

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**RATLARDA KURŞUN ASETAT KAYNAKLI KARACİĞER HASARI
ÜZERİNE CHRYSİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Pınar COŞKUN

Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği

I. DANIŞMAN
Prof. Dr. Fulya BENZER
II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Fatih Mehmet KANDEMİR

TUNCELİ-2019

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

RATLARDA KURŞUN ASETAT KAYNAKLI KARACİĞER HASARI
ÜZERİNE CHRYSİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Pınar COŞKUN
(11874045)

Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği

I. DANIŞMAN
Prof. Dr. Fulya BENZER
II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Fatih Mehmet KANDEMİR

TUNCELİ-2019

**T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RATLARDA KURŞUN ASETAT KAYNAKLI KARACİĞER HASARI
ÜZERİNE CHRYSİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Pınar COŞKUN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 11.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **oybirliği/oyçokluğu** ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fulya BENZER
(Munzur Üniversitesi)

İ.DANIŞMAN

Prof. Dr. Mine ERİŞİR
(Fırat Üniversitesi)

ÜYE

Doç. Dr. Alper GÜVEN
(Munzur Üniversitesi)

ÜYE

Bu tez, Enstitümüz Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Prof. Dr. Numan YILDIRIM
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu çalışma, Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: YLMUB017-24

NOT: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı “Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu”ndaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Bu çalışma kurşun asetat (PbA) kaynaklı karaciğer hasarı üzerine chrysinin (CH) etkilerinin araştırılması amacıyla yapıldı. Çalışmada 35 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat, her grupta 7 rat olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. 1. Grup (Kontrol): Oral yolla serum fizyolojik verildi. 2. Grup (CH grubu): CH (50 mg kg⁻¹ ağırlık gün⁻¹) 7 gün boyunca oral olarak ratlara verildi. 3. Grup (PbA grubu): PbA (30 mg kg⁻¹) 7 gün boyunca 30 mg kg⁻¹ PbA oral yolla ratlara verildi. 4. Grup (PbA+CH 25 grubu): 7 gün boyunca 25 mg/kg CH uygulamasından 30 dakika sonra 30 mg kg⁻¹ PbA ratlara oral yoldan verildi. 5. Grup (PbA +CH 50 grubu): 7 gün süreyle 50 mg/kg CH uygulamasından 30 dakika sonra 30 mg kg⁻¹ PbA ratlara oral yoldan verildi. Son uygulamadan 24 saat sonra (8.günde) ratlar hafif sevofloran anestezisi altında ötenazileri yapılarak, doku ve kan örnekleri alındı. Serumda Aspartat Aminotransferaz (AST), Alanin Aminotransferaz (ALT) ve Alkalın Fosfataz (ALP) düzeylerine, karaciğer dokusunda Malondialdehit (MDA), Glutasyon (GSH) ve Nitrik Oksit (NO[•]) düzeyleri ile Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) ve Arginaz enzim aktivitelerine bakıldı. Kontrol ile kıyaslandığı zaman serum ALT, AST ve ALP düzeyleri PbA verilen grupta arttı, bu artış CH ile kısmen düzeltildi. Karaciğer MDA ve NO[•] düzeyleri PbA verilen gruplarda artarken, antioksidan enzim aktiviteleri ile GSH düzeyi azaldı. CH uygulanması; artan MDA ve NO[•] düzeylerini azalttı, azalan antioksidan enzim aktiviteleri ile GSH düzeylerini ise artırdı. Histolojik olarak bakıldığında ise, kontrol ve CH gruplarındaki ratların karaciğer dokuları normal histolojik görünümdeydi. Tek başına PbA uygulanan grup ratlarının karaciğerlerinde hepatositlerde şiddetli düzeyde nekrotik değişiklikler ve hidropik dejenerasyonlar görüldü. PbA+CH 25 grubundaki ratların karaciğerlerinde hepatositlerde orta düzeyde nekrotik değişiklikler ve hidropik dejenerasyonlar görüldü. Bu gruplarda ayrıca yer yer periportal ve perivasküler alanlarda mononükleer hücre infiltrasyonlarına rastlandı. PbA ile birlikte CH 50 uygulanan gruptaki ratların karaciğerlerinde ise nekroz, hidropik dejenerasyonlar ve mononükleer hücre infiltrasyonlarının azaldığı belirlendi. Sonuç olarak karaciğerde PbA kaynaklı hasarlarını azaltmada CH etkili olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Antioksidanlar, Chrysin, Kurşun Asetat, Karaciğer, Rat, Serbest Radikal Hasarı

ABSTRACT

Investigation of Chrysin Effects On Lead Asetat-Induced Liver Damage in Rats

This study was conducted to investigate the effects of chrysin (CH) on lead acetate (PbA) inducing liver injury. In this study, 35 male Sprague Dawley rats were divided into 5 groups as 7 rats in each group. Group 1 (Control): Saline was given orally. Group 2 (CH group): CH (50 mg kg⁻¹ weight day⁻¹) were orally given rats for 7 days. Group 3 (PbA group): PbA (30 mg kg⁻¹) was orally given to rats at 30 mg kg⁻¹ PbA for 7 days. Group 4 (PbA +CH 25 group): 25 mg/kg CH was orally given to rats for 7 days. In addition, 30 mg kg⁻¹ PbA was given orally to rats for 7 days after 30 minutes of the application of the CH. Group 5 (PbA+CH 50 group): 50 mg kg⁻¹ CH was orally given to rats for 7 days. Furthermore, 30 mg kg⁻¹ PbA was given orally to rats for 7 days after 30 minutes of the application of the CH. The rats were euthanized under mild sevoflurane anesthesia and tissue and blood samples were taken 24 hours after the last application (8th day). Serum Aspartate Aminotransferase (AST), Alanine Aminotransferase (ALT) and Alkaline Phosphatase (ALP) levels, Malondialdehyde (MDA), Glutathione (GSH) and Nitric Oxide (NO[•]) levels in liver tissue and Süperoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GSH-Px) and arginase enzyme activities were examined. Serum ALT, AST and ALP levels increased in the PbA group when compared with the control, and this increase was partially corrected with CH. Liver MDA and NO[•] levels increased in the PbA administered groups while antioxidant enzyme activities and GSH levels decreased. Although, CH administration decreased the increased MDA and NO[•] levels, it increased the decreased antioxidant enzyme activities and GSH levels. Histologically, the liver tissues of control and CH groups were in normal histological appearance. Severe necrotic changes and hydropic degeneration were observed in hepatocytes in the group of rats treated with PbA alone. However, medium-level necrotic changes and hydropic degeneration were observed in hepatocyte in the group of rats treated with PbA+CH 25. In these groups, mononuclear cell infiltrations were also occasionally observed in the periportal and perivascular areas. Besides, noxious, hydropic degeneration and mononuclear cell infiltrations were decreased in the livers of the rats treated with PbA and CH 50. As a result, CH is effective in the reducing PbA damages in the liver.

Key Words: Antioxidants, Chrysin, Lead Asetate, Liver, Rat, Free Radical Damage

TEŞEKKÜRLER

Tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde bilgi ve tecrübesiyle bana ışık tutan I. Danışman hocam danışman Prof. Dr. Fulya BENZER'e, deneysel çalışmamı yürütmemde ve analizlerin yapılmasında her türlü yardımı yapan Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya A.D öğretim üyesi II. Danışman hocam Prof. Dr. Fatih Mehmet KANDEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımın histopatolojik analizlerini yapan Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji A.D öğretim üyesi Doç. Dr. Serkan YILDIRIM'a, deneysel ve laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya A.D Dr. öğretim üyesi Sefa KÜÇÜKLER'e ayrıca bu projeye maddi destek sağlayan Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (MÜNİBAP) teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Pınar COŞKUN

Tunceli, 2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	III
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜRLER	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VIII
TABLolar LİSTESİ.....	IX
KISALTMALAR LİSTESİ	X
SEMBOLLER LİSTESİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Serbest Radikaller	2
1.1.1. Serbest Radikal Kaynakları	4
1.1.2. Serbest Radikal Çeşitleri	5
1.1.2.1.Hidroperoksil Radikali	5
1.1.2.2.Süperoksit.....	5
1.1.2.3.Hidrojen Peroksit Radikali.....	5
1.1.2.4. Singlet Oksijen	6
1.1.2.5. Üçlü Oksijen.....	6
1.1.2.6. Nitrik Oksit.....	6
1.2. Serbest Radikallerin Neden Olduğu Hasarlar	7
1.2.1. Proteinlere Oksidatif Etkileri	8
1.2.2. DNA'ya Oksidatif Etkileri	8
1.2.3.Lipitlere Oksidatif Etkileri	8
1.3. Serbest Radikal Ve Hastalıklar	9
1.4. Serbest Radikallerin Oluşum Mekanizmaları	9
1.5. Antioksidanlar	9
1.5.1. Antioksidanların Etki Şekli	10
1.5.2. Antioksidanların Sınıflandırılması	11
1.5.2.1.Enzimatik Antioksidanlar.....	11
1.5.2.1.1. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	11
1.5.2.1.2. Katalaz (CAT).....	12
1.5.2.1.3. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	12
1.5.2.1.4. Glutasyon Redüktaz (GR).....	13
1.5.2.2.Nonenzimatik Antioksidanlar	13
1.5.2.2.1. E Vitamini	13
1.5.2.2.2. C Vitamini (Askorbik Asit).....	14
1.5.2.2.3. A Vitamini	14
1.5.2.2.4.Bioflavonoidler.....	14
1.5.2.2.5.Karotenoidler.....	15
1.5.2.2.6. Flavonoidler	15
1.5.2.2.7. Chrysin	16
1.5.2.2.7.1.Chrysinin Yapısı.....	16
1.5.2.2.7.2. Chrysin Kaynakları	17
1.5.2.2.7.3. Chrysin'in Farmakolojik Aktiviteleri	17
1.5.2.2.7.4. Bioyararlanım.....	18
1.6. Kurşun Asetat.....	18

