelen B(a)P'ın insan ve hayvanlarda çeşitli kanserlere neden olan ajan olabileceği gösterilmiştir. B(a)P'ın karsinojenik ve mutajenik etkileri memelilerde ve memeli hücre sistemlerinde yaygın bir şekilde araştırılmaktadır [16, 17, 88].

Birçok karsinojen maddenin hücredeki oksidatif stresi artırarak kansere sebep olabileceği anlaşılmıştır. Bu maddeler SOD, GSH-Px ve katalaz aktiviteleri dahil hücrenin antioksidan savunmasında ani ve sürekli bir değişime sebep olabilirler [113]. PAH'ların metabolizmaları boyunca reaktif oksijen türleri (ROT) oluşabilir [23]. Serbest radikaller DNA, lipid ve proteinler gibi biyolojik olarak önemli olan makromoleküller ile reaksiyona girerek bu makromoleküllerin yapı ve fonksiyonlarını bozabilirler [114]. Biyolojik sistemlerde ROT'ların en önemli etkileri protein oksidasyonu, enzim inaktivasyonu ve DNA hasarıdır [23]. ROT'lar belli bir oranda normal insan metabolizmasında da üretilirler ve bu ROT üretimi antioksidan savunma sistemi tarafından kontrol altında tutulur [114].

Yeni bir düzenleyici peptid olarak Adrenomedullin (AdM); 1993 yılında, Japon bilim adamları tarafından bazı peptidlerin trombosit siklik-adenozin monofosfat (cAMP) düzeylerine etkisi araştırılırken feokromositoma (adrenal medulla tümörü) hücrelerinden elde edilmiştir [66].

AdM; damar genişletici, bronşiyal genişletici, tuz ve su dengesini düzenleyici, nörotransmitter, büyüme faktörü, hormon salınımını düzenleyici, anjiogenik molekül ve antimikrobiyal molekül olarak görev yapan çok fonksiyonlu bir peptiddir [73, 74]. Bunlara ilave olarak tümör biyolojisinde AdM'nin farklı etkiler gösterdiği rapor edilmiştir [71].

Adrenomedullin sistemik ve lokal inflamasyon ve sepsis sırasında plazmada yüksek düzeylere ulaşır. Bu multifonksiyonel peptidin artışı enfeksiyon sırasında tamamen inflamasyonu yansıtır, hem hormon hem de sitokin gibi davranır, aynı zamanda bölgesel kan akımını, lökosit göçünü, elektrolit dengesini kardiyak performansını ve glukoz alımını kontrol eder. Çoğu çalışmada AdM'nin inflamasyon boyunca sitokinler gibi inflamatuvar araçlar ile hem NO-bağımlı hem de NO-bağımsız mekanizmalar ile üretilmesi hem tedavinin devam etmesi hem de hemostazisin yeniden düzenlenmesinde başarılı bir role sahip olduğundan bahsedilmektedir. Fakat bazı olgularda ise hasar ve enfeksiyon cevabı patolojik hasarla sonuçlanabilir [69].

Nitrik oksit hücrel patofizyolojide önemli bir rol oynayan, atmosferik şartlarda gaz olan kararsız, reaktif, serbest radikal bir gazdır [26, 49-51]. NO, bir gaz olmasına rağmen biyolojik şartlar altında etkisini biyolojik sıvılarda çözünerek göstermektedir [52]. NO, doğada bulunan moleküller arasında moleküler ağırlığı en küçük olan moleküllerden birisidir. NO'nun molekül ağırlığının küçük, lipofilik yapıda ve yüksüz olması reseptörlere bağımlı olmadan membranlardan kolayca diffüze olmasını sağlamaktadır [53]. NO; diğer serbest radikaller gibi çok kısa yarılanma süresine sahip olup, birkaç saniye içinde daha kararlı yapıda olan nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) oksitlenir. Biyolojik sıvılardaki NO_2^- ve NO_3^- *in vivo* ve *in vitro* olarak ölçülebilir ve bu da NO üretiminin göstergesi olarak kullanılmaktadır [54]. ROT'lar gibi RNOT'lar da çoklu biyolojik etkilere sebep olan, daha kararlı türlerin şekillenmesi için biyolojik olarak oluşan serbest radikallerin etkileşiminden ortaya çıkmaktadır. Biyolojik sistemlerde bütün RNOT'ların öncül kaynağı NO'dur [46].

Düşük konsantrasyondaki NO; hücre içi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu azaltabilir, ancak NO'nun yüksek konsantrasyonu sonucu peroksinitritin şekillenmesi yoluyla oksidatif hasar artabilir. Peroksinitrit ve onun radikal türevleri serbest tiyollerle okside edebilir, lipid peroksidasyonunu ve protein hasarını ilerletebilir. ONOO⁻ tiyollerle reaksiyona girerek S-Nitrosotiyollerin şekillenmesini sağlar, böylece damar gevşemesi ve trombosit agregasyonunun inhibisyonu gibi etkileri uyarır. Bu reaksiyon NO'nun oksidatif stresin etkisini hafifletmesini sağlayarak hücre için koruyucu bir yol olarak kullanılabilir [64]. NO, oksidatif stresin etkisini oksidanları temizleyerek, peroksidaz reaksiyonunu engelleyerek ve süperoksit tarafından oluşturulan redükleyici ajanları temizleyerek azaltabilir [63].

PAH'ların metabolize olmaları sırasında oluşan ROT'lar hücrel koşullarda ciddi miktar ve çeşitlilikte radikal üretilmesine neden olmaktadır. Radikal üretimi

organizmaya zarar verici boyutlara ulaştığında birçok patolojik durum ortaya çıkmaktadır [27]. AdM'nin 1993 yılında keşfinden sonra yapılan çalışmalarda çok fonksiyonlu bir peptid olduğunun ortaya çıkarılmasının ardından AdM ile ilgili çalışmaların sayısı artmıştır. AdM'nin, çeşitli patolojik durumlarda koruyucu ve telafi edici özellik gösterdiği son yıllarda yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Son yıllarda AdM ve NO'nun oksidatif şartlardaki etkileri ile ilgili çalışmalar da literatürde yer almıştır (91-97).

Bu çalışmada karsinojenik bir kimyasal madde olduğu bilinen B(a)P ve birçok patolojik durumda farklı etkiler gösteren, peptid bir hormon olan AdM uygulamasına bağlı olarak; antioksidan enzim seviyelerindeki, lipid peroksidasyonundaki, total glutasyon seviyesindeki, NO ve AdM seviyelerindeki değişikliklerin ve B(a)P'in olası histopatolojik etkileriyle AdM arasındaki etkileşiminin araştırılması amaçlanmıştır.

Deney gruplarındaki hayvanlarda ölçülen parametrelerde kontrol ve yağ uygulanan gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemsiz düzeyde bulunmuştur.

AdM uygulama grubundaki hayvanların kalp dokularında ölçülen MDA seviyesindeki artış kontrol ve yağ gruplarından istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$). B(a)P uygulama grubundaki hayvanların kalp dokularındaki MDA seviyeleri kontrol, yağ ve AdM uygulama gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). B(a)P+AdM uygulama grubu hayvanların kalp dokularındaki MDA seviyesi ise AdM ve B(a)P uygulama gruplarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmıştır ($p<0.05$).

Böbrek dokusunda B(a)P+AdM uygulama grubundaki hayvanlarda ölçülen MDA seviyelerindeki azalış, B(a)P uygulama grubuna göre önemli iken diğer gruplarda istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır ($p<0.05$).

Karaciğer dokusunda MDA seviyesindeki değişimler değerlendirildiğinde gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemsizdir.

Akciğer dokusunda MDA seviyesindeki değişimler incelendiğinde, AdM ve B(a)P+AdM uygulama gruplarındaki artış kontrol ve yağ gruplarına göre önemli düzeydedir ($p<0.05$). Bununla birlikte B(a)P+AdM uygulama grubundaki artış B(a)P uygulama grubu ile karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$).

Elde ettiğimiz sonuçlar diğer araştırmacıların yaptıkları çalışmaların sonuçları ile karşılaştırıldığında; K.B. Kim vd. [18] 20 mg i.p. olarak B(a)P uygulamalarının ilk 12. saatte MDA seviyelerinin değişimi üzerine istatistiksel olarak önemli bir etki yapmadığı ancak 12. saatten sonra lipid peroksidasyonunu arttırdığını bildirmişlerdir,

Badary ve arkadaşları [82] yine i.p. yolla B(a)P uygulamasının karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonunu istatistiksel olarak önemli düzeyde arttırdığını ancak akciğer ve mide dokularında istatistiksel olarak önemli bir değişimin olmadığını rapor etmişlerdir. Selvendiran [83], Pan [84], Samart [85] ve Saunders [86] yaptıkları çalışmalarda farklı dozlardaki ve farklı canlılara uygulanan B(a)P'nin lipid peroksidasyonunu arttırdığını ileri sürmüşlerdir. Park vd. [87] 0.1-1-4-10 μ M B(a)P uygulamasının insan hepatoma hücrelerindeki MDA seviyelerini incelemişler ve sadece 1 μ M B(a)P uygulamasının MDA seviyesini istatistiksel olarak önemli düzeyde arttırdığını rapor etmişlerdir. Wang ve arkadaşları [89] yaptıkları çalışmada farklı dozlarda i.p. olarak B(a)P uygulamasının, çalıştıkları balık türünde, MDA seviyesini istatistiksel olarak önemli düzeyde değiştirmedikini bildirmişlerdir.

