

**FARKLI MİKTARLARDA KÜKÜRT İÇEREN ve GÜN
KURUSU KAYISIYLA BESLENEN RATLARIN SERUM
ve KARACİĞER OKSİDATİF STRES
PARAMETRELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Önder OTLU

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Aysun BAY KARABULUT
Doktora Tezi – 2016**

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI MİKTARLARDA KÜKÜRT İÇEREN ve GÜN KURUSU KAYISIYLA
BESLENEN RATLARIN SERUM ve KARACİĞER OKSİDATİF STRES
PARAMETRELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Önder OTLU

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Aysun BAY KARABULUT**

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından 2012/131
proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2016**

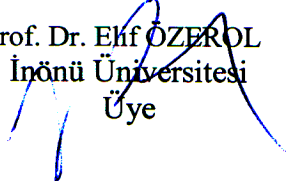
KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Önder OTLU'nun "Farklı Miktarlarda Kükürt İçeren ve Gün Kurusu Kayısıyla Beslenen Ratların Serum ve Karaciğer Oksidatif Stres Parametrelerinin Karşılaştırılması"** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

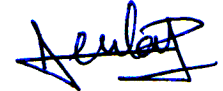
Tez Savunma Tarihi: 03/06/2016



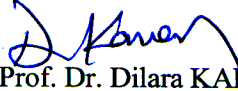
Prof. Dr. Aysun BAY KARABULUT
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı
Jüri Başkanı



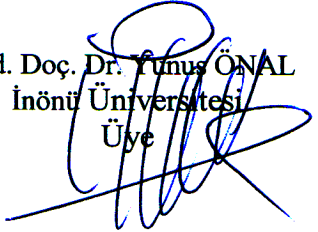
Prof. Dr. Elif ÖZEROL
İnönü Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Sevtap BAKIR
Cumhuriyet Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Dilara KAMAN
Fırat Üniversitesi
Üye



Yrd. Doç. Dr. Yunus ÖNAL
İnönü Üniversitesi
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/....../2016 tarih ve/2016/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kayısı (<i>Prunus armeniaca</i> L.)	3
2.1.1. Kayısının Kökeni ve Tarihçesi	3
2.1.2. Dünyada ve Türkiye’de Kayısı Üretimi	3
2.1.3. Malatya Kayısının Genel Özellikleri ve Besin Değerleri.....	4
2.1.3.1. Yaş Kayısının Besin Değeri	4
2.1.3.2. Kayısının İnsan Sağlığı Açısından Önemi	6
2.1.4. Kayısının Hasadı, Kükürtlenmesi ve Kurutma Yöntemleri	6
2.1.4.1. Yaş Kayısların Hasat Zamanı ve Hasat Yöntemleri.....	6
2.1.4.2. Yaş Kayısların Kükürtleme İşlemi	8
2.1.4.3. Kükürtleme Odasının Özellikleri	9
2.1.4.4. Kükürtleme İşlemi ve Süresi	9
2.1.4.5. Kükürtlenen Kayısların Kurutulması	10
2.1.4.6. Kurutulmuş Kayısların Depolanması	11
2.2. Koruyucu Gıda Katkı Maddeleri ve SO ₂	11
2.2.1. Gıda Koruyucu Olarak SO ₂	12
2.3. Serbest Radikaller ve Etkileri.....	12
2.3.1. Serbest Radikallerin Özellikleri ve Oksidatif Stresin Oluşumu	12
2.3.2. Serbest Radikal Kaynakları	14
2.3.2.1. Mitokondri.....	14
2.3.2.2. Peroksizomlar	14
2.3.2.3. Endoplazmik Retikulum	15
2.3.3. Serbest Radikallerin Moleküler Hedefleri.....	16
2.3.3.1. Deoksiribonükleik Asit (DNA)	16

2.3.3.2. Ribonükleik Asit (RNA).....	17
2.3.3.3. Lipitler	17
2.3.3.4. Proteinler	17
2.4. Antioksidanlar	18
2.4.1. Antioksidanların Sınıflandırılması	20
2.4.1.1. Enzimatik Antioksidanlar	22
2.5. Flavonoidler.....	24
2.5.1. Flavonoid Çeşitleri ve Yapısal Özellikleri	25
2.5.2. Flavonoid kaynakları	27
2.5.3. Flavonoidlerin Metabolizması.....	28
2.6. Oksidatif Stres Oluşumu.....	28
2.7. Karaciğer	29
2.7.1. Karaciğerin Kan Dolaşımı ve Damarlanması.....	29
2.7.2. Karaciğerin Fizyolojisi ve Fonksiyonları	30
2.8. Kullanılan Parametreler İle İlgili Genel Bilgiler	31
2.8.1. IL-1B	31
2.8.2. 8-OHdG	32
2.8.3. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit.....	33
2.8.4. GSH	36
3. MATERYAL VE METOD	37
3.1. Ratların Temini.....	37
3.2. Deney Grupları	37
3.3. Kükürt Oranı Belirli Kayısların Elde Edilmesi	38
3.4. Gün Kurusu Kayısı ve Kükürtlü Kayısı İçeren Yemlerin Hazırlanması	38
3.5. Kan ve Karaciğer Dokularının Elde Edilmesi ve Analizlere Hazırlanması	39
3.5.1. Doku Homojenizasyonu ve Tamponları.....	39
3.6. Serum ve Karaciğer Doku Homojenatında TAS, TOS, OSİ, IL-1 β , 8-OHdG, MDA ve GSH Analizleri	40
3.6.1. Total Oksidan Status (TOS) Aktivitesi Tayini	40
3.6.2. Total Antioksidan Status (TAS) Aktivitesi Tayini.....	41
3.6.3. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)	42

3.6.4. IL-1 β Seviyesi Tayini	42
3.6.5. 8-OHdG Tayini	43
3.6.6. MDA Analizi	43
3.6.7. GSH Analizi	45
3.7. Karaciğer Dokusunun Histolojik Analizleri	47
3.8. Verilerin İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi	48
4. BULGULAR	49
4.1. Biyokimyasal Bulgular	49
4.1.1. Serum ve Doku TAS Seviyeleri	49
4.1.2. Serum ve Doku TOS Seviyeleri	51
4.1.3. Serum ve Doku OSI Seviyeleri	53
4.1.4. Serum ve Doku IL-1 β Seviyeleri	55
4.1.5. Serum ve Doku 8-OHdG Seviyeleri	57
4.1.6. Serum ve Doku MDA Seviyeleri	59
4.1.7. Serum ve Doku GSH Seviyeleri	61
4.2. Histolojik Bulgular	63
5. TARTIŞMA	68
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR	72
EKLER	79
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	79
EK-2. ETİK KURUL ONAYI	80

TEŞEKKÜR

Akademik eğitim hayatımın ilk gününden bu yana göstermiş olduğu desteği, sabrı ve emekleri için danışman hocam sayın Prof. Dr. Aysun BAY KARABULUT'a; bu çalışmanın gerçekleşmesinde büyük rolü olan Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Yunus Önal'a; histolojik muayenelerin yapılması ve değerlendirilmesi aşamasındaki emekleri için Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet Gül'e;

Doktora süresi boyunca eğitimime değerli bilgileri ile katkıda bulunan İnönü Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine;

Bu süreçte sürekli yanımda olan, birlikte çalışmaktan her zaman keyif aldığım eşim, kariyerdaşım, arkadaşım Gül OTLU'ya;

Kıymetli arkadaşlıkları ve tecrübeleri sayesinde çok şey öğrendiğim, çalışma arkadaşlarım Turgut Özal Tıp Merkezi Merkez Laboratuvarı personeline;

Projeye sağlamış oldukları destek dolayısıyla İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne;

Son olarak hayata geldiğim ilk günden bu yana daha iyi bir birey olabilmem için emek, zaman ve en önemlisi sevgisini veren; sahip olmaktan her zaman gurur duyduğum aileme teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Farklı Miktarlarda Kükürt İçeren ve Gün Kuruşu Kayısıyla Beslenen Sıçanların Serum ve Karaciğer Oksidatif Stres Parametrelerinin Karşılaştırılması

Amaç: Dünya kayısı üretiminin büyük bir bölümünü Türkiye tek başına sağlamakta ve Malatya ili için “kayısının başkenti” tanımlaması yapılmaktadır. Yaş kayısı ihracatı yapan diğer ülkelerin aksine Türkiye kuru kayısı ihracatı yapmaktadır. Kuru kayısıların depolanma ömürlerinin uzun olması amacıyla kükürtleme işlemi yapılmaktadır. Ancak bu işlem kayısının raf ömrünü uzatmakla birlikte ihracatını da engellemektedir. Çünkü ihracatın önündeki en büyük engel Avrupa Birliği’nin getirmiş olduğu 2000 ppm’lik kükürt dioksit sınırlamasıdır. Bu kapsamda çalışmamızın amacı 2000 ppm kükürt dioksit miktarını aşan kayısıların tüketilmesinde oksidatif stres açısından değişiklikleri gözlemlemektir.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda 1000 ppm, 2000 ppm, 3000 ppm, 4000 ppm ve gün kuruşu kayısı katılan yemlerle üç ay süre ile beslenen toplam 84 adet rat kullanılmıştır. Üç ayın sonunda serum ve karaciğer oksidatif stres belirteçleri incelenmiştir. Bu amaçla MDA, GSH, TAS, TOS, OSI, IL-1 β ve 8-dOHG seviyeleri ölçülmüştür. Aynı zamanda karaciğerin histolojik hasar skorları belirlenmiştir.

Bulgular: Serum ve karaciğer oksidatif stres parametreleri içerisinde sadece TOS seviyeleri arasında farklılık bulunmadı. Diğer parametrelerde gün kuruşu kayısı ile beslenen gruplarda en yüksek TAS ve en düşük OSI sonuçları elde edildi. MDA, IL-1 β ve 8-dOHG seviyeleri en yüksek olan grup 1000 ppm grubu iken GSH seviyesi en yüksek grup 2000 ppm grubu olarak gözlemlendi. Histolojik hasar açısından istatistiksel olarak fark bulunamadı.

Sonuç: Kükürt oranı farklı kayısıların tüketilmesi ratlarda hem oksidatif stres parametreleri açısından hem de karaciğer hasarı açısından anlamlı farklılıklar meydana getirmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer, kuru kayısı, oksidatif stres, rat

ABSTRACT

Comparison of the Oxidative Stress Parameters of the Serum and Liver Tissue in Rats Feed by Sun-Dried Apricot Which Contains Different Amount of Sulphur

Aim: Turkey provides a large part of the dried apricot production in the world alone, thus Malatya province is defined as “the capital of the Apricot”. Turkey export both dried and fresh apricots. The sulfation process is carried out in order to extend their life of storage of dried apricots. But sulfation also prevents the export. The European Union has brought that 2000 ppm of sulfur dioxide limit which is the biggest obstacle in front of the apricot export. In this context, the purpose of our study, when consumption of apricots which is contain exceed amount of 2000 ppm of sulfur to observe the changes in terms of oxidative stress.

Material and Methods: In our study, totally 84 rats were feed with contains different amount of sulphur or sun dried apricots chow for 3 months. The levels of MDA, GSH, TAS, TOS, OSI, IL-1 β ve 8-dOHG are measured in serum and liver tissue samples. Additionally, histologic injury score was determined in the liver.

Results: There were no differences only between TOS levels of serum and liver oxidative stress parameters. In the group fed with sun dried apricots have the highest TAS levels and lowest OSI results. 1000 ppm group have the highest level of MDA, IL-1 β ve 8-dOHG while, 2000 ppm group has the highest GSH level. There is no statictically difference between groups in terms of liver injury scores.

Conclusion: Consumption of apricots which contain different sulfur ratio did not show significant alterations on both oxidative stress parameters and liver injury ratio.

Key Words: Liver, oxidative stress, rat, dried apricot

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALT:	Alanin aminotransferaz
RO[•] :	Alkoksil radikali
AST:	Aspartat aminotransferaz
FAO:	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu
VLDL:	Çok düşük dansiteli lipoprotein
PUFA:	Çoklu doymamış (poliansatüre) yağ asidi
DNA:	Deoksiribonükleik asit
8-oxoG :	7,8-dihidro-8-okzo-guanozin
Na₂HPO₄:	Disodyumhidrojen fosfat
H₂O₂:	Hidrojen peroksit
8-OHdG:	8-hidroksi-2-deoksiguanozin
OH[•] :	Hidroksil radikali
4-HNA:	4-hidroksinenonal
H₃PO₄:	Fosforik asit
IL1β:	İnterlökin 1 beta
GPx:	Glutasyon peroksidaz
GRx:	Glutasyon Redüktaz
GSH:	Glutasyon
GST:	Glutasyon-S-Transferaz
CAT:	Katalaz

SO₂:	Kükürt dioksit
L[·]:	Lipid radikali
LDH:	Laktat dehidrogenaz
LOO[·]:	Lipid peroksil radikali
MDA:	Malonildialdehit
NO:	Nitrik oksit
OSİ:	Oksidatif Stres İndeksi
ROO[·]:	Peroksil radikali
KCl:	Potasyum klorür
RNS:	Reaktif Nitrojen Türevleri
ROS:	Reaktif Oksijen Türevleri
RNA:	Ribonükleik asit
O₂[·]:	Süperoksit radikali
SOD:	Süperoksit dismutaz
TBA:	Tiyobarbitürik asit
TCA:	Trikloroasetik asit
TAS:	Total Antioksidan Kapasitesi
TOS:	Total Oksidan Kapasitesi
TÜİK:	Türkiye İstatistik Kurumu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Glutasyon Redoks Döngüsü.....	24
Şekil 2.2. Karaciğerin Yapısı.....	30
Şekil 2.3. 8-OHdG Oluşumu.	32
Şekil 2.4. Bir poliansatüre yağ asidinin (PUFA) peroksidasyonu	35
Şekil 2.5. GSH'ın moleküler yapısı.....	36
Şekil 3.1. MDA standart grafiği	45
Şekil 3.2. GSH Standart grafiği	47
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kurusu kayisılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu TAS sonuçlarının karşılaştırılması.....	51
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kurusu kayisılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu TOS sonuçlarının karşılaştırılması.....	53
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kurusu kayisılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu OSI sonuçlarının karşılaştırılması.....	55
Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kurusu kayisılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu IL-1 β sonuçlarının karşılaştırılması.	57
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kurusu kayisılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu 8-OH sonuçlarının karşılaştırılması.	59
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kurusu kayisılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu MDA sonuçlarının karşılaştırılması.	61
Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kurusu kayisılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu GSH sonuçlarının karşılaştırılması.	63
Şekil 4.8. Karaciğer santral ven görüntüleri	64
Şekil 4.9. Karaciğer dokusu toplam hasar skoru grafiği.....	66
Şekil 4.10. Karaciğer portal alan görüntüleri	67

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo No

Sayfa No

Tablo 2.1. Malatya Bölgesinde Yaygın Olarak Yetiştirilen Kayısı Türlerinin Besin Değerleri	5
Tablo 2.2. Bazı Kurutmalık Kayısı Çeşitleri İçin Kullanılan Kükürt Miktarı ve Kükürtleme Süreleri	10
Tablo 2.3. ROS Ve RNS Türleri, Sembolleri ve Yarı Ömürleri	13
Tablo 2.4. Serbest Radikal Oluşumuna Sebep Olan Eksojen Kaynaklar	15
Tablo 2.5. Serbest Radikal Hasarı Sonucu Açığa Çıkan Modifiye Bazlar	16
Tablo 2.6. Farklı Aminoasitlerden Meydana Gelen Oksidasyon Ürünleri	18
Tablo 2.7. Organizmada Antioksidan Sistem Elemanları	20
Tablo 2.8. Doğal (Endojen) Antioksidanlar	21
Tablo 2.9. Flavonoid Gruplarının Yapısal Özellikleri ve Bulundukları Gıdalar	26
Tablo 2.10. Bazı Sebzelerdeki Flavonoid Türleri ve Göreceli Miktarları	27
Tablo 3.1. Malondialdehit Deney Protokolü	44
Tablo 3.2. Glutasyon Deney Protokolü	46
Tablo 4.1. Farklı Konsantrasyonlarda Kükürt İçeren ve Gün Kuru Kayılarıyla Beslenen Ratların Serum Ve Doku TAS Sonuçları	50
Tablo 4.2. Farklı Konsantrasyonlarda Kükürt İçeren ve Gün Kuru Kayılarıyla Beslenen Ratların Serum Ve Doku TOS Sonuçları	52
Tablo 4.3. Farklı Konsantrasyonlarda Kükürt İçeren ve Gün Kuru Kayılarıyla Beslenen Ratların Serum Ve Doku OSI Sonuçları	54
Tablo 4.4. Farklı Konsantrasyonlarda Kükürt İçeren ve Gün Kuru Kayılarıyla Beslenen Ratların Serum Ve Doku IL-1 β Sonuçları	56
Tablo 4.5. Farklı Konsantrasyonlarda Kükürt İçeren ve Gün Kuru Kayılarıyla Beslenen Ratların Serum Ve Doku 8-OH Sonuçları	58
Tablo 4.6. Farklı Konsantrasyonlarda Kükürt İçeren ve Gün Kuru Kayılarıyla Beslenen Ratların Serum Ve Doku MDA Sonuçları	60
Tablo 4.7. Farklı Konsantrasyonlarda Kükürt İçeren ve Gün Kuru Kayılarıyla Beslenen Ratların Serum Ve Doku GSH Sonuçları	62
Tablo 4.8. Karaciğer Dokusu Ortalama Histolojik Muayene Skorları	65

1. GİRİŞ

Kayısı, ticari olarak dünyanın birçok yerinde yetiştirilebilen önemli meyve türlerinden birisidir. Dünyada yaklaşık 70 milyon kayısı ağacından yıllık 2,5-2,8 milyon ton yaş kayısı üretimi yapılmaktadır. Türkiye'de yaklaşık 16 milyon kayısı ağacından 400-600 bin ton yaş kayısı üretimi yapılmaktadır. Bu miktarın her yıl 250-300 bin ton kadarı Malatya'da üretilmektedir. Üretilen kayısının büyük bölümü kükürtlendikten sonra kurutulmaktadır. Yıllık 50-120 bin ton kuru kayısının yaklaşık 100 ülkeye ihracatıyla 150-200 milyon dolar arasında gelir elde edilmektedir. Kayısı, Malatya iline yaptığı ekonomik katkı nedeniyle vazgeçilmez ürün haline gelmiştir (1).

Kuru kayısının muhafaza edilmesinde kullanılan kükürt konusunda ithalatçı ülkelerin hassasiyeti her geçen gün artmaktadır. Birçok Avrupa ülkesi ve ülkemizde kuru kayısıda bulunması gereken kükürt miktarı 2000 ppm'dir ve bu miktarın aşağı çekilme ihtimali vardır. Gönüllü insanlarda yapılan denemeler 13-14 mg/kg. dan fazla alınan sülfite boğaz ve mide yanmaları, baş ağrısı hatta kusma gibi toksik belirtiler meydana getirdiğini göstermiştir. Laboratuvar uygulamaları ile birçok çalışma yapılmış ancak çelişkili sonuçlar bulunmuştur. Kükürtleme bileşiklerinin toplumun çoğunda bir tehlike oluşturduğuna dair bir kanıt bulunmamıştır. Bazı insanlar 50 mg/kg vücut ağırlığı düzeyinde sülfite hiçbir reaksiyon göstermezlerken bazı insanlarda çok az miktarda alınması halinde baş ağrısı, bulantı gibi semptomlara neden olabilmektedir (1).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, artmış serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun, birçok hastalığın patogeneğinde rol aldığını göstermektedir. Miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, astım, diabetes mellitus, romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar, kanser ve yaşlanma dahil birçok hastalığın oksidatif stres ile ilişkisi gösterilmiştir (2). Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır. Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Bu radikaller genel olarak Reaktif Oksijen Türleri (ROS) olarak adlandırılırlar (2). ROS'dan ileri gelen hasarı engellemek veya yavaşlatmak

için vücutta bazı savunma sistemleri geliştirilmiştir. Bu savunma sistemleri antioksidan savunma sistemleri olarak adlandırılır (2).

Oksidatif stres olarak bilinen durum, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki ciddi dengesizlik sonucu meydana gelmektedir. Bu dengesizlik genelde doku hasarına yol açmaktadır (3).

Meng Z. ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, sülfür dioksit'e maruz bırakılan farelerin karaciğer Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GPx), redükte Glutasyon (GSH) gibi oksidatif stres parametrelerini arttırdığı tespit edilmiş (4). Aynı bilim adamının başka bir grupta yaptığı çalışmada kükürt dioksit türevlerine (sodyum sülfat ve sodyum bisülfat) maruz kalan farelerde DNA hasarı meydana geldiği rapor edilmiştir (5). Otlu A. ve ekibini yaptığı bir çalışmada gün kurusu kayısının diyetle eklenmesiyle SOD ve CAT aktivitesinin arttığı, lipid peroksidasyonunun azaldığı rapor edilmiştir (6). Öztürk F. ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir araştırmada gün kurusu kayısının karaciğer üzerine oksidatif stresi azaltıcı etkisi olduğu rapor edilmiştir (7).

Tüm bu bilgilere rağmen kükürtle muamele edilmiş kayısının etkilerinin, gün kurusu kayısıyla karşılaştırıldığı veya artan kükürt miktarlarının etkilerinin araştırıldığı bir yayın bulunamamıştır. Bu bağlamda yapmış olduğumuz çalışmanın amacı yüksek ve düşük kükürt içeren kayılarla beslenmenin serum ve karaciğer oksidatif stres parametrelerine etkilerini karşılaştırmak ve kayısı ihracatının önündeki en büyük engel olarak görülen bu sınırın aşılması halinde meydana gelebilecek etkileri gözlemlemek tezimizin amacını oluşturmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kayısı (*Prunus armeniaca* L.)

2.1.1. Kayısının Kökeni ve Tarihçesi

Kayısı (*Prunus armeniaca* L.) Rosales takımının Rosaceae familyasının Prunoideae alt familyasının *Prunus* cinsine girer. Dünyada ıslahı yapılan 6 tür kayısı bulunmaktadır. Bu türler *Prunus armeniaca*, *Prunus brigantiaca* (Briancon kayısı- Alperigi), *Prunus mume* (japon kayısı), *Prunus mandshurica* (Mançurya kayısı), *Prunus holosericea* (Tibet kayısı), *Prunus dasycarpa* (siyah ve mor kayısı) türleridir. Kayısı meyvesi; açık sarıdan turuncu rengine kadar geniş bir renk varyasyonu (açık sarı, sarı, turuncu, koyu turuncu, kırmızı ve yeşil) sahiptir. Kayısı meyvesi oval, yuvarlak, eliptik gibi şekillere sahip ve ağırlığı 20-80 g arasında değişmektedir (8).

Kayısının anavatanının Çin olduğu ve Anadolu topraklarına girişinin iki bin yıldan fazla bir geçmişi olduğu kabul edilmektedir. Ülkemizde kayısı ve zerdali yetiştiriciliği Malatya bölgesi, Elazığ-Erzincan-Sivas bölgesi, Akdeniz bölgesi, Kars-Iğdır bölgesi, Ege bölgesi, İç Anadolu bölgesi ve Marmara bölgesinde farklı yoğunluk ve çeşitlerle yapılmaktadır. Ancak Malatya bölgesi kayısı üretiminde özelleşmiş bir bölge olup Türkiye kayısı tüm üretimin yarısından fazlasını gerçekleştirmektedir (9).

2.1.2. Dünyada ve Türkiye’de Kayısı Üretimi

FAO’nun 2012 verilerine göre dünya üzerindeki toplam kayısı üretimi yaklaşık 4 milyon ton (3.956.640) olup bu miktarın yaklaşık 800.000 (759.768) tonu Türkiye’den karşılanmaktadır. Kayısı üretiminde Türkiye %20’lik bir payla lider durumdadır. Türkiye’yi sırasıyla İran, Özbekistan ve Cezayir izlemektedir (10).