2. MATERYAL VE METOT	19
2.1. Materyal.....	19
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar.....	19
2.1.2. Kullanılan Deney Hayvanları	219
2.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	19
2.1.4. Deneysel Uygulamalar	20
2.1.5. Deney Sonunda Numunelerin Alınması	20
2.2. Metod.....	20
2.2.1. ALT Aktivitesinin Tayini	21
2.2.2. AST Aktivitesinin Tayini	22
2.2.3. ALP Aktivitesinin Tayini	22
2.2.4. Biyokimyasal Analizler için Doku Örneklerinin Hazırlanması	23
2.2.4.1. MDA, GSH, GPx, SOD, CAT ve Protein Tayini İçin Karaciğer Doku Örneklerinin Hazırlanması.....	23
2.2.5. Biyokimyasal Analizler (MDA, GSH, GPx, SOD, CAT ve Protein Tayini)	24
2.2.5.1. MDA Tayini.	24
2.2.5.2. GSH Tayini.....	25
2.2.5.3. SOD Tayini.....	27
2.2.5.4. CAT Tayini.....	28
2.2.5.5. GSHPx Tayini	29
2.2.5.6. Arginaz Tayini.....	31
2.2.5.7. Nitrik Oksit (NO [•]) Seviyesinin Ölçülmesi.....	31
2.2.5.8. Protein Tayini	35
2.2.5.9. Histopatolojik İnceleme.....	36
2.2.5.10. İstatistiksel Analiz	36
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	38
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR.....	56
ÖZGEÇMİŞ	67

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil.1.1. Farklı yollardan serbest radikallerin üretimi	4
Şekil.1.2. Moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu ve NO ilişkisi	6
Şekil.1.3. Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu.....	10
Şekil.1.4. Vitamin C.....	12
Şekil.1.5. Flavonoidlerin sınıflandırılması.....	14
Şekil.1.6. Chrysinin yapısı	15
Şekil.2.1. MDA standart grafiği	24
Şekil.2.2. GSH standart grafiği	26
Şekil.2.3. NO standart grafiği.....	33
Şekil.3.1. Serum ALT aktivitesi.....	36
Şekil.3.2. Serum AST aktivitesi	36
Şekil.3.3. Serum ALP aktivitesi	37
Şekil.3.4. Karaciğer MDA düzeyi	37
Şekil.3.5. Karaciğer GSH düzeyi	38
Şekil.3.6. Karaciğer SOD aktivitesi.....	38
Şekil.3.7. Karaciğer CAT aktivitesi... ..	39
Şekil.3.8. Karaciğer GSH-Px aktivitesi.....	39
Şekil.3.9. Karaciğer arginaz aktivitesi.....	40
Şekil.3.10. Karaciğer NO düzeyi	40
Şekil.3.11. Kontrol grup, karaciğer dokusu normal histolojik görünümü.....	42
Şekil.3.12. CH 50 grup, karaciğer dokusu normal histolojik görünümü	42
Şekil.3.13. Pb grup, karaciğer dokusu normal histolojik görünümü	43
Şekil.3.14. Pb+CH 25 grup, karaciğer dokusu normal histolojik görünümü	43
Şekil.3.15. Pb+CH 50 grup, karaciğer dokusu normal histolojik görünümü.....	44

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1.1. Reaktif oksijen türleri (ROS)	3
Tablo 1.2. Reaktif nitrojen türleri (RNS)	3
Tablo.2.1. MDA Düzeyinin ölçümü.....	24
Tablo 2.2. SOD aktivitesinin ölçümü	27
Tablo 2.3. CAT aktivitesinin ölçümü	28
Tablo 2.4. GSH-Px Aktivitesinin ölçümü	29
Tablo 2.5. Karaciğer dokusunda arginaz aktivitesi ölçümü	32
Tablo 2.6. NO ⁻ düzeyinin ölçümü.....	33
Tablo 2.7. Protein ölçümü	34
Tablo 3.1. Histopatolojik bulgular	41

KISALTMALAR LİSTESİ

SOD	: Süperoksit dismutaz
CAT	: Katalaz
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
MDA	: Malondialdehit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
GST	: Glutasyon S-transferaz
G6PD	: Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
AST	: Aspartat Aminotransferaz ve
ALT	: Alanin Aminotransferaz Alkalın Fosfataz
ALP	: Alkalın Fostataz

SEMBOLLER LİSTESİ

$^1\text{O}_2$	: Singlet oksijen
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
HNO_3	: Nitrik asit
$\text{HO}\cdot$	: Hidroksil
HOCl	: Hipoklorit asit
LOOH	: Lipit hidroperoksit
N_2O_4	: Dinitrojen tetroksid
NO^-	: Nitroksil anyonu
$\text{NO}\cdot$	: Nitrik oksit
NO^+	: Nitrosil katyonu
$\text{NO}_2\cdot$	: Azot dioksit
O_2^-	: Süperoksit
O_3	: Ozon
$\text{ONOO}\cdot$	: Peroksinitrit
$\text{RO}\cdot$	: Alkoksil
$\text{ROO}\cdot$	: Peroksil
γ	: Gama

1. GİRİŞ

İnsanların çevre yoluyla ağır metallere maruz kalmaları fizyolojik, biyokimyasal ve histolojik bozukluklara neden olabilir. Bu metaller kirli hava, su, toprak ve gıda da dahil olmak üzere çok farklı şekillerde bulunabilir. Özellikle geçiş metal iyonları canlıdaki serbest radikallerin neden olduğu hasarı hızlandırır. Bu metallerin yüksek dozlarına maruz kalmak nadiren meydana gelse de kronik olarak düşük dozda maruz kalma önemli bir sağlık sorunu ve küresel bir sorun olarak görülebilir (Wang ve Fowler, 2008). Kurşun (Pb) insan sağlığını tehdit eden en önemli ağır metallerdendir (Matović ve ark., 2015).

Serbest radikaller dış yörüngelerinde eşlenmemiş elektron bulundurmaları nedeniyle diğer bileşiklerden farklıdır. Bu eşlenmemiş elektron nedeniyle kararsız yapıda bulunan serbest radikal molekülü, kararlı hale geçebilmek için elektronunu başka bir elektron ile eşleştirmesi gerekmektedir. Bu nedenle de serbest radikaller oldukça aktif moleküllerdir (Phaniendra ve ark., 2015).

Reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinden kaynaklanan bu radikaller farklı fizikokimyasal ve patofizyolojik durumlara maruz kalma sonucu endojen sistemler tarafından vücutta üretilmektedirler (Kumar, 2011).

Serbest radikaller ve diğer reaktif türler normal metabolik işlemler sırasında oluşabileceği gibi x-ışınları, ozon, sigara içiciliği, hava kirleticileri, endüstriyel kimyasallar gibi dış nedenlerden de kaynaklanabilir. Serbest radikaller insan sağlığına çok zararlı olup, diyabet, kanser, ateroskleroz, hipertansiyon vb. çeşitli dejeneratif hastalıklara neden olabilmektedir (Kumar, 2011).

Antioksidanlar, serbest radikal reaksiyonlarını inhibe ederek ya da söndürerek hücrel hasarı geciktiren veya inhibe eden moleküllerdir (Young ve Woodside, 2001). ABD Gıda ve İlaç İdaresi'ne (FDA) göre, antioksidanlar, oksidasyondan kaynaklanan bozulmaları, tekstür veya renk bozukluklarını geciktirerek gıdaları korumak için kullanılan maddeler olarak tanımlanmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

Hem enzimatik hem de enzimatik olmayan reaksiyonları geciktiren antioksidanlar vücudu oksidatif hasara karşı korur. Lipit oksidasyonunu önlemek için gıdaya enzimatik olmayan antioksidanlar sıklıkla eklenir. Bazı lipid antioksidanları, belirli koşullar altında diğer moleküle karşı pro-oksidan etki gösterebilir, bu nedenle gıda ve terapötik kullanım için antioksidanlar dikkatli bir şekilde tanımlanmalıdır (Kumar, 2011).