Tarafımızdan yapılan çalışmada elde edilen MDA seviyeleri incelendiğinde B(a)P uygulamasına bağlı olarak kalp dokusunda lipid peroksidasyonun arttığı ancak diğer dokularda istatistiksel olarak önemli bir artışın olmadığı belirlenmiştir. Yukarıda belirtildiği gibi literatürde B(a)P uygulamasına bağlı olarak MDA seviyelerindeki değişimler farklılıklar göstermektedir. Yaptığımız çalışma bu bakımdan K.B. Kim [18], Badary [82] Selvendiran [83], Pan [84], Samart [85], Saunders [86], Park vd. [87] ve Wang'ın [89] yaptıkları çalışmalar ile uyum göstermektedir.

Kalp dokusu SOD enzim aktivitesi bakımından değerlendirildiğinde B(a)P uygulama grubunda kontrol, yağ ve AdM gruplarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde bir azalış, ayrıca B(a)P+AdM uygulama grubunda B(a)P uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir artış kaydedilmiştir ($p<0.05$).

Böbrek dokusunda AdM uygulama grubundaki SOD enzim aktivitesindeki azalma kontrol ve yağ gruplarına göre istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$). Yine böbrek dokusunda, SOD enzim aktivitesi B(a)P ve B(a)P+AdM uygulama gruplarında AdM uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artmıştır ($p<0.05$).

Karaciğer dokusundaki B(a)P uygulama grubundaki SOD enzim aktivitesindeki azalışın kontrol, yağ ve AdM uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemli olduğu ve B(a)P+AdM uygulama grubunda kontrol ve AdM uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir artış olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).

Akciğer dokusunda, AdM uygulama grubundaki ölçülen SOD enzim aktivitesi sonuçlarımızda kontrol grubuna göre önemli bir artış gözlenirken B(a)P uygulama grubunda AdM uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir azalmanın olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Akciğer dokusunun B(a)P+AdM uygulama grubunda ise

kontrol ve B(a)P uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir artış vardır ($p<0.05$).

Selvendiran vd. [83] farelere B(a)P'ın oral yolla uygulanmasıyla meydana gelen akciğer kanserinde, Samart ve arkadaşları [85] farelere subkutan yolla uygulanan B(a)P'ın karaciğer ve akciğer dokularında ve Saunders vd. [86] sıçanlara gavaj yolu ile B(a)P uygulamasının farelerin beyin dokusunda SOD enzim aktivitesinin azalttığını bildirmişlerdir. K.B. Kim ve arkadaşları [80] yaptıkları çalışmada oral yolla B(a)P uygulamasının karaciğer dokusundaki SOD enzim aktivitesinin uygulamadan 6 saat sonra önemli derecede azalttığını ve 24 saat sonra kontrol gruplarına göre SOD enzim aktivitesinde artma olduğunu, böbrek dokusunda 72. saate kadar SOD aktivitesinde azalma olduğunu ve 72. saatten sonra SOD aktivitesinin arttığını, akciğer dokusundaki SOD enzim aktivitesinde ise önemli bir değişikliğin olmadığını bildirmişlerdir. H.S. Kim vd. [18] i.p. olarak B(a)P uygulamasının SOD aktivitesini 6 saat sonra gruplarına göre eritrositlerde istatistiksel olarak önemli derecede arttığını 24. saatte en yüksek seviyeye ulaştığını ve 96. saatte kontrol seviyesine düştüğünü göstermişlerdir. Badary ve arkadaşları [82] i.p. yolla B(a)P uygulamasının karaciğer, akciğer ve mide dokularında SOD enzim aktivitesinin değişmediğini rapor etmişlerdir. Pan vd. bir deniz canlısında yaptıkları çalışmada [84] 0.5 µg/L ve 1.0 µg/L olan konsantrasyonlarda SOD aktivitesinin kontrole göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğunu 10 µg/L ve 50 µg/L ise başlangıçta arttığını ancak daha sonra kontrolden daha düşük seviyeye azaldığını bildirmişlerdir. Jifa ve arkadaşlarının bir balık türünde yaptıkları çalışmada [88] SOD enzim aktivitesinin 2-20 µg/L dozda ve 6, 12, 18 günlük uygulama gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı bildirilmiştir.

Kalp ve karaciğer dokularındaki B(a)P uygulama grubundaki hayvanlarda ölçülen SOD enzim aktivitesindeki azalış Selvendiran [83], Samart [85] ve Saunders'ın [86] yaptıkları çalışmalar ile; böbrek ve akciğer dokularında ise kontrole göre önemli bir değişikliğin olmamasından dolayı H.S. Kim [18], K.B. Kim [80] ve Badary'nin [82] yaptıkları çalışmalar ile uyum göstermektedir.

Kalp dokusunda AdM, B(a)P ve B(a)P+AdM uygulama grupları arasındaki katalaz enzim aktivitesindeki artış kontrol ve yağ uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Yine kalp dokusundaki B(a)P ve B(a)P+AdM uygulama gruplarındaki azalış AdM grubundan istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$).

Böbrek dokusundaki kontrol ve yağ gruplarına göre CAT aktivitesindeki azalış AdM, B(a)P ve B(a)P+AdM uygulama gruplarından istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmuştur ($p<0.05$).

Karaciğer dokusunda B(a)P uygulama grubu CAT enzim aktivitesindeki azalış kontrol, yağ ve AdM uygulama gruplarından istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$). Ayrıca B(a)P+AdM grubundaki artış B(a)P uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeydedir ($p<0.05$).

Akciğer dokusundaki AdM uygulama grubundaki CAT enzim aktivitesindeki artış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$). Akciğer dokusunda B(a)P uygulama grubunda istatistiksel olarak önemli bir azalma saptanırken, B(a)P+AdM uygulama grubunda B(a)P uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir artış kaydedilmiştir ($p<0.05$).

Selvendiran vd. [83], Samart vd. [85] ve Saunders vd. [86] B(a)P uygulamasının CAT enzim aktivitesinin azalttığını bildirmişlerdir buna karşın, Park vd. [87] 0.1-1-4-10 μ M B(a)P uygulamasının insan hepatoma hücrelerinde CAT enzim aktivitesini arttırdığını rapor etmişlerdir. Jifa ve arkadaşlarının [88] yaptıkları çalışmanın sonunda balık karaciğer dokusunda CAT enzim aktivitesinin B(a)P uygulamasıyla değişmediğini bildirilmiştir. K.B. Kim vd. yaptıkları çalışmada [80] sıçan karaciğer dokusunda CAT enzim aktivitesinin uygulamadan 6 saat sonra önemli derecede düştüğünü ancak hemen kontrol seviyesine geri yükseldiğini, böbrek dokusundaki CAT enzim aktivitesi uygulamadan 12 saat sonra azaldığı ve 96. saatte kontrole yakın bir seviyeye yükseldiği rapor ederken, akciğer dokusundaki CAT enzim aktivitesinde önemli bir değişikliğin olmadığını göstermişlerdir. H.S. Kim vd. [18] i.p. olarak B(a)P uygulamasının CAT aktivitesini 6 saat sonra kontrol gruplarına göre eritrositlerde istatistiksel olarak önemli derecede arttığını, 24. saatte en yüksek seviyeye ulaştığını ve 96. saatte kontrol seviyesine düştüğünü göstermişlerdir.

Kalp dokusundaki CAT enzim aktivitesindeki artma Park [87] ve H.S. Kim'in [18] yaptıkları çalışmalar ile böbrek, karaciğer ve akciğer dokularındaki azalma ise K.B. Kim [80], Selvendiran [83], Samart [85] ve Saunders'in [86] yaptıkları çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Jifa vd.'nin [88] yaptıkları çalışmada kontrole göre önemli bir değişikliğin olmaması bakımından sonuçlarımız ile uyumlu değildir.

GSH-Px aktivitesindeki değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde kalp dokusunda B(a)P uygulama grubundaki artış önemli derecede değilken, B(a)P+AdM

uygulama grubundaki artışın kontrol, yağ ve AdM uygulama gruplarına göre önemli derecede olduğu saptanmıştır ($p<0.05$).

Böbrek dokusunda GSH-Px enzim aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir değişikliğe rastlanmamıştır.