Kayısı üretimi yapan ülkelerden Fransa, İtalya, İspanya ve Yunanistan yaş kayısı ihracatı yapmaktayken Türkiye, Avustralya, İran ve diğer Orta Asya ülkeleri daha ziyade kuru kayısı ihracatı yapmaktadırlar (11).

TÜİK 2013 verilerine göre Türkiye’de meyve veren 14milyon kayısı ağacından toplam 780.000 ton kayısı üretimi yapılmıştır. Bu üretim miktarının yaklaşık 420.000 tonu

Malatya ilinden karşılanmıştır. Bu üretim miktarları ile Malatya ili ülke üretiminin %50'sinden fazlasını, dünya kayısı üretiminin ise yaklaşık %10'unu tek başına karşılamaktadır (12).

Yukarıdaki veriler göz önüne alındığında Malatya ilinin “Kayısının başkenti” olarak anılmasının haklı sebepleri olduğu aşikardır.

2.1.3. Malatya Kayısının Genel Özellikleri ve Besin Değerleri

Malatya kayısıları Türkiye'nin farklı bölgelerinde yetişen kayısılar ile karşılaştırıldığında ortaya ciddi farklar çıkmaktadır. Bu farkların en önemlisi kayısındaki kuru madde oranıdır. Yerli ve yabancı diğer kayısı çeşitlerinde %14-18 olan kuru madde oranı Malatya kayısılarında %24-28 arasındadır. Kuru madde oranının yüksek olması kurutmalık kayısılarda aranan bir özelliktir. Bununla beraber Malatya'nın sahip olduğu iklim koşulları kayısı ağacının verim şartlarını tam anlamıyla karşılamaktadır. Malatya kayısı ağaçları daha soğuk ya da daha sıcak iklim bölgelerine götürüldüğünde bölge iklim şartlarına adaptasyonu mümkün olmamakta ve ağaçlardan ekonomik anlamda verim elde edilememektedir. İklim şartlarına uyum ve kayısı çeşitliliği açısından Malatya kayısı üstün özelliklere ve kaliteye sahiptir (13).

2.1.3.1 Yaş Kayısının Besin Değeri

Malatya'da yaygın yetiştirilen bazı kayısı türlerinin besin değerleri Tablo 2.1'de verilmiştir (14).

Tablo 2.1. Malatya bölgesinde yaygın olarak yetiştirilen kayısı türlerinin besin değerleri. (100 gr yaş kayısıda)

Kayısı Türü	% Kuru Madde	Toplam Fenolik İçerik	Vitamin A	Vitamin C	Glukoz	Fruktoz	Potasyum	Sodyum	Kalsiyum	Fosfor
Hacıhaliloğlu	24.78±0.44	5341.29±206.50	8.88±0.62	3.77±1.7	19.21±0.63	13.56±0.64	1849±36	10.9±0.1	102.3±9.0	107.0±1.3
Hasanbey	19.6±1.54	5827.98±401.84	22.2±4.56	49.3±2.3	14.72±0.76	12.16±0.67	1811±56	8.8±2.3	100.7±0.6	118.6±2.3
Soğancı	25.81±2.49	4965.99±355.64	9.18±2.97	28.5±0.7	17.16±2.44	13.99±1.52	1879±69	8.9±1.8	110.0±0.8	97.9±4.5
Kabaası	22.0±0.27	5822.03±73.72	26.18±0.16	41.6±3.7	18.64±0.29	13.05±0.18	1880±75	12.6±2.9	105.7±8.3	97.0±3.1
Çöloğlu	23.53±1.26	5674.25±459.27	5.74±0.50	20.6±3.8	18.95±0.81	15.68±0.65	1227±57	14.0±1.4	87.0±2.6	72.0±2.8
Çataloğlu	21.5±0.22	6107.21±209.41	17.53±4.89	27.9±1.0	21.40±0.72	15.02±0.36	1377±48	13.9±1.8	140.8±4.0	88.9±7.4
Hacıkız	16.86±0.13	6592.38±59.83	13.05±0.37	37.1±2.3	23.67±0.32	11.03±0.31	1605±63	15.9±7.3	173.6±4.0	104.6±2.4

2.1.3.2. Kayısının İnsan Sağlığı Açısından Önemi

Günlük enerji ve protein gereksiniminin karşılanmasına çok az katkıda bulunan kayısı meyvesi vitamin ve mineral madde içeriğiyle önemli bir yere sahiptir. Özellikle A vitaminin öncül maddesi olan β -karoten'den zengin olan kayısı bu özelliği ile göz sağlığı, kemik, diş gelişmesi ve endokrin bezlerin çalışması gibi fonksiyonların sağlıklı çalışmasını sağlamaktadır. Aynı zamanda bir antioksidan olan β -karoten kanserojen maddelerin detoksifikasyonunda da rol oynamaktadır.

Sodyum bakımından fakir, potasyum bakımından zengin olan kayısının bu yönü ile kalp yetmezliği, hepatit ve siroz gibi hastalıkların tedavisini desteklemek amacıyla kullanımı tavsiye edilmektedir.

Yetişkin bir insanın günlük 25 g diyet lifine ihtiyacı vardır. 100 g kuru kayısıda 24 g diyet lifi ihtiva etmektedir. Bu özelliği ile kuru kayısı günlük diyet lifi alımını tek başına karşılamaktadır. Diyet lifinin yeterli alınımı ile kabızlık, apandisit, hemoroid, obezite ve kolon kanseri gibi hastalıklara yakalanma riski azalmakta bununla beraber bağırsakların düzenli çalışması sağlanmaktadır (15).

2.1.4. Kayısının Hasadı, Kükürtlenmesi ve Kurutma Yöntemleri

2.1.4.1. Yaş Kayısların Hasat Zamanı ve Hasat Yöntemleri

Hasat Zamanının Belirlenmesi

Malatya bölgesinde genellikle hasat zamanı Mayıs ayının son haftasında başlayıp Haziran ayının son haftalarına kadar uzamaktadır. Ancak ağaçtaki meyvelerin hepsi aynı anda olgunlaşmadığı için hasat da kademeli olarak yapılmaktadır. Kayısı ağacında en önce üst daldaki meyveler olgunlaşmakta daha sonra orta yükseklikteki meyveler ve en son alt dallardaki meyveler olgunlaşmaktadır. Hasat da bu sırayı takip eder ve bir ağaçtan üç kerede meyvenin tümü hasat edilebilir.

Kayısı meyvesinin hasat zamanı meyvenin daldan kolay kopması, kabuk yüzeyinin $\frac{3}{4}$ 'ünün saman sarısı renge dönmesi ve meyve etinin $\frac{1}{2}$ 'sinin sarı renge dönmesi ile anlaşılır.

Sofralık kayısıların hasat zamanı için gönderilecek pazarın uzaklığı ve tüketim süresi göz önünde bulundurulmalıdır. Bu etmenler göz önüne alındığında sofralık kayısılarına hasat sırasında parmakla basıldığında meyve etinin ezilmemesi aynı zamanda meyve renginin kendine özgü sarı renge dönmüş olması tavsiye edilmektedir. Erken hasat edilen kayısılar renk ve aroma bakımından geri kalırken hasadı geciken kayıslarda olgunlaşma ilerlemiş olur. Bu durumda hasat ve taşıma sırasında meyveler bozulmaya başlar ve pazarda bekleme süreleri azalır.

Kurutmalık kayıslarda ise hasat biraz geciktirilerek yapılır. Bu gecikmenin sebebi meyvedeki kuru madde miktarının biraz daha yükselmesinin istenmesidir. Ancak meyvenin kendiliğinden düşecek kadar olgunlaşmasına ve yumuşamasına izin verilmeden hasat yapılmalıdır. Kurutmalık kayısılar tam olgunlaştığı zaman hasat edilirse kurutma randımanı ve kalitesinde düşüşler meydana gelir. Hasat çok geciktirildiğinde ise kurutma randımanı yükselir ancak kükürtleme sırasında sıra akar, şekil ve renk bakımında düşük kaliteli ürün elde edilir.

Genellikle sofralık kayısılar sert, kurutmalık kayısılar tam olgun, dondurulacak veya yakın pazara götürülecek sofralık kayısılar ise bu iki olgunluk derecesinde hasat edilmektedir (16).

Kayısı Hasat Yöntemleri

Kayısı ağaçlarından hasat yapılmada kullanılabilecek en uygun yöntem el ile yapılan hasattır. Bu yöntemde meyveler kirlenmeden temiz kalmakta ve olgunluk kontrol edilebilmektedir. Böylelikle olgunlaşmamış meyvelerin hasadının önüne geçilebilir. Ancak hasat döneminin kısa sürmesi ve büyük kayısı bahçeleri için yeterli iş gücü bulunamaması nedeniyle elle toplama yöntemi pratikte uygulanması zor bir yöntemdir.

Elle toplama yönteminin dışında ağaç dallarını silkeleme ve uzun sopalarla dalları çırpma yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Dallar çırpılarak yapılan hasat yönteminde sopalarla dallara vurulduğu için olgun meyvelerle birlikte ham meyvelerde dökülmekte ayrıca bir sonraki yılda meyve verecek olan gözler zedelenmektedir. Çırpma yönteminin bir diğer zararı da dallara vurulması ile açılan yaralardan zararlı bitki ve organizmaların gelişmesi için uygun ortam hazırlanmaktadır. Sonuç olarak çırpma yönteminin ağaca verdiği

zararlardan ötürü elle toplama yapılamayan büyük bahçelerde hasat dalların silkelenmesi suretiyle yapılmalıdır (17).

2.1.4.2. Yaş Kayısların Kükürtleme İşlemi

Kükürt dioksit (SO₂) meyve ve meyve ürünlerinin korunmasında oldukça yaygın olarak kullanılan ve ilk çağlardan beri bilinen en eski yöntemlerden biridir. Kükürtleme işlemi sırasında açığa çıkan SO₂ gazı meyvelerde meydana gelen renk değişimini engellemenin yanı sıra meyveleri hastalık ve zararlılara karşı korumaktadır. Kayısı meyvelerinin kükürtleme işlemi kükürtleme odası (islîm odası) denilen kapalı odalarda, kerevet üzerinde veya kasalar ile yapılmaktadır.

Kerevet Yöntemi ile Kükürtleme

Kerevetler 90x90 veya 90x180 cm ölçülerinde plastik veya kavak ağacı kerestesinden imal edilmektedir. Kerevetlerde çıtalar, yarım santimetre aralıklarla yerleştirilmiştir. Kayıslar kerevete tek bir sıra halinde dizilirler ve dizme sırasında yaralı, şekli bozuk, aşırı olgun veya ham kayıslar seçilir. Tek sıra halinde kayısı dizilen bir kerevet 30-32 kg kayısı taşıyabilir. Kerevet yöntemi ile kayısların toplam yüzey alanları arttırılır. Böylece daha az kükürtle homojen bir kükürtleme işlemi gerçekleştirilebilir (18).

Kasa Yöntemi ile Kükürtleme

Malatya ve civarındaki şehirlerde kükürtleme işlemi plastik veya tahta kasalara doldurularak yapılmaktadır. Kasalarla yapılan kükürtleme işleminde üst taraftaki meyveler yeteri kadar SO₂ gazı alırken orta ve alt kademedeki meyveler daha az SO₂ gazı almaktadır. Bu durumda kasalar kükürtleme odasından çıkmadan önce ikinci bir kükürtleme işlemi yapılmaktadır. İkinci kükürtleme sonrasında orta ve alt kademedeki meyveler yeterli SO₂ gazı alırken üst taraftaki meyveler fazla kükürt gazı almakta ve kuru kayısı randımanı düşmektedir (19). Bu nedenle kasa yöntemi ile kükürtleme işlemi bırakılmalı ve kerevet yönteminin kullanımı yaygınlaştırılmalıdır.

2.1.4.3. Kükürtleme Odasının Özellikleri

Kükürtleme odası eni ve boyu 2.5 m, yüksekliği 2.2 m ölçülerine sahiptir. Duvarları tuğla veya betondan yapılır ve 30 cm kalınlığındadır. Kapının ölçüleri 110x200 cm, contalı ve hava geçirmez bir yapıdadır. Belirtilen ölçülerdeki bir kükürtleme odasında tek seferde kerevetlerle 1200 kg, kasalarla 1500 kg yaş kayısı kükürtlenebilir.

Kükürtleme işleminde kullanılacak kükürdün yanması için bir kapta ısıtmak gereklidir. Toz kükürt 25-30 cm çapında ve 5-6 cm derinliğinde madeni bir kapta eritilir. Bu amaçla oda kapısının karşı duvarının ortasında bir kükürt ocağının yapılması gerekmektedir.

Kerevetler veya kasalarla yaş meyveler kükürt odasına yerleştirildikten sonra ocak üzerindeki madeni kaba bir miktar kükürt konularak ocak yakılır. Yanan ocağın üzerindeki kükürdün erimesi için kap içindeki kükürt karıştırılır. Kükürt eriyip mavi renk alınca bir kibrit ile erimiş kükürt tutuşturulur ve kükürt yanmaya başlayınca odadan dışarı çıkılarak kapısı kapatılır (20).

2.1.4.4. Kükürtleme İşlemi ve Süresi

Kükürtleme işlemi yaş kayısıların kapalı bir ortamda yakılan kükürtten oluşan SO₂ gaz atmosferinde belirli bir süre tutulmasıdır. Kükürtleme süresini kayısı çeşidi, meyve olgunluğu, meyvenin bütün ya da ikiye bölünmüş olması ve ortam sıcaklığı etkilemektedir. Kayısı meyvelerinin yeterli oranda kükürt dioksit gazı aldığı; meyve kabuğunun şeffaflaşması, meyve etinin içerisinde beyaz damar kalmayacak şekilde yumuşaması ve meyvenin 2/3'ünün pişmiş gibi bir görünüm kazanması ile anlaşılmaktadır. Bazı kayısı çeşitlerinin kükürtleme süreleri Tablo 2.2' de verilmiştir (21).

Tablo 2.2. Bazı kurutmalık kayısı çeşitleri için kullanılan kükürt miktarı ve kükürtleme süresi.

Kayısı Çeşidi	Olgunluk	Şekil	1 Ton Yaş Kayısıya	
			Kükürt (kg)	Süre (saat)
Hacı kız	Olgun	Tam	3	6
	Ham	Tam	2	4
	Olgun	İkiye ayrılmış	1	2
	Olgun	Tam	6	12
Hasanbey	Ham	Tam	5	10
	Olgun	İkiye ayrılmış	3	6
H. Haliloğlu	Olgun	Tam	4	8
Çöloğlu	Ham	Tam	3	6
Çataloğlu	Olgun	Çekirdeksiz tam	3	6

2.1.4.5. Kükürtlenen Kayıların Kurutulması

Kükürtlenmiş kayılar güneşte veya kurutma tesislerinde sıcak hava ile suni olarak kurutulmaktadır. Malatya ve civar illerde kayıların kurutulduğu Temmuz-Ağustos aylarında hava şartlarının uygun olması sebebiyle güneşte kurutma tercih edilmektedir.

Kükürtleme odasından çıkartılan kayıların kerevet üzerinde kurutulması en uygun yöntemdir fakat kerevet sayısı yetersiz ise meyveler 1-1.2 m genişlikte ve sık dokunmuş bezler üzerinde tek sıra halinde dizilerek kurumaya bırakılır. Kurutma yeri seçiminde doğrudan güneş ışığı alan ve meyvelerin kirlenmesine sebep olabilecek tozlu yollardan, sanayi tesislerinden, demir yollarından, çöplük ve ahırlardan uzak yerler tercih edilmelidir.

Kurutma sonrası kayısı meyvesinin su kaybetmesi ile bağlantılı olarak hacmi azalmakta ve kükürt oranı bir miktar artış göstermektedir. 2000 ppm kükürt oranına sahip şekerpare tipi kuru kayısı elde etmek için bir ton yaş kayısıya iki kilogram toz kükürt kullanılması yeterlidir (22).

2.1.4.6. Kurutulmuş Kayıların Depolanması

Usulüne uygun kurutulmuş meyvedeki su miktarı mikroorganizma faaliyeti için gerekli miktarın altına düşmekte ve böylece biyokimyasal süreçler yavaşlamakta sonuç olarak renk bozulması, tat ve besin değeri kayıpları azalmaktadır. Kurutulmuş meyvelerin kalitesini yüksek sıcaklık, ortamın nemi, havalandırma, ışık, böcekler, toz ve yabancı kokular etkilemektedir.

Kuru kayılardaki yüksek şeker içeriği dolayısıyla meyveler nem almaya yatkın hale gelmektedir. Ortam neminin ürünlerdeki nemden fazla olduğu durumlarda kuru meyveler dış ortamdan nem alır. Böyle bir durumda meyvelerde enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar hızlanmakta ve küf mantarlarının gelişmesi kolaylaşmaktadır. Kuru kayıların depolandığı ortamlarda nem oranı %20' nin altında olmalıdır. İdeal nem oranı %15' tir.

Depolama sırasında meyvede bulunan kükürdün bir bölümü parçalanarak veya doğrudan atmosfere verilerek kaybolmaktadır. Kayıdaki kükürt miktarı 1200-1500 ppm olduğunda böcek zararı başlamakta, doğal sarı renk kaybolup kararmalar ve esmerleşmeler meydana gelmektedir (23).

2.2. Koruyucu Gıda Katkı Maddeleri ve SO₂

Gıdalardaki mikroorganizmaların ölmesine neden olan veya mikroorganizmaların çoğalması ve faaliyetini önlemek amacı ile belli düzeylerde gıdalara katılan ve insan sağlığına zararı bulunmayan maddelere koruyucu (prezervatif) maddeler denir. Koruyucu maddeler gıda ögesi olmayıp gıdaya yabancı olan kimyasal bileşiklerdir ve bu maddelerin kullanılma miktarları daima sınırlıdır.

En fazla kullanılan koruyucu katkı maddeleri içinde benzoik asit, formik asit, nisin, borik asit, O-fenilfenol, difenil ve SO₂ bulunmaktadır. Bu maddelerin kullanım alanları gıdaların özelliklerine ve saklanma koşullarına göre değişmektedir (24).

2.2.1. Gıda Koruyucu Olarak SO₂

Bilinen en eski gıda koruyucu maddelerden biri olan SO₂, antioksidan özellikleri ve güçlü koruyucu etkileri sebebiyle meyvelerden elde edilen ürünlerin korunmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Şarap ve meyve suyu sanayisinde, marmelat üretiminde, elma, armut, şeftali, üzüm ve kayısı meyvelerinin kurutulmasında çeşitli kükürt tuzları kullanıldığı bilinmektedir.

SO₂ gıdalarda koruyucu olarak birden fazla şekilde etki etmektedir. Bu etkilerden ilkinin mikroorganizmalar üzerine ortamın pH değerini düşürerek meydana getirirken diğer taraftan hücre içi oksidasyon enzimlerini inhibe etmektedir. İkinci olarak SO₂ meyvelerdeki karbonil grubu ara ürünler ile reaksiyona girerek bu ürünlerin esmer renkli pigmentlere dönüşümünü bloke ederek göstermektedir. Bu reaksiyon sonucunda meyvelerdeki enzimatik olmayan esmerleşme engellenir. Koruyucu etkilerinin yanı sıra SO₂ aynı zamanda oksijen akseptörü görevi görerek antioksidan özellik de göstermektedir. Karotenoidlerin ve askorbik asitin kaybını sınırlandırmaktadır.

Kurutma teknolojisinde yukarıda belirtilen olumlu etkilerine karşılık SO₂'nin güçlü korozif etkileri, kurutulmuş üründe yabancı bir koku olarak devamlı hissedilmesi ve B1 vitamini süratle parçalaması gibi olumsuz yönleri de mevcuttur (25). Gerek bu sebeplerle gerekse insan sağlığına olan etkileri nedeniyle SO₂'in kullanımı sınırlandırılmıştır. 2011 yılında Avrupa Birliği gıda katkılarına dair düzenlemede kuru kayısıda izin verilen SO₂ miktarı 2000 ppm olarak belirlenmiştir (26).

2.3. Serbest Radikaller ve Etkileri

2.3.1. Serbest Radikallerin Özellikleri ve Oksidatif Stresin Oluşumu

Serbest radikaller, kabuğa yakın veya en dış orbitalinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron bulunduran ve bağımsız olarak meydana gelebilen atom veya moleküller olarak tanımlanmaktadır ve serbest radikaller normal hücresel metabolizmanın ürünleridir. Eşlenmemiş elektronlar sebebiyle serbest radikaller değişken, kısa ömürlü ve oldukça reaktiflerdir. Reaktif özellikleri sebebiyle serbest radikaller kararlı hale gelebilmek için hücrenin diğer bileşiklerinden elektron koparabilir ve elektronu koparılan bileşik radikal haline gelir. Bu durumla beraber zincirleme reaksiyonlar meydana gelmekte ve hücreler zarar

görmektedir. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) birlikte serbest radikalleri ve diğer radikal olmayan reaktif türleri oluşturmaktadır (27). Metabolizma sırasında üretilen ROS ve RNS türleri Tablo 2.3’de verilmiştir.

Tablo 2.3. ROS ve RNS türleri ve yarı ömürleri

Serbest Radikal	Yarı ömür
Reaktif Oksijen Türleri-ROS	
Radikaller	
Süperoksit	10^{-6} saniye
Hidroksil	10^{-10} saniye
Alkoksil radikali	10^{-6} saniye
Peroksil radikali	17 saniye
Radikal Olmayanlar	
Hidrojen peroksit	Kararlı
Singlet oksijen	10^{-6} saniye
Ozon	
Organik peroksit	Kararlı
Hipoklorik asit	Kararlı (dk)
Hipobromik asit	Kararlı (dk)
Reaktif Nitrojen Türleri-RNS	
Radikaller	
Nitrik oksit	Çevre şartlarına bağlı
Nitrojen dioksit	
Radikal Olmayanlar	
Peroksinitrit	10^{-3} saniye
Nitrozil katyon	
Nitroksil anyon	
Dinitrojen trioksit	
Dinitrojen tetraoksit	
Nitröz asit	
Peroksinitröz asit	Oldukça kararlı
Nitril klorit	

2.3.2. Serbest Radikal Kaynakları

Endojen veya eksojen kaynaklar serbest radikallerin meydana gelişini hızlandırabilirler. Endojen kaynaklı serbest radikal üretimi mitokondri, peroksizomlar ve endoplazmik retikulum gibi oksijen tüketiminin yüksek olduğu hücresel organellerde meydana gelmektedir. Organellerde meydana gelen ROS dışında prostaglandin sentezi, fagositik hücreler, bağışıklık hücrelerin aktivasyonu, yangısal durumlar, enfeksiyon gibi süreçler de ROS üretimine sebep olmaktadır.

2.3.2.1. Mitokondri

Hücre içi ROS' un büyük bir bölümünün kökeni mitokondridir. Ökaryotik hücrelerde üretilen ROS' un %90' dan fazlası mitokondri kaynaklıdır (28). Elektron transport sistemindeki iki büyük kompleks (kompleks I ve kompleks II) süperoksit radikali oluşumunda önemli roller oynamaktadır. Kompleks I ve II' den Koenzim Q' ya aktarılan elektronlar dolayısıyla Koenzim Q indirgenmektedir (QH₂). İndirgenmiş Koenzim Q, yeniden yükseltgenmiş hale geçmek için stabil olmayan semikinon anyon (Q⁻) oluşturmaktadır. Meydana gelen semikinon anyonu oksijene elektron aktararak süperoksit radikalinin oluşumuna yol açmaktadır. Süperoksit radikalinin oluşumu enzimatik olmayan reaksiyonlarla ilerlediği için metabolik faaliyetlerin yüksek olduğu durumlarda ROS oluşumu da artmaktadır.