Karaciğer birçok fizyolojik süreç için kritik bir merkezdir. Bu fizyolojik süreçlere makro besin metabolizması, kan hacminin düzenlenmesi, bağışıklık sistemi desteği, büyüme sinyal yollarının endokrin kontrolü, lipid ve kolesterol homeostazı ve mevcut birçok ilaç dahil olmak üzere ksenobiyotik bileşiklerin parçalanması dahildir (Trefts ve ark., 2017).

Doğal bir flavonoid olan Chrysin (5,7-dihidroksi flavon, CH), çeşitli çiçeklerin bitki özütlerinde, balda, propoliste ve uçucu yağlarda bol miktarda bulunur (Jaganathan ve Mandal, 2009). Antioksidan, anti-enflamatuar, anti-apoptotik ve anti-kanserojenik özellikleri nedeniyle, CH son zamanlarda sıkça kullanılmaktadır (Mantawy ve ark., 2014). Antioksidan savunma sistemini güçlendirdiği saptanan CH'in karaciğer hasarına karşı özellikle etkili olduğu ve oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir (Pushpavalli ve ark., 2010). Bu çalışma ratlarda PbA kaynaklı karaciğer hasarına karşı oral yoldan verilen CH'in etkileri araştırmak amacıyla yapılmıştır.

1.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller normal hücresel metabolizmanın ürünleridir. Bir serbest radikal dış yörüngesinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren bir atom veya molekül olarak tanımlanabilir ve bağımsız olarak var olma yeteneğine sahiptir. Serbest radikallerin tek elektronu onu dengesiz, kısa ömürlü ve yüksek oranda reaktif hale getirir. Yüksek reaktiviteleri nedeniyle, stabilite elde etmek için diğer bileşiklerden elektronları çalabilirler. Böylece saldırıya uğrayan molekül elektronunu kaybeder ve serbest radikal haline gelir ve sonunda canlı hücreye zarar veren bir zincir reaksiyonu akışını başlatır. (Phaniendra ve ark., 2015).

Hem reaktif oksijen türleri (ROS) hem de reaktif nitrojen türleri (RNS) toplu olarak serbest radikalleri ve diğer radikal olmayan reaktif türleri oluşturur (Pham-Huy ve ark., 2008). ROS / RNS, yaşam sisteminde hem faydalı hem de toksik bileşikler olarak iki yönlü bir rol oynamaktadır. Orta veya düşük seviyelerde ROS/RNS yararlı etkilere sahiptir ve immün fonksiyonlarda (yani patojenik mikroorganizmalara karşı savunma), çeşitli hücresel sinyal yollarında, mitojenik cevap ve redoks düzenlemesi gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda rol alırlar. Fakat daha yüksek konsantrasyonda hem ROS hem de RNS,

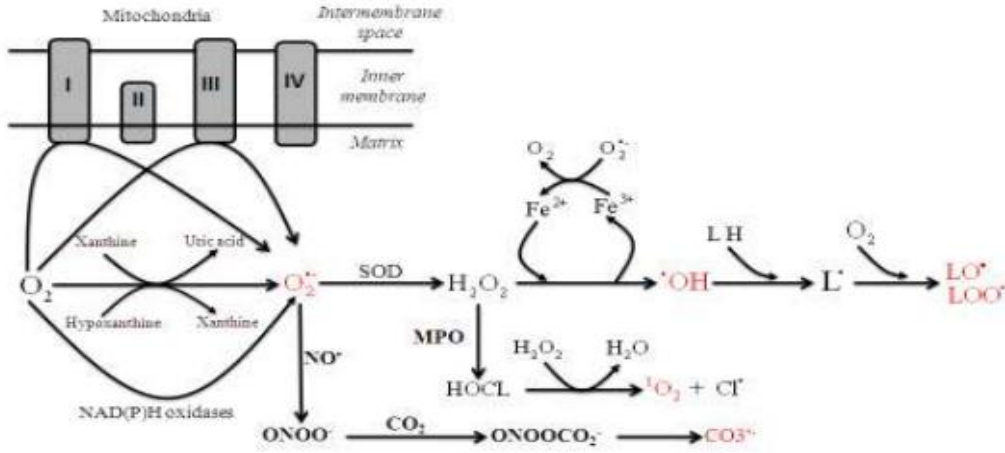
sırasıyla oksidatif stres ve nitrosatif stres oluşturur, bu da biyomoleküllerde potansiyel hasara neden olur. Oksidatif stres ve nitrosatif stres bir tarafta aşırı ROS / RNS üretimi ve diğer tarafta enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar eksikliği olduğunda gelişir. En önemlisi, aşırı ROS, lipitler (Yla-Herttua, 1999), proteinler (Stadtman ve Levine, 2000) ve DNA (Marnett, 2000) dahil olmak üzere çeşitli biyomoleküllerin bütünlüğüne zarar verebilir, solunum hastalıkları yanı sıra yaşlanma sürecinde, kardiyovasküler hastalıklar, şeker hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar, romatoid artrit, katarakt gibi çeşitli hastalıklarda oksidatif strese yol açabilir.

Tablo 1.1. Reaktif oksijen türleri (ROS)

Radikaller	Radikal olmayanlar
Hidroksil HO $\cdot$	Singlet oksijen $^1\text{O}_2$
Alkoksil RO $\cdot$	Ozon O $_3$
Peroksil ROO $\cdot$	Hipoklorit asit HOCl
Süperoksit O $_2^{\cdot-}$	Lipit hidroperoksit LOOH
Nitrikoksit NO $\cdot$	Hidrojen peroksit H $_2\text{O}_2$
Azot dioksit NO $_2^{\cdot}$	

Tablo 1.2. Reaktif nitrojen türleri (RNS)

Radikaller	Radikal olmayanlar
Nitrojen dioksit NO $_2^{\cdot}$	Nitrik asit HNO $_3$
Nitrik oksit NO $\cdot$	Nitrosil katyonu NO $^+$
	Nitroksil anyonu NO $^-$
	Dinitrojen tetroksid N $_2\text{O}_4$
	Peroksinitrit ONOO $^-$



Şekil 1.1. Farklı yollardan serbest radikallerin üretimi (Kunwar ve KI , 2011).

1.1.1.Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikaller, çevresel faktörlerden, fizyolojik süreçlerden veya endojen kaynaklardan dolayı meydana gelebilir (Sultan, 2014).

Endojen kaynaklar, bunlar serbest radikallerin kaynağı olarak görev yapan enzimatik reaksiyonlar olabilir. Solunum zincirinde, fagositozda, prostaglandin sentezinde ve sitokrom P450 sisteminde yer alan reaksiyonları içerirler. Serbest radikallerin bazı iç üretim kaynakları mitokondri, ksantin oksidaz, fagositler, demir ve diğer geçiş metallerini içeren reaksiyonlar, peroksisomlar, arachidonat yolları, egzersiz, iskemi/reperfüzyon ve yangısal reaksiyonlardır (Tegeli ve ark., 2014).

Eksojen kaynaklar, bunlar oksijenin organik bileşiklerle enzimatik olmayan reaksiyonlarını içerir. Serbest radikaller, iyonlaştırıcı radyasyonlarla başlatılan reaksiyonlarda da ortaya çıkabilir. Bazı serbest radikal kaynakları sigara dumanı, çevresel kirlenici maddeler, radyasyonlar, ultraviyole ışık, ozon, bazı ilaçlar, böcek ilaçları, anestezipler ve endüstriyel çözücülerdir. (Engwa, 2018).

Fizyolojik Faktörler, stres, duygu vb. ruhsal durum ve hastalık koşulları da serbest radikallerin oluşumundan sorumludur (Fiorentino ve ark., 2013).

1.1.2. Serbest Radikal Çeşitleri

1.1.2.1. Hidroperoksil Radikali

Perhidroksil kökü olarak da adlandırılan hidroperoksil kökü, $\text{HO}_2^\cdot$ kimyasal formülü ile gösterilmekte olup, süperoksitin protonlanmış biçimidir. Hidroperoksil, bir protonun bir oksijen atomuna transferi yoluyla oluşturulur. $\text{HO}_2^\cdot$ bir takım biyokimyasal reaksiyonlarda çift katmanlı lipid tabakasındaki doymamış yağ asitlerinden ve tokoferolden hidrojen atomlarını uzaklaştırmak suretiyle oksidant gibi davranabilir. Bu nedenle, lipid peroksidasyonunun önemli bir başlatıcısı olabilir (Kumar, 2011).

1.1.2.2. Süperoksit

Süperoksit anyon radikali, enzimatik reaksiyon, otooksidasyon reaksiyonu ve moleküler oksijene bir elektronun transfer edildiği enzimatik olmayan elektron transfer reaksiyonları sırasında oluşan en yaygın reaktif oksijen türüdür. Çoğunlukla mitokondri içinde üretilir ve biyomoleküllerle reaktivitesi düşüktür. Süperoksit üretebilen enzimler arasında ksantin oksidaz (Kuppusamy ve Zweier, 1989), lipoksijenaz, siklooksijenaz (Kontos ve ark., 1985; McIntyre ve ark., 1999) ve NADPH'ye bağlı oksidaz bulunur. Oksidan veya redüktan olarak hareket edebilen Süperoksit radikali, kükürt, askorbik asit veya NADPH'yi okside edebilirken, Sitokrom C ve metal iyonlarını ise redükte edebilir. (Gebiki ve Bielski, 1981).