Karaciğer dokusu GSH-Px enzim aktivitesi bakımından değerlendirildiğinde B(a)P+AdM uygulama grubunda AdM ve B(a)P uygulama gruplarına göre istatistiksel olarak önemli bir azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Akciğer dokusundaki GSH-Px enzim aktivitesinde AdM grubunda yağ grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir artışın olduğu gözlenirken, B(a)P ve B(a)P+AdM uygulama gruplarında kontrol ve AdM gruplarına göre istatistiksel olarak önemli bir azalmanın olduğu kaydedilmiştir ($p<0.05$).

Hanachi vd. [81] i.p. yolla B(a)P uygulanan farelerinin karaciğer ve böbrek dokularındaki GSH-Px aktivitesinin karaciğer dokusunda 4 haftalık uygulama grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede arttığını, ancak böbrek dokusunda istatistiksel olarak önemli bir değişikliğin olmadığını rapor etmişlerdir. Selvendiren vd. [83] ve Saunders vd. [86] çalışmalarının sonucunda GSH-Px aktivitesinin istatistiksel olarak önemli bir azalmanın olduğunu rapor etmişlerdir. Pan vd. [84] B(a)P uygulamasının GSH-Px aktivitesini tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak önemli derecede arttırdığını bildirmişlerdir. Jifa vd. [88] 6, 12, 18 günlük 2-20 µg/L B(a)P'a maruz kalan bir balık türünde yaptıkları çalışmada GSH-Px enzim aktivitesinde 6. gün 2 µg/L uygulama grubundaki artışın istatistiksel olarak önemsiz olduğu ancak diğer uygulama gruplarındaki değişikliklerin istatistiksel olarak önemli olduğu bildirilmiştir. Wang vd. [89] 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg ve 10 mg/kg dozlarda tek i.p. enjeksiyonla B(a)P uygulamasına bağlı olarak GSH-Px enzim aktivitesinin 0,5 ve 1 mg/kg dozlardaki artışların istatistiksel olarak önemli iken 5 ve 10 mg/kg dozlardaki farkların önemsiz olduğunu bildirmişlerdir.

B(a)P uygulama grubu hayvanlarda yaptığımız GSH-Px enzim aktivitesi ölçümleri; akciğer dokusundaki GSH-Px enzim aktivitesinin azalmasından dolayı Selvendiren [83] ve Saunders'ın [86] çalışmaları ile kalp, böbrek ve karaciğer dokularında ölçülen GSH-Px enzim aktivitelerinde istatistiksel olarak bir farkın olmamasından dolayı ise Hanachi [81] ve kısmen de Jifa [88] ve Wang'ın [89] yaptıkları çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Pan vd.'nin [84] yaptıkları çalışma ise yaptığımız çalışmayı desteklememektedir.

Kalp dokusunda AdM uygulama grubunda ölçülen toplam GSH seviyesindeki artış kontrol ve yağ gruplarından istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$). Yine kalp dokusunda B(a)P ve B(a)P+AdM uygulama gruplarındaki değişimler kontrol, yağ gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bir artış AdM uygulama grubuyla karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak önemli bir azalış olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).

Uygulamalara bağlı olarak böbrek dokusunda toplam GSH seviyeleri bakımından değerlendirildiğinde gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli değildir.

Karaciğer dokusunda toplam GSH seviyeleri bakımından sadece B(a)P+AdM uygulama grubundaki artış B(a)P uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeydedir ($p<0.05$).

Uygulamalara bağlı olarak akciğer dokuları toplam GSH seviyeleri bakımından değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır.

Selvendiren vd. [83] B(a)P uygulamasına bağlı olarak GSH düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir azalmanın olduğunu rapor etmişlerdir. Jifa vd. [88] farklı doz ve günlerde B(a)P uygulamasının toplam GSH miktarında 18. günlük uygulama gruplarındaki artışın istatistiksel olarak önemli olduğunu diğer uygulama gruplarındaki değişikliklerin önemsiz olduğu rapor edilmiştir. Wang vd. [89] tarafından yapılan çalışmada B(a)P uygulamasının GSH seviyesinde istatistiksel olarak önemli düzeyde artışa neden olduğu rapor edilmiştir.

Sonuçlarımız literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında Jifa vd. [88] ve Wang vd.'nin [89] yaptıkları çalışmalar ile paralellik gösterirken Selvendiren vd.'nin [83] yaptığı çalışma ile uyuşmamaktadır.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde farklı dozlarda ve sürelerde B(a)P uygulamasının canlıdan canlıya ve aynı canlının farklı dokularında MDA seviyelerini, SOD, CAT, GSH-Px enzim aktivitelerini ve toplam GSH miktarlarını farklı olarak etkilediği görülebilmektedir. Bu nedenle yaptığımız çalışmada kalp, böbrek karaciğer ve akciğer dokularında farklı sonuçların nedeninin uyguladığımız B(a)P dozuna ve süresine bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Yaptığımız histolojik incelemelerde kalp dokusunda AdM ve B(a)P uygulamalarının kalp dokusunda hasara neden olduğu, ancak B(a)P+AdM'nin birlikte uygulama grubunda kalp dokusunun genel olarak normal yapıda görüldüğü tespit edilmiştir. Kalp dokusundaki MDA seviyeleri incelendiğinde B(a)P+AdM

uygulamasının lipid peroksidasyonunu telafi edici etkisinin olduğu görülmüştür. Böbrek dokusundaki histolojik incelemelerimiz böbrek dokusunda önemli derecede bir hasar olmadığını sadece B(a)P uygulama grubunda telafi edilebilir düzeyde bir dejenerasyonun olduğunu göstermektedir. Böbrek dokusundaki MDA seviyelerinde de istatistiksel olarak bir değişiklik gözlenmemiştir, ancak B(a)P uygulama grubunda diğer gruplara göre bir artış vardır. İstatistiksel olarak önemli olmayan bu artış histolojik incelemede telafi edilebilir dejenerasyon olarak değerlendirilebilir. Akciğer dokusundaki histolojik incelemelerimizin sonucunda tüm uygulama gruplarında hasara neden olabilen değişiklikler gözlenmiştir. Akciğer dokusunda ölçülen MDA seviyeleri incelendiğinde AdM ve B(a)P+AdM uygulama gruplarında istatistiksel olarak önemli olan ancak B(a)P uygulama grubunda istatistiksel olarak önemli olmayan bir artış gözlenmiştir. Bu nedenle kalp, böbrek ve akciğer dokularında yaptığımız histolojik incelemelerimiz antioksidan parametrelerdeki sonuçlarımızı desteklemektedir. Buna karşın karaciğer dokusundaki histolojik incelemelerimiz, uygulama gruplarında nekrotik yapıların görülmesine karşın MDA seviyelerinde istatistiksel olarak önemli artışların olmaması bakımında çalışmamızı desteklememektedir. Ancak karaciğer dokusundaki MDA seviyeleri tüm uygulama gruplarında istatistiksel olarak önemli olmasa da artmıştır. Bununla birlikte karaciğer dokusundaki antioksidan savunma sistemine ait diğer parametrelerimiz incelendiğinde B(a)P ve B(a)P+AdM uygulama gruplarında CAT enzim aktivitelerinin azalmış olması ve B(a)P+AdM uygulama grubunda GSH-Px aktivitesinin de azalmış olması karaciğer dokusunda oksidatif stresin etkili olduğunu göstermektedir.

Shimosawa vd. [91] oksidatif stres ile indüklenen değişimleri araştırmışlardır. Bu çalışma ile araştırmacılar AdM'nin oksidatif stresi engellediğini rapor etmişlerdir. Yoshimoto vd. [92] çalışmalarının sonucunda AdM'nin hücre içi ROT oluşumunu inhibe ettiğini ve AdM'nin anjiotensin-II ile indüklenen vasküler hasarda antioksidan olarak koruyucu bir rol aldığını bildirmişlerdir. Matsui vd. [93] tarafından yapılan çalışmada hipoksia ile indüklenen vasküler hasar modelinde AdM'nin koruyucu bir peptid olduğunu ve bu koruyucu özelliğini ROT oluşumunu baskılama ile yapabileceğini bildirmişlerdir. Cao vd. [94] çalışmalarının sonunda AdM'nin endotelial fonksiyonları geliştiren önemli antioksidan özelliklere sahip olduğunu bildirilmiştir. Chen vd. [95] yaptıkları çalışmada AdM uygulamasının sıçan serebral endotelial hücre kültüründe oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Fujita vd. [96] tarafından hiperozmotik tuz ile indüklenen ROT

üretiminin AdM knock-out farelerin izole hipotalamuslarında yabancı tiptekilere göre istatistiksel olarak yüksek olduğu bildirilmiştir.