Yukarıda anlatılanlarla beraber mitokondride ROS üretimine katılan monoamino oksidaz, α -ketoglutarat dehidrogenaz, gliserol fosfataz dehidrogenaz gibi enzimler de bulunmaktadır.

2.3.2.2. Peroksizomlar

Peroksizomlarda farklı metabolitlerden oksijene elektron transferleri gerçekleşmektedir ve H₂O₂ oluşmaktadır. Oluşan H₂O₂ oksidatif fosforilasyon ile ATP oluşturmak yerine ısı enerjisi olarak serbest bırakılmaktadır. H₂O₂ üretimini arttıran temel metabolik olay yağ asitlerinin beta oksidasyonudur (28).

Peroksizomlarda H_2O_2 ' nin yanı sıra O_2 , $OH\cdot$ ve $NO\cdot$ gibi radikaller de meydana gelmektedir. Farklı radikallerin oluşmasını sağlayan farklı enzimler peroksizomların bünyesinde bulunmaktadır.

2.3.2.3. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik retikulum bünyesindeki pek çok enzim ROS oluşumuna sebebiyet vermektedir. Ditiyollerden moleküler oksijene elektronların aktarımı yapan ve H_2O_2 oluşumuna sebep olan Erop1p enzimi buna örnek olarak verilebilir.

Endojen kaynaklarla birlikte serbest radikallerin oluşumuna sebep olan ekzojen kaynaklar da mevcuttur (28). Serbest radikal oluşumuna sebep olan ekzojen kaynakların bir kısmı Tablo 2.4' de verilmiştir.

Tablo 2.4. Serbest radikal oluşumuna sebep olan ekzojen kaynaklar

Hava ve su kirliliği	Ultraviyole ışınlar
Alkol	Yiyecekler (Yanmış etler, kullanılmış yağlar)
Tütün dumanı	İlaçlar (Halotan, Parasetamol, Metrenidazol)
Geçiş metalleri	Kimyasallar (CCl_4)
Ağır metaller	
Endüstriyel çözücüler	
Pestisitler	
Yüksek sıcaklık	

2.3.3. Serbest Radikallerin Moleküler Hedefleri

Antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kalması hücre içinde serbest radikallerin birikmesine yol açmaktadır. Söz konusu radikaller yüksek reaktif olmaları sebebiyle nükleik asitler, proteinler ve yağlar gibi üç temel hücre bileşenine de zarar verebilirler.

2.3.3.1. Deoksiribonükleik Asit (DNA)

Oksijen ve nitrojen radikallerinin ikisi de DNA hasarı oluşturabilir. ROS üretiminin merkezi olan mitokondri DNA' sını hücresel DNA' ya göre daha fazla hasarla karşılaşmaktadır. DNA üzerinde en fazla zarar oluşturabilen oksijen radikali, hidroksil radikali. Hidroksil radikali, DNA üzerindeki pürin ve pirimidin bazlarına, deoksiriboz şekerlere zarar vererek tek zincir veya çift zincir üzerinde DNA kırıklarına yol açabilmektedir. Hidroksil radikali pürin ve pirimidin bazlarından hidrojen atomu eksilmesine ve böylece modifiye bazların oluşmasına sebep olmaktadır (28). Tablo 2.5' de serbest radikal hasarına bağlı ortaya çıkan modifiye bazlar verilmiştir.

Tablo 2.5. Serbest radikal hasarı sonucu açığa çıkan modifiye bazlar

Timin glikol	5-formil urasil
Urasil glikol	Sitozin glikol
5-hidroksideoksi üridin	5,6-dihidrotironin
5-hidroksideoksi sitidin	5-hidroksi-6-hidro-sitozin
Hidantoin	5-hidroksi-6-hidro urasil
8-hidroksi deoksi guanozin	Urasil glikol
8-hidroksi deoksi adenozin	Alloksan
2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin	

Oksijen radikallerinin dışında nitroksil radikalleri, özellikle peroksinitrit, guanin ile etkileşime girerek 8-nitroguanin ve 8-oksodeoksiguanozin gibi modifiye bazlar meydana getirebilir. 8-nitroguanin oluşumu kanserle alakalı mutajenik bir lezyon olarak değerlendirilmektedir.

2.3.3.2. Ribonükleik Asit (RNA)

Tek zincirli yapıları, aktif onarım mekanizmalarının olmaması ve DNA gibi proteinlerle sarılı olmaması RNA'nın oksidatif hasara daha yatkın olmasını sağlamıştır. Bununla birlikte RNA'ların sitoplazma içerisinde mitokondriye yakın bulunmaları da hasar oluşumunu arttırmaktadır. Alzheimer, Parkinson gibi hastalıklarda ve miyopatilerde RNA hasarının rol oynadığı bildirilmiştir. 7,8-dihidro-8-okso-guanozin (8-oxoG) üzerinde en fazla araştırma yapılan RNA hasar ürünüdür (28).

2.3.3.3. Lipitler

Membran fonksiyonlarında akışkanlığın artması, membrana bağlı enzim ve reseptörlerin inaktivasyonu gibi bozukluklar meydana getirmesi sebebiyle lipit peroksidasyonu pek çok patolojik durumla ilişkili bulunmuştur. Serbest radikaller tarafından en fazla hasara uğrayan bileşikler poliansatüre yağ asitlerinin fosfolipit gruplarıdır.

Lipit peroksidasyonun oluşumu herhangi bir serbest radikalın bir yağ asidine saldırması ve metilen grubundan bir hidrojen çıkarmasıyla başlamaktadır. Bu reaksiyon sonucunda karbon merkezli lipit radikali (L[•]) meydana gelmektedir. Lipit radikali lipit peroksil radikali (LOO[•]) oluşturmak amacıyla moleküler oksijen ile reaksiyona girebilir. Oluşan lipit peroksil radikali sonunda lipit peroksidasyonunun zararlı bileşikler olan malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinenonal (4-HNA) oluşan bir dizi yeniden düzenlenme reaksiyonuna girmektedir (28).

2.3.3.4. Proteinler

Protein oksidasyonu radikal olan ve olmayan bileşikler tarafından oluşabilmektedir. ROS protein yapısında bulunan farklı aminoasitleri okside ederek çeşitli zararlar vermektedir. Bu zararları protein-protein çapraz bağları, proteinlerin denatüre edilerek fonksiyon kayıpları, reseptör ve taşıyıcı proteinlerin fonksiyon kayıpları şeklinde kendini göstermektedir. Metiyonin ve sistein gibi kükürt içeren aminoasitler ROS tarafından oksidasyona daha fazla uğramaktadır ancak biyolojik sistemlerde sadece bu iki aminoasit için onları doğal formuna dönüştürebilecek enzimler mevcuttur. Bu enzimler disülfid redüktaz ve metiyonin sülfoksit redüktazdır.

Farklı aminoasitler ROS kaynaklı saldırılar sonucu farklı oksidasyon ürünleri açığa çıkartmaktadır (28). Bu aminoasitler ve oksidasyon ürünlerine örnekler Tablo 2.6’ da verilmiştir.

Tablo 2.6. Farklı aminoasitlerden meydana gelen oksidasyon ürünleri

Aminoasit	Oksidasyon Ürünleri
Fenilalanin	2,3-dihidroksifenilalanin 2-hidroksifenilalanin 3-hidroksifenilalanin 4-hidroksifenilalanin
Tirozin	3-4-dihidroksifenilalanin Tirozin-Tirozin çapraz bağları Nitrotirozin
Histidin	2-oksohistidin
Asparjin, Aspartik asit, Arjinin	Glutamik semialdehit
Lizin	α -Aminoadipik semialdehit
Prolin	2-prolidon 4-hidroksiprolin 5-hidroksiprolin
Treonin	2-Amino-3-keto butirik asit
Lösin ve Valin	Hidroksil rezidüleri

2.4. Antioksidanlar

Antioksidan maddeler, bir ortamda okside olabilen herhangi bir maddeden daha az konsantrasyonda bulunurlar ve o maddenin okside olmasını geciktirir veya engellerler (29). Hem hücre içi sıvılarda hem de hücre dışı sıvılarda bulunan antioksidanların temel görevi serbest radikal hasarını engellemektir. Antioksidan savunma sistemleri kendi aralarında primer savunma sistemleri ve sekonder savunma sistemleri olarak ikiye ayrılırlar.

1. Primer (birincil) savunma sistemi: SOD, GPx, CAT gibi enzimler; A, C, E vitaminleri; glutatyon ve ürik asit gibi bileşikler birincil savunma sistemini oluşturur.

2. Sekonder (ikincil) savunma sistemi: Lipolitik enzimler, peptidazlar, proteazlar, DNA onarım enzimleri, ekzonükleaz, endonükleaz ve ligaz ikincil savunma sistemini oluşturur (30).

Antioksidanlar üzerinde yapılan ilk çalışmalarda bu maddelerin biyolojik zarlardaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu engellediğine dair sonuçlar bulunmuştur. Ancak günümüzde antioksidan maddelerin proteinler, lipitler ve nükleik asitler ile birlikte farklı makromolekülleri koruduğu bilinmektedir (31, 32).

Antioksidanların temel etkileri iki başlık altında toplanabilir:

A) Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

- 1- Oksijen radikallerini uzaklaştırır ya da oluşan radikalleri azaltırlar.
- 2- Radikal özellikli reaktif bileşenleri ortamdan uzaklaştırırlar.
- 3- Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırırlar.

B) Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

1- Toplayıcı (scavenging) etki: Toplayıcı özelliğe sahip antioksidanlar ortamda meydana gelen oksijen radikallerini bağlayarak onları bir başka moleküle çevirirler. Böylece ortamdaki radikal bileşik konsantrasyonunu azaltırlar. Antioksidan enzimler toplayıcı etkiye örnek olarak verilebilir.

2- Bastırıcı (quencher) etki: Bastırıcı etkinin temelinde ortamdaki radikal bileşiğin yapısına bir hidrojen iyonu eklenerek radikal etkinin azaltılması yatmaktadır. Bitkisel kaynaklı pekçok flavonoid ve vitaminler bu etkiye sahiptirler.

3-Onarıcı (repair) etki: Kimi antioksidanlar oksidatif hasara maruz kalmış molekülleri onarırlar.

4- Zincir kırıcı (chain breaking) etki: Zincir kırıcı antioksidanlar bir radikale elektron vererek veya bir radikalden elektron alarak radikal arasındaki bağları kırarak fonksiyon gösterirler (33).

2.4.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidan sistem elemanları daha kolay incelenebilmesi amacıyla farklı özellikleri göz önüne alınarak sınıflandırılabilir. Günümüzde antioksidan moleküller enzimler, suda çözünen radikal tutucuları, yağda çözünen radikal tutucuları ve metal iyonlarını bağlayan proteinler olarak gruplandırılmaktadır (Tablo 2.7).

Kaynaklarına göre antioksidan moleküllerin sınıflandırılması için organizmanın kendisinin sahip olduğu endojen kaynaklı ve dışarıdan özellikle bitkiler vasıtasıyla alınan eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere iki kavramdan bahsedilebilir (34). Endojen kaynaklı antioksidanlar Tablo 2.8' de özetlenmiştir.

Sonuç olarak sınıflandırmada meydana gelen farklılıklara rağmen antioksidan sistemin temel görevi radikal oluşumunu engellemek, oksidatif hasarı onararak hasara uğramış molekülleri temizlemek olarak açıklanabilir (32).

Tablo 2.7. Organizmada antioksidan sistem elemanları.

Enzimler	Süperoksit dismutaz Katalaz Glutasyon peroksidaz Glutasyon redüktaz Glutasyon transferaz
Suda çözünen Radikal tutucuları	Glutasyon Vitamin C Ürik asit Glukoz Sistein
Yağda çözünen radikal tutucuları	Vitamin E β -Karoten Bilirubin Ubikinol Flavonoidler
Metal iyonlarını bağlayan proteinler	Ferritin Transferrin Haptoglobin Seruloplazmin Albumin

Tablo 2.8. Doğal (endojen) antioksidanlar (35)

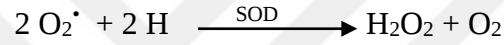
Antioksidanlar	Yapısı	Yerleşimi	İşlevi
Sitokrom oksidaz	Tetramerik protein	Plazma	Süperoksit nötralizanı
Süperoksit Dismutaz (SOD)	Cu,Zn, Mn SOD	Mitokondri, serum	Süperoksit'i H_2O_2 'ye çevirir
Katalaz (CAT)	Hemoprotein	Peroksizomlar	Peroksit nötralizanı
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Selonoprotein	Sitozol, mitokondri	Lipit peroksidasyonu ürünlerini indirger
Glutasyon redüktaz (GRx)	Dimerik protein	Sitozol, mitokondri	Disülfidleri indirger
α -tokoferol	Yağda çözünen vitamin	Membranlar, Ekstrasellüler ortam	Peroksidasyonu azalır
β -karoten	Vit-A prekürsörü	Hücre membranları	Peroksil temizleyicisi
Glutasyon (GSH)	Tripeptit	İntrasellüler ortam alveoller	Redoks substratı
Ürik asit	Okside pürin bazı	Geniş bir dağılım gösterir	Hidroksil toplar, Vitamin C'yi korur
Sistein	Amino asit	Geniş bir dağılım gösterir	Organik bileşikler indirger
Albumin	Protein	Plazma, serum	Serbest radikal giderici
Bilirubin	Hemoprotein ürün	Dolaşım kanı, dokular	Zincir kırıcı antioksidan
Serüloplazmin	Protein	Dolaşım kanı, dokular	Süperoksiti H_2O_2 'ye çevirir
Transferrin	Glikoprotein	Plazma	Demir iyonlarını bağlar
Laktoferrin	Protein	Plazma	Demir iyonlarını bağlar
Ferritin	Glikoprotein	Dolaşım kanı, dokular	Doku demiri bağlayıcısı
Askorbik asit	Suda çözülen vitamin	Hücre içi ve dışı sıvıları	Vitamin E'yi rejenere eder

2.4.1.1. Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz

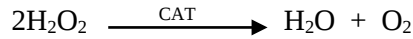
Endojen bir antioksidan olan Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimi, iki molekül süperoksit radikalini ($O_2^{\cdot}$) substrat olarak kullanarak reaksiyon sonucunda hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijen (O_2) açığa çıkartır (38, 39). Böylelikle oluşan $O_2^{\cdot}$ ortamdan uzaklaştırılmış olunur.

Antioksidan enzim olarak görev yapan iki farklı SOD mevcuttur ve bunların hücre içi yerleşimi farklılık göstermektedir. Yapısında bakır ve çinko bulunan SOD sitozolde bulunurken, mangan içeren SOD ise mitokondride yerleşmiştir (37).



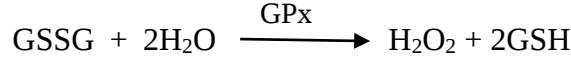
Katalaz (CAT)

Özellikle memeli eritrositlerinde yüksek miktarlarda bulunan bu enzimin yapısında 4 adet demir iyonu ve hem proteini bulunmaktadır. Bu nedenle CAT enzimi bir hemoproteindir. CAT antioksidan aktivitesini H_2O_2 'den su (H_2O) ve O_2 meydana getirmek suretiyle göstermektedir (40, 41).



Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz, hücrelerin sitozollerinde bulunan bir enzimdir. Hidroperoksitlerin indirgenmesinde rol oynar. GPx, sitozol ve mitokondrilerde SOD tarafından oluşturulan H_2O_2 ve yağ asidi hidroperoksitlerini yok eder. GPx, düşük H_2O_2 konsantrasyonunda çalışır. GPx enziminin selenyum bağımlı aktivite gösterdiği bilinmektedir (42).

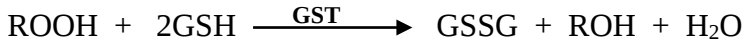


GPx, fagositik hücrelerde önemli işlevleri vardır. GPx ve diğer antioksidanlar, solunum sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu, fagositik hücrelerin zarar görmesini engellerler. Glutasyon Peroksidaz, eritrositlerde oksidan strese karşı en etkili olan antioksidandır (43).

Glutasyon-S-Transferaz (GST)

Glutasyon (GSH); glutamik asit, glisin ve sisteinden oluşan bir tripeptiddir. SH, sisteinin sülfidril grubudur ve molekülün alışveriş yapan bölümüdür. Ksenobiyotik metabolizmasında glutasyon, faz I enzimlerince oluşturulan reaktif ürünler ile konjugasyona girer. Bunun sonucunda reaktif ürünler hücre makromoleküllerine (DNA, RNA, protein) bağlanamaz ve hücre hasarı oluşmaz (44).

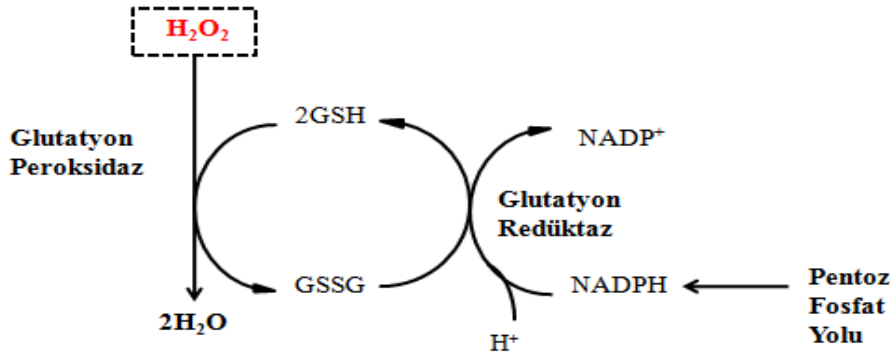
Glutasyon ve ksenobiyotiklerin reaksiyonunu gerçekleştiren enzimler, glutasyon- S-transferazlar (GST)' dir.



Glutasyon Redüktaz (GRx)

Glutasyon redüktaz flavin adenin dinükleotid (FAD) içerir. NADPH'tan bir elektronun GSSG'nin disülfid bağlarına aktarılmasında rol oynar. NADPH serbest radikal hasarına karşı koruyucu olduğu için önemlidir ve major kaynağı pentoz fosfat yoludur (45).

H₂O₂ indirgenmesiyle GSH oksitlenir. Glutasyon peroksidazın fonksiyonu için okside glutasyon tekrar indirgenir. Reaksiyon GSH redüktaz tarafından katalizlenir. Enzim NADPH bağımlı bir flavoproteindir (34). Glutasyon redoks döngüsü Şekil 2.1' de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Glutasyon Redoks Döngüsü

2.5. Flavonoidler

Flavonoidler çeşitli sebze, meyve ve otlarda bulunan polifenol grubu doğal kimyasallardır. Günlük diyetteki polifenolik madde içeriği anti oksidan ve radikal süpürücü özellikleri dolayısıyla önemlidir. Flavonoidlerin antioksidan özelliklerinin yanı sıra ortamda geçiş elementlerinin varlığında prooksidan özellik gösterdiği de bilinmektedir. Bitkilerde meyve ve çiçeklerde renk oluşumunu sağlayan, çevresel koşullara göre koruma görevini üstlenen flavonoidler; insanlarda antioksidan aktiviteleri ile radikal süpürücü olarak görev yapmaktadırlar. Flavonoidlerin temel faydaları şunlardır:

- Zararlı mikroorganizmaların fonksiyonlarını bozarak bakteri ve virüslere karşı koruma sağlarlar. Bağışıklık sistemini desteklerler.
- Damar endotelini koruyarak damar tıkanıklıklarını azaltıcı rol oynarlar.
- Allerjik reaksiyonların baskılanmasını sağlarlar.
- Enzim aktivitelerini düzenlerler ve anti kanserojen olarak görev üstlenirler.
- Fosfolipaz-A2, siklooksijenaz, lipooksijenaz enzimlerini inhibe ederek antiinflamatuvar özellik gösterirler.

Flavonoidler, önemli metal şelatörleri ve serbest radikal temizleyicisi gibi görev yaparlar. Flavonoid türleri kimyasal yapılarının farklılıkları ile birbirinden ayrılmaktadır ve söz konusu yapısal farklılıklar nedeniyle vücuttaki etkileri de farklılıklar göstermektedir.

Bütün flavonoidler 3' - 4' dihidroksi konfigürasyonu nedeniyle antioksidan aktiviteye sahiptir. Flavonoidler merkezde yer alan C halkasının oksidasyon düzeyine göre adlandırılırlar (46).

2.5.1. Flavonoid Çeşitleri ve Yapısal Özellikleri

Flavonoidler,

1. Flavanol
2. Flavanon
3. Flavon
4. İsoflavon
5. Flavonol
6. Antosiyanidin şeklinde gruplandırılırlar.

Yukarda belirtilen altı grubun kendine özgü yapısal farklılıklar mevcuttur. Bu yapısal farklar nedeniyle her grubun antioksidan ve radikal süpürücü etkileri değişiklik göstermektedir. Tablo 2.9' da flavonoid gruplarının yapısal özellikleri ve bulundukları gıdalar verilmiştir (46).

Tablo 2.9. Flavonoid gruplarının yapısal özellikleri ve bulundukları gıdalar

Flavonoid Altgrubu	B halkasının C halkası ile bağlandığı pozisyon	C halkasındaki doymamışlık	C halkasının fonksiyonel grubu	Önemli gıda flavonoidi	Bulunan gıdalar
Flavanol	2	Yok	3-OH 3-O-Gallat	(+)Kateşin (+)Gallokateşin (-) Epikateşin (-) Epigallokateşin (-) Epikateşin-3-gallat (-) Epigallokateşin-3-gallat	Çay, kırmızı üzüm, pekmez, şalgam suyu
Flavanon	2	Yok	4-Oxo	Eriodisitol Hesperetin Naringenin	Turunçgil suyu
Flavon	2	2-3 çift bağ	4-Oxo	Apigenin Luteolin	
İsoflavon	3	2-3 çift bağ	4-Oxo	Daidzein Genistein Glisetin Biosiyenin Formomentin A	
Flavonol	2	2-3 çift bağ	3-OH 4-Oxo	İsoramnetin Kampferol Mirisetin Kuersetin	
Antosiyanidin		1-2, 3-4 çift bağ	3-OH	Siyanidin Delfinidin Malvidin Pelargonidin Petunidin Peonidin	

2.5.2. Flavonoid kaynakları

Flavonoidler hemen hemen bütün bitkilerde ve bitki bazlı ürünlerde mevcuttur. Fakat flavonoid konsantrasyonu bitkinin olgunluğuna ve işleme yöntemine göre değişmektedir. Birkaç örnek verecek olursak antosiyanin; çilek ve kirazda, flavanone; limonda, flavanol; kırmızı üzüm, çay, çikolatada, flavanol; meyve ve sebzelerde yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Tablo 2.10’ da bazı sebzelerdeki flavonoid türleri ve göreceli miktarları verilmiştir (46).