1.1.2.3. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit, süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalize edilen bir dismutasyon reaksiyonuyla in vivo olarak oluşturulur. Kendisi serbest radikal değildir, ancak nispeten düşük konsantrasyonda ($10 \mu\text{M}$) hücreye zarar verebilir. Daha yüksek konsantrasyonlarda gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz gibi hücresel enerji üreten enzimler inaktive edilir. Biyolojik zarlara kolayca nüfuz edebilir. H_2O_2 'in DNA üzerinde doğrudan bir etkisi yoktur ancak geçiş metali iyonları varlığında hidroksil radikalini ($\text{OH}^\cdot$) üreterek

DNA'ya zarar verebilir. H_2O_2 'i ortadan kaldırabilen başlıca antioksidan enzimler CAT, GSH-Px ve peroksiredoksinlerdir. (Phaniendra ve ark., 2015).

1.1.2.4. Singlet Oksijen

Serbest bir radikal değildir, ancak bazı radikal reaksiyonları esnasında oluşabilir ve diğer reaksiyonları tetikleyebilir. Bu hidrojen peroksit moleküllerinden kaynaklanmaktadır. Ayrışmada singlet oksijen, süperoksit ve hidroksil radikallerini oluşturur (Tegeli ve ark., 2014). Nötrofillerin (Hampton ve ark., 1998) ve eozinofillerin (Kanovsky, 1989) aktivasyonu ile *in vivo* olarak üretilir. Aynı zamanda, lipoksijenazlar (Chan 1971), dioksijenazlar (Hayaishi ve Nozaki 1969) ve laktoperoksidaz (Kanofsky, 1983) gibi enzimler tarafından katalize edilen bazı enzimatik reaksiyonlar sırasında da oluşur. DNA hasarı (Sies ve Menck, 1992) ve doku hasarına neden olabilen oldukça güçlü bir oksitleyici ajandır.

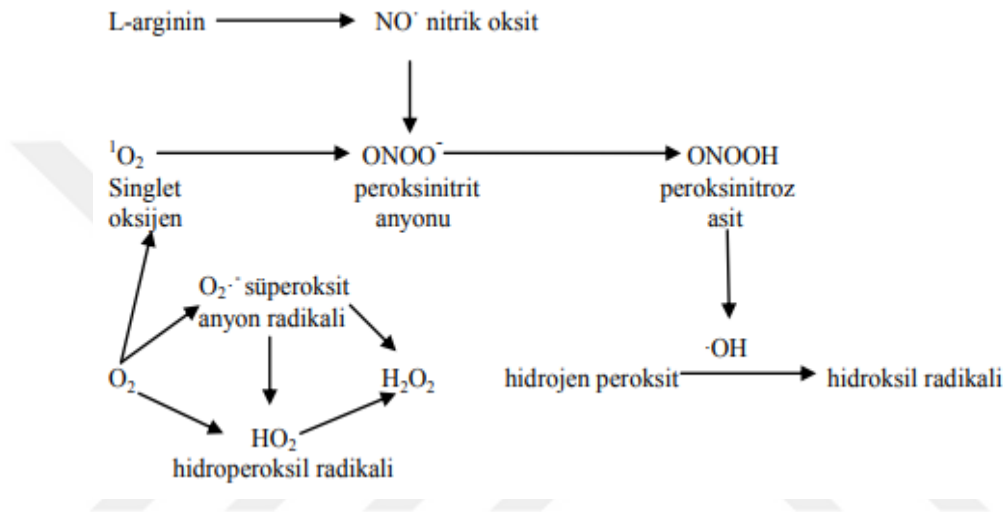
1.1.2.5. Üçlü Oksijen

Üçlü oksijen, genellikle oksitleri oluşturmak için elementler ve iyonlarla reaksiyona girebilir, tekli halde bulunan organik bileşiklerle reaksiyona girmez. Ancak üçlü oksijen, diğer aktif radikallerin, radyasyonların, ultraviyole ışığın ve ısıya etkiyle veya oksijenle birleşerek oluşan kompleks moleküller ve geçiş metali tarafından üretilen serbest radikal molekülleriyle kolayca reaksiyona girip aktif peroksit radikalleri ve doymamış yağ asitlerini oluşturur. (Kumar, 2011).

1.1.2.6. Nitrik Oksit

Nitrik oksit ($NO\cdot$), diğer bir adıyla azot monoksit olarak bilinir. Atmosferdeki bakteriler, asit yağmurları, baca gazları, jetler, egzoz gazları ile sigara dumanları $NO\cdot$ ve diğer reaktif oksijen türlerini üreterek hava kirliliğine neden olur. Havadaki $NO\cdot$ oksijenle birleşerek çok kısa sürede NO_2^- (nitrit) ve NO_3^- (nitrat) oluşturur. $NO\cdot$ ' in açık formülünde olan çiftlenmemiş elektronu, azot ve oksijen atomları üzerinde yer değiştirerek 'rezonans

stabilitesi' sağlar, reseptörden bağımsız olarak membranlardan kolayca diffüze olur (Lowenstein ve ark., 1994; Yallampalli ve ark., 1994). Tüm bu özellikleri NO'ye ideal bir haberci molekül olma özelliği kazandırmaktadır (Lowenstein ve ark., 1994). Ayrıca su ve oksijen varlığında, 3-20 saniye gibi çok kısa bir yarı ömre sahiptir ve kolayca oksitlenir (Marletta, 1987; Yallampalli ve ark., 1994).



Şekil 1.2. Moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu ve NO ilişkisi (Reiter, 1995).

1.2. Serbest Radikallerin Neden Olduğu Hasarlar

Serbest radikaller inaktive edilmezse, kimyasal reaktiviteleri proteinler, karbonhidratlar, lipitler ve nükleik asitler dahil olmak üzere tüm hücrel makromoleküllere zarar verebilir. Protein üzerindeki yıkıcı etkileri, katarakt gibi hastalıklara neden olmada rol oynayabilir. DNA'ya serbest radikal hasarı, kanserin neden olduğu ve bunun da LDL kolesterol üzerindeki etkisinin kalp hastalığından büyük olasılıkla sorumlu olduğu anlamına gelir. Serbest radikaller yaşlanmadan da sorumludur (Bagchi ve Puri, 1998).

1.2.1. Proteinlere Oksidatif Hasarlar

Protein oksidasyonu, $O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$, peroksil, alkoksil, hidroperoksil gibi radikal türlerin yanı sıra, H_2O_2 , O_3 , $HOCl$, singlet oksijen, $OONO^-$ gibi nonradikal türler tarafından da uyarılabilir (Dean ve ark., 1997).

Proteinlere oksidatif atak, bölgeye özgü amino asit modifikasyonu, peptid zincirinin parçalanması, çapraz bağlı reaksiyon ürünlerinin toplanması, elektrik yüklerinin değişmesi ve proteolize karşı artan duyarlılık ile sonuçlanır (Farr ve Kogoma, 1991).

1.2.2. DNA'ya Oksidatif Hasar

Aktive edilmiş oksijen ve iyonize radyasyon tarafından üretilen ajanlar, DNA'da silinme, mutasyon ve diğer öldürücü genetik etkilere yol açan çok sayıda lezyonlara neden olurlar. DNA'daki bu hasarın karakterizasyonu, şeker ve baz kısımlarının her ikisinin de oksidasyona duyarlı olduğunu ve bu oksidasyon sonucunda baz yapısında bozulmalar, tek iplik kopmaları ile proteinlerde çapraz bağlanmalar oluşabileceğini göstermektedir (Imlay ve Linn, 1988).

ROS / RNS, her ikisi de nükleik asitlere oksidatif olarak zarar verebilir. Mitokondriyal DNA, ROS saldırısına nükleer DNA'dan daha savunmasızdır, çünkü ROS tarafından üretilen yere yakın bir yerde bulunur. ROS, en önemlisi, $OH^{\bullet}$ radikali, purin ve pirimidin bazları, deoksiriboz şeker omurgası gibi tüm DNA bileşenleriyle doğrudan reaksiyona girer ve DNA'daki tek ve çift sarmallı kopmalar dahil olmak üzere bir dizi değişikliğe neden olur. (Phaniendra ve ark., 2015).

1.2.3. Lipidlere Oksidatif Hasar

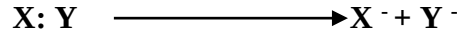
Serbest radikaller, hücre zarı kolesterolü ve yağ asitlerinin doymamış bağları ile reaksiyona girerek, peroksidasyonu başlatırlar. Radikallerin reaksiyonu sonucu, lipit peroksitler, lipit alkoller ve aldehit yapısında yan ürünler oluşur. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda malondialdehit oluşur (Senturkler ve Dizdaroglu, 1999).