Tarafımızca yapılan çalışmada AdM uygulamasına bağlı olarak böbrek dokusunda SOD ve CAT enzim aktivitelerinin azaldığı saptanmıştır. Ancak, kalp ve akciğer dokularında MDA seviyelerinin artmış olması ve aynı zamanda kalp dokusunda CAT enzim aktivitesinin ve toplam GSH seviyelerinin artması, akciğer dokusundaki SOD, CAT ve GSH-Px enzim seviyelerinin de artmasından dolayı AdM'nin kalp ve akciğer dokuların artan MDA seviyesini telafi etmek için enzim aktivitelerini arttırmış olabileceğini akla getirmektedir. Bu bağlamda kalp, böbrek ve akciğer dokularında AdM'nin koruyucu etkisinin olabileceğini söylenilebilir ve bu açıdan yaptığımız çalışma literatürdeki çalışmalar ile paralellik göstermektedir [91-96].

Çalışmamızda kontrol grupları ile karşılaştırıldığında B(a)P ve AdM'nin ayrı ayrı uygulamalarının oksidatif strese neden olarak kalp dokusunda oksidatif hasarı indükleyici etki göstermişken B(a)P ve AdM'nin birlikte uygulanması kalp dokusunda lipid peroksidasyonunun azalmasına, SOD, CAT, GSH-Px enzim aktivitelerinde ve toplam GSH seviyesinde artmasına neden olmuştur. Bu sonuçlar bize kalp dokusunda B(a)P+AdM uygulamasının reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hasarı engellemiş olabileceğini göstermektedir. Yani B(a)P ve AdM'nin birlikte uygulanması ayrı ayrı uygulamanın aksine kalp dokusu için telafi edici bir etki göstermiştir. Böbrek dokusundaki MDA seviyeleri incelendiğinde kalp dokusundaki telafi edici etki böbrek dokusunda da görülebilir. Zira; B(a)P uygulama grubuna göre B(a)P+AdM uygulama grubundaki MDA seviyelerindeki azalış lipid peroksidasyondaki azalışı göstermektedir. Akciğer dokusunda, B(a)P ve AdM'nin hem ayrı ayrı uygulamaları hem de kombine uygulaması oksidatif stresten kaynaklanan hasarı tetiklemiştir. Hatta B(a)P ve AdM'nin kombine uygulamasının hem lipid peroksidasyonda artışa yol açtığından bu hasarı daha da arttırıcı yönde etki yaptığı söylenebilir. Karaciğer dokusunda ise B(a)P uygulaması SOD ve CAT enzim aktivitelerini kontrol gruplarına göre azaltırken, B(a)P+AdM uygulaması SOD enzim aktivitesini sadece kontrole göre CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerini ise B(a)P uygulama grubuna göre azaltmıştır. Ayrıca Toplam GSH seviyesinin B(a)P+AdM uygulama grubunda B(a)P uygulama grubuna göre artmıştır.

AdM uygulama grubu hayvanların kalp dokularındaki NO konsantrasyonundaki artış kontrol ve yağ grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$). B(a)P uygulama grubunda NO konsantrasyonu kontrol ve yağ gruplarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artarken AdM uygulama grubuna göre istatistiksel

olarak azalmıştır ($p<0.05$). B(a)P+AdM uygulama grubundaki hayvanların kalp dokularındaki NO konsantrasyonu AdM ve B(a)P uygulama gruplarına göre istatistiksel olarak azalmıştır ($p<0.05$).

Böbrek dokusundaki NO konsantrasyonları AdM, B(a)P ve B(a)P+AdM uygulama gruplarındaki azalma kontrol ve yağ gruplarına göre istatistiksel olarak önemli olarak bulunmuştur ($p<0.05$).

Karaciğer ve akciğer dokularında NO ölçülebilmiştir.

Bakan vd. [98] yaptıkları bir çalışmada mide kanseri olan insanların serumlarında MDA ve NO seviyelerini araştırmışlar ve bu iki parametre arasında pozitif korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Bakan vd. [99] yaptıkları bir başka çalışmada lenfotik lösemili hastaların serumlarında antioksidan enzim ve NO seviyelerini çalışmışlardır. Araştırmacılar serum NO seviyelerinin lösemi hastalarında kontrole göre istatistiksel olarak yüksek olduğunu ve bu durumun uzun süreli dönemde DNA'da hasara yol açarak mutasyon ve kansere neden olabileceğini bildirmişlerdir. Suresh vd. [100] otomobil emisyonuna maruz kalan trafik polislerinin kontrol grubuna göre yüksek MDA seviyelerine karşın azalan antioksidan enzim aktiviteleri ve NO seviyeleri bildirmişlerdir. Garçon vd. [101] Sprague Dawley sıçanlarının akciğer dokusunda 3'er mg B(a)P ve Fe₂O₃'ün ayrı ayrı ve birlikte intratrakeal damlatma uygulanması sonucu oksidatif etkilerini çalışmışlardır. NO seviyelerinin uygulama gruplarında ve özellikle de kombine uygulama olan grupta NO seviyelerinde daha da yükseldiğini bildirmişlerdir. Herken vd. [105] hastaların serumlarındaki SOD enzim aktivitesi ve NO konsantrasyonunu ölçmüşler ve çalışmalarının sonunda SOD enzim aktivitesinin azaldığını, NO konsantrasyonunun ise arttığını ancak bu değişikliklerin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli olmadıklarını rapor etmişlerdir. Fargali vd. [115] yapmış oldukları çalışmada perfüze edilmiş sıçan hepatosit hücrelerinde oksidatif stres hasarında NO'nun olası ikili rolleri araştırılmıştır. Bu çalışmada hepatositlerde LPS ile indüklenen NO salınımı ile lipid peroksidasyonu arasında negatif korelasyon elde edilmiştir. Farghali vd'nin yapmış oldukları çalışmada normal, anoksia/reoksijenizasyon şartlarında karaciğerde NO seviyeleri ölçülebilmiştir. Buna karşın, LPS uygulamasına bağlı olarak karaciğer hücrelerinde NO seviyeleri ölçülebilmiştir.

Tarafımızca yapılan çalışmada kalp dokusunda artan oksidatif hasara karşı NO seviyelerinin de arttığı tespit edilmiştir. Artan bu NO üretiminin kontrol grupları ile karşılaştırıldığında B(a)P ve AdM'nin ayrı ayrı ve birlikte uygulamalarındaki

antioksidan savunma sistemindeki etkileri ile paralellik göstermektedir. Böbrek dokusunda yapılan uygulamalara bağlı olarak kontrol grupları ile karşılaştırıldığında lipid peroksidasyonunda B(a)P+AdM uygulama grubundaki azalış hariç diğer uygulama gruplarında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır, bununla birlikte böbrek dokusundaki CAT aktivitesi kontrol grupları ile karşılaştırıldığında AdM, B(a)P ve AdM+B(a)P uygulama gruplarında azalmıştır. Böbrek dokusundaki NO konsantrasyonları da azalmıştır. Böbrek dokusunda lipid peroksidasyonundan kaynaklanan bir hasarın olmaması ve aynı zamanda NO konsantrasyonlarında istatistiksel bir azalmanın olması bu dokuda NO'dan kaynaklanan bir negatif etkinin olmadığını düşündürmektedir. Karaciğer ve akciğer dokularında NO konsantrasyonlarının ölçülememesinin nedeninin bu dokularda NO'dan kaynaklanan oksidatif hasarın olabilmesine karşın NO'nun son ürünü olarak nitrit veya nitratın oluşmamasından dolayı NO konsantrasyonlarının ölçülememiş olabileceğini düşündürmektedir. Yukarıda çalışmaları kısaca özetlenen araştırmacıların sonuçlarında görüldüğü gibi bazı patolojik hastalıklarında neden olabileceği oksidatif stresin artması durumunda NO konsantrasyonlarının artması söz konusu olabileceğinden çalışmamız literatürdeki veriler ile uyum göstermektedir [98-101, 105, 115].

Oksidatif hücre hasarının çeşitli hücrelerdeki patofizyolojik koşullarda NO'nun koruyucu veya zararlı etkileri tartışmalıdır. NO'nun süperoksit ile reaksiyona girip peroksinitrit oluşturması nedeni ile NO'nun toksik bir metabolit veya ürün olduğu ifade edilmektedir. Çünkü peroksinitrit daha sonra çok daha reaktif olan hidroksil radikaline ayrılmakta ve sonuçta protein nitrasyonunu teşvik etmektedir. Ayrıca NO, reaktif nitrojen oksit türlerini de oluşturabilmektedir. Güçlü nitroze edici ve oksidatif özellikleri olan RNOT'lar oksijen varlığında, oksidatif stresin belirli patofizyolojik durumlarında sitotoksik reaksiyonlara katkıda bulunabilirler. Ancak bu duruma zıt olarak NO'nun oksidatif hasarda koruyucu fonksiyonu olduğunu ifade eden çalışmalarda mevcuttur. Örneğin NO, aktive olmuş insan lökositleri tarafından oluşturulan süperoksit radikallerini inaktive etmektedir.

AdM'nin vazoaktif bir peptid olarak tanımlanmasından sonra bu peptidin multifonksiyonlu özellikler göstermesi nedeniyle bilim insanlarının ilgisini çekmiş ve oldukça popüler bir çalışma konusu olmuştur AdM hakkındaki araştırmalar günümüzde de hızla devam etmektedir.