Tablo 2.10. Bazı sebzelerdeki flavonoid türleri ve göreceli miktarları

	Flavonol Kuersetin Kampferol Mirisetin Isoramnetin	Flavon Apigenin Luteolin
Kuru fasülye	★	
Pancar	★	★
Brokoli	★ ★	
Lahana	★	★
Havuç	★	
Karnabahar	★	★
Salatalık	★	
Kara lahana	★ ★ ★	
Soğan (beyaz)	★ ★ ★	
Soğan (kırmızı)	★ ★ ★ ★	
Maydanoz	★	★ ★ ★ ★
Turp	★	
Taze bezelye	★	
Acı biber	★ ★ ★	★
Tatlı biber	★	★ ★ ★
Patates	★ ★ ★	
Ispanak	★	
Domates	★	

2.5.3. Flavonoidlerin Metabolizması

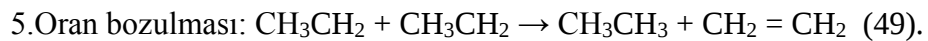
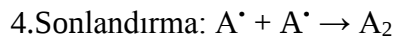
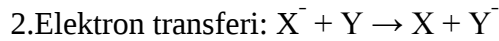
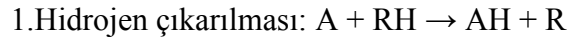
Flavonoidler sıcak asit ve enzimlerin etkisiyle aglikon ve şekerlere yıkımlanabilirler. İnsanlarda flavonoidlerin emilimi ve metabolizması ile ilgili farklı mekanizmaların var olduğu tahmin edilmektedir. Ratlardaki diyet çalışmalarında flavonoidlerin ancak %20'sinin bağırsaktan emildiği gösterilmiştir. Kateşinler oral alımı takiben bağırsaklardan absorbe edilirlerken kuersetinin emiliminin glukoz konjugasyonu ile arttığı belirlenmiştir. Naringin ve hesperidinin glikozid halinde veya glikozid bağlarının kırılarak aglikonlar şeklinde absorbe edildiğine dair bulgular mevcuttur.

Flavonoidlerin temel atılım mekanizmasında üriner sistem yer almaktadır. Vücuda alınan flavonoidler çeşitli hidroksiaromatik asitlere dönüştürülerek üriner sistemden atılmaktadır. Örneğin kateşinlerin temel üriner metabolitleri dimetilkateşin glukronidleri veya sulfametil kateşindir. Kuarsetinin üriner atılımı vücuda alınan miktarla ve süreyle artış göstermektedir (46).

2.6. Oksidatif Stres Oluşumu

Serbest radikaller hem normal şartlar altında hem de patolojik herhangi bir olay sonucunda meydana gelmektedir. Bu radikaller oluşmaya başladığı andan itibaren antioksidan savunma sistemleri devreye girerek doku hasarını azaltmaya çalışırlar. Oksidatif stres terimi en basit tabiriyle antioksidan sistemin serbest radikaller ile başa çıkamadığı durum olarak açıklanabilir (47). Oksidatif strese ait en karakteristik belirteç lipit peroksidasyonudur. Lipit peroksidasyonu biyolojik membranlarda yer alan doymamış yağ asitlerinden hidrojen uzaklaşması ile başlamaktadır (48).

Serbest radikale ait reaksiyonlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:



Oksidatif stresin organizmada kanser yatkınlığını arttırdığı bilinmektedir. Bu etkinin temelinde oksidatif stresin birden fazla sistemi etkilemesi yatmaktadır. Örneğin oksidatif stres hem DNA hasarına yol açıp hem de tümör süpresor genlerde mutasyonlara neden olarak hücrelerde kontrol dışı bölünmeleri tetikleyebilir. Böylece kanser oluşması için ilk adımlar atılmış olunur (50).

2.7. Karaciğer

2.7.1. Karaciğerin Kan Dolaşımı ve Damarlanması

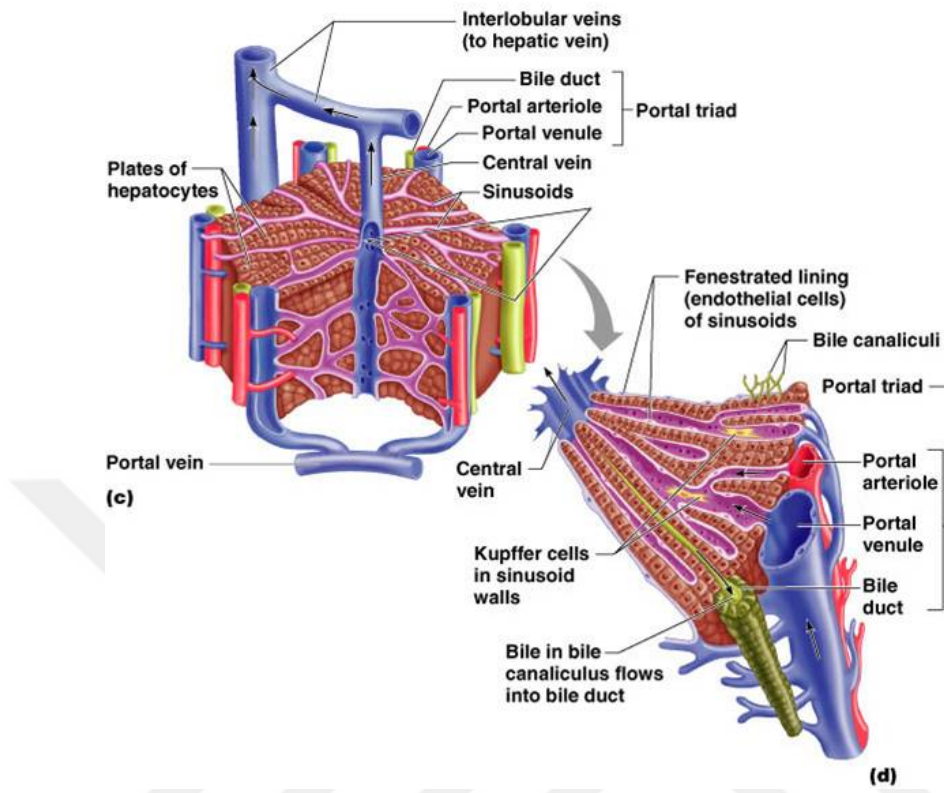
Karaciğerin kanlanması iki temel damar rol oynamaktadır. Bunlar:

1. Portal ven: Abdominal organlardan gelen oksijenden fakir, besinden zengin kan taşır,
2. Hepatik arter: Oksijenden zengin kan taşır.

Karaciğer lobülünde kan akımı çevreden merkeze doğrudur. Oksijen ve metabolitleri ile bağırsaklardan emilen diğer maddeler önce lobülün çevresindeki hücrelere, daha sonra merkezindeki hücrelere taşınır (51).

Arteriyel Sistem: Hepatik arter dokunun iç kısımlarına kadar dallanır ve lobüller arası arterleri meydana getirir (51). Hepatik arter, sistemik arteriyel kan taşır. Karaciğer kanlanmasının %25' ini, oksijenizasyonunun ise %30 – 50' sini karşılar. Ayrıca gastroduodenal arterden ve inferior frenik arterden de arteriyel beslenme olur (52).

Portal Ven Sistemi: Portal ven karaciğer içerisinde dallanarak portal alanlarda küçük portal venüller oluşturur. Portal venüller dallanarak dağıtıcı venleri oluşturur. Dağıtıcı venlerden çıkan giriş (inlet) venülleri, sinüzoidlere ulaşır. Sinüzoidler ışınal olarak ilerler ve birleşerek lobülün merkezinde santral ya da santrallobüler veni oluştururlar. Santral ven lopçuk boyunca ilerledikçe daha fazla sinüzoid alır ve çapı giderek büyür. Sonra lobülü terk eder ve daha büyük olan lopçuk altı venle birleşir. Lopçuk altı venler giderek birbirlerine yaklaşarak kaynaşırlar. Sonunda iki ya da daha fazla sayıdaki büyük hepatik venler meydana gelir. Bu venlerin hepsi vena kava inferiora açılır. Portal sistem pankreas ve dalaktan gelen kan ile bağırsaklardan emilen kanı taşır (51).



Şekil 2.2: Karaciğerin Yapısı (53).

2.7.2. Karaciğerin Fizyolojisi ve Fonksiyonları

Karaciğerin, sistemleri ilgilendiren önemli görevleri vardır. Karaciğerin temel görevleri şunlardır:

- Filtre fonksiyonu: Portal sistemde bağırsaklardan gelen mikroorganizmalar hepatik sinüslerde bulunan makrofajlar (kuppfer hücreleri) aracılığı ile filtrelenmiş olur. Sonuç olarak kan yolu ile gelen bakteriler ortadan kaldırılır.
- Metabolik fonksiyonu: Karaciğer karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmalarında görev alır. Vitamin, mineral ve glikojen gibi maddelerin depolanmasında görev alır. Ayrıca koagülasyon faktörlerinin sentezinde de görevlidir (54).
- Detoksifikasyon fonksiyonu: Hidrofilik olmamaları nedeniyle böbrekten atılamayan zararlı ürünler hepatositlerde oksidasyon ve konjugasyon yolu ile zararsızlaştırılır. Bunun için gerekli enzimler agranüler endoplazma retikulum membranlarında vardır.

- Kolesterol ve yağ metabolizması: Kolesterol, safra tuzlarının oluşmasında ve VLDL sentezinde kullanılır.
- Üre sentezi: Üre, protein ve nükleik asitlerin yıkımı sonucu amonyumdan oluşan bir maddedir.
- Plazma proteinlerinin sentezi ve endokrin sekresyonu: Glikoproteinler, albumin, lipoproteinler, protrombin, fibrinojen ve non-immun globülinler hepatositlerde üretilirler.
- Pek çok hormonun modifikasyonu: Tiroksin, büyüme hormonu, insülin, glukagon gibi hormonların modifikasyonunun yapıldığı yerdir.
- D vitamini metabolizması.
- Safra yapımı ve ekzokrin sekresyonu: Safra, bağırsaklarda absorpsiyona yardımcı olmak üzere çeşitli maddeler içerir. Safra; su ve elektrolitler, safra tuzları ve safra pigmentlerinden oluşur. Safra tuzları bağırsaklarda lipidleri emulsiyon haline getirerek, kolesterol ve lipidleri solusyon halinde tutan maddelerdir (55).

2.8. Kullanılan Parametreler İle İlgili Genel Bilgiler

2.8.1. IL-1B

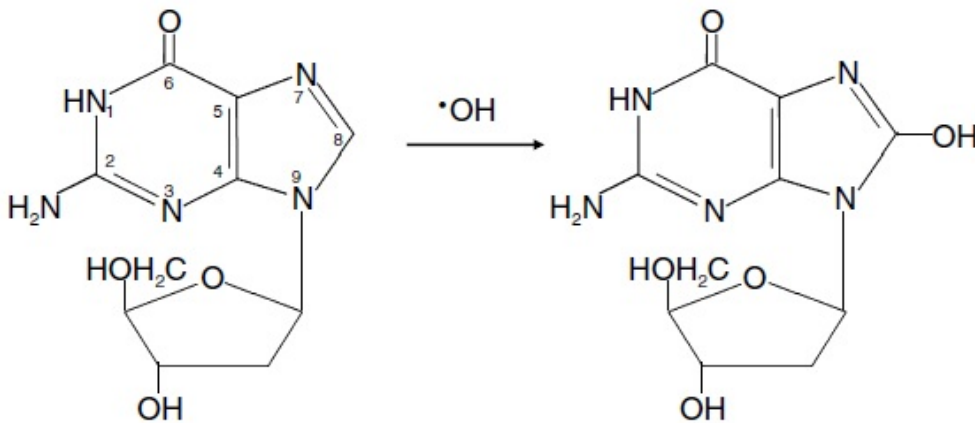
İnterlökin-1 (IL-1)' in en önemli kaynağı makrofajlardır ve rol oynadıkları temel mekanizma immunolojik ve yangısal cevabın oluşmasıdır. makrofajlardan başka endotel, düz kas hücreleri ve fibroblastlar da IL-1 salgılamaktadırlar. IL-1 immunolojik yanıtı T ve B lenfositlerin değişik açılardan gelişmesini, adhezyonunu, fonksiyonel aktivasyonunu, timik T ve B hücre prekürsörlerinin olgunlaşmasını sağlayarak aynı zamanda lenfokin ve lenfokin reseptörlerin sentezini arttırarak meydana getirmektedir. Ayrıca araşidonik asit metabolizmasının uyarılmasını, hepatositlerdeki akut faz proteinlerinin sentezini ve IL-2'nin artışıını sağlamaktadır (56).

2.8.2. 8-OHdG

Hasarlı DNA'nın replikasyonu, genetik mutasyon veya apoptoza sebep olduğu için oksidatif DNA hasarı oldukça tehlikelidir. DNA tamir sistemleri hasarlı bazları zincirden çıkartıp yerine yeni bazları ekleyebilirler. Zincirden çıkarılmış hasarlı bazlar kan akımına dahil olur ve metabolize edilmeden idrarla vücutu terk ederler.

Yüksek reaktiviteye sahip olan hidroksil radikali DNA hasarı oluşumuna en fazla katkıda bulunan radikal olarak düşünülebilir. Ancak sahip olduğu yüksek reaktivite nedeniyle hidroksil radikali, ancak kısa mesafeler kat edip organik bileşiklerle reaksiyona girerler. Bu nedenle hidroksil radikali ancak DNA'ya yakın bölgelerde oluştuğunda zarar verebilir. Hidroksil radikalının aksine hidrojen peroksit daha uzun mesafeler kat edebilir ve biyolojik membranlardan geçerek DNA'ya ulaşabilir. Hidrojen peroksit Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali oluşturur ve böylece DNA'ya zarar verebilir.

Guanin bazının oksidasyona en kolay uğrayan baz olmasının temel sebebi diğer bazlar içinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip olmasıdır. Hidroksil radikalının C-8 pozisyonundaki çift bağla reaksiyona girmesi sonucu 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) oluşmaktadır. 8-OHdG, insanlarda en fazla bulunan oksidatif DNA hasarı tamir ürünüdür ve oldukça stabil olan bu ürün oksidatif DNA hasarının gösterilmesinde kullanılmaktadır (57). Ayrıca guanin bazının oksidasyonu ile birlikte oldukça ciddi sonuçlara yol açabilecek G:C → T:A baz değişim mutasyonları meydana gelebilir (58).



Şekil 2.3. 8-OHdG Oluşumu.

8-OHdG'nin kan plazması ve idrara salınması iki mekanizma ile mümkündür. Birincisi, oluşan 8-hidroksi-2'deoksiguanozin tri-fosfat enzimatik olarak 8-hidroksi-2'deoksiguanozin mono-fosfat (8-OHdGMP)'a yıkımlanır. 8-OHdGMP'nin yıkımlanması ile 8-OHdG serbest kalarak kana ve kandan idrara aktarılır. İkinci mekanizmada ise nükleotid çıkarma tamir sistemi rol oynamaktadır. Bu sistemde oksidatif hasarlı bazları içeren bütün bir zincir parçası kesilip çıkartılmakta ve yerine karşı zincir bazlarına göre yeni zincir sentezlenmektedir (59). Bütün bir zincirin çıkarılması yerine hasarlı bazın çıkarıldığı baz çıkarma tamir sisteminde ise 8-oksoguanin DNA glikozilaz 1 enzimi temel rolü üstlenmektedir (60).

Alzheimer, artrit, aterosikleroz, katarakt, osteoporoz, Tip II diyabet, depresyon ve kalp yetmezliği gibi klinik durumlarda 8-OHdG seviyelerinde anlamlı değişiklikler meydana geldiği bildirilmiştir (61, 59, 57).

2.8.3. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit

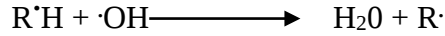
Serbest radikaller savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak düzeyde oluştuklarında organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Oksijen radikallerinin ilk hedefi poliansature yağ asitleri (PUFA)'dır. PUFA'nın oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinmektedir. Serbest radikal kaynakları plazma membranı ve hücre içi organellerde lipid peroksidasyonunu tetikler. Lipid peroksidasyon reaksiyonları ortamdaki Fe ve Cu gibi transizyonel metallerin varlığında katalizlenebilir. Bu zincirleme reaksiyon tüm yeni oluşan serbest radikaller tükeninceye kadar devam eder (62-66).

Lipid peroksidasyonu üç aşamada gerçekleşmektedir:

1. Başlangıç basamağı: Hız kısıtlayıcı basamak olup organizmada oluşan oksijen kaynaklı radikallerin membran yapısındaki PUFA'ya ait metilen (-CH₂-) grubundaki hidrojen atomunu koparması ile lipid peroksidasyonu başlar. Yağ asidinde mevcut olan çift C-H bağı zayıflatılarak H⁺ atomunun uzaklaştırılması kolaylaştırılmaktadır (63, 67-69).

İlk hidrojen atomunu kopartacak reaktivitedeki radikaller, hidroksil (OH), alkoksil (RO), peroksil (ROO) ve hidroperoksil (H₂O₂) radikalleridir. Süperoksit anyonu ve hidrojen peroksid daha az reaktif olduklarından bu reaksiyonu başlatamamaktadır. Bir H atomunun

uzaklaşması ile PUFA 'nın karbon zinciri doymamış lipid radikali (R[•]) haline gelir (70, 67, 63, 65).



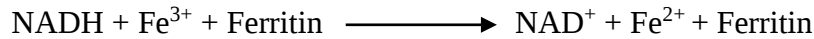
2. İlerleme basamağı: Lipid radikali kararsız olduğundan dien konjugasyonu ile bağların yeri değişir ve dien konjugatı oluşur. Oluşan dien konjugatı oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksil radikalini oluşturur (63, 67, 68, 69).



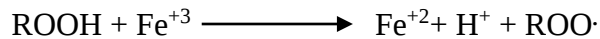
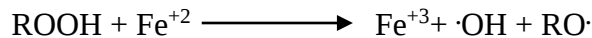
Oluşan lipid peroksil radikali diğer PUFA'nden hidrojen atomu kopararak lipid hidroperoksidi ve yeni lipid radikalini oluştururlar. Yani yeni zincir tepkimeleriyle bu dönüşüm defalarca tekrarlanarak lipid hidroperoksitlere dönüşür (63, 67, 68).

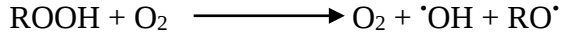


Reaksiyonun uzaması membrandaki lipid/protein oranına bağlıdır. Oluşan hidroperoksitler fizyolojik koşullarda kararlıdır. Fakat perhidroksil radikali, süperoksit anyonu, geçiş metal iyonları veya metal kompleksleri ile karşılaştıklarında parçalanabilmektedirler (62, 63, 69).



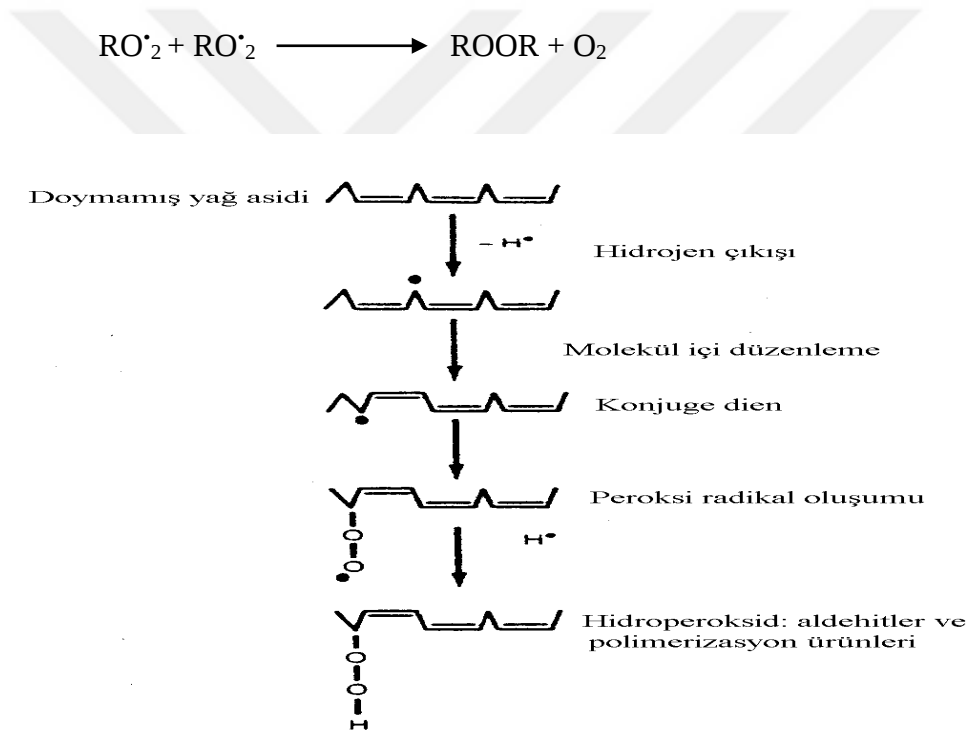
Redükte metal iyonları (Fe²⁺ ve Cu⁺) lipid hidroperoksidi ile reaksiyon vererek lipid alkoksil radikalini (RO[•]), okside metal iyonları ise (Fe³⁺ ve Cu²⁺) alkoksil ve peroksil (ROO[•]) (ROO[•], lipid aldehit, alkil radikaller vb.) radikallerini oluşturmaktadır (63, 66, 67).





Serbest radikallerin tiroid hastalıklarının patogeneğinde ve hastalığın ilerleyen safhalarında gözlenen komplikasyonlardan sorumlu olduğu bildirilmiştir (71).

3. Sonlanma basamağı: Lipid peroksidasyon zincir reaksiyonları, iki lipid peroksid radikali birbiriyle etkileşinceye (annihilasyon) kadar devam etmektedir. Sonuç itibariyle endo peroksid (ROOR) oluşmaktadır (Şekil 2.4) (63, 67, 69, 72).



Şekil 2.4. Bir poliansatüre yağ asidinin (PUFA) peroksidasyonu (67).

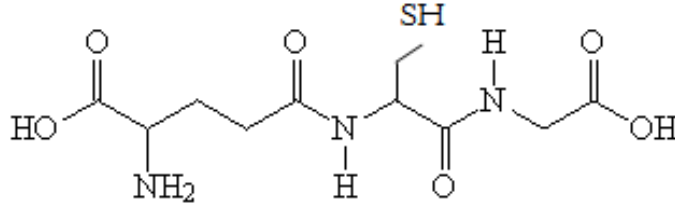
Lipid peroksidasyonu, karbon bağlarının kopması ile aldehid yapısındaki yıkım ürünlerinin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Oluşan 4-hidroksinonenal ve malondialdehit lipid aldehitleri (MDA) hücrenin farklı kısımlarına diffüz olabildiklerinden hasarın boyutunu atılabilirler. MDA protein tiyolleri ile reaksiyona girer. Lipid ve proteinler arasında çapraz köprüler oluşturarak hasara yol açar. Bunun sonucunda deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini

değiştirir. Bu etkiler MDA'nın mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar. Malondialdehit miktarının artması hasarın göstergesidir (66, 67, 69).

Aktif bir bileşik olan 4-hidroksinonenal ise trombosit agregasyonunu ve aktif adenilat siklazı inhibe eder (66, 67, 73).

2.8.4. GSH

Glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. Hücrede en fazla tiyol içeren yapıdır. GSH'nin moleküler yapısı Şekil 2.5.' da gösterilmiştir.



Şekil 2.5. GSH'nin moleküler yapısı (74).

GSH sentezinde kullanılan sisteinin kaynağı N-asetilsisteindir. Glutaminin glutaminaz ile hidrolizi glutamatın bir kaynağını oluştururken, diğer kaynağını ise α -ketoglutarat ile dallı zincirli aminoasitlerin transaminasyonu oluşturur. GSH'daki glutatyon radikali (GS^-) bir prooksidandır. İki GS^- birleşerek okside glutatyonu (GSSG) oluştururlar ve GSH redüktaz tarafından GSH'ya indirgenirler.