1.3. Serbest Radikaller ve Hastalıklar

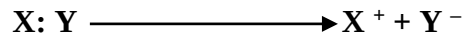
Serbest radikaller, ateroskleroz, diyabet, iskemi/reperfüzyon (I/R) yaralanması, enflamatuar hastalıklar (romatoid artrit, iltihaplı bağırsak hastalıkları ve pankreatit), kanser, nörolojik hastalıklar gibi insanlarda fizyolojik fonksiyonlarını etkileyen pek çok dejeneratif hastalıklara neden olurlar (Cui ve ark., 2004). Ancak serbest radikaller her zaman zararlı değildirler, bazen insan vücudunda faydalı bir amaca hizmet ederler. Canlı sistemdeki oksijen radikalleri muhtemelen hücresel yapının olgunlaşma sürecinde gerekli olan bileşiklerdir. Beyaz kan hücreleri, hastalıklara karşı vücut savunma mekanizmasının bir parçası olarak istilacı patojen mikroorganizmaları yok etmek için serbest radikal salgırlar. Dolayısıyla, bu radikallerin tamamen ortadan kaldırılması sadece imkansız değil, aynı zamanda zararlı da olacaktır (Bagchi ve Puri, 1998).

1.4. Serbest Radikallerin Oluşum Mekanizması

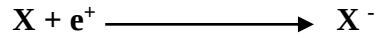
1) Normal molekülün kovalent bağının homolitik bölünmesiyle, her bir parça eşleştirilmiş elektronlardan birini korur.



2) Normal molekülden tek elektron kaybıyla



3) Normal moleküle tek elektron ilavesiyle



Bir radikal eşlenmemiş elektronunu başka bir moleküle bağışlayabilir. Eşleşmek için diğer moleküllerden elektron alabilir veya moleküle basit bir şekilde bağlanabilir. (Halliwell ve Gutteridge, 1984).

1.5. Antioksidanlar

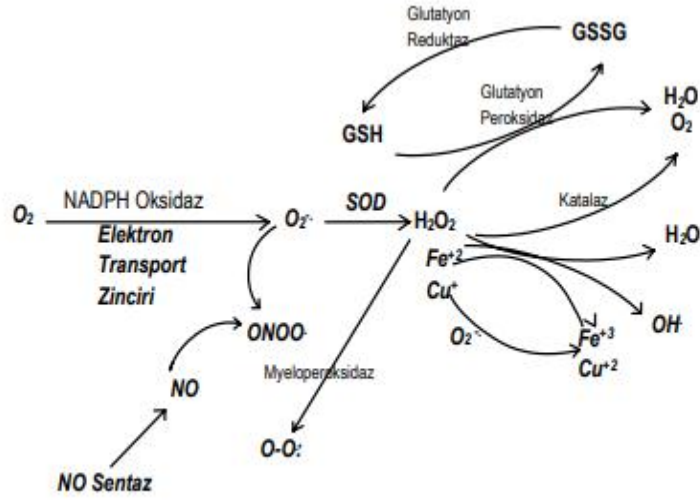
Antioksidanlar, nispeten küçük konsantrasyonlarda bile oksidasyon sürecinin bir inhibitörü olup farklı fizyolojik reaksiyonlarda rol oynarlar. Bitki materyalinin antioksidan bileşenleri, radikal temizleyicileri görevi görür ve radikallerin daha az reaktif türe dönüşmesine yardımcı olur. Meyve, sebze ve çay gibi diyet kaynaklarında çeşitli serbest radikal temizleyici antioksidanlar bulunmaktadır (Mandal ve ark., 2009).

Antioksidanlar oksitlenebilir substratların düşük konsantrasyonlarıyla karşılaştıkları zaman, bu maddelerin oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya engelleyen maddelerdir (Tegeli ve ark., 2014).

1.5.1. Antioksidanların Etki Şekli

Genel olarak, antioksidanlar aşağıdaki yollarla hareket eder.

- I. Zincir kırma reaksiyonu; serbest radikalleri yakalamak için lipit fazında etkili olurlar, örn. Tokoferol
- II. Reaktif oksijen türlerinin konsantrasyonunu azaltma; örn. Glutatyon
- III. Başlatıcı radikalleri temizleyerek; süperoksit serbest radikallerini yakalamak için lipit fazında etki olan süperoksit dismutaz gibi.
- IV. Geçiş metal katalizörünü şelatlamak suretiyle; bu şekilde, laktoferrin ve ferritin demir kaynaklı oksidan stresin kontrol altında tutulmasını sağlarken, seruloplazmin ile albümin bakır tutucular olarak görev alır (Tegeli ve ark., 2014).



Şekil 1.3. Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu (Vincent, 2004).

1.5.2. Antioksidanların Sınıflandırılması

1.5.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar arasında SOD, CAT, GR ve GSH-Px bulunur.

1.5.2.1.1. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

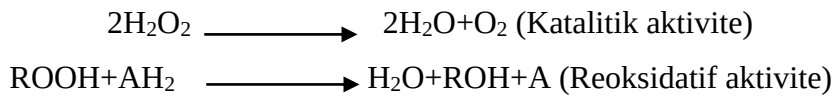
GSH-Px, esas olarak böbreklerde sentezlenen ve karaciğerde çok fazla bulunmasına rağmen hemen hemen tüm dokularda bulunan bir enzimdir (Roxborough ve ark., 1999). Subselüler yerleşimi genellikle sitozol ve mitokondridir. Enzimin aktif bölgesinde bulunan Selenyum, kofaktör olarak görev yapar ve selenyum eksikliği, enzimin aktivitesini büyük ölçüde etkiler (Nakane ve ark., 1998). GSH-Px, hidrojen peroksit veya diğer lipid hidroperoksitler gibi türlerin parçalanmasını sağlarken indirgenmiş glutatyonun (GSH) oksidasyonunu katalize eder: GSH-Px poliansature yağ asitlerinin (PUFA) oksidasyonu sonucu şekillenen lipid peroksitleri (ROOH) toksik olmayan, stabil hidroksil yağ asidi formuna (ROH) indirger (Tegeli ve ark., 2014).



GSH-Px'in ayrıca lipid hidroperoksitlere de etki etmesi, lipid peroksidasyonundan kaynaklanan hücrel hasarların tamirinde rol oynayabileceğini göstermektedir (Gibson ve ark., 1985).

1.5.2.1.2. Katalaz (CAT)

Katalaz, karakterize edilen ilk antioksidan enzimdir. Çoğunlukla hidrojen peroksit üretebilen hücrelerin peroksizomları içinde bulunur. Her biri bir hem grubu ve bir NADPH molekülü içeren dört protein alt biriminden oluşur (Kirkman ve ark., 1987). CAT çoğunlukla karaciğerde ve eritrositlerde en fazla aktiviteyi gösterir fakat diğer dokularda da bulunur (Engwa, 2018). Hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüşümünü iki aşamada katalizler:

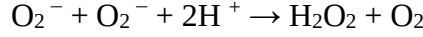


1.5.2.1.3. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD, memeli dokularında üç şekilde var olan ve kofaktörleri, subselüler yerleşimleri ve doku dağılımları bakımından farklı olan enzimatik bir antioksidandır.

- I. Bakır çinko süperoksit dismutaz (CuZnSOD) sitoplazmada ve hemen hemen tüm memeli hücrelerinin organellerinde bulunur (Liou ve ark., 1993). Bu enzim, her biri katalitik olarak aktif bir bakır ve çinko atomu içeren iki protein alt birimine sahip yaklaşık 32.000 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahiptir (Engwa, 2018).
- II. Manganez süperoksit dismutaz (MnSOD), 40.000 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahiptir ve hemen hemen tüm hücrelerin mitokondrisinde bulunur (Weisiger ve Fridovich, 1973). Her biri tek bir manganez atomu içeren dört protein alt biriminden oluşur.
- III. Ekstraselüler süperoksit dismutaz (ECSOD), CuZnSOD'dan farklı bir enzimdir (Marklund, 1982). Sadece fibroblastlarda ve endotel hücrelerinde sentezlenir ve heparan sülfatlara bağlandığı hücre yüzeyinde eksprese edilir. Heparinden salınmasının ardından, hücre dışı sıvılara salınır ve dolaşıma girer.

Superoksit dismutaz, süperoksitin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalize eder:



Hidrojen peroksit daha sonra katalaz veya GSH-Px ile giderilebilir (Engwa, 2018).

1.5.2.1.4. Glutasyon Redüktaz (GR)

GR, bir flavin nükleotid bağımlı enzimdir ve GSH-Px ile benzer bir doku dağılımına sahiptir (Gibson ve ark., 1985). GR' in görevi, okside glutasyonun redükte glutatyona oranını artırmak için NADPH'ı kullanarak GSSG'den GSH üretmektir.

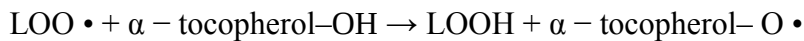


GR'nin glutasyon dönüşümünü yapabilmek için ihtiyaç duyduğu NADPH, pentoz fosfat yolundaki Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-PD) tarafından sağlanır. (Engwa, 2018).