Kalp dokusunda AdM uygulama grubundaki AdM seviyesinde azalma olduğu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak önemsiz olduğu, B(a)P ve B(a)P+AdM

uygulama gruplarındaki adrenomedullin seviyelerindeki azalışın ise kontrol ve yağ gruplarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

Böbrek dokusundaki adrenomedullin seviyelerindeki değişimler istatistiksel olarak önemsizdir.

Karaciğer dokusundaki adrenomedullin seviyesi AdM, B(a)P ve B(a)P+AdM uygulama gruplarında istatistiksel olarak önemli düzeyde artmıştır ($p<0.05$).

AdM seviyelerinin ölçümünden elde edilen sonuçlara göre akciğer dokusunda AdM ve B(a)P uygulama gruplarındaki artış, kontrol ve yağ gruplarına göre istatistiksel olarak önemli değildir. Buna karşın B(a)P+AdM uygulama grubundaki artış, hem kontrol ve yağ grubundan hem de AdM ve B(a)P uygulama gruplarından istatistiksel olarak önemli düzeydedir ($p<0.05$).

B(a)P aynı zamanda oksidatif bir stresör olarak bilinmektedir [115]. Bu açıdan değerlendirildiğinde, çeşitli stres şartlarında canlılardaki AdM seviyelerinin değişimi ile ilgili literatürde çalışmalar mevcuttur.

Farklı stres koşullarına bağlı olarak AdM düzeylerinin değiştiği pek çok sayıda çalışma yapılmıştır. L.Y. Al-Ayadhi [117] tıp fakültesi öğrencilerinde akademik stresin psikolojik stres modeli olarak kullanıldığı bir çalışmada nörohormanal değişimleri araştırmıştır. Çalışma sonucunda araştırmacı öğrencilerin final sınavları döneminde plazma AdM seviyelerinin, sınav öncesi döneme göre önemli seviyede yükseldiğini rapor etmiştir. Fujioka [118] yapmış olduğu çalışmada ameliyat öncesi ve sonrası plazma AdM seviyelerini araştırmıştır. Araştırmacı tarafından cerrahi stres şartlarında insanlarda plazma AdM seviyelerinin ameliyat öncesine göre önemli derecede arttığı rapor edilmiştir. Shan ve Krukoff [119] farklı fizyolojik stres modelleri kullanarak yaptıkları çalışmada sıçanların merkezi sinir sisteminde proadrenomedullin mRNA dağılımını araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda stres şartları altında proadrenomedullin mRNA'sının geniş bir dağılım gösterdiği bildirilmiştir. Boldt vd. [120] yaptıkları çalışmada normal doğum ve sezeryan ile doğan bebeklerde yapılan çalışmada yeni doğanlarda doğum stresinin AdM seviyeleri üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar normal doğum ile doğan bebeklerde AdM seviyelerinin sezeryan ile doğan bebeklere oranla önemli oranda yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Çevresel bir kirleticisi ve stres faktörü olduğu düşünülen B(a)P uygulamasına bağlı olarak tarafımızca yapılan çalışmada kalp dokusunda B(a)P ve B(a)P+AdM uygulamalarında AdM seviyelerinin düşmüş olması literatürde strese bağlı olarak AdM seviyelerinin arttığı bulguları ile uyumsuz iken, karaciğer dokusundaki B(a)P ve

B(a)P+AdM uygulama gruplarında ve akciğer dokusundaki B(a)P+AdM uygulama grubunda AdM seviyelerinin artmış olması literatür ile uyumludur [117-120]. Böbrek dokusunda ise AdM düzeyleri B(a)P ve B(a)P+AdM uygulama gruplarında istatistiksel açıdan bir değişikliğin olmadığı gözlenmemiştir. Bununla birlikte AdM düzeyleri kontrol grubuna göre B(a)P uygulama grubunda istatistiksel olarak önemli olmasa da artış, B(a)P+AdM uygulama grubunda ise azalış göstermiştir.

Organizmalar iç ve dış kaynaklı uyarılara tepki göstererek yaşamlarını sürdürmeye çalışırlar. Bu uyarılar organizmayı olumsuz yönde etkileyecek düzeye ulaştığında, uyarıların olumsuz etkilerini gidermek için organizmalar büyük çaba sarf ederler. Bu durum genellikle strese verilen cevabı açıklamaktadır. Organizmanın yaşamsal faaliyetlerini etkileyen bu faktörler stres faktörü olarak değerlendirilirler. Toksik özellikteki kimyasal maddeler de organizmalar için bir stres faktörüdürler. Hayvansal organizmalarda stres faktörlerine karşı kontrol mekanizmasının; hormonal ve sinirsel yolla sağlandığı ve birbirlerini dengeleyen sistemlerin var olduğu bilinmektedir. Organizmalar yaşamları boyunca pek çok kimyasal maddeye maruz kalmakta ve bu kimyasalların etkisinin önlenmesi için organizmadaki biyolojik sistemler etkili olmaya çalışmaktadırlar. Bu kimyasal maddelerden biriside benzo(a)piren'dir. Benzo(a)piren'in metabolize olmasıyla şekillenen diol epoksitleri daha önce açıklandığı gibi karsinojenik etkilere sahiptirler. Organizmalarda karsinojenik etkilerin giderilmesi için çok sayıda koruyucu sistemin devreye girmesi de beklenir. Adrenomedullin de hem koruyucu hem de anjiogenik özellikleri nedeniyle çok fonksiyonlu bir peptid hormondur. Tarafımızdan yapılan çalışmada canlıların çevrelerinde sıkça karşılaşılabileceği pek çok kimyasaldan birisi olan benzo(a)piren ile son 15 yılda oldukça ilgi çeken adrenomedullin arasındaki ilişki hem biyokimyasal hem de histolojik açıdan değerlendirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, AdM'nin belirli ölçülerde koruyucu etkiye sahip olduğu söylenebilir. Ancak; benzo(a)piren ve adrenomedullin arasındaki ilişkinin, dolayısıyla karsinojenik maddeler ve adrenomedullin arasındaki etkileşimin daha detaylı olarak ortaya konulabilmesi için daha sonra yapılacak çalışmalarda; adrenomedullin'in uygulama düzeyi, uygulama süresi, adrenomedullin uygulamasından etkilenebilecek dokularının çeşitliği ve çalışılan biyokimyasal faktörler arttırılarak adrenomedullinin hem stres hem de karsinojenik etkiler karşısındaki rolünün daha da aydınlatılacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] <http://www.aof.edu.tr/kitap/IOLTP/2282/unite19.pdf> (Kanserojenik, Mutajenik ve Teratojenik Kimyasallar)
- [2] web.ead.anl.gov/ecorisk/related/documents/Final_BG_Sediment_Guidance.pdf (Guidance For Environmental Background Analysis)
- [3] K. Hylland, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Ecotoxicology in Marine Ecosystems*, **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Part A, 69:1-2 (2006) 109-123.
- [4] http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/en/gdwq3_12.pdf (Chemical fact sheets)
- [5] <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69-c1.pdf> (1. Public Health Statement)
- [6] <http://www.hesiglobal.org/NR/rdonlyres/16C681B8-61FC-4890-A8F8-DCB1E2CFB8AE/0/PAHsCaseStudy9164.pdf>
- [7] <http://www.npi.gov.au/database/substance-info/profiles/74.html> (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)
- [8] <http://www.gr.nl/pdf.php?ID=1335&p=1> (BaP and PAH from coal-derived sources)
- [9] USEPA. Procedures for the Derivation of Equilibrium partitioning Sediment Benchmarks (ESBs) for the Protection of Benthic Organisms: PAH Mixtures. EPA-600-R-02-013. Office of Research and Development, Washington, DC, USA, 2003, p. 1-175.
- [10] B.J.F. Pitts and J.N. Pitts, *Tropospheric Air Pollution: Ozone, Airborne Toxics, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, and Particles*, **Science**, 276:5315 (1997) 1045-1051.
- [11] R.A. Kanaly and S. Harayama, *Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria*, **Journal of Bacteriology**, 182:8 (2000) 2059-2067.
- [12] <http://www.rmrc.unh.edu/Conference/Oct2005/Review%20of%20PAHs%20in%20asphaltfinal6.pdf> (Agency for Toxic Substance and Disease Registry, 1995. Toxicology Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Services)
- [13] www.city.toronto.on.ca/health/pdf/cr_appendix_b_pah.pdf (Benzo[a]pyrene and Other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)
- [14] S. Reynaud and P. Deschaux *The Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on the Immune System of Fish: A Review*, **Aquatic Toxicology**, 77:2 (2006) 229-238.
- [15] <http://en.wikipedia.org/wiki/Benzopyrene> (Benzopyrene)
- [16] <http://cira.ornl.gov/documents/Benzoapyrene.pdf> (R.A. Faust, *Toxicology Summary for Benzo[a]pyrene*, Prepared for: Oak Ridge Reservation Environmental Restoration Program, 1994)
- [17] A. Ramesh and M.E. Knuckles, *Dose-dependent benzo(a)pyrene [B(a)P]-DNA adduct levels and persistence in F-344 rats following subchronic dietary exposure to B(a)P*, **Cancer Letters**, 240:2 (2006) 268-278.
- [18] H.S. Kim, S.J. Kwack and B.M. Lee, *Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzymes and Benzo[a]pyrene-quinones in the Blood of Rats Treated with Benzo[a]pyrene*, **Chemico-Biological Interactions**, 127:2 (2000) 139-150.
- [19] S. Naylor, L.S. Gan, B.W. Day, R. Pastorelli, P.L. Skipper and S.R. Tannenbaum, *Benzo[a]pyrene Diol Epoxide Adduct Formation in Mouse and Human Hemoglobin: Physicochemical Basis for Dosimetry*, **Chemical Research in Toxicology**, 3:2 (1990) 111-117.