GSH doğrudan veya dolaylı olarak reaktif oksijen türlerini temizler. Hücresel oksidasyon-redüksiyonda önemli rol oynayan tiyol proteinleriyle etkileşir (75).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Ratların Temini

Bu çalışmada kullanılan Wistar albino türü 84 adet (42 adet dişi ve 42 adet erkek) rat, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Çalışma süresince İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu esaslarına uyuldu. 18 haftalık 205 ± 13 gram ağırlığında dişi ve erkek sıçanlar deney gününe kadar standart barınma kafeslerinde tutuldu. Deney boyunca içme suları günlük değiştirildi ve standart kafes temizliği yapıldı. Ratlar $24-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında, iyi havalandırılan ve 12şer saatlik karanlık/aydınlık ışıklandırmasına sahip odalarda barındırıldılar. Dişi ve erkek ratlar ayrı kafeslerde tutuldu ve kendi aralarında 6 gruba ayrıldı. İstatiksel anlamlılığın sağlanması amacıyla gruplar, her grupta 7 rat olacak şekilde tasarlandı. Yem alımının homojen olmasının istenilmesi sebebiyle her gruptaki ratlar bir kafeste en fazla iki rat olacak şekilde dağıtıldı. Deney boyunca yalnızca kontrol grupları ticari pellet yemle beslendi.

3.2. Deney Grupları

Deney grupları aşağıda belirtildiği şekilde düzenlendi:

1.Grup: Kontrol Grubu (n=14; 7 erkek, 7 dişi): Bu gruptaki ratlar ticari pellet yemlerle beslendi. 12.hafta içerisinde kanları ve karaciğer dokuları alınarak sakrifiye edildi.

2.Grup: Gün Kuru Kayısı Grubu (n=14; 7 erkek, 7 dişi): %10 oranında gün kuru kayısı ile hazırlanmış olan yemler adlibutum olarak verildi. 12.hafta içerisinde kanları ve karaciğer dokuları alınarak sakrifiye edildi.

3. Grup: 1000 ppm Kükürtlü Kayısı Grubu (n=14; 7 erkek, 7 dişi): %10 oranında 1000 ppm kükürt içeren kayısı ile hazırlanmış olan yemler adlibutum olarak verildi. 12.hafta içerisinde kanları ve karaciğer dokuları alınarak sakrifiye edildi.

4. Grup: 2000 ppm Kükürtlü Kayısı Grubu (n=14; 7 erkek, 7 dişi): %10 oranında 2000 ppm kükürt içeren kayısı ile hazırlanmış olan yemler adlibutum olarak verildi. 12.hafta içerisinde kanları ve karaciğer dokuları alınarak sakrifiye edildi.

5. Grup: 3000 ppm Kükürtlü Kayısı Grubu (n=14; 7 erkek, 7 dişi): %10 oranında 3000 ppm kükürt içeren kayısı ile hazırlanmış olan yemler adlibutum olarak verildi. 12.hafta içerisinde kanları ve karaciğer dokuları alınarak sakrifiye edildi.

6. Grup: 4000 ppm Kükürtlü Kayısı Grubu (n=14; 7 erkek, 7 dişi): %10 oranında 4000 ppm kükürt içeren kayısı ile hazırlanmış olan yemler adlibutum olarak verildi. 12.hafta içerisinde kanları ve karaciğer dokuları alınarak sakrifiye edildi.

3.3. Kükürt Oranı Belirli Kayısların Elde Edilmesi

Kayıslardaki kükürt miktarları TS 8131 standardına göre belirlendi.

Deneyin yapılışı: Üç boyunlu balona 150 ml saf su konuldu ve oluşturulan düzenekten 15 dk boyunca 30 kabarcık/dk akış hızında azot gazı geçirildi. D tüpüne 10 ml %3'lük hidrojenperoksit konuldu. Öğütülen örnekten 5gr, tartıldı ve üç boyunlu balonun içine konuldu. Örneğin üzerine 130 ml saf su ve 40 ml %15'lik HCl konuldu ve kapağı kapatıldı. Soğutucu suyu açıldı ve balon altındaki ısıtıcı çalıştırıldı. Kaynama başladıktan sonra yaklaşık 1 saat kaynatıldı. Bu sürenin sonunda D tüpü 200ml saf su ile bir erlene yıkandı. Üzerine 3 damla brom fenol mavisi eklendi ve 0,1 N NaOH ile renk sarıdan mavi menekşe rengine dönene kadar titre edildi.

Hesaplama:

$SO_2 \text{ (ppm)} = 3200 \cdot (V_{NaOH}) / m$ formülü ile kuru kayısının içerdiği kükürt miktarı bulundu.

V_{NaOH} : Harcanan NaOH miktarı

m: Tartılan kayısı numunesinin miktarı

ppm: mgSO₂/kg kuru kayısı olarak kayısıda kükürt oranı

3.4. Gün Kuru Kayısı ve Kükürtlü Kayısı İçeren Yemlerin Hazırlanması

Deney boyunca gün kuru ve kükürtlü kayıslar yeme %10 oranında karıştırıldı. Hazırlanan yemlerin beklemeye bağlı olarak kükürt oranlarının azalmasını minimuma indirmek amacıyla yemler her defasında 3 kg olacak şekilde hazırlandı. Bu amaçla önceden öğütülmüş ve +4 C°'de muhafaza edilmiş kayıslardan 300 g tartılıp üzerine toplam ağırlık 3 kg olana kadar (yaklaşık 2700 g) toz yem eklendi. Bir miktar su ilavesi ile karışım iyice homojenize olana kadar yoğruldu ve pellet makinesi yardımı ile tekrar pellet haline getirildi.

Makineden çıkan yaş pelletler kuruması amacıyla kartonlar üzerine tek sıra halinde serildi ve hava akımının kuvvetli olduğu serin odalarda kurumaya bırakıldı.

3.5. Kan ve Karaciğer Dokularının Elde Edilmesi ve Analizlere Hazırlanması

Çalışmanın 12. Haftasında ratlar genel anestezi altında sakrifiye edildi. Bunun için ratlara 5 mg/kg xylasine ve 50 mg/ kg ketamin intravenöz uygulanarak genel anestezi sağlandı. Ratların karın derisi ve deri altı dokuları bistüri ile açıldı. Barsaklar dışarı alınarak vena cava inferior'dan 5 ml' lik enjektörlerle kan örnekleri alındı. Kan alınan enjektörlerin iğne ucu çıkartılarak kanlar biyokimya tüplerine boşaltıldı. Tüpler soğutmalı santrifüjde 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serumlar eppendorf tüplerine küçük porsiyonlar halinde bölündü ve -80 C° derin dondurucuda laboratuvar analizlerinin yapılacağı güne kadar muhafaza edildi. Ratlardan alınan karaciğer dokusunun bir parçası histolojik inceleme için % 10' luk formaldehid içerisinde fikse edilerek saklandı. Karaciğer dokusunun geriye kalan parçası ise ikiye ayrılarak grup numaraları belirtilmiş alüminyum folyoya sarılarak plastik poşetlere konuldu. Doku numuneleri -80 C° derin dondurucuda homojenizasyon yapılacağı güne kadar saklandı.

3.5.1. Doku Homojenizasyonu ve Tamponları

Derin dondurucudan çıkartılan dokuların aktive kaybını en aza indirmek amacıyla homojenizasyon işlemi boyunca buz üzerinde çalışıldı. Alınan dokular yaklaşık 200 mg ağırlığında küçük parçalara ayrıldı. Tartılan dokular, içi buz dolu taşıma kaplarına yerleştirilmiş ve numaralandırılmış cam tüplere bırakıldı. Doku bırakılan tüplerin her birine sırayla 1ml Tris-HCl tamponu eklenerek homojenizatörle 16000 devir/dakika hızda 2 dakika homojenize edildi. Sonra 1ml daha Tris-HCl tamponu eklendi 1 dakika daha homojenize edildi. Bu işlem her bir tüp için ayrı ayrı uygulandı. Homojenizasyon işlemi bittikten sonra bütün tüpler 4000 rpm de +4°C 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra oluşan süpernatantlar eppendorf tüplerine porsiyonlanarak biyokimyasal parametrelerin ölçümü için kullanıldı.

Tris-HCl Tamponu:

0,2 M Tris (A): 24,23 g Tris alınıp bir miktar distile su içerisinde çözüldükten sonra toplam hacim distile su ile 1 L' ye tamamlandı.

0,1 N HCl (B): 8,3 ml HCl alınıp içerisinde bir miktar distile su bulunan balon joje içerisine eklendi. HCl eklenmesi esnasında balonjoje musluk suyu altında soğutuldu. Daha sonra son hacim distile su ile 1 L' ye tamamlandı.

Doku örnekleri uygun oranlarda karıştırılarak elde edilen 50Mm Tris-HCl (Ph:7.4) tamponda buz içerisinde, soğukta 16.000 devir/ dakika hızda 3 dakika homojenize edilmiştir. Homejenatların geri kalan kısmı, soğutmalı santrifüjde +4 °C' de 15 dakika süreyle 3500 rpm'de santrifüj edilerek elde edilerek süpernatant elde edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar eppendorf tüplerine porsiyonlanarak -80 °C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.6. Serum ve Karaciğer Doku Homojenatında TAS, TOS, OSİ, IL-1β, 8-OHdG, MDA ve GSH Analizleri

3.6.1. Total Oksidan Status (TOS) Aktivitesi Tayini

Serum ve karaciğer dokusu TOS aktivitesi Total Oksidan Status kiti (Rel Assay Diagnostics) kullanılarak çalışıldı.

Ölçümün prensibi: Örnek içinde bulunan oksidanlar ferröz iyon şelatör komplekslerini ferrik iyonlara çevirir. Oluşan ferik iyonlar kromojen solüsyonu ile renkli bir kompleks oluşturur ve oluşan bu kompleks örneklerdeki oksidan miktarıyla doğru orantılı olarak 530 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Ölçüm standardı olarak üretilmiş kitte mevcut olan 20 µmol H₂O₂ Equiv./L solüsyonu kullanıldı.

Sonuçlar µmol H₂O₂ Equiv./L olarak ifade edildi.

Reaktifler:

Ayraç 1 (Tampon solüsyonu) : 50 ml

Ayraç 2 (Substrat solüsyonu) : 10 ml

Standart (Stabilize Standart Solüsyon) : 5 ml. 20 µmol H₂O₂ Equiv./L konsantrasyona sahip.

Ölçümün Yapılışı:

1. 250 µl Ayraç 1 bütün kuyucuklara eklendi. Standart kuyucuğuna 37 µl standart, numune kuyucuklarına 37 µl numune eklendi. 530 nm’ de ilk okuma yapıldı.
2. Bütün kuyucuklara 12 µl Ayraç 2 eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk. çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 530 nm’ de ikinci okuma yapıldı ve sonuçlar hesaplandı.

Sonuçların hesaplanması:

Sonuç= (Δ Abs numune / Δ Abs standart 2) X Standart 2’nin Konsatrasyonu (20 µmol H₂O₂ Equiv./L)

Δ Numune absorbans: (Numunenin 2. absorbansı- Numunenin 1. absorbansı)

Δ Standart 2 absorbans: (Standart 2’ nin 2. absorbansı - Standart 2’ nin 1. absorbansı)

Standart 2 değer: 20 µmol H₂O₂ Equiv./L

3.6.2. Total Antioksidan Status (TAS) Aktivitesi Tayini

Serum ve karaciğer dokusu TOS aktivitesi Total Oksidan Status kiti (Rel Assay Diagnostics) kullanılarak çalışıldı.

Ölçümün prensibi: Örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalın dekolorize olması esasına dayanır. Bu dekolorizasyon örnekteki antioksidan moleküllerin konsantrasyonları ile doğru orantılıdır.

Standart olarak kit içerisinde bulunan ve E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanıldı.

Sonuçlar, mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edildi.

Reaktifler:

Ayraç 1 (Buffer Solüsyonu): 1× 50 ml

Ayraç 2 (ABTS Radikal Solüsyonu): 1× 10 ml

Standart 1 (Blank): Kitte mevcut değildir. Deiyonize su kullanılır.

Standart 2: (1.0 mmol Trolox E Equiv./L) Solüsyon 1× 5 ml

Ölçümün Yapılışı:

1. 250 µl Ayraç 1 bütün kuyucuklara eklendi. Standart kuyucuğuna 15 µl standart, numune kuyucuklarına 15 µl numune eklendi. 660 nm’ de ilk okuma yapıldı.

2. Bütün kuyucuklara 37 µl Ayraç 2 eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk. çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 660 nm’ de ikinci okuma yapıldı ve sonuçlar hesaplandı.

Sonuçların hesaplanması:

$$\text{Sonuç} = [(\Delta\text{Abs Std1}) - \Delta\text{Abs Numune})] / [(\Delta\text{Abs Std1}) - (\Delta\text{Abs Std2})]$$

Δ Absorbans Standart 1: (Std 1’ in ikinci absorbansı - Std 1’ in birinci absorbansı)

Δ Absorbans Standart 2: (Std 2’ nin ikinci absorbansı - Std 2’ nin birinci absorbansı)

Δ Numune Absorbans = (Numunenin ikinci absorbansı - Numunenin birinci absorbansı)

3.6.3. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Total Oksidan Seviye (TOS) / Total Antioksidan Seviye (TAS) bölünerek Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) hesaplandı. OSİ birimi, AU (Arbitrary Unit) olarak ifade edildi.

Oksidatif stres indeksini (OSİ) hesaplamak için:

$\text{OSİ} = \text{TOS} / (\text{TAS} \times 100)$ formülü kullanıldı.

3.6.4. IL-1β Seviyesi Tayini

IL-1β aktivitesi ticari Rat IL-1β ELISA Kit (SunRed) kullanılarak, çift antikor sandviç enzim işaretli sistemle (ELISA) Biotek ELx800 cihazında çalışıldı.

Ölçümün yapılması: Rat IL-1β monoklonal antikorlarla kaplanmış kuyucuklara 40 µl numune, 10 µl biyotinle işaretli IL-1β antikor ve 50 µl Streptavidin-HRP solüsyonu eklenerek 37 °C’de bir saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bağlanmayan bileşenlerin ortamdan uzaklaştırmak amacıyla kuyucuklar yıkama solüsyonu ile üç kere yıkandı. Yıkama işleminden sonra önce 50 µl Kromojen A solüsyonu ve daha sonra 50 µl Kromojen B solüsyonu eklenerek 37 °C’de 10 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklara 50 µl Stop solüsyonu eklendi. Stop solüsyonundaki asit sayesinde kuyucuklardaki mavi renk sarıya dönüştü. Oluşan sarı rengin optik dansitesi 450 nm’de ölçüldü ve numunelerde bulunan IL-1β konsantrasyonları pg/L olarak belirlendi.

3.6.5. 8-OHdG Tayini

8-OHdG aktivitesi hazır ticari Rat 8-OHdG ELISA Kit (SunRed) kullanılarak, çift antikor sandviç enzim işaretli sistemle (ELISA) Biotek ELx800 cihazında çalışıldı.

Ölçümün Yapılması: Rat 8-OHdG monoklonal antikorlarla kaplanmış kuyucuklara 40 µl numune, 10 µl biyotinle işaretli 8-OHdG antikor ve 50 µl Streptavidin-HRP solüsyonu eklenerek 37 °C’de bir saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bağlanmayan bileşenlerin ortamdan uzaklaştırmak amacıyla kuyucuklar yıkama solüsyonu ile üç kere yıkandı. Yıkama işleminden sonra önce 50 µl Kromojen A solüsyonu ve daha sonra 50 µl Kromojen B solüsyonu eklenerek 37 °C’de 10 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklara 50 µl Stop solüsyonu eklendi. Stop solüsyonundaki asit sayesinde kuyucuklardaki mavi renk sarıya dönüştü. Oluşan sarı rengin optik dansitesi 450 nm’de ölçüldü ve numunelerde bulunan 8-OHdG konsantrasyonları ng/mL olarak belirlendi.

3.6.6. MDA Analizi

Lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA’nın ölçümü Uchiyama ve Mihara yöntemi (76) ile bakılmıştır. Yöntem kısaca numuneler içerisindeki MDA’nın TBA ile 95°C’deki reaksiyonu sonucu oluşan pembe-kırmızı rengin absorbansının spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan rengin şiddeti ortamdaki MDA miktarı ile orantılı olarak artmaktadır. Ortamdaki n – butanole ekstrakt oluşturarak geçen serum MDA düzeyi spektrometrede 532 nm’de ölçülmüştür.

a. Kullanılan Reaktifler:

29 mmol/L TBA çözeltisi: 418 mg TBA 75 mmol NaH₂PO₄ 2H₂O çözeltisinde (1.170 gr tartılıp distile su ile 80 ml’ye tamamlanmıştır.) pH’ı 0,1N HCl ile 2.8’e ayarlanmış ve hacmi daha sonra 100 ml’ye tamamlanmıştır.

% 1,5 KCl çözeltisi: 1.5gr KCl tartılıp 100 ml distile suda çözülmüştür.

% 1 H₃PO₄ çözeltisi: 11.8 ml %85’lik H₃PO₄’den alınıp 1000 ml’ye distile su ile tamamlanmıştır.

Standartlar :

20 mmol/L stok standart solüsyonu hazırlamak üzere 329 µl 1,1,3,3-tetrametoksipropene etanolle 100 ml'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti + 4 °C'de 1 ay stabildir.

Standart ölçümü için 20 mmol/L stok standart solüsyonundan sırasıyla 10; 8; 6; 4; 2; 1; 0.5 µmol/L'lik seri dilusyonlar hazırlanmıştır. Numunelere uygulanan işlemlerin aynısı standartlara da uygulanmıştır.

b. Deneyin Yapılışı

Malondialdehit deney protokolü Tablo 3.1'de verilmiştir.

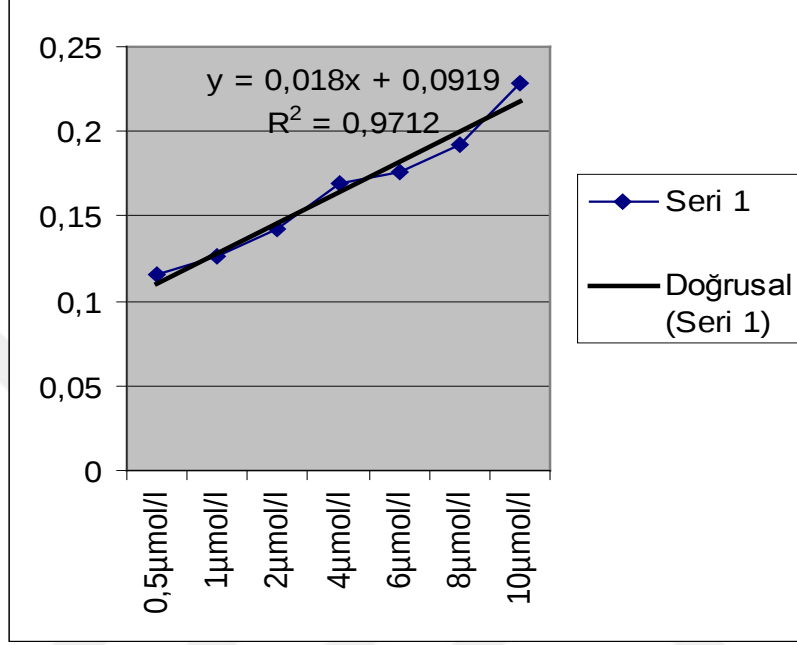
Tablo 3.1. Malondialdehit deney protokolü

	Numune	Standart	Kör
Distile Su	-	-	500 µl
Numune(Plazma)	250 µl	-	-
Standart	-	500 µl	-
KCl	250 µl	-	-
H ₃ PO ₄	3 ml	3 ml	3 ml
TBA solüsyonu	1 ml	1 ml	1 ml

Deney tüpleri 5 sn vortekslenmiştir. 100°C'de su banyosunda 45 dk inkübasyondan sonra buz banyosunda soğutulmuştur. Numunelerin her birine 4 ml n-bütanol ilave edildikten sonra en yüksek devirde yaklaşık 5 dk vorteks yapılmış daha sonra tüpler 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek üstte oluşan faz spektrofotometrede 532 nm'de okunmuştur.

c. Malondialdehit Aktivitesinin Hesaplanması: Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar, numunelerle aynı şartlarda çalışılmış ve standart grafiği çizilmiştir. Numune

absorbansları sulandırma faktörü olan 10 ile çarpıldıktan sonra standart grafiğinden elde faktörle de çarpılarak MDA miktarı nmol/L olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.1. MDA standart grafiği

3.6.7. GSH Analizi

Çalışmada glutatyon tayini Fairbanks ve Klee'nin geliştirdiği yöntemle göre yapıldı (77). Yöntem kısaca numuneler içerisindeki glutatyonda bulunan sülfidril gruplarının Elman ayırıcı ile reaksiyonu sonucu oluşan sarı renkli ürünün absorbansının spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi prensibine dayanmaktadır.

a. Kullanılan Reaktifler:

Triklorasetik asit (Cl_3CCOOH) (% 10'luk): 27.25g TCA tartılarak 250 ml distile su içerisinde çözüldü.

Sodyum Hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) Çözeltisi (0.3M): 21.8g Na_2HPO_4 tartılıp 200 ml distile suda çözüldü.

Trisodyum Sitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) Çözeltisi (% 1): 300 mg sodyum sitrat alınıp 30 ml distile suda çözöldü.

DTNB Reagent($C_{14}H_8N_2O_8S_2$) Çözeltisi: 12 mg DTNB reagent tartılıp hazırlanan trisodyum sitrat çözeltisi içinde çözöldü.

Standartlar

1000 μ mol GSH stok Çözeltisi: 31 mg GSH 100 ml distile suda çözöldü.

Standart ölçümü için 1000 μ mol stok standart solüsyonundan sırasıyla 500; 100; 50; 25; μ mol/L’lik seri dilusyonlar hazırlandı. Numunelere uygulanan işlemlerin aynısı standartlara da uygulandı.

b. Deneyin Yapılışı

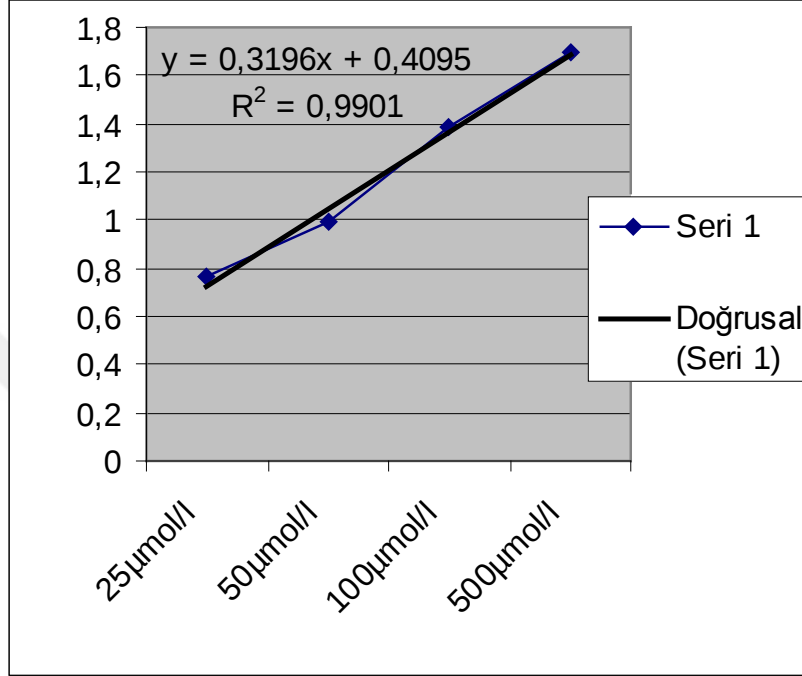
0.5 ml numune üzerine 0.9 ml TCA çözeltisi ilave edildikten sonra 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüplerin altındaki pellet hareket ettirilmeden süpernatantlar yeni tüplere alındı. Bu aşamadan sonraki deney protokolü Tablo 3.2’ de verilmiştir.

Tablo 3.2. Glutasyon deney protokolü

	KÖR	STD	Numune
Distile su	0.5 ml	-	-
Numune (Süpernatant)	-	-	0.5 ml
Standart	-	0.5 ml	-
0,3M Na_2HPO_4	4 ml	4 ml	4 ml
DTNB reagent	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml

Tüpler karıştırıldıktan sonra ağızları kapatılıp 10 dk karanlıkta bekletildikten sonra spektrofotometrede 410 nm’de köre karşı okuması yapıldı.

c. GSH Aktivitesinin Hesaplanması: Numune absorbansları standart grafiğinden elde faktörle de çarpılarak GSH aktivitesi $\mu\text{mol/l}$ olarak hesaplandı.