1.5.2.2. Nonenzimatik Antioksidanlar

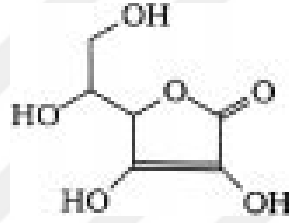
1.5.2.2.1. E Vitamini(α -tocopherol)

E Vitamini, hücre zarlarında ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) dahil olmak üzere çeşitli lipid partiküllerinde lipid peroksidasyonu sırasında etkili bir "zincir kırıcı" olarak işlev gören, yağda çözünür bir antioksidandır. Rolü lipid peroksil radikallerini temizlemek (LOO) ve lipid peroksidasyon zinciri reaksiyonlarını sonlandırmaktır (Herrera ve Barbas, 2001).



1.3.2.2.2. C Vitamini (Askorbik Asit)

Askorbik asit, suda çözünür bir antioksidandır. Ayrıca, lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmak için bir zincir kırıcı olarak da işlev görür. Bu reaksiyonda, askorbik asit lipit radikaline (LOO) bir elektron bağışlayarak askorbat radikaline dönüşür. İki molekül askorbat radikali hızlı bir şekilde reaksiyona girerek bir molekül askorbat ve bir molekül radikal giderici aktiviteye sahip olmayan dehidroaskorbat üretir. Dehidroaskorbat, oksidoredüktaz tarafından katalize edilen iki elektron ilavesiyle askorbata dönüştürülebilir. Daha çok askorbat, hücre zarlarında E vitaminini yeniden işlevsel hale getirebilmek için GSH ile reaksiyona girebilir (Oh ve ark., 2010).



Şekil 1.4. Vitamin C (Tegeli ve ark., 2014).

1.5.2.2.3. A Vitamini

Tam olarak anlaşılmamasına rağmen, A vitamini, insanların LDL'yi bakır kaynaklı oksidasyona karşı önleyen hayati bir antioksidan olarak kabul edilir (Livrea ve ark., 1995). Monaghan ve Schmitt (1932), A vitamininin antioksidan potansiyelini ilk olarak ortaya çıkarmışlardır ve A vitaminin lipitleri acılaşmaya karşı koruyabildiğini de göstermişlerdir.

1.5.2.2.4. Bioflavonoidler

Bioflavonoidler meyve ve sebzelerde yaygın olarak dağılmış bir doğal benzo- γ -piran türevleri grubudur. Serbest radikalleri temizlemede güçlü antioksidan aktivitelere sahip oldukları tespit edilen en bol polifenollerdir. Genel olarak hidroksil radikalının oluşturduğu DNA hasarına karşı koruma sağladıkları bildirilmiştir (Russo ve ark., 2000). Ayrıca, biyoflavonoidler bakır veya demir gibi metal iyonlarını şelatlayabilmekte ve böylece ROS oluşumunu engelleyebilmektedir (De Souza ve de Giovanni, 2004). Bu

biyoflavonoidler arasında flavonol, flavonlar, flavonololler, flavan-3-oller, flavonon, antosiyanidin, izoflavon, vb. bulunmaktadır (Engwa, 2018).

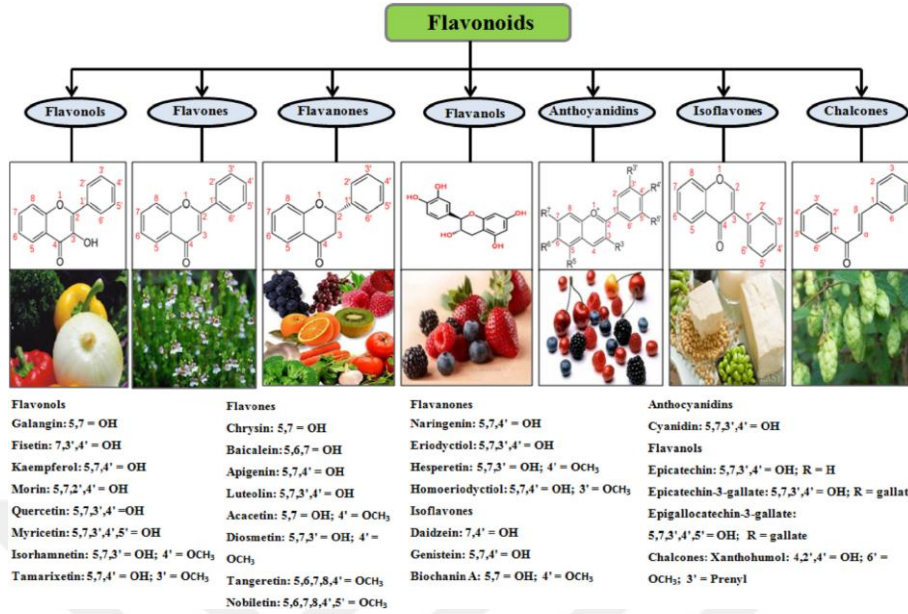
1.5.2.2.5. Karotenoidler

Karotenoidler, fitoenden sentezlenen, lipitte çözünür yaygın fito-besinler arasındadır. Bunlar arasında en bol olarak bulunanlar xanthophyll (zeaksantin, lutein) ve karotinlerdir (likopen, b-karoten). Karotenoidlerin genel olarak hücre zarının lipid peroksidasyonu işlemi sırasında üretilen peroksil radikallerini temizlediği bilinmektedir. Bu nedenle, peroksil radikallerinin temizlenmesi, hücresel lipitleri ve membran hasarlarını önler (Engwa, 2018). Karotenoidlerin oldukça lipofilik oldukları ve peroksil radikal temizleme aktiviteleri nedeniyle hücresel membranların ve lipoproteinlerin ROS'a karşı korunmasında önemli bir rol oynadıkları bilinmektedir (Stahl ve Sies, 2003).

1.5.2.2.6. Flavonoidler

Flavonoidler, biyolojik özelliklerinden dolayı insan sağlığına fayda sağlayan, büyük miktarda düşük moleküler ağırlıklı polifenolik bileşikler içeren bitkilerin ikincil metabolitleridir. Bugüne kadar yaklaşık 5000 çeşit flavonoid tanımlanmıştır (Pietta, 2000). Flavonoidler, antiallerjen ve antibiyotik özellikte olmaları, enzim aktivitelerini düzenleyici, hücre çoğalmasını inhibe edici, ülser, ishal ve iltihabı önleyici ilaç gibi görev almalarından dolayı önem taşımaktadırlar (Robards ve Antolovich, 1997; Coskun, 2005). Diyetisyenler, normal bir diyetle insanlar tarafından yaklaşık ortalama flavonoid alımını 1 g / gün olacak şekilde hesaplarlar (De Vries ve ark., 1997). Flavonoidler, doğal olarak ortaya çıkan polifenoller olup bunlar, flaksonlar, antosiyanidinler, flavonoller, flavonlar, kateşinler (veya flavanoller), izoflavonlar, dihidroflavonoller ve kalkonlardır (Hodnick ve ark., 1988; Beecher, 2003), (Şekil 1.5).

Flavonoid (OH) + R • → flavonoid (O •) + RH (Engwa, 2018).



Şekil 1.5. Flavonoidlerin sınıflandırılması (Mani ve Natesan, 2018).

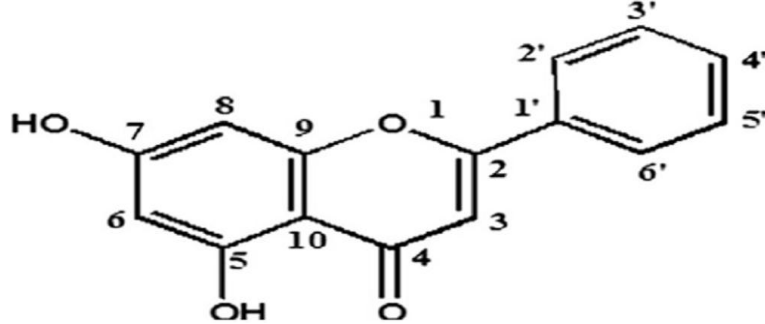
1.5.2.2.7. Chrysin

Genel olarak, CH, (5,7-dihidroksiflavon) antioksidan, antienflamatuar, antikanser ve antiviral aktiviteler dahil olmak üzere birçok biyolojik aktivite ve farmakolojik etkiler sergileyen bir flavondur. Bir dizi in vitro ve in vivo çalışma, CH' in çeşitli hastalıklara karşı tedavi edici etkilerini ortaya koymuştur. Doğada yaygın olarak bulunan 15 karbonlu flavon omurgasına sahip CH, farklı meyvelerin, sebzelerin ve hatta mantarların en önemli biyoaktif bileşenlerinden biridir. CH, C halkasının ikinci pozisyonuna bağlanmış iki A kaynaşık halkası, A ve C ve bir fenil halkası B'den oluşan ortak bir kimyasal yapıya sahiptir (Mani ve Natesan, 2018).