- [20] R. Serpi, *Mechanism Of Benzo(A)Pyrene-Induced Accumulation Of P53 Tumour Suppressor Protein In Mouse*, **Department of Pharmacology and Toxicology, University of Oulu, OULU**, 2003.
- [21] C.M. Lee, S.Y. Chen, Y.C.G. Lee, C.Y.F. Huang and Y.M.A. Chen, *Benzo[a]pyrene and glicine N-methyltransferase Interactions: Gene expression profiles of the liver detoxification patway*, **Toxicology and Applied Pharmacology**, 214:2 (2006) 126-135.
- [22] H. Rubin *Synergistic Mechanism in Carsinogenesis by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and by Tabacco Smoke: a Bio-Historical Perspective with Updates*, **Carsinogenesis**, 22:12 (2001) 1903-1930.
- [23] A.G. Mendikute, A. Etzeberria, I. Olabarrieta and M. P. Cajaraville, *Oxygen radicals production and actin filament distruption in bivalve haemocytes treated with benzo(a)pyrene*, **Marine Environmental Research**, 54:3-5 (2002) 431-436.
- [24] G. Burçak ve G. Andican, *Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma*, **Cerrahpaşa Tıp Dergisi**, 35 (2004) 159-169.
- [25] N Altan, A.S. Dinçel and C. Koca, *Dibetes Mellitus and Oksidative Stres*, **Turkish Journal of Biochemistry**, 31:2 (2006), 51-56.
- [26] Y. Çiğremiş, *Sigara Tityakilerinde Eritrosit İçi Süperoksit Dismutaz, Katalaz ve Glutatyon Peroksidaz Aktivite Düzeyleri*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Türkiye, 1997.
- [27] J.A. Badway and M.L. Karnovsky, *Active oxygen species and the function of phadocytic leukocytes*, **Annual Review of Biochemistry**, 49 (1980) 695–726.
- [28] K. Kılınç ve A. Kılınç, *Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri*, **Hacettepe Tıp Dergisi**, 33:2 (2002) 110–118.
- [29] İ. Meram ve Ş. Aktaran, *serbest radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri*, **Arşiv**, 11 (2002) 299–304.
- [30] U. Mercan, *Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi*, **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi**, 15:1-2 (2004) 91-96.
- [31] B. Ateş, *“İntestinal İskemi-Reperfüzyon Uygulamalarında Değişik Antioksidanların Koruyucu Etkilerinin Araştırılması”* Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Türkiye, 2001.
- [32] N. Rencüzoğulları, *“Ratlarda Deneyisel Olarak Oluşturulan Kadmiyum Toksikasyonu Üzerine Likopenin Etkilerinin Araştırılması”*, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Türkiye, 2006.
- [33] C. Çavdar, A. Sifil ve T. Çamsarı, *Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma*, **Türk Nefroloji, Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi**, 3:4 (1997) 92-95.
- [34] C. Yazıcı and K. Köse, *Melatonin: The Antioxidant Power Of Darkness*, **Erciyes University Journal of Health Science**, 13:2 (2004) 56-65.
- [35] Y.S. Karafakoğlu, *Oxidative Status in Tobacco Harvesters*, **The Medical Journal of Kocatepe**, 5: 7 (2004) 7-11.
- [36] http://www.genetikbilimi.com/gen/serbest_radikaller.htm (Serbest Radikaller)
- [37] www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.ppt (Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar)
- [38] A. Ersoy and K. Dilek, *Red Blood Cell Membrane Lipid Peroxidation and Changes of Antioxidative Homeostasis in Patients on Chronic Hemoialysis*, **Office Journal of the Turkish Nephrology, Association**, 1 (1999) 1-4.
- [39] G. Çıkım, G. Ozan, F. Gülcü, D. Baykan ve M.F. Gürsu, *Toksik Multinodüler Guatrılı Olgularda Homosistein Düzeyi ve Lipid Peroksidasyonu*, **Fırat Tıp Dergisi**, 9:4 (2004) 116–119.

- [40] L.De.Z. Loeckie, J.H.N. Meerman, J.N.M. Commandeur, and N.P.E. Vermeulen, *Biomarkers of Free Radical Damage Applications in Experimental Animals and in Humans*, **Free Radical Biology and Medicine**, 26:1/2 (1999) 202-226.
- [41] Z. Selamoğlu, “*Sentetik Organoselenyum Bileşiklerinin Antioksidatif Özelliklerinin İncelenmesi*” Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Türkiye, 2005.
- [42] K.M. Üstdal, H. Haspaylan, R. Saraymen and E. Kılıç, *Investigation of Erythrocyte SOD and CAT Levels of Patients with Bipolar Affective Disorder Treated with or Without Lithium*, **Erciyes University Journal of Health Science**, 13(1):16 (2004) 16–20.
- [43] J.M. Mates and F.S. Jimenez, *Antioxidant Enzymes and Their Implications in Pathophysiologic Processes*, **Frontiers in Bioscience**, 4 (1999) 339-345.
- [44] E.N. Grayck, H.B. Suliman and C.A. Piantadosi, *Extracellular Superoxide Dismutase*, **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 37:12 (2005) 2466-2471.
- [45] Y. Tekkes, “*Streptozotosin ile Diabet Oluşturulmuş Farelerde Aspirin ve E Vitaminin Dokularda Lipid Peroksidasyonu Ve Antioksidan Sisteme Etkisinin Araştırılması*”, Yüksek Lisans Tezi, Sütçü İmam Üniversitesi Türkiye, 2006.
- [46] R.P. Patel, J. Andrew, H. Sellak, C.R. White, H. Jo, B.A. Freeman and V.M.D. Usmar, *Biological aspects of reactive nitrogen species*, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**, 1411: 2-3 (1999) 385-400.
- [47] A. Kılınç ve K. Kılınç, *Nitrik Oksit: Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri*, Palme Yayıncılık, Ankara, 2003, 7-8.
- [48] G.Y. Anacak, J.D. Catravas, *Nitric Oxide and the Endothelium: History and Impact on Cardiovascular Diseases*, **Vascular Pharmacology**, 45:5 (2006) 268-276.
- [49] A. Rivero, *Nitric Oxide: an antiparasitic molecule of invertebrate*, **Trends in Parasitology**, 22:5 (2006) 219-225.
- [50] X. Garcia and F. Stein, *Nitric Oxide*, **Seminars in Pediatric Infectious Diseases Journal**, 17:2 (2006) 55-57.
- [51] S.H. Synder and D.S. Bredt, *Biological Roles of Nitric Oxide*, **Scientific American**, 266:5 (1992) 68-71.
- [52] H.K. Kendall, R.I. Marshall and P.M. Bartold, *Nitric Oxide and Tissue Destruction*, **Oral Diseases**, 7:1 (2001) 2-10.
- [53] M.İ. Doğru, “*Yaşlanma ve Soğuk Stresine Bağlı Olarak Sıçan Dokularında Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Aktivitesinin*”, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Türkiye, 2001.
- [54] S.S. Zoroğlu, M. Yürekli, İ. Meram, S. Söğüt, H. Tutkun, Ö. Yetkin, E. Sivasli, H. A. Savaş, M. Yanik, H. Herken and Ö. Akyol, *Pathophysiological Role of Nitric Oxide and Adrenomedullin in Autism*, **Cell Biochemistry and Function**, 21:1 (2003) 55-60.
- [55] M. K. Türkdoğan, H. Testereci, T. Kahraman, F.H. Dilek and E. Akman, *Nitric Oxide Oxidation Products in the Serum of Patients with Gastric and Esophageal Cancer and Helicobacter Pylori*, **The Turkish Journal of Gastroenterology**, 10:3 (1999) 193-196.
- [56] F.X. Guix, I. Uribealago, M. Coma and F.J. Munoz, *The Physiology and Pathophysiology of Nitric Oxide In The Brain*, **Progress in Neurobiology**, 76:2 (2005) 126-52.
- [57] W. Xu, S. Zheng, R.A. Dweik and S.C. Erzurum, *Role of Epithelial Nitric Oxide in Airway Viral Infection*, **Free Radical Biology and Medicine**, 41:1 (2006) 19-28.