Şekil 3.2. GSH Standart grafiği

3.7. Karaciğer Dokusunun Histolojik Analizleri

Histolojik inceleme için karaciğer dokusu örnekleri % 10'luk formaldehit ile 48 saat süreyle oda ısında tespit edildi. Tespit işlemi sonrasında karaciğer doku örnekleri artan derecelerde etanol serilerinden (%50-%99) geçirilerek dehidratasyon, xylen serilerinden geçirilerek şeffaflandırma yapıldı. Daha sonra 62 °C erimiş parafin infiltrasyonunun ardından doku örnekleri parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom yardımıyla 6 μm kalınlığındaki kesitler lamalar üzerine alındı. Karaciğer kesitleri hematoksilin – eozin (H-E) ile boyandıktan sonra Nikon Optiphot-2 ışık mikroskobu, Nikon DS-Fi2 kamerave Nikon DS-L3 görüntü analiz sisteminde (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) ile incelenerek fotoğraflar çekildi.

Karaciğer kesitlerindeki histopatolojik değişiklikler; periportal inflamasyon, konjesyon ve hepatosit hasarı (piknotik nukleus, nukleus kromatolizisi, hepatosit nekrozu)

(0; yok, 1; hafif, 2; orta dercede, 3; şiddetli-yaygın), 0 ile 3 arasında maksimum toplam skor 9 olacak şekilde skorlandı.

3.8. Verilerin İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi

Yapılan bu deneysel çalışmada kükürt oranları farklı kuru kayısılar ve gün kurusu kayısı ile beslenen Wistar albino cinsi erkek ve dişi ratların serum ve karaciğer dokularında TAS, TOS, OSI, IL-1 β ve 8-OHdG düzeyleri araştırıldı.

İstatistiki anlamda verilerin değerlendirilebilmesi için öncelikle verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile kontrol edildi ve normal dağılımın mevcut olmadığı gözlemlendi. Bu durumda kullanılacak testler non-parametrik testler olarak belirlendi.

Verilerin özetlenmesi için tanımlayıcı ölçü olarak ortanca, minimum ve maksimum değerler kullanıldı. Grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis varyans analizi, gruplar arasında ikili karşılaştırmalar için ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi 0,05 olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

4.1.1. Serum ve Doku TAS Seviyeleri

Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kurusu kayısılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu TAS sonuçları Tablo 4.1' de ve Şekil 4.1' de gösterilmiş. En yüksek serum TAS değeri Gün Kuruşu grubunda elde edilirken karaciğer dokusu en yüksek TAS değeri 3000 ppm grubunda gözlemlenmiştir. En düşük değerler ise serum numunelerinde 3000 ppm grubundan, doku numunelerinde ise Gün Kuruşu grubundan elde edilmiştir.

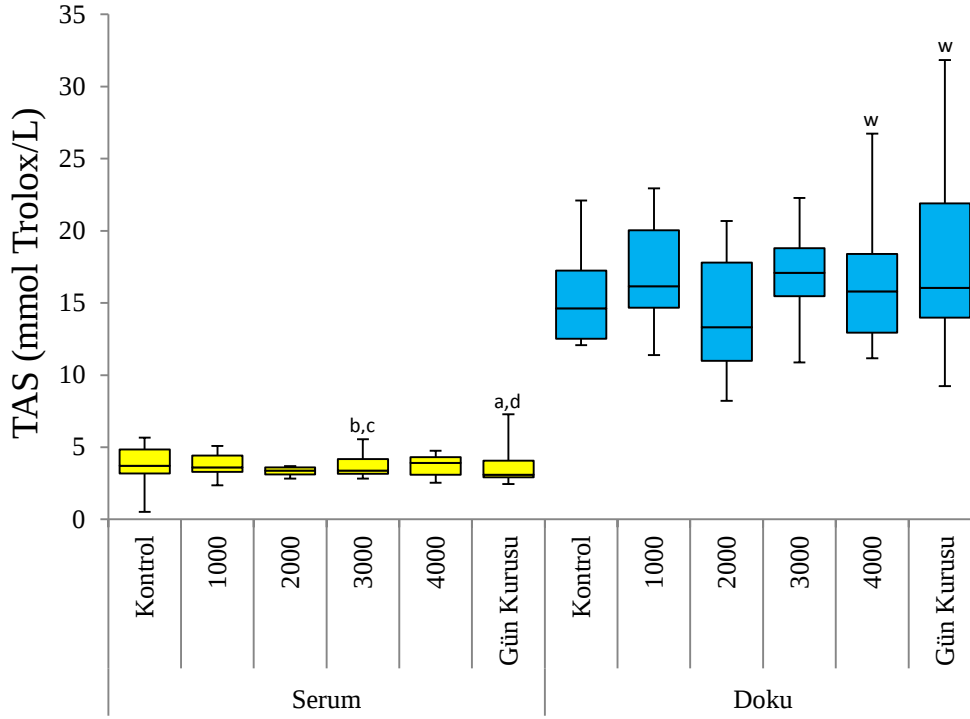
Gruplar arası karşılaştırmalar sonucunda serum numunelerinde Gün Kuruşu grubu TAS seviyesi, Kontrol ve 3000 ppm grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunurken; 3000 ppm grubu TAS seviyesinin, 1000 ppm ve 2000 ppm gruplarına kıyasla anlamlı derecede azaldığı gözlemlenmiştir. Karaciğer dokusu sonuçlarında ise 4000 ppm grubundaki ve Gün Kuruşu grubunda meydana gelen TAS seviyesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Tablo 4.1. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kurusu kayısılarla beslenen ratların serum ve doku TAS sonuçları

TAS (mmol Trolox/L)	SERUM					TAS (mmol Trolox/L)	DOKU				
	n	Median	Minimum	Maksimum	<i>p</i>		n	Median	Minimum	Maksimum	<i>p</i>
Kontrol	14	3.71	0.53	5.66	0.007	Kontrol	14	14.615	12.07	22.1	0.654
1000 ppm	14	3.60	2.35	5.08	0.006	1000 ppm	14	16.145	11.39	22.95	0.749
2000 ppm	14	3.38	2.83	3.69	0.442	2000 ppm	13	13.31	8.22	20.68	0.775
3000 ppm ^{b,c}	14	3.24	2.83	5.56	0.125	3000 ppm	14	17.085	10.88	22.27	0.565
4000 ppm	14	3.83	2.54	4.75	0.898	4000 ppm ^w	14	15.805	11.16	26.74	0.084
Gün kurusu ^{a,d}	14	3.96	2.45	7.29	0.609	Gün kurusu ^w	14	16.035	9.24	31.84	0.655

^ap<0,05, kontrole göre;^bp<0,05, 1000 ppm grubuna göre;^cp<0,05, 2000 ppm grubuna göre;^dp<0,05, 3000 ppm grubuna göre

^wp<0,05, 3000 ppm grubuna göre



Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kurusu kayısılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu TAS sonuçlarının karşılaştırılması.

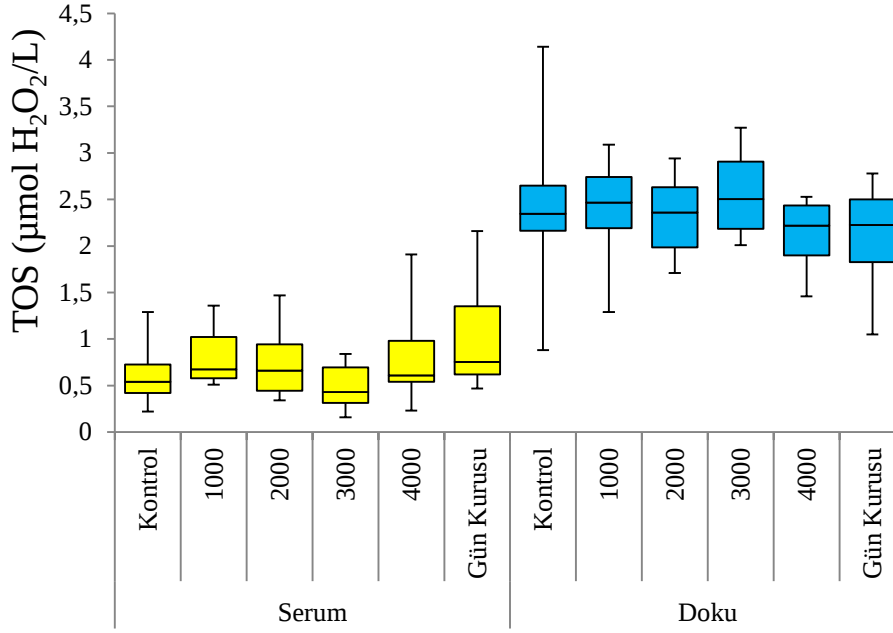
^ap<0,05, kontrole göre; ^bp<0,05, 1000 ppm grubuna göre; ^cp<0,05, 2000 ppm grubuna göre; ^dp<0,05, 3000 ppm grubuna göre; ^wp<0,05, 3000 ppm grubuna göre

4.1.2. Serum ve Doku TOS Seviyeleri

Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kurusu kayısılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu TOS sonuçları Tablo 4.2' de ve Şekil 4.2' de gösterilmiş. Elde edilen sonuçlara göre karaciğer dokusu en yüksek TOS seviyesi 3000 ppm grubu en düşük TOS seviyesi 2000 ppm grubunda gözlemlenmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalarda serum ve doku TOS seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir sonuç bulunmamıştır.

Tablo 4.2. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kurusu kayısılarla beslenen ratların serum ve doku TOS sonuçları

TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{L}$)	SERUM					TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{L}$)	DOKU				
	n	Median	Minimum	Maksimum	<i>p</i>		n	Median	Minimum	Maksimum	<i>p</i>
Kontrol	14	0.54	0.22	1.29	0.337	Kontrol	14	2.34	0.88	4.14	0.035
1000 ppm	14	0.67	0.51	1.36	0.002	1000 ppm	14	2.46	1.29	3.09	0.565
2000 ppm	14	0.66	0.34	1.47	0.014	2000 ppm	13	2.36	1.71	2.94	0.943
3000 ppm	14	0.43	0.16	0.84	0.848	3000 ppm	14	2.50	2.01	3.27	0.848
4000 ppm	14	0.61	0.23	1.91	0.848	4000 ppm	14	2.22	1.46	2.53	0.655
Gün kurusu	14	0.75	0.47	2.16	0.002	Gün kurusu	14	2.22	1.05	2.78	0.035



Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kuruğu kayısılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu TOS sonuçlarının karşılaştırılması.

4.1.3. Serum ve Doku OSI Seviyeleri

Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kuruğu kayısılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu TOS sonuçları Tablo 4.3' de ve Şekil 4.3' de gösterilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalarda serum numunelerinde Gün Kuruğu grubu OSI seviyesi, Kontrol ve 3000 ppm grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunurken; 3000 ppm grubu OSI seviyesinin, 1000 ppm ve 2000 ppm gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç TAS sonuçları ile ters orantı göstermektedir çünkü TAS seviyesi yüksek olan grupların OSI seviyelerinin düşük olması normal bir durumdur.

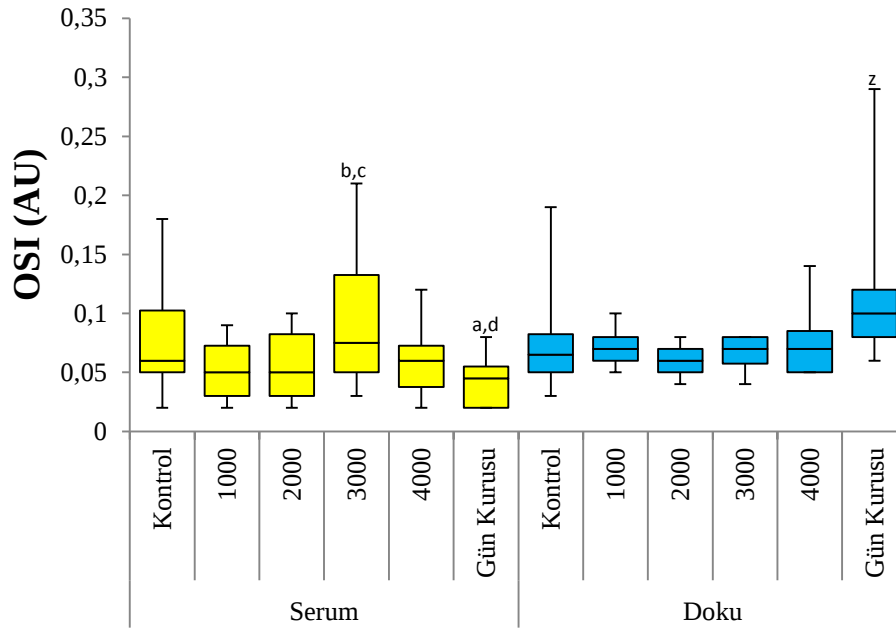
Karaciğer dokusu sonuçlarında ise sadece 2000 ppm grubu ile Gün Kuruğu grubu arasındaki değişiklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Tablo 4.3. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kurusu kayısılarla beslenen ratların serum ve doku OSI sonuçları

SERUM						DOKU					
OSI (AU)	n	Median	Minimum	Maksimum	<i>p</i>	OSI (AU)	n	Median	Minimum	Maksimum	<i>p</i>
Kontrol	14	0.06	0.02	0.18	0.030	Kontrol	14	0.06	0.03	0.19	0.033
1000 ppm	14	0.05	0.02	0.09	0.002	1000 ppm	14	0.07	0.05	0.10	0.596
2000 ppm	14	0.05	0.02	0.10	0.363	2000 ppm	13	0.06	0.04	0.08	0.770
3000 ppm ^{b,c}	14	0.07	0.03	0.21	0.246	3000 ppm	14	0.07	0.04	0.08	0.427
4000 ppm	14	0.06	0.02	0.12	0.898	4000 ppm	14	0.07	0.05	0.14	0.743
Gün kurusu ^{a,d}	14	0.04	0.02	0.08	0.021	Gün kurusu ^z	14	0.08	0.04	0.27	0.334

^ap<0,05, kontrole göre; ^bp<0,05, 1000 ppm grubuna göre; ^cp<0,05, 2000 ppm grubuna göre; ^dp<0,05, 3000 ppm grubuna göre

^zp<0,05, 2000 ppm grubuna göre



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kuru kayısılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu OSI sonuçlarının karşılaştırılması.

^ap<0,05, kontrole göre; ^bp<0,05, 1000 ppm grubuna göre; ^cp<0,05, 2000 ppm grubuna göre; ^dp<0,05, 3000 ppm grubuna göre; ^zp<0,05, 2000 ppm grubuna göre

4.1.4. Serum ve Doku IL-1 β Seviyeleri

Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kuru kayısılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu IL-1 β sonuçları Tablo 4.4' de ve Şekil 4.4' de gösterilmiş. Serum IL-1 β için en yüksek değer 1000 ppm grubu, en düşük değer Gün Kuru grubuna aittir. Gruplar arası karşılaştırmalar sonucunda 1000 ppm grubuna ait IL-1 β seviyesi Kontrol grubundan anlamlı derece yüksek olduğu; geriye kalan grupların IL-1 β seviyesinin 1000 ppm grubuna göre anlamlı derece azaldığı gözlemlenmiştir.

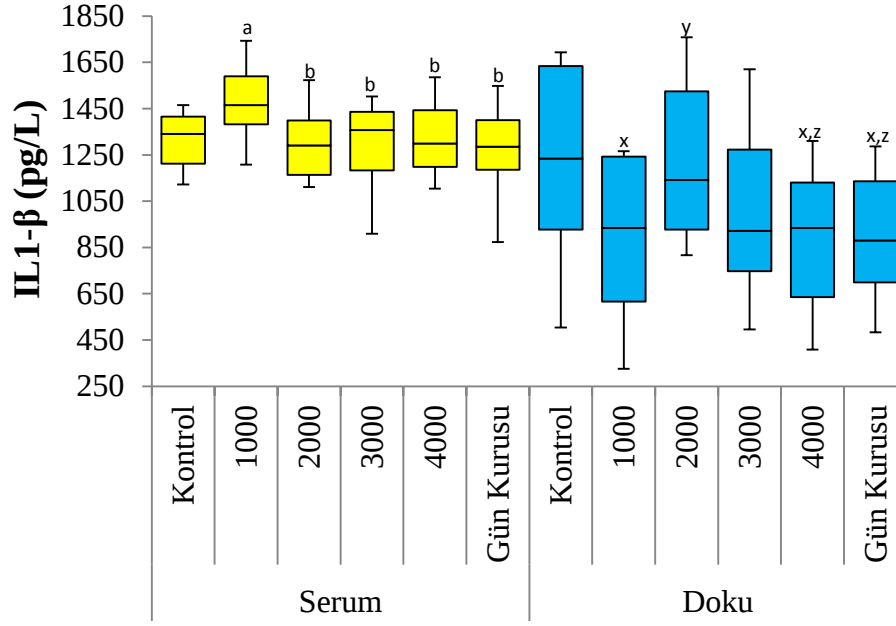
Karaciğer IL-1 β seviyeleri arasından en yüksek değer Kontrol grubu; en düşük değer Gün Kuru grubuna aittir. 1000 ppm, 4000 ppm ve Gün Kuru grupları Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük IL-1 β seviyelerine sahiptir. Aynı durum 2000 ppm grubu ile yapılan kıyaslamalarda da mevcuttur.

Tablo 4.4. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kurusu kayısılarla beslenen ratların serum ve doku IL-1 β sonuçları

SERUM						DOKU					
IL1-B (pg/L)	n	Median	Minimum	Maksimum	<i>p</i>	IL1-B (pg/L)	n	Median	Minimum	Maksimum	<i>p</i>
Kontrol	14	1341.17	1122.77	1465.74	0.025	Kontrol	14	1234.48	504.35	1693.10	0.013
1000 ppm ^a	14	1465.74	1208.30	1743.94	0.041	1000 ppm ^x	14	934.42	326.09	1265.52	0.225
2000 ppm ^b	14	1291.35	1110.89	1573.70	0.073	2000 ppm ^y	13	1140.98	816.39	1758.62	0.775
3000 ppm ^b	14	1357.78	908.91	1503.11	0.035	3000 ppm	14	922.13	495.65	1620.69	0.055
4000 ppm ^b	14	1299.65	1104.95	1586.16	0.025	4000 ppm ^{x,z}	14	934.42	408.70	1310.34	0.565
Gün kurusu ^b	14	1286.16	873.27	1548.79	0.002	Gün kurusu ^{x,z}	14	880.33	482.61	1286.21	0.798

^ap<0,05, kontrole göre; ^bp<0,05, 1000 ppm grubuna göre;

^xp<0,05, kontrole göre; ^yp<0,05, 1000 ppm grubuna göre; ^zp<0,05, 2000 ppm grubuna göre



Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kurusu kayısılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu IL-1 β sonuçlarının karşılaştırılması.

^ap<0,05, kontrole göre; ^bp<0,05, 1000 ppm grubuna göre; ^xp<0,05, kontrole göre; ^yp<0,05, 1000 ppm grubuna göre; ^zp<0,05, 2000 ppm grubuna göre

4.1.5. Serum ve Doku 8-OHdG Seviyeleri

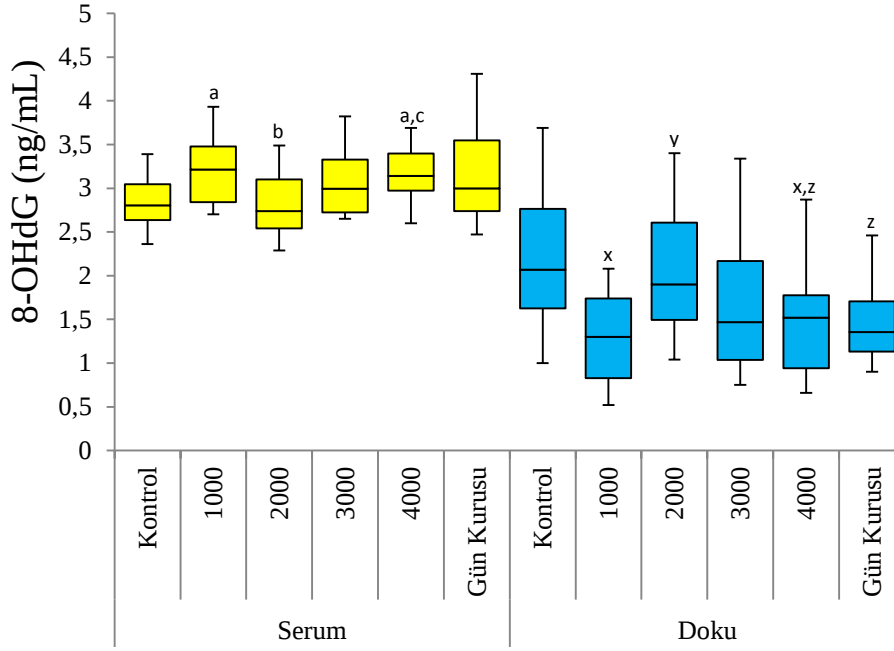
Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kurusu kayısılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu 8-OHdG sonuçları Tablo 4.5' de ve Şekil 4.5' de gösterilmiştir. Serum 8- OHdG sonuçlarından en yüksek iki değer 1000 ppm ve 4000 ppm gruplarından; en düşük iki değer ise Kontrol ve 2000 ppm gruplarından elde edilmiştir. 1000 ppm ve 4000 ppm grupları Kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek 8- OHdG seviyesine sahiptir. 2000 ppm grubunda meydana gelen 8- OHdG seviyesindeki azalma hem 1000 ppm grubuna hem de 4000 ppm grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır.

Karaciğer dokusu 8- OHdG seviyeleri açısından en yüksek sonuç Kontrol grubuna en düşük sonuç ise 1000 ppm grubuna aittir. Gruplar arası karşılaştırma sonuçlarında 1000 ppm ve 4000 ppm grupları Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük sonuçlara sahiptir. 2000 ppm, 4000 ppm ve Gün Kuru gruplarının sahip olduğu 8- OHdG seviyesi 2000 ppm grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur.

Tablo 4.5. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kurusu kayısılarla beslenen ratların serum ve doku 8-OHdG sonuçları

8-OHdG (ng/mL)	SERUM					8-OH (ng/mL)	DOKU				
	n	Median	Minimum	Maksimum	<i>p</i>		n	Median	Minimum	Maksimum	<i>p</i>
Kontrol	14	2.80	2.36	3.39	0.250	Kontrol	14	2.07	1.00	3.69	0.035
1000 ppm ^a	14	3.21	2.7	3.93	0.064	1000 ppm ^x	14	1.30	0.52	2.08	0.406
2000 ppm ^b	14	2.74	2.29	3.49	0.898	2000 ppm ^y	13	1.90	1.04	3.40	0.199
3000 ppm	14	2.99	2.65	3.82	0.250	3000 ppm	14	1.47	0.75	3.34	0.025
4000 ppm ^{a,c}	14	3.14	2.60	3.69	0.124	4000 ppm ^{x,z}	14	1.52	0.66	2.87	0.484
Gün kurusu	14	3.00	2.47	4.31	0.013	Gün kurusu ^z	14	1.35	0.90	2.46	0.749

^ap<0,05, kontrole göre; ^bp<0,05, 1000 ppm grubuna göre; ^cp<0,05, 2000 ppm grubuna göre; ^xp<0,05, kontrole göre; ^yp<0,05, 1000 ppm grubuna göre; ^zp<0,05, 2000 ppm grubuna göre;



Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kuruğu kayısılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu 8- OHdG sonuçlarının karşılaştırılması.