1.5.2.2.7.1. Chrysinin Yapısı

A halkasının 5. ve 7. pozisyonlarında ek bir hidroksil grubu ile ortak flavon yapısını paylaşır (Şekil 1.6). CH, amino asit fenilalanininden dönüştürülür. Fenilpropanoidler, bitkiler tarafından amino asitler fenilalanin ve tirozinden sentezlenen çeşitli organik bileşikler ailesidir. İsimleri, altı karbonlu aromatik fenil grubundan ve sinamik asidin fenilpropanoid biyosentezinin ilk basamağında fenilalaninden sentezlenen threarbon propen ucundan

türetilmiştir. Diğer flavonoidlerle karşılaştırıldığında, CH, spektroskopik tekniklerle en az çalışılan flavonoiddir (Pusz ve ark., 2000; Munoz ve ark., 2016).



Şekil 1.6. Chrysinin yapısı

1.5.2.2.7.2. Chrysin Kaynakları

CH, propolis, mavi tutku çiçeği (*Passiflora caerulea*) ve bal gibi ekonomik değeri yüksek ve tıbbi etkisi olan birçok bitki özünde bol miktarda bulunan bir diyet fitokimyasalıdır. *Passiflora* cinsi, yaklaşık 500 türle kıyaslandığında, Passifloraceae familyasının en büyüğüdür. (Anesini ve Perez, 1993). Bu cinsin türleri, yeni dünyanın tropik ve sıcak ılıman bölgelerinde dağılmıştır; Asya, Avustralya ve tropikal Afrika'da daha nadir görülürler.

1.5.2.2.7.3. Chrysin'in Farmakolojik Aktiviteleri

CH, çeşitli insan ve sıçan hücre tiplerinde apoptozun indüklenmesi yoluyla antienflamatuar (Cho ve ark., 2004), antioksidan (Woodman ve Chan, 2004) ve kanser kemopreventif aktivitesi göstermektedir. CH, aynı zamanda nöroprotektif, antibakteriyel, antiastmatik ve antidiyabetik etkiler de gösterir. Oksidatif hasarı inhibe eder, tümör nekroz faktörü a (TNF-a) ve IL-b ile etkileşime girer ve kaspaz ve bcl-2 ile ilişkilidir, bu nedenle motor ve duyu fonksiyonları geliştirir (Kandhare ve ark., 2014). CH, azalmış trigliserit seviyeleri, serbest yağ asitleri, toplam kolesterol, fosfolipitler, düşük yoğunluklu lipoprotein-C ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein-C seviyeleri ve yüksek yoğunluklu lipoprotein seviyeleri ile kanıtlanan umut verici hepatoprotektif ve antihiperlipidemik etkileri göstermektedir (Pushpavalli ve ark., 2010).

1.5.2.2.7.4. Biyoyararlanım

Farmakokinetik çalışmalar, yeni terapötik bileşiklerin in vivo farmakolojik ve toksikolojik etkilerini daha iyi anlamak için çok önemlidir. Bununla birlikte, terapötik potansiyeline rağmen, insanlarda chrysin ve muhtemelen diğer flavonoidlerin biyoyararlanımı, temel olarak zayıf emilim, hızlı metabolizma ve hızlı sistemik eliminasyon nedeniyle son derece düşüktür. Diğer diyet biyoflavonoidleri gibi, CH metabolizması hepatik ve bağırsak hücrelerinde oksidasyondan ziyade hem glukuronidasyon hem de sülfatlama dahil konjugasyon yolları ile katalize edilir (Mani ve Natesan, 2018).

1.6. Kurşun Asetat

İnsan sağlığını tehdit eden en önemli ağır metallerden biridir (Özbolet ve Tuli, 2016). PbA neden olduğu toksik etkiler, oksidatif stres ve serbest radikal üretimi ile meydana gelmektedir. Endüstriyel olarak yaygın biçimde kullanılan PbA, organik ve inorganik formda bulunur. İnorganik PbA, atmosferde partiküller halinde bulunurken organik PbA uçucu olup, çoğunlukla gıda maddeleri ve içme suyuna karışmaktadır. Bu sebeple organik PbA inorganik PbA'ya göre canlı yaşamını daha fazla etkilemektedir. Endüstriyel kullanımdaki yaygınlığı ile çevresel ögelerdeki yaygınlığı, PbA'ı, çevresel ve mesleki yönden önemli bir maruz kalma etkeni haline getirmektedir (Gülçin ve ark., 2002; Pionelli, 2002).

PbA'nın, laboratuvar hayvanlarında ve insanlarda, merkezi ve periferik sinir sistemi, hematopoetik sistem, kardiyovasküler sistem, böbrek, karaciğer ve üreme sistemi de dahil olmak üzere, geniş bir yelpazede fizyolojik, biyokimyasal ve davranışsal işlev bozukluğu yarattığı bilinmektedir (ATSDR, 2007).

Bu tez çalışması, atmosferde yaygın olarak bulunan PbA'nın karaciğerde meydana getirdiği hasarın göstergelerinden serum ALT, AST, ALP düzeyleri ile karaciğer dokusu MDA, GSH ve NO[•] düzeyleriyle beraber SOD, CAT, GSH-Px ile arginaz aktiviteleri üzerine CH'in koruyucu etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Pb asetat: Sigma-Aldrich Chemical Company (Dorset, UK)

CH: Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO)

CH ve Pb analitik saflıkta kullanıldı ve doz ayarlamaları sırasıyla Eldutar ve ark., 2017; Ozkaya ve ark., 2018 makalelerine göre yapıldı.

2.1.2. Kullanılan Deney Hayvanları

Çalışmada Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinde (ATADEM) yetiştirilen 250-270 g ağırlığındaki 35 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Deneyde kullanılacak olan ratlar uygulamadan 7 gün önce gruplar arası istatistiki fark olmayacak şekilde tartılarak seçildi ve ortamlarına uyumları sağlandı. Hayvanlar 24-25 °C sabit sıcaklık ve onikişer saatlik karanlık aydınlık siklusü sağlanarak kafeslerde tutuldu. Deneysel süreçte ratlara standart rat yemi ve su ad libitum olarak verildi. Çalışma, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığının tarihli (09.11.2017) ve karar No: 13/155 izni ile belgelendirildi.

2.1.3. Kullanılan Cihazlar

UV-visible Spektrofotometre: BIO-TEK EPOCH, GEN 5 Yazılımlı

Soğutmalı Santrifüj: Hettich Rotina 38 R

pH Metre: METTLER TOLEDO (Seven Compact)

Etüv: MMM Group, Ecocell 55

Vorteks: IKA MS-2

Otomatik Pipetler: BRAND transferpette ®

Saf Su Cihazı: GFL 2001/2

Buzdolabı: Vestel Nofrost

Hassas Terazisi: SHIMADZU ATX224
Çalkalamalı Su Banyosu: GFL 1083
Homojenizatör: TissueLyser II, Qiagen
Trackman: GILSON®

2.1.4. Deneysel Uygulamalar

Çalışmada 35 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat, her grupta 7 rat olacak şekilde 5 gruba ayrıldı.

1. Grup (Kontrol): Oral yolla serum fizyolojik verildi.
2. Grup (CH grubu): CH (50 mg kg⁻¹ ağırlık-gün) 7 gün boyunca oral olarak ratlara verildi.
3. Grup (PbA grubu): PbA (30 mg kg⁻¹) 7 gün boyunca 30 mg/kg PbA oral yolla ratlara verildi.
4. Grup (PbA+CH 25 grubu): 7 gün boyunca 25 mg/kg CH uygulamasından 30 dakika sonra 30 mg/kg PbA ratlara oral yoldan verildi.
5. Grup (PbA+CH 50 grubu): 7 gün süreyle 50 mg/kg CH uygulamasından 30 dakika sonra 30 mg/kg PbA ratlara oral yoldan verildi.

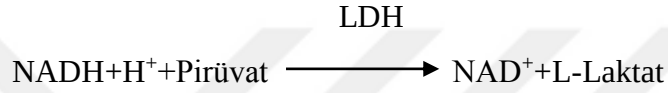
2.1.5. Deney Sonunda Numunelerin Alınması

Deneysel uygulamalardan 24 saat sonra ratlar hafif sevofloran anestezisi altında ötenazileri yapılarak, doku ve kan örnekleri alındı. Kan örnekleri serum enzim analizleri için antikoagülanlı tüplere aktarıldı, +4 °C’de 3000 devirde, 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Karaciğer dokuları ile serum örnekleri biyokimyasal analizler yapılncaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi. Deneyleri yapmaya başlamadan önce sıvı azot kullanarak TissueLyser II (Qiagen) ile 5 mikron çapa kadar öğütülen karaciğer dokularından gerekli miktarlar tartılarak analizlere uygun olan tamponlarla sulandırıldı.

2.2. Metot

2.2.1. ALT Aktivitesinin Tayini

ALT tayini prensibi aşağıdaki denklemde yer almaktadır (Matsuda ve ark., 2012).



Analizde Kullanılan Reaktifler

Reaktif 1: Tris buffer (pH 7.5): 110 mmol L⁻¹, L-Alanin: 600 mmol L⁻¹, LDH ≥ 1500 U L⁻¹

Reaktif 2: α-Ketoglutarat: 16 mmol L⁻¹, NADH: 0.24 mmol L⁻¹

Çalışma Reaktifi (Rç): Reaktif 1'den 4 hacim, Reaktif 2'den 1 hacim alınıp karıştırılır.