- [58] J.C. Oates and G.S. Gilkeson, *The Biology of Nitric Oxide and Other Reactive Intermediates in Systemic Lupus Erythematosus*, **Clinical Immunology**, 121:3 (2006) 243-250.
- [59] S.G. Hummel, A.J. Fischer, S.M. Martin, F.Q. Schafer and G.R. Buettner, *Nitric Oxide as a Cellular Antioxidant: A little Goes a Long Way*, **Free Radical Biology and Medicine**, 40: 3 (2006) 501-506.
- [60] S. Moncada and A. Higgs, *L-arginine- Nitric Oxide Pathway*, **The New England of Medicine**, 329: 27 (1993) 2002-2012.
- [61] S.B. Abramson, A.R. Amin, R.M. Clancy and M. Attur, *The Role of Nitric Oxide in Tissue Destruction*, **Best Practice and Research in Clinical Rheumatology**, 15:5 (2001) 831-845.
- [62] B. Bonavida, S. Khineche, S.H. Yopez, H. Garban, *Therapeutic Potential of Nitric Oxide in Cancer*, **Drug Resistance Updates**, 9:3 (2006) 157-173.
- [63] D.A. Wink, K.M. Miranda, M.G. Espey, R.M. Pluta, S.J. Hewett, C. Colton, M. Vitek, M. Feelisch, and M.B. Grisham, *Mechanisms of the Antioxidant Effects of Nitric Oxide*, **Antioxidants and Redox Signaling**, 3:2 (2001) 203-213.
- [64] G. Walford and J. Loscalzo, *Nitric Oxide in Vascular Biology*, **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 1:10 (2003) 2112-2118.
- [65] R.P. Patel, J. Andrew, H. Sellak, C.R. White, H. Jo, B.A. Freeman and V.M.D. Usmar, *Biological aspects of reactive nitrogen species*, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**, 1411:2-3 (1999) 385-400.
- [66] S. Kalman, *Adrenomedullin A New Renal Regulation Peptide*, **Official Journal of the Turkish Society of Nephrology**, 11:4, (2002), 198-201
- [67] J.P. Hinson, S. Kapas and D.M. Smith, *Adrenomedullin, a Multifunctional Regulatory Peptide*, **Endocrine Reviews**, 21:2 (2006) 138-167.
- [68] T. Ishimitsu, H. Ono, J. Minami and H. Matsuoka, *Pathophysiologic and Therapeutic Implications of Adrenomedullin in Cardiovascular Disorders*, **Pharmacology and Therapeutics**, 111:3 (2006) 909-927.
- [69] G.U. Halaç, “İskemik İnmede İlk 72 Saat Plazma Adrenomedullin Düzeyinin Lezyon Lokalizasyonu, Etyolojik Alt Gruplar Ve Prognozla İlişkisi”, Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi 1.Nöroloji Kliniği, İstanbul, 2005.
- [70] J. Beltowski and A. Jamroz, *Adrenomedullin - What do we know 10 years since its discovery?*, **Polish Journal of Pharmacology**, 56:1 (2004) 5-27.
- [71] M. Julian, M. Cacho, M.A. Garcia, S.M. Santamaria, B.P. Teresa, A. Ramos, A. Martinez and F. Cuttitta, *Adrenomedullin: a New Target for the Design of Small Molecule Modulators with Promising Pharmacological Activities*, **European Journal of Medicinal Chemistry**, 40:8 (2005) 737-750.
- [72] E. Güler, A. Balat, M. Çekmen, M. Kılınç, E. Sivash, M. Yürekli and C. Duman, *The Effects of Anticancer Drugs on Levels of Nitric Oxide and Adrenomedullin*, **The Turkish Journal of Pediatrics**, 48:3 (2006) 202-208.
- [73] B. Yanagawa and N. Nagaya, *Adrenomedullin: Molecular Mechanisms and its Role in Cardiac Disease*, **Amino Acids**, 32:1, (2007), 157-164.
- [74] L.L. Nikitenko, S.B. Fox, S. Kohoe, M.C.P. Rees and R. Bicknell, *Adrenomedullin and Tumor Angiogenesis*, **British Journal of Cancer**, 94:1 (2006) 1-7.
- [75] S. M. Lowson, *Alternatives to Nitric Oxide*, **British Medical Bulletin**, 70:1 (2004) 119-131.
- [76] H. Nishimatsu, E. Suzuki, D. Nagata, N. Moriyama, H. Satonaka, K. Walsh, M. Sata, K. Kangawa, H. Matsuo, A. Goto, T. Kitamura and Y. Hirata,

- Adrenomedullin Induces Endothelium-Dependent Vasorelaxation Via the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-Dependent Pathway in Rat Aorta*, **Circulation Research**, 89:1 (2001) 63-70.
- [77] J Dotsch, E. Schoof, H.O. Schocklmann, B. Brüne, I. Knerr, R. Repp and W. Rascher, *Nitric Oxide Increases Adrenomedullin Receptor Function In Rat Mesangial Cells*, **Kidney International**, 61:5 (2002) 1707-1713.
- [78] M. Jougasaki and J.C. Burnett, *Adrenomedullin: Potential in Physiology and Pathophysiology*, **Life Sciences**, 66:10 (2000) 855-872.
- [79] Ö. Güneysel, *Multifonksiyonel Bir Peptid; Adrenomedullin*, **Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi**, 24:2 (2004) 159-166.
- [80] K.B. Kim and B.M. Lee, *Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene*, **Cancer Letters**, 113:1-2 (1997) 205-212.
- [81] G. Garçon, F. Zerimech, M.H. Hannonthiaux, P. Gosset, A. Martin, T. Marez and P. Shirali, *Antioxidant Defense Disruption by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-Coated onto Fe₂O₃ Particles in Human Lung Cells (A549)*, **Toxicology**, 166:3 (2001) 129-137.
- [82] H. Parichehr, N.A. Shamaan, J. Ramli, J.H. Arshad and M.A. Syed, *The Effect of Benzo(a)pyrene on Glutathione S-Transferase, Glutathione Peroxidase in the Liver and Kidney Mouse Mus Musculus*, **Pakistan Journal of Medical Sciences**, 19:3 (2003) 197-202.
- [83] O.A. Badary, H.A. AbdEl-Gawad, R.A. Taha, A.A. Ali and F.M.A. Hamada, *Effects of Benzo[a]pyrene on Tissue Activities of Metabolizing Enzymes and Antioxidant System in Normal and Protein-Malnourished Rats*, **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, 17:2 (2003) 86-91.
- [84] K. Selvendiran, P. Senthilnathan, V. Magesh, and D. Sakthisekaran, *Modulatory Effect of Piperine on Mitochondrial Antioxidant System in Benzo(a)pyrene-induced Experimental Lung Carcinogenesis*, **Phytomedicine**, 11:1 (2004) 85-89.
- [85] L.Q. Pan, J. Ren and J. Liu, *Responses of Antioxidant Systems and LPO Level to Benzo(a)pyrene and Benzo(k)fluoranthene in the Haemolymph of the Scallop Chlamys Ferrari*, **Environmental Pollution**, 141:3 (2006) 443-451.
- [86] R.M. Samarth, M. Panwar and A. Kumar, *Modulatory Effects of Mentha piperita on Lung Tumor Incidence, Genotoxicity and Oxidative Stress in Benzo[a]pyrene-Treated Swiss Albino Mice*, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 47:3 (2006) 192-198.
- [87] C.R. Saunders, S.K. Das, A. Ramesh, D.C. Shockley and S. Mukherjee, *Benzo(a)pyrene-induced Acute Neurotoxicity in the F-344 Rat: Role of Oxidative Stress*, **Journal of Applied Toxicology**, 26:5 (2006) 427-438.
- [88] S.Y. Park, S.M. Lee, S.K. Ye, S.H. Yoon, M.H. Chung and J. Choi, *Benzo[a]pyrene-induced DNA Damage and p53 Modulation in Human Hepatoma HepG2 Cells for the Identification of Potential Biomarkers for PAH Monitoring and Risk Assessment*, **Toxicology Letters**, 167:1 (2006) 27-33.
- [89] W. Jifa, Y. Zhiming, S. Xiuxian and W. You, *Response of Integrated Biomarkers of Fish (Lateolabrax japonicus) Exposed to Benzo[a]pyrene and Sodium Dodecylbenzene Sulfonate*, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 65:2 (2006) 230-236.
- [90] C. Wang, Y. Zhao, R. Zheng, X. Ding W. Wei, Z. Zuo and Y. Chen, *Effects of Tributyltin, Benzo[A]Pyrene and Their Mixture on Antioxidant Defense Systems in Sebastiscus marmoratus*, **Ecotoxicology and Environmental Safety** 65:3 (2006) 381-387.