^ap<0,05, kontrole göre; ^bp<0,05, 1000 ppm grubuna göre; ^cp<0,05, 2000 ppm grubuna göre; ^xp<0,05, kontrole göre; ^vp<0,05, 1000 ppm grubuna göre; ^zp<0,05, 2000 ppm grubuna göre.

4.1.6. Serum ve Doku MDA Seviyeleri

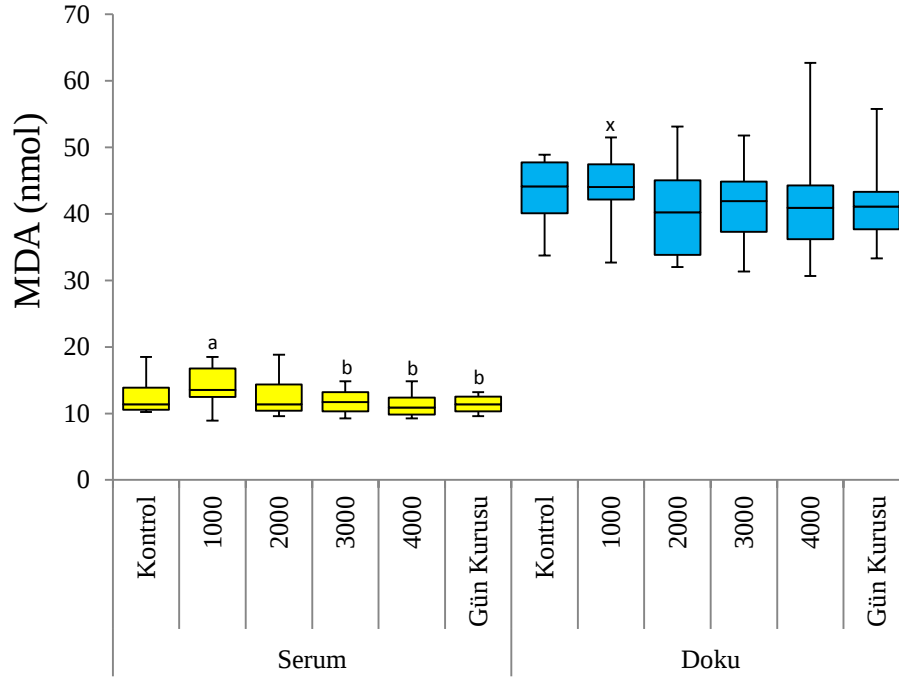
Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kuruğu kayısılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu MDA sonuçları Tablo 4.6' da ve Şekil 4.6' da gösterilmiş. Serumlardan elde edilen MDA seviyeleri arasında en yüksek değer 1000 ppm grubunda en düşük değer ise 4000 ppm grubunda elde edilmiştir. Kontrol grubuna göre tek fark 1000 ppm grubundaki MDA seviyesi yüksekliğidir. Bununla birlikte 3000 ppm, 4000 ppm ve Gün Kuruğu gruplarında MDA seviyesi 1000 ppm grubuna göre anlamlı derece düşmüştür.

Karaciğer MDA seviyeleri açısından da en yüksek değer 1000 ppm grubuna aittir. Gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı olan tek farklılık Kontrol grubu ile 1000 ppm grubu arasında gözlemlenmiştir.

Tablo 4.6. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kurusu kayısılarla beslenen ratların serum ve doku MDA sonuçları

	SERUM						DOKU				
MDA (nmol)	n	Median	Minimum	Maksimum	<i>p</i>	MDA (nmol)	n	Median	Minimum	Maksimum	<i>p</i>
Kontrol	14	11.38	10.23	18.38	0.010	Kontrol	14	40.09	29.70	44.88	0.482
1000 ppm ^a	14	13.53	8.91	18.48	0.798	1000 ppm ^x	14	44.05	32.67	51.48	0.608
2000 ppm	14	11.38	9.57	18.81	0.177	2000 ppm	13	40.26	32.01	53.13	0.253
3000 ppm ^b	14	11.71	9.24	14.85	0.442	3000 ppm	14	41.91	31.35	51.81	0.749
4000 ppm ^b	14	10.89	9.24	14.85	0.221	4000 ppm	14	40.92	30.69	62.70	0.655
Gün kurusu ^b	14	11.38	9.57	13.20	0.845	Gün kurusu	14	41.08	33.33	55.77	0.225

^ap<0,05, kontrole göre; ^bp<0,05, 1000 ppm grubuna göre; ^xp<0,05, kontrole göre



Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kuruğu kayısılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu MDA sonuçlarının karşılaştırılması.

^ap<0,05, kontrole göre; ^bp<0,05, 1000ppm grubuna göre; ^xp<0,05, kontrole göre

4.1.7. Serum ve Doku GSH Seviyeleri

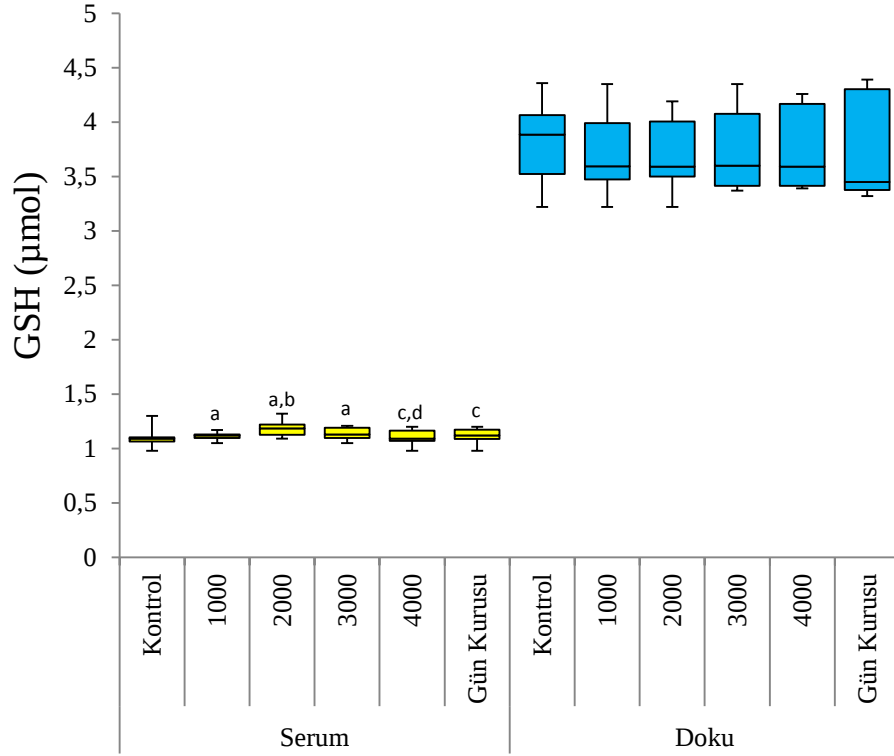
Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kuruğu kayısılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu GSH sonuçları Tablo 4.7' de ve Şekil 4.7' de gösterilmiş. En yüksek serum GSH seviyesi 2000 ppm grubunda gözlemlenirken en düşük seviye Kontrol ve 4000 ppm gruplarında eşit olarak ölçülmüştür. 1000 ppm, 2000 ppm ve 3000 ppm gruplarında Kontrol grubuna göre GSH seviyeleri anlamlı derecede artmıştır. Bununla birlikte 4000 ppm ve Gün Kuruğu gruplarında 2000 ppm ve 3000 ppm gruplarına göre anlamlı düşüşler gözlemlenmiştir.

Karaciğer dokusunda yapılan ölçümlerde en yüksek MDA seviyesi Kontrol grubunda; en düşük MDA seviyesi ise Gün Kuruğu grubunda bulunmuştur ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Tablo 4.7. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kurusu kayısılarla beslenen ratların serum ve doku GSH sonuçları

SERUM						DOKU					
GSH (μmol)	n	Median	Minimum	Maksimum	<i>p</i>	GSH (μmol)	n	Median	Minimum	Maksimum	<i>p</i>
Kontrol	14	1.09	0.98	1.30	0.949	Kontrol	14	3.88	3.22	4.36	0.064
1000 ppm ^a	14	1.12	1.05	1.17	0.399	1000 ppm	14	3.59	3.22	4.35	0.655
2000 ppm ^{a,b}	14	1.18	1.09	1.32	1.000	2000 ppm	13	3.59	3.22	4.19	1.000
3000 ppm ^a	14	1.13	1.05	1.21	0.405	3000 ppm	14	3.60	3.37	4.35	0.565
4000 ppm ^{c,d}	14	1.09	0.98	1.20	0.438	4000 ppm	14	3.57	3.39	4.26	0.522
Gün kurusu ^c	14	1.12	0.98	1.20	0.222	Gün kurusu	14	3.45	3.32	4.39	0.034

^ap<0,05, kontrole göre; ^bp<0,05, 1000 ppm grubuna göre; ^cp<0,05, 2000 ppm grubuna göre; ^dp<0,05, 3000 ppm grubuna göre

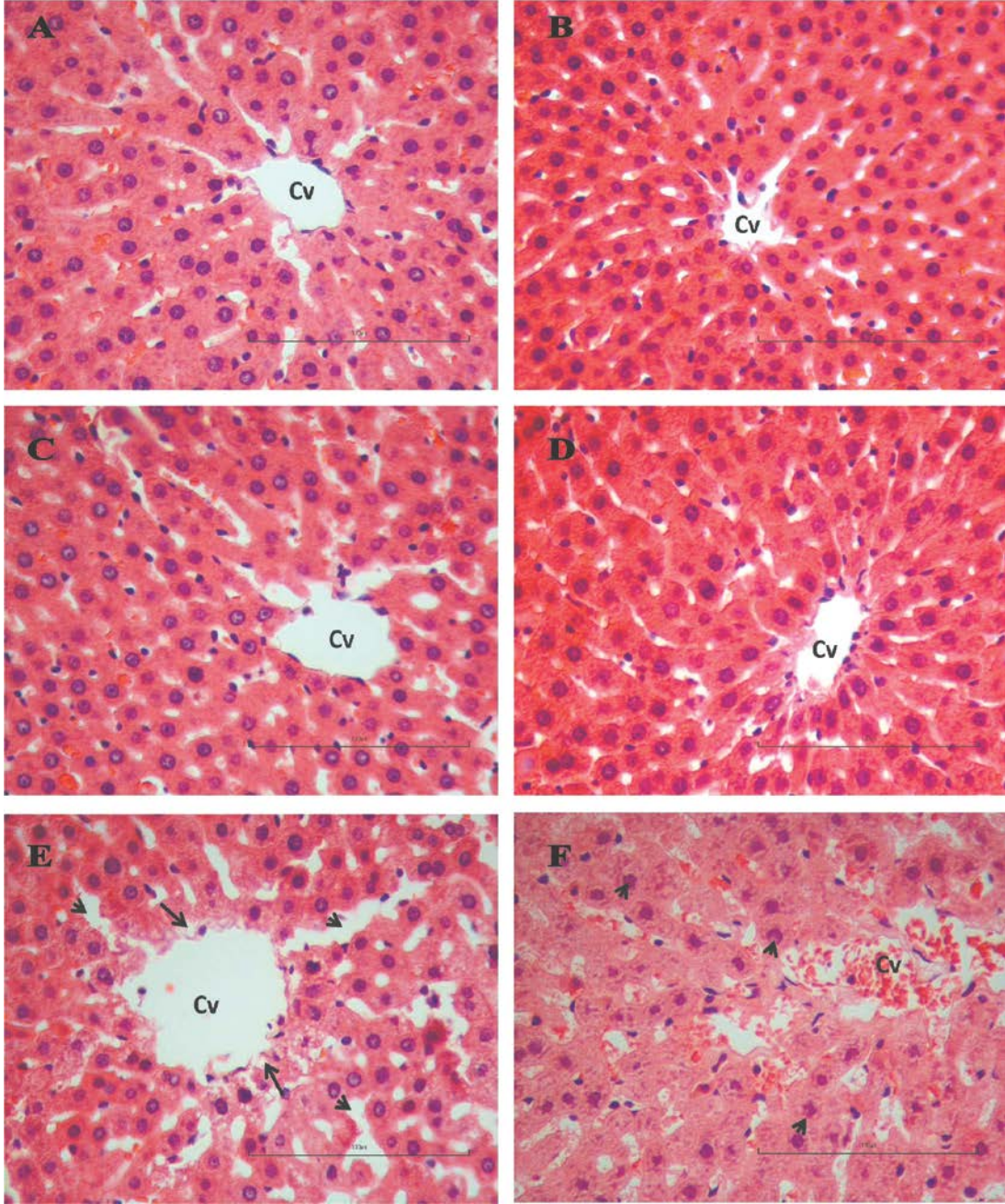


Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda kükürt içeren ve gün kurusu kayısılarla beslenen ratların serum ve karaciğer dokusu GSH sonuçlarının karşılaştırılması.

^ap<0,05, kontrole göre;^bp<0,05, 1000ppm grubuna göre;^cp<0,05, 2000ppm grubuna göre;^dp<0,05, 3000ppm grubuna göre

4.2. Histolojik Bulgular

Kontrol, Gün kurusu, 1000 ppm ve 2000 ppm gruplarında yapılan mikroskopik incelemede karaciğer kesitleri normal histolojik yapıda değerlendirildi. Karaciğer portal triad bağ dokusu, içerdiği arter ven ve safra kanalı yapıları ile hepatositler, sinuzoidler ve santral ven olağan yapıda izlendi. Ancak her dört gruba ait incelenen kesitlerde nadir olarak minimal düzeyde konjesyon izlendi.



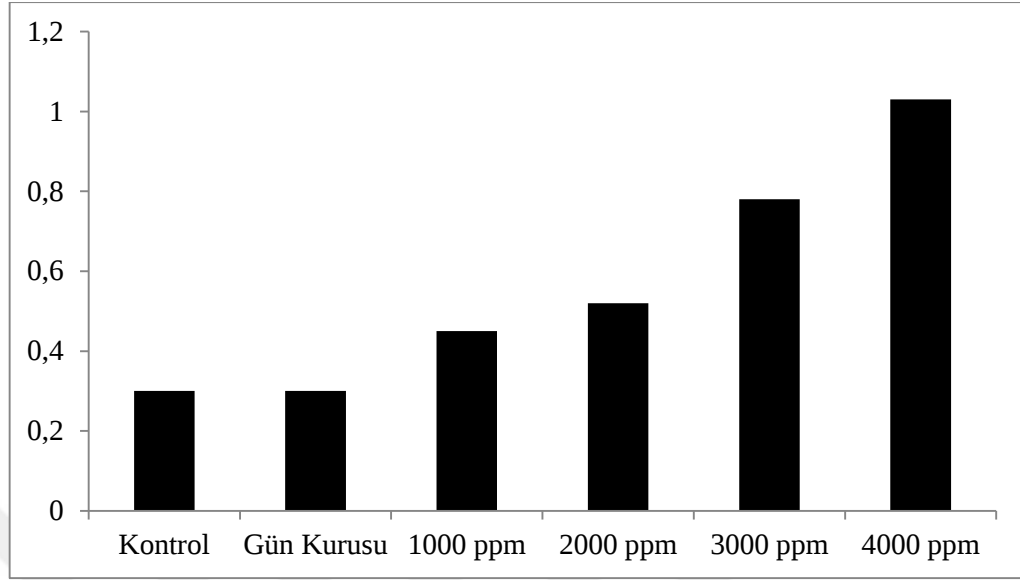
Şekil 4.8. Karaciğer santral ven (Cv) görüntüleri (40x büyütme). A. Kontrol grubu, B. Gün Kurusu grubu, C. 1000 ppm grubu, D. 2000 ppm grubu, E. 3000 ppm grubu santral ven hasarı (oklar) ve dilate sinuzoidler (ok başları), F. 4000 ppm grubu santral vende konjesyon ve hepatosit nukleuslarında kromatolizis (ok başları).

3000 grubuna ait karaciğer kesitlerinin histolojik incelenmesinde yer yer santral ven hasarı ile santral ven çevresi hepatositlerde nuklear kromatolizis ve az da olsa hepatosit hasarı izlendi. Karaciğer lobülleri merkezi bölgelerinde minimal düzeyde sinuzoidal dilatasyon saptandı. Periportal bağ dokusu alanlarda minimal düzeyde inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve vasküler konjesyon mevcuttu. Ayrıca hepatositlerde minimal düzeyde sitoplazmik eozinofili ve nuklear heterokromazi artışı gözlemlendi.

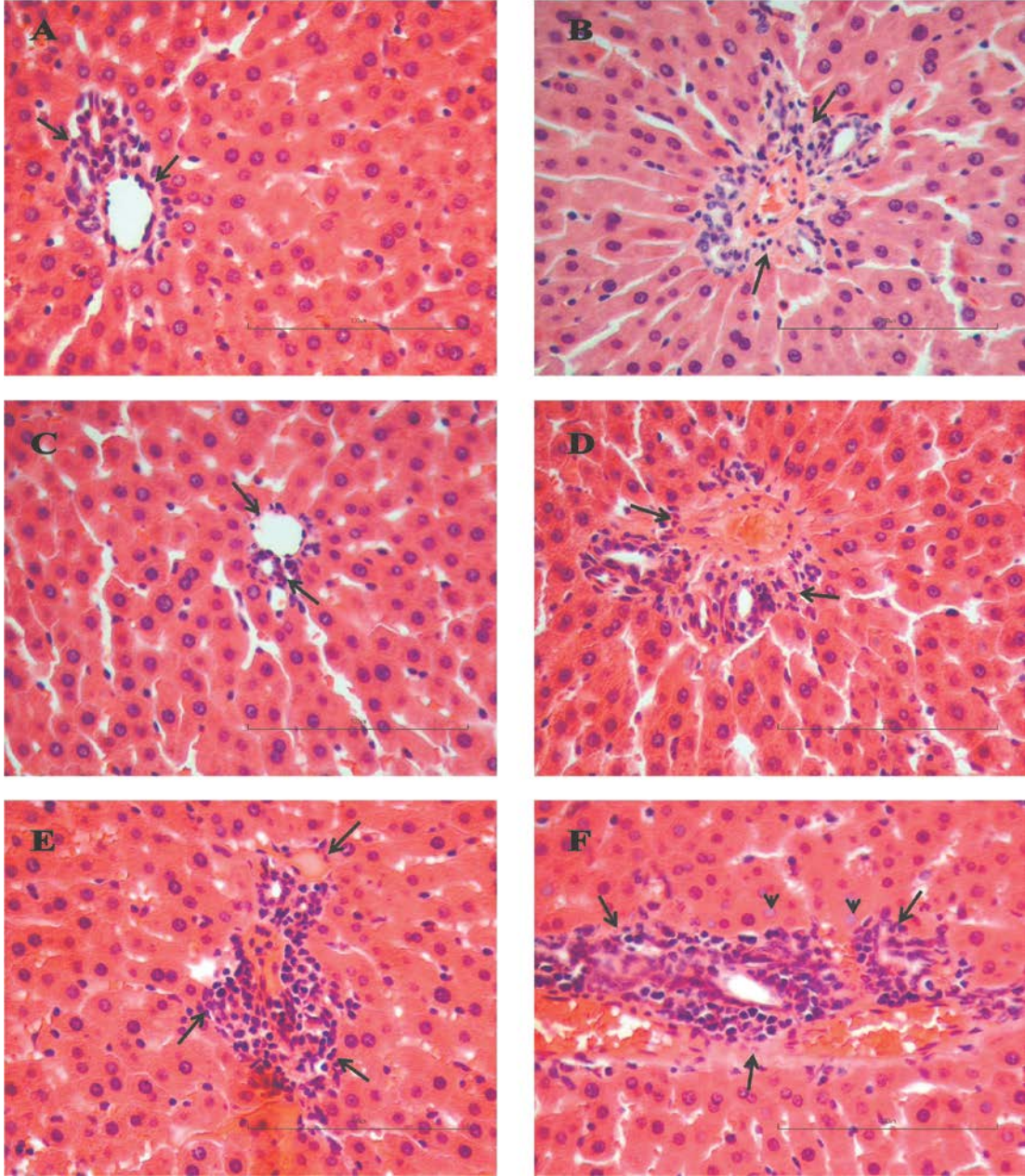
4000 ppm grubundaki karaciğer kesitlerinde santral ven hasarı, hepatositlerde yer yer yaygın nuklear kromatolizis ve heterokromatik-piknotik nukleus yapısı mevcuttu. Bazı kesitlerde karaciğer lobüllerinin merkezinde daha belirgin olmak üzere sinuzoidal dilatasyon saptandı. Periportal bağ dokusu alanlarda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve vasküler konjesyon izlendi.

Tablo 4.8. Karaciğer dokusu ortalama histolojik muayene skorları

Gruplar	Periportal İnflamasyon Skoru	Konjesyon Skoru	Hepatosit Hasarı Skoru	Toplam Hasar Skoru
Kontrol (n=14)	0.15	0.15	0	0.30
Gün Kurusu (n=14)	0.15	0.15	0	0.30
1000 ppm (n=14)	0.18	0.18	0.09	0.45
2000 ppm (n=14)	0.21	0.21	0.10	0.52
3000 ppm (n=14)	0.30	0.30	0.18	0.78
4000 ppm (n=14)	0.42	0.39	0.22	1.03



Şekil 4.9. Karaciğer dokusu toplam hasar skoru grafiği. Gruplar arasında karaciğer hasar skoru açısından istatistiksel olarak farklılık bulunmamıştır.



Şekil 4.10. Karaciğer portal alan (oklar) görüntüleri (40x büyütme). A. Kontrol grubu, B. Gün Kuruğu grubu, C. 1000 ppm grubu, D. 2000 ppm grubu, E. 3000 ppm grubu periportal alanda inflamatuvar inflamasyon ve vasküler konjesyon (oklar), F. 4000 ppm periportal alanda inflamatuvar inflamasyon ve vasküler konjesyon (oklar), hepatosit nukleuslarında kromatolizis (ok başları).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda farklı belirli konsantrasyonda kükürt içeren kayisılarla ve gün kurusu kayisılarla beslenen dişi ve erkek ratların serum ve karaciğer oksidatif stres parametreleri ile DNA hasarı belirteçleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar kükürtlü kayisıların oral alımının oksidatif stres ve DNA hasarını anlamlı derecede etkilemediğini göstermiştir.

Kükürtlü kayisılar ile ilgili makaleler genellikle işçi güvenliğini sağlamak amacıyla doğrudan SO₂ gazının solunması ile ilgili çalışmalar olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmalara göre kükürtleme işleminde çalışan işçiler 106-722 ppm arasında SO₂ gazına maruz kalmakta ve maruziyetten sonra bir saat içinde boğazda yanma, göz ve burun kaşıntıları, öksürük gibi semptomlar açığa çıkmaktadır (78). N.Köksal ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada SO₂ gazına bir saat süreyle maruz kalan işçilerin serum TNF- α , IL1- β , IL-6 ve IL-8 seviyeleri yükseldiği gözlemlenmiştir. Ancak yükselen TNF- α ve IL1- β seviyelerinin alveolar makrofajlardan tarafından salındığı ve akut akciğer hasarında erken salınan sitokinler oldukları için yüksek seviyelerin beklendiği belirtilmiştir (79). Gökırmak ve ark. SO₂ gazına maruz kalan işçilerin serum GPx, CAT ve SOD aktivitelerinde düşüşle birlikte MDA seviyelerinde yükselme gözlemlenmiştir (80). Uren ve ark. insan periferik lenfositlerini 0.1, 0.5 ve 1 ppm konsantrasyonunda SO₂ gazı ile muamele etmiş ve sonuçta SO₂ gazının kardeş kromatid değişiklikleri meydana getirdiği, mitotik indeks ve replikasyon indeksini arttırarak sitotoksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir (81). Adı geçen çalışmalar ile yaptığımız çalışmaların sonuçlarının birbirinden farklı olmasının temel sebebi kükürdün vücuda giriş yollarının farklı olmasıdır. Çalışmamız kükürtlü kayısı tüketiminin etkilerini araştırmayı amaçladığı için kayisıların yeme karıştırılarak ratlara oral yolla verilmesi en uygun ve doğal yoldur.