Deneyin Yapılışı

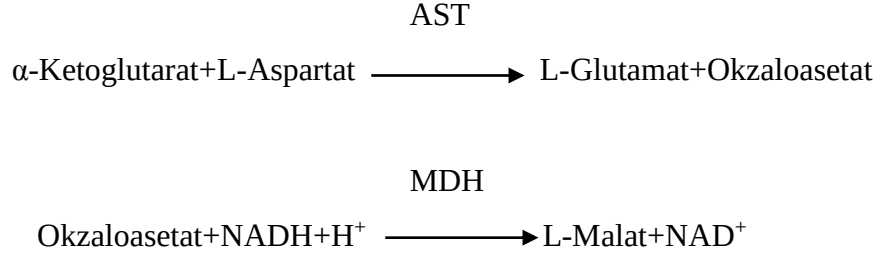
- Çalışma reaktifinden 1 mL alındı
- 100 µL örnek eklendi.
- Vorteksle karıştırıldı.
- Örnek 37 °C' de 1 dakika inkübatör de bekletildi.
- 340 nm'de 3 dakika boyunca dakika başına değişen absorbans spektrofotometrik olarak okundu.
- Dakika başına değişen optik yoğunluk ölçüldü. Sonuç U L⁻¹ olarak verildi.

Hesaplama

340 nm: ΔOD dakika⁻¹ x 1746

2.2.2. AST Aktivitesinin Tayini

AST tayini prensibi aşağıdaki denklemde yer almaktadır (Matsuda ve ark., 2012).



Analizde Kullanılan Reaktifler

Reaktif 1: Tris buffer (pH 7.8): 88 mmol L⁻¹, L-Aspartat: 260 mmol L⁻¹, LDH ≥ 1500 U L⁻¹, MDH ≥ 900 U L⁻¹

Reaktif 2: α -Ketoglutarat: 12 mmol L⁻¹, NADH: 0.24 mmol L⁻¹

Çalışma Reaktifi (Rç): Reaktif 1'den 4 hacim, Reaktif 2'den 1 hacim alınıp karıştırılır.

Deneyin yapılışı

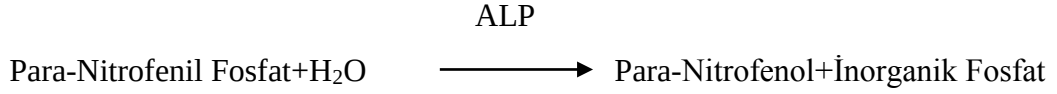
- Çalışma reaktifinden 1mL alındı.
- 100 μ L örnek eklendi.
- Vorteks ile karıştırıldı.
- Örnek 37 °C'de 1 dakika inkübatör de bekletildi.
- 340 nm'de 3 dakika boyunca dakika başına değişen absorbans spektrofotometrik olarak okundu.
- Dakika başına değişen optik yoğunluk ölçüldü. Sonuç U L⁻¹ olarak verildi.

Hesaplama

340 nm: ΔOD dakika⁻¹ x 1746

2.2.3. ALP Aktivitesinin Tayini

ALP tayini prensibi aşağıdaki denklemde yer almaktadır (Matsuda ve ark., 2012).



Analizde Kullanılan Reaktifler

Reaktif 1: Diethanolamin tamponu (pH 10.2): 1.25 mol L⁻¹, Magnezyum Klorür: 0.625 mmol L⁻¹

Reaktif 2: Para-Nitrofenil Fosfat: 50 mmol L⁻¹

Çalışma Reaktifi (Rç): Reaktif 1'den 4 hacim Reaktif 2'den 1 hacim alınıp karıştırılır.

Deneyin yapılışı

- Çalışma reaktifinden 1mL alındı.
- 20 µL örnek eklendi.
- Vorteksle karıştırıldı.
- Örnek 37 °C'de 1 dakika inkübatörde bekletildi.
- 405 nm'de 3 dakika boyunca dakika başına değişen absorbans spektrofotometrik olarak okundu.
- Dakika başına değişen optik yoğunluk ölçüldü. Sonuç U L⁻¹ olarak verildi.

Hesaplama

405 nm: $\Delta\text{OD dakika}^{-1} \times 2750$

2.2.4.1. MDA, GSH, GSHPx, SOD, CAT ve Protein Tayini İçin Karaciğer Doku Örneklerinin Hazırlanması

TissueLyser II kullanılarak toz haline getirilmiş olan karaciğer dokuları MDA, GSH, GPx ve protein analizleri için %1.15'lik KCl ile sulandırılarak homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar MDA ve protein için 3500 rpm'de 15 dakika GSH ve GPx için 11000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısım analizlerde kullanıldı. SOD aktivite tayini için karaciğer ve böbrek dokuları için Tris-HCl Tamponu (pH 7.4) ile

sulandırılarak homojenize edilmiş ve 7000 rpm’de 60 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısım analizde kullanıldı. CAT aktivite tayininde ise dokular Triton-x-100 ile sulandırılarak homojenize edildi ve 3500 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısım analiz için hazır hale getirildi.

2.2.5. Biyokimyasal Analizler (MDA, GSH, GSHPx, SOD, CAT ve Protein Tayini)

2.2.5.1. MDA Tayini

Hazırlanan homojenatta MDA düzeyinin ölçümü Placer ve ark., (1966) bildirdiği metoda göre yapıldı. Bu metot’ta MDA bir lipid peroksidasyon aldehit ürünüdür ve bu yöntemle göre tiyobarbitürik asit (TBA) ile analiz sırasında pembe renkli olan bir yapı oluşumu gözlenir. Analiz sonrası oluşan bu çözeltinin absorbansı ELISA okuyucusunda 532 nm dalga boyunda ölçülür ve standart grafiğe göre hesaplanır.

Analizde Kullanılan Reaktifler

Tiyobarbitürik Asit (TBA) Solüsyonu: 0.67 g tiyobarbitürik asit %10’ luk 80 mL perklorik asit içinde çözündürülüp toplam hacim 100 mL’ye distile suyla tamamlandı.

Trikloroasetik asit (TCA) Solüsyonu: % 10’luk (100 mL’de 10 g TCA olacak şekilde) hazırlanan çözelti ışık almayacak şekilde kahverengi cam şişelerde +4 °C muhafaza edildi.

Renk Ayırıcı: 3 birim TCA ile 1 birim TBA’nın karıştırılmasıyla elde edilir ve analizde kullanılmak üzere deneyden hemen önce hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

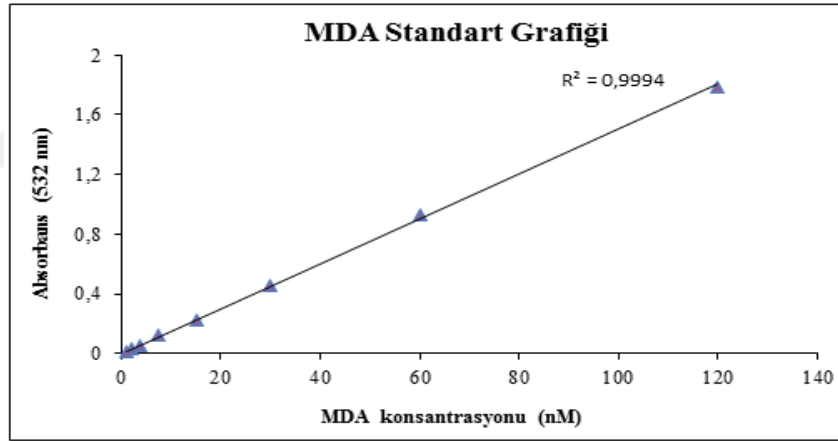
Tablo.2.1. MDA Düzeyinin Ölçümü

	Kör (mL)	Standart (mL)	Örnek (mL)
Örnek	-	-	0.25
%0.9 NaCl	0.25	-	-

Renk Ayıracı	2.25	2.25	2.25
Standart	-	0.25	

- Vida kapaklı cam tüplerin kapakları kapatıldı ve vortekste 5 dakika karıştırıldı.
- Su banyosu 100 °C'ye ayarlandı tüpler su banyosunda 20 dakika kaynatıldı ardından soğutuldu.
- Soğutulan tüpler 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant alındı.
- Pleyte yüklenen numuneler köre karşı 532 nm dalga boyunda okundu.

Karaciğer Dokularında MDA Düzeyinin Hesaplanması: Dokulardaki MDA düzeyleri, 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) kullanılarak hazırlanmış standart grafikten yararlanarak hesaplanmış olup sonuçlar nmol g⁻¹ doku olarak verildi.



Şekil 2.1. MDA standart grafiği

2.2.5.2. GSH Tayini

Hazırlanan homojenatta GSH düzeyinin ölçümü Sedlak ve Lindsay'ın (1968) bildirdiği metoda göre yapıldı. Bu metoda göre DTNB [5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik) asit], sülfidril gruplu bileşikler tarafından indirgenir ve meydana gelen sarı renk spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda ölçülür.

Analizde Kullanılan Reaktifler