- [91] T. Shimosawa, H. Matsui, G. Xing, K. Itakura, K. Ando and T. Fujita, *Organ-Protective Effects of Adrenomedullin*, **Hypertension Research** 26 (2003) 109-112.
- [92] T. Shimosawa, T. Ogihara, H. Matsui, T. Asano, K. Ando and T. Fujita, *Deficiency of Adrenomedullin Induces Insulin Resistance by Increasing Oxidative Stress*, **Hypertension**, 41:5 (2003) 1080-1085.
- [93] T. Yoshimoto, N. Fukai, R. Sato, T. Sugiyama and N. Ozawa, *Antioxidant Effect of Adrenomedullin on Angiotensin II-Induced Reactive Oxygen Species Generation in Vascular Smooth Muscle Cells*, **Endocrinology**, 145:7 (2004) 3331-3337.
- [94] H. Matsui, T. Shimosawa, K. Itakura, X. Guanqun, K. Anda and T. Fujita, *Adrenomedullin Can Protect Against Pulmonary Vascular Remodelling Induced by Hypoxia*, **Circulation**, 109:18 (2004) 2246-2251.
- [95] Y.N. Cao, K. Kuwasako, J. Kato, T. Yanagita, T. Tsuruda, T. Eto and K. Kitamura, *Beyond Vasodilation: The Antioxidant Effect of Adrenomedullin in Dahl Salt-Sensitive Rat Aorta*, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 332:3 (2005) 866-872.
- [96] L. Chen, B. Kis, D.W. Busija, H. Yamashita and Y. Ueta, *Adrenomedullin Protects Rat Cerebral Endothelial Cells from Oxidant Damage in vitro*, **Regulatory Peptides**, 130:1-2 (2005) 27-34.
- [97] M. Fujita, T. Kuwaki, K. Ando and T. Fujita, *Sympatho-Inhibitory Action of Endogenous Adrenomedullin Through Inhibition of Oxidative Stress in the Brain*, **Hypertension**, 45:6 (2005) 1065-1072.
- [98] E. Bakan, S. Taysi, M.F. Polat, S. Dalga, S. Umudum, N. Bakan, and M. Gumus, *Nitric Oxide Levels and Lipid Peroxidation in Plasma of Patient with Gastric Cancer*, **Japanese Journal of Clinical Oncology**, 32:5 (2002) 162-166.
- [99] N. Bakan, S. Taysi, O. Yilmaz, E. Bakan, S. Kuskay, N. Uzun and M. Gundogdu, *Glutathione Peroxidase, Glutathione Reductase, Cu-Zn Superoxide Dismutase Activities, Glutathione, Nitric Oxide and Malondialdehyde Concentrations in Serum of Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia*, **Clinica Chimica Acta**, 338:1-2 (2003) 143-149.
- [100] Y. Suresh, M.M.S. Devi, V. Manjari and U.N. Das, *Oxidant Stress, Antioxidants and Nitric Oxide in Traffic Police of Hyderabad, India*, **Environmental Pollution**, 109:2 (2000) 321-325.
- [101] G. Garçon, P. Gosset, S. Garry, T. Marez, M.H. Hannonthiaux and P. Shirali, *Pulmonary Induction of Proinflammatory Mediators Following the Rat Exposure to Benzo(a)pyrene-Coated onto Fe₂O₃ Particles*, **Toxicology Letters**, 121:2 (2001) 107-117.
- [102] F. Regoli, M. Nigro, M. Benedetti, D. Fattorini and S. Gorbi, *Antioxidant efficiency in early life stages of the Antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*: Responsiveness to pro-oxidant conditions of platelet ice and chemical exposure*, **Aquatic Toxicology**, 75:1(2005) 43-52.
- [103] M. Saint-Denis, J.F. Narbonne, C. Arnaud, E. Thybaud and D. Ribera, *Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of lead acetate*, **Soil Biology & Biochemistry** 33:3 (2001) 395-404.
- [104] P.G. Wells, P.M. Kim, R.R. Laposa, C.J. Nicol, T. Parman and L.M. Winn, *Oxidative damage in chemical teratogenesis*, **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 396:1-2 (1997) 65-78.
- [105] H. Herken, Ö. Akyol, H.R. Yılmaz, H. Tutkun, H.A. Savaş, M.E. Özen, A. Kalenderoğlu and M. Güleç, *Nitric Oxide, Adenosine Deaminase, Xanthine*

- Oxidase and Superoxide Dismutase in Patients with Panic Disorder: Alterations by Antidepressant Treatment*, **Human Psychopharmacology Clin Exp**, 21:1 (2006) 53-59.
- [106] M.M. [Bradford](#), *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*, **Analytical Biochemistry**, 7:72 (1976) 248-54.
- [107] H. Luck, *Catalase*, *Methods of Enzymatic Analysis*, in H.U. Bergmeyer (Ed.) Varleg Chemie, Academic Pres, New York, Section:3, 1963, p. 885-888.
- [108] R.A. Lawrence and R.F. Burk, *Glutathione Peroxidase-Activity in Selenium-Defficient Rat Liver*, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 71:4 (1976) 952-958.
- [109] Y. Sun, L.W. Oberley and Y. Li, *A Simple Method For Clinical Assay of Superoxide Dismutase*, **Clinical Chemistry**, 34:3 (1988) 497-500.
- [110] T.P.M. Akerboom and H. Sies, *Assay of Glutathion, Glutathione disulfide and Mixed Disulfides in Biological Samples*, **Methods in Enzymology**, 77 (1981) 373-383.
- [111] J.A. Buege and S.D. Aust, *Microsomal Lipid Peroxidation*, **Methods in Enzymology**, 52 (1978) 302-310.
- [112] C. Evereklioglu, E. Ozbek, H. Er, M. Cemken and M. Yurekli, *Urinary Adrenomedullin Levels are Increased and Correlated with Plasma Concentrations in Patients with Behçet's Syndrome*, **International Journal of Urology**, 9:6 (2002) 296-303
- [113] H. Dülger, S. Alici, M.R. Şekeroğlu, T. Noyan and A. Yalçinkaya, *Kanserli Hastalarda Kemoterapinin Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkisi*, **Van Tıp Dergisi**, 9:2 (2002), 56-59.
- [114] H. Li, Q. Chen, Y. Ma and J. Zhou, *Imbalanced Free Radicals and Antioxidant Defense Systems in Schizophrenia*, **Journal of Zhejiang University Science B**, 7:12 (2006) 51-55.
- [115] H. Farghali, S. Hynie, Z. Vohnikova and K. Masek, *Possible Dual Role of Nitric Oxide in Oxidative Stress Injury: A Study in Perfused Hepatocytes* **International Journal of Immunopharmacology**, 19:9-10 (1997) 599-605.
- [116] K Winzer, W. Becker, C.J.F. Van Noorden and A. Köhler, *Short-Time Induction of Oxidative Stress in Hepatocytes of the European flounder (Platichthys flesus)* **Marine Environmental Research**, 50:1-5 (2000) 495-501.
- [117] L.Y. Al-Ayadhi, *Neurohormonal Changes in Medical Students During Academic Stress*, **Annals of Saudi Medicine**, 25:1 (2005) 36-40.
- [118] S. Fujioka, *Increased Plasma Concentration of Adrenomedullin During and After Major Surgery*, **Surgery Today**, 31:7 (2001) 575-579.
- [119] J. Shan and T.L. Krukoff, *Distribution of Preproadrenomedullin mRNA in the Rat Central Nervous System and its Modulation by Physiological Stressors*, **Journal of Comparative Neurology**, 432:1 (2001) 88-100.
- [120] T. Boldt, P. Luukkainen, F. Fyhrquist, M. Pohjavuori and S. Andersson, *Birth Stress Increases Adrenomedullin in the Newborn*, **Acta Paediatrica**, 87:1 (1998) 93-94.
- [121] J. Dötsch, E. Schoof, H.O. Schöcklmann, B. Brüne, I. Knerr, R. Repp and W. Rascher, *Nitric Oxide Increases Adrenomedullin Receptor Function in Rat Mesangial Cells*, **Kidney International**, 61: (2002) 1707-1713.
- [122] Y. Jinghui, Z. Minjia, F. Fengying, T. Chao-Shu and L. Ju-Xiang, *Impact of Nitric Oxide on Adrenomedullin-and Proadrenomedullin N-terminal 20 Peptide-Induced Cardiac Responses: Action by Alone and Combined Administration*, **Peptides**, 24: (2003) 1963-1969.

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Gaziantep’te doğdu. İlk ve orta öğrenimini Gaziantep’te tamamladı. 1995 yılında İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümünde başladığı Yüksek öğrenimini 1999’da tamamladı. 1999 yılında başladığı Yüksek Lisans eğitimini 2001 yılında tamamladı ve aynı yıl Doktora eğitimine başladı. 2001 Mart ayında M.E.B. tarafından sınıf öğretmeni olarak ataması yapılan Arzu DOĞRU 6 aylık öğretmenlik görevini yaptıktan sonra 2001 Eylül ayında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Halen İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmakta olan Arzu DOĞRU evli ve bir çocuk annesi olup İngilizce bilmektedir.