Kayisıların kükürtleme işlemine maruz bırakılmasının meyvelerde fiziksel ve kimyasal değişikliklere yol açtığı bilinmektedir. Kükürtleme işlemi ile total polifenol miktarı ile birlikte malik asit, sitrik asit ve β -karoten miktarlarının azaldığı belirtilmiştir (82). T. Kan ve S. Z. Bostan kükürt miktarının yüksek olduğu durumlarda kayisılardaki kateşin, epikateşin, rutin gibi flavonoidlerin miktarında azalmalar olduğunu gözlemlenmiştir (83). Söz konusu flavonoidlerin ve total polifenollerin azalması göz önüne alındığında

çalışmamızda kullanılan kayısılarda da aynı durumun meydana gelmesi olasıdır. Gruplar arasındaki farkların pek çok parametrede ortaya çıkmaması kayısıların antioksidan aktivitelerinde temel rol üstlenen bileşiklerin yıkımlanması olabilir.

Yılmaz, Karaman, Vardı ve ark. yapmış oldukları çalışmada hepatoktemi yapılan ratlara %5 oranında gün kurusu kayısıli yemler vermiş ve karaciğer enzimleri ile oksidatif stres parametrelerine bakmışlardır. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre %5 gün kurusu kayısı verilmesi gruplar arasında SOD, CAT, MDA, GPx seviyelerini anlamlı derecede etkilememiş sadece GSH seviyeleri yükselmiştir (84). B.Yurt ve İ.Çelik %20 etanol ile oksidatif stres oluşumunu indükleyerek ratlara %15 ve %30 oranlarında kükürtlü ve gün kurusu kayısıli yemler vermiştir. Çalışmadan elde ettikleri sonuçlara göre etanol verilmesi ile artış gösteren AST, ALT, LDH ve MDA seviyeleri kayısıli yemlerin verildiği gruplarda azalma göstermiştir (85). F. Öztürk ve arkadaşları karbontetraklorür (CCl₄) ile oluşturdukları karaciğer hasarında %10 ve %20 oranlarında kükürtlü kayısı vermiş ve karaciğer fonksiyon testleri (AST, ALT) ile oksidatif stres parametrelerini (MDA, CAT, SOD, GSH, GPx) gözlemlemiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre CCl₄ ile birlikte kayısıli yem alan gruplarda bütün parametreler artış göstermiştir (7). Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçların yukarıda bahsedilen sonuçlarla çeliştiği fikri bizce doğru değildir. Bahsi geçen çalışmaların deneysel tasarımında alkol ve kimyasal uyarıcılarla organizmanın normal işleyişi bozulmuş veya operasyonlar yapılmıştır. Bu durumlarda oksidatif stres parametrelerinin aşırı yükselişi ve kayısıların antioksidan etkilerini gözlemlemek daha kolay olmaktadır. Yapmış olduğumuz çalışmada ratların metabolizmasına hiç bir şekilde müdahale edilmemiş, böylece oksidatif stres parametrelerinde aşırı yükselme veya düşmeler görülmemiştir. Nitekim F. Öztürk ve ark. yaptığı çalışmada da yalnızca kayısı alan gruplardaki değerler kontrol grubuna oldukça yakındır (7). Bu sonuçlara göre aslında sağlıklı bir organizmada kükürtlü kayısının hayatı tehdit eden zararlar meydana getirmediği öngörülebilir.

Farklı miktarda kükürt içeren kayısıli yemlerle beslenen deney hayvanlarında biyokimyasal parametreler belirgin farklılıklar göstermemesine rağmen histolojik incelemelerin sonuçları aynı tabloyu yansıtmamaktadır. Mikroskopik bulgularda kayısıda bulunan kükürt miktarı arttıkça karaciğer hasarı puanlarının artmış olduğu gözlemlenmiştir. Fakat söz konusu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Yine de bu konuda göz

önünde bulundurulması gereken birkaç önemli hususa değinmek isteriz. Birincisi karaciğerde meydana gelebilecek en önemli patolojik değişiklik nekrozdur ve hiçbir deney grubumuzda nekroz olgusuna rastlanılmamıştır. Meydana gelen değişikliklerin hepsi zamanla kendiliğinden düzelebilecek yangısal değişikliklerdir. Bu anlamda yüksek kükürt miktarının karaciğer dokusu üzerinde hafif etkileri olduğunu ve dokuda kalıcı hasar bırakmadığını söyleyebiliriz.

Deney hayvanları üzerinde yapılan toksikasyon çalışmalarında çok daha düşük konsantrasyonlu toksik maddeler, karaciğer üzerinde ağır tahribatlara ve hasar puanlarının yükselmesine sebep olmaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz histolojik hasar puanlarının yükselişi pek çok toksik maddenin sebep olduğu artıştan daha düşüktür. Ayrıca bilindiği gibi deney hayvanları normal yaşamlarında kükürtle karşılaşmamaktadır. Dolayısıyla vermiş olduğumuz kükürtlü kayıslar deney hayvanlarının kükürtle ilk kez karşılaşmasına ve aşırı duyarlılık reaksiyonları göstermesine sebep olmuş olabilir. Deney hayvanlarının aksine insanoğlu yaşamı boyunca kükürt ve ya kükürt dioksit gazı ile dönem dönem karşılaşmaktadır ve kükürt miktarı yüksek besinlere karşı gösterecekleri reaksiyon daha ılımlı olacaktır.

Histolojik değişikliklerin biyokimyasal parametrelere yansımamış olması da çalışmanın tartışmaya değer diğer bir yanıdır. Bilindiği üzere biyokimyasal parametreler hücrelerde anlık değişebilir ve akut artışlar meydana geldikten sonra hücreler mevcut duruma adaptasyon gösterebilirler. Çalışmamızda karaciğer dokusu biyokimyasal parametrelerinin hepsi serum sonuçlarından yüksek olmasına rağmen grupların kendi aralarında karşılaştırılmasında farklılıkların az oluşu bu adaptasyon sonucu ortaya çıkmış olabilir. Ayrıca biyokimyasal parametrelerde meydana gelen anlık değişikliklerin aksine morfolojik değişimlerin için daha uzun zamana ihtiyaç vardır. Bu sebeple doku hasar puanları arasında istatistiksel farklılık gözlemlenmemiş olabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada farklı miktarda kükürt içeren ve gün kurusu kayısı ile beslenen ratlarda oksidatif stres parametrelerindeki değişimi araştırdık. Çalışmamızın amacı Avrupa Birliği Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği'nde belirlenmiş olan 2000 ppm kükürt dioksit sınırının aşılması halinde meydana gelen değişimlerinin gözlemlenmesi idi. Her grupta 14 deney hayvanı bulunmaktaydı ve deney grupları Kontrol, 1000 ppm kükürtlü kayısı, 2000 ppm kükürtlü kayısı, 3000 ppm kükürtlü kayısı, 4000 ppm kükürtlü kayısı ve gün kurusu kayısı alan ratlardan oluşmaktaydı. Yapmış olduğumuz biyokimyasal ve histolojik incelemelerin sonucunda oksidatif stres parametrelerinin 2000 ppm'in üzerindeki miktarlarda çok fazla değişmediğini ve doku bazında bir takım hayati olmayan değişiklikler meydana getirdiğini gözlemledik.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar göz önüne alınarak aşağıdaki önerileri sunuyoruz:

1. Avrupa Birliği ülkelerinde uygulanan 2000 ppm. kükürt dioksit sınırı değiştirilmese bile sınırın üzerinde kükürt dioksit içeren kayısılar, ambalajlarında farklı renkler veya uyarılar ile tüketime sunulabilir.
2. Kayısı ambalajları kapalı olmalı, güneş ışığı altında kalmamalı ve saklanma koşulları kutular üzerinde belirtilmeli.
3. Kayısı tüketilmesinin beslenme ve sağlığa olan etkileri aşikârdır. Ancak kayısının tüketilme şekli doğrudan ve ya yaş grubuna bağlı olarak komposto şeklinde olmalıdır.
4. Kayıyı mümkünse taze, mevsim dışında tüketilecek kayıları ise gölgede kurutulmuş olarak saklamak gerekmektedir.
5. Bu çalışma ile birlikte kayısındaki kükürt miktarı ve sağlık ilişkisi üzerine daha ayrıntılı çalışmalar yapılmalıdır. Kayıların etkilerini daha doğru görebilmek için doğrudan ve ya komposto olarak tüketimin etkilerinin araştırılacağı bir çalışma daha değerli veriler sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. Asma BM, Gültek A, Kan T, Birhanlı O. *Kayısıda Kükürt Sorunu*, 1. Baskı. Malatya, ÖzGayret Ofset, 2005: 56-58.
2. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Turk J Biochem* 2006, 31 (2): 51-6.
3. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet Fak Derg* 2004, 15 (1-2): 91-6.
4. Meng Z. Oxidative damage of sulfur dioxide on various organs of mice: sulfur dioxide is a systemic oxidative damage agent. *Inhalation Toxicology* 2003, 15: 181-95.
5. Meng Z, Qin G, Zhang B, Bai J. DNA damaging effects of sulfur dioxide derivatives in cells from various organs of mice. *Mutagenesis* 2004, 19(6): 465-8.
6. Parlakpınar H, Olmez E, Acet A, Ozturk F, Tasdemir S, Ates B, Gul M, Otlı A. Beneficial effects of apricot-feeding on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Food Chem Toxicol* 2009, 47(4): 802-8.
7. Ozturk F, Gul M, Ates B, Ozturk IC, Cetin A, Vardi N, Otlı A, Yılmaz I. Protective effect of apricot (*Prunus armeniaca* L.) on hepatic steatosis and damage induced by carbon tetrachloride in Wistar rats. *Br J Nutr* 2009, 102(12): 1767-75.
8. Cengiz E. Kayısı (*Prunus Armeniaca* L.) ve Kayısı Çekirdeğinde Kuersetinin Hplc-MS ile Tayini. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, 2011.
9. Coşkun AL. Farklı Kükürtleme Yöntemlerinin ve Depolama Sıcaklıklarının Kuru Kayısıların Fiziksel Ve Kimyasal Niteliklerine Etkisi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2010.
10. The Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics, <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> 19 Aralık 2014.
11. *Fırat Kalkınma Ajansı*. FKA Kayısı Araştırma Raporu, 1. Baskı, 2010: 16.
12. Türkiye İstatistik Kurumu. Bitkisel Üretim İstatistikleri, http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001 19 Aralık 2014.

13. Asma BM. *Mişmiş*, 1. Baskı. Malatya, Evin Ofset, 2004: 18.
14. Akın EB, Karabulut I, Topcu A. Some compositional properties of main Malatya apricot varieties. *Food Chemistry* 2008, 107: 939–48.
15. Asma BM. *Mişmiş*, 1. Baskı. Malatya, Evin Ofset, 2004: 20.
16. Asma BM, Gültek A, Kan T, Birhanlı O. *Kayısıda Kükürt Sorunu*, 1. Baskı. Malatya, ÖzGayret Ofset, 2005: 56-58.
17. Asma BM, Gültek A, Kan T, Birhanlı O. *Kayısıda Kükürt Sorunu*, 1. Baskı. Malatya, ÖzGayret Ofset, 2005: 59.
18. Asma BM, Gültek A, Kan T, Birhanlı O. *Kayısıda Kükürt Sorunu*, 1. Baskı. Malatya, ÖzGayret Ofset, 2005: 60.
19. Asma BM, Gültek A, Kan T, Birhanlı O. *Kayısıda Kükürt Sorunu*, 1. Baskı. Malatya, ÖzGayret Ofset, 2005: 61.
20. Asma BM, Gültek A, Kan T, Birhanlı O. *Kayısıda Kükürt Sorunu*, 1. Baskı. Malatya, ÖzGayret Ofset, 2005: 62.
21. Asma BM, Gültek A, Kan T, Birhanlı O. *Kayısıda Kükürt Sorunu*, 1. Baskı. Malatya, ÖzGayret Ofset, 2005: 64-65.
22. Asma BM, Gültek A, Kan T, Birhanlı O. *Kayısıda Kükürt Sorunu*, 1. Baskı. Malatya, ÖzGayret Ofset, 2005: 66-67.
23. Asma BM, Gültek A, Kan T, Birhanlı O. *Kayısıda Kükürt Sorunu*, 1. Baskı. Malatya, ÖzGayret Ofset, 2005: 68-69.
24. Ermiş H. Kayısı Kükürtleme İşinde Çalışan İşçilerde Sülfür Dioksit Gazına Maruziyetin Bronş Hiperreaktivitesi Üzerine Etkisi. Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Malatya: İnönü Üniversitesi, 2003.
25. Asma BM, Gültek A, Kan T, Birhanlı O. *Kayısıda Kükürt Sorunu*, 1. Baskı. Malatya, ÖzGayret Ofset, 2005: 16-20.
26. Commission Regulation (EU) No 1129/2011. Official Journal of the European Union, 12 November 2011.
27. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem* 2015, 30(1): 11-26.
28. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 2014, 164-75.

29. Kızılcahamam Kurs Notları. Serbest Radikallerle Hücre Yaralanması, 1993: 12-4.
30. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. New York, Oxford University Press, 1999: 179-82.
31. Yalçın AS. Serbest radikaller ve patolojik etkileri. *Sendrom* 1992, 4: 40-3.
32. Akpoyraz M, Durak İ. Serbest radikallerin biyolojik etkileri. *Ankara Univ Tıp Fak Mecm* 1995, 48: 253-62.
33. Akkuş İ. *Serbest Oksijen Radikalleri ve Fizyopatolojik Etkileri*, 1.Baskı. Konya, Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım, 1995: 54.
34. Aslan R. Homeostatik mekanizmanın korunması ve sağaltımda antioksidanlar. *İlaç ve Tedavi Dergisi* 1999, 12(8): 475-80.
35. Deby C, Goutier R. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem Pharmacol* 1990, 39(3): 399-405.
36. Aleksandra K, Ivan S, Visnja L, Milica B. Mitochondria-targeted antioxidants: future perspectives in kidney ischemia reperfusion injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016, 1-12.
37. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001, 54(3): 176-86.
38. Uysal M. *Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres*, 1.Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2006: 45.
39. Özkan A, Gündüz G, Çıplak B, Fışkın K. Kimyasal mücadele uygulanmış dociostarus morakanus epidemik popülasyonunda alınan örneklerde antioksidan enzim aktiviteleri. *Turk J Biol* 2000, 24: 141-9.
40. Karabulut AB, Özerol E, Temel İ. Yaş ve sigara içiminin eritrosit katalaz aktivitesi ve bazı hematolojik parametreler üzerine etkisi. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2002, 9(2): 85-8.
41. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* 2000, 25(10): 502-8.
42. Risnes SF, Hartwig A. Impact of cadmium on antioxidant enzymes in HCT116 cells and protective interaction by selenium. *Perspectives in science* 2015, 55.
43. Zhao J, Liu XJ, Ma JW, Zheng RL. DNA damage in healthy term neonate. *Early Hum Dev* 2004, 77(1-2): 89-98.

44. Koç S. Glutasyon S-Transferaz Genindeki Delesyonların (Gstt1, Gsttm1) Koroner Arter Hastalığı ve Akut Miyokart İnfarktüsü İle İlişkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2008.
45. Özkan A, Fışkın K. Serbest oksijen radikalleri, karsinogenez ve antioksidant enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi* 2004, 14: 52-60.
46. Karabulut AB. *Yaşamın Biyokimyasal Sırları*, 1. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri 2015: 117-126.
47. Kaur H, Perkins MJ. The free radical chemistry of food additives. In: Aruoma OI, Halliwell B. (eds) *Free Radicals and Food Additives*, 1st ed. London, Taylor & Francis, 1991: 17-35.
48. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 2004, 15 (1-2): 91-6.
49. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *Faseb* 1995, 9: 526-33.
50. Schuyer M, Berns EM. Is TP53 dysfunction required for BRCA1-associated carcinogenesis? *Mol Cell Endocrinol* 1999, 155: 143-52.
51. Aytekin Y, Solakoğlu S. *Temel Histoloji*, 1.Baskı. İstanbul, Barış Kitapevi, 1998: 22.
52. D'Angelica M, Fong Y. The liver. In: Townsend CM Jr, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL (eds). *Sabiston Textbook of Surgery*. 1st ed. Philadelphia, Saunders Press, 2004: 1513-1569.
53. Zorn AM. Liver Development, <http://www.stembook.org/node/512.html> 13 Ekim 2014.
54. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*, 2nd ed. Philadelphia, Saunders Press, 1996: 883-888.
55. Eşrefoğlu M. *Özel Histoloji*. 1.Baskı. Malatya, Medipes Yayıncılık, 2009: 36.
56. Otlı G. Sıçanlarda Farklı Besinsel Yağların Postprandial İnflamasyon Etkilerinin Sirkadiyen Ritme Göre Karşılaştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Malatya: İnönü Üniversitesi, 2013.
57. Kroese LJ, Scheefer PG. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and cardiovascular disease: a systematic review. *Curr Atheroscler Rep* 2014, 16: 452.

58. Guo Y, Weck J, Sundaram R, Goldstone AE, Louis GB, Kannan K. Urinary concentrations of phthalates in couples planning pregnancy and its association with 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a biomarker of oxidative stress: longitudinal investigation of fertility and the environment study. *Environ. Sci. Technol* 2014, 48: 9804–11.
59. Syslová K, Böhmová A, Mikoška M, Kuzma M, Pelclová D, Kaier P. Multimarker screening of oxidative stress in aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014, 1: 1-18.
60. Lee HT, Lin CS, Lee CS, Tsai CY, Wei YH. Increased 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in plasma and decreased mRNA expression of human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1, anti-oxidant enzymes, mitochondrial biogenesis-related proteins and glycolytic enzymes in leucocytes in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Immunology* 2013, 176: 66–77.
61. Lopresti AL, Maker GL, Hood SD, Drummond PD. A review of peripheral biomarkers in major depression: the potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2014, 48: 102–11.
62. Kurban S, Mehmetoğlu İ. Okside düşük dansiteli lipoprotein otoantikorları ve klinik önemi. *J Med Sc* 2005, 25: 73-84.
63. Yarsan E. Lipit peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar. *YYÜ Vet Fak Derg* 1998, 9(1-2): 89-95.
64. Dirican M. LDL oksidasyonu ve aterosklerozla ilişkisi. *Biyokimya Dergisi* 1999, 1(24): 41-8.
65. Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Vin'a-Ribes J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition* 1998, 80(1): 77–112.
66. Söğüt S. Sıçan Akciğerinde Bleomisin İle Oluşturulan Fibroziste Oksidan/Antioksidan Sistemin Rolü ve Erdosteinin Fibrozis Üzerine Etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Malatya: İnönü Üniversitesi, 2002.

67. Karabulut AB. Hepatit B’li Hastalarda Eritrosit ve Lenfosit Antioksidan Enzimler, Nitrik Oksit Düzeyleri Ve Plazma Stokinleri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Malatya: İnönü Üniversitesi, 2001.
68. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, significance. *Am J Clin Nutr* 1993, 57: 715-25.
69. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *JCEI* 2015, 6(3): 331-6.
70. Akkuş I. *Serbest Radikaller ve Fizyoterapik Etkileri*, 1.Baskı. Konya, Mimoza Basım, 1995: 40.
71. Bianchi G, Solaroli E, Zaccheroni V. Oxidative stress and anti-oxidant metabolites in patients with hyperthyroidism: effect of treatment. *Horm Metab Res* 1999, 31: 620-4.
72. Özekin A, Değer O. LDL oksidasyonu ve etkileri. *İbni Sina Tıp Dergisi* 2001, 6: 125-32.
73. Tanırgan G, Koldaş M, Uras F. Serbest radikaller: an introduction to free radical biochemistry. *Haseki Tıp Bülteni* 1994, 32(4): 304-8.
74. Sevgiler Y. Oreochromis Niloticus’da Karaciğer Ve Böbrek Dokularında Fenthionin Nac ve Bso Modölatörlüğünde Glutasyon Metabolizmasına Oksitadif Etkileri. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2007.
75. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 2002, 18: 872–9.
76. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978, 34: 271-8.
77. Fairbanks V, Klee GG. Biochemical aspects of hematology. In: Burtis CA, Ashwood ER (eds). *Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd ed. Philadelphia, Saunders Press, 1994:2026–2027.
78. Koksall N, Hasanoglu HC, Gokirmak M, Yildirim Z, Gultek A. Apricot sulfurization an occupation that induces an asthma-like syndrome in agricultural environments. *American Journal of Industrial Medicine* 2003, 43: 447–53.

79. Koksall N, Yildirim Z, Gokirmak M, Hasanoglu HC, Mehmet N, Avcı H. The role of nitric oxide and cytokines in asthma-like syndrome induced by sulfur dioxide exposure in agricultural environment. *Clinica Chimica Acta* 2003, 336: 115–22.
80. Gokirmak M, Yildirim Z, Hasanoglu HC, Koksall N, Mehmet N. The role of oxidative stress in bronchoconstriction due to occupational sulfur dioxide exposure. *Clinica Chimica Acta* 2003, 331: 119–26.
81. Uren N, Yuksel S, Onal Y. Genotoxic effects of sulfur dioxide in human lymphocytes. *Toxicology and Industrial Health* 2014, 30(4): 311–5.
82. Türkyılmaz M, Özkan M, Güzel N. Loss of sulfur dioxide and changes in some chemical properties of Malatya apricots (*Prunus armeniaca* L.) during sulfuring and drying. *J Sci Food Agric* 2014, 94: 2488–96.
83. Kan T, Bostan SZ. Effect of sulfurization and process conditions on polyphenol content of anatolian apricots (*Prunus Armeniaca*). *Journal of Food Processing and Preservation* 2013, 37: 163–70.
84. Yilmaz I, Karaman A, Vardi N, Cetin A, Erdemli E. Effects of organic apricot on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Transplantation Proceedings* 2013, 45: 2455–60.
85. Yurt B, Celik I. Hepatoprotective effect and antioxidant role of sun, sulphited-dried apricot (*Prunus armeniaca* L.) and its kernel against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology* 2011, 49: 508–13.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

22.03.1987-Üsküdar doğumluyum. İlköğretim ve lise eğitimimi Malatya’da tamamladım. 2004 yılında kazandığım Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden 2009 yılında mezun oldum ve aynı yılın Eylül ayında İnönü Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda doktora eğitimime başladım. Doktora eğitimim sırasında 2012-2013 yılları arasında bir yıl süre ile yurtdışında araştırma görevlisi olarak çalışma imkanı buldum. Yurtiçi ve yurtdışı makalelerim ve poster sunumlarım mevcut olup halen Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı’nda ÖYP Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.

EK-2. ETİK KURUL ONAYI



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 08-01-2016
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2016/A-02
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyü : Wistar Albino
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : ☒E ☐D ☐Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 84 Adet
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı :

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Aysun Bay Karabulut'un yürütücüsü olduğu "Farklı Miktarlarda Kükürt İçeren ve Gün Kurusu Kayısıyla Beslenen Ratların Serum ve Karaciğer Oksidatif Stres Parametrelerinin Karşılaştırılması" isimli 2016/A-02 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

 Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ Başkan	 Prof. Dr. Nigar VARDI Üye	 Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ Üye
 Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ Üye	 Yrd.Doç.Dr.Mehmet KARATAŞ Üye	 Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN Üye
 Salih AVCI Sivil Üye	 Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU Sivil Üye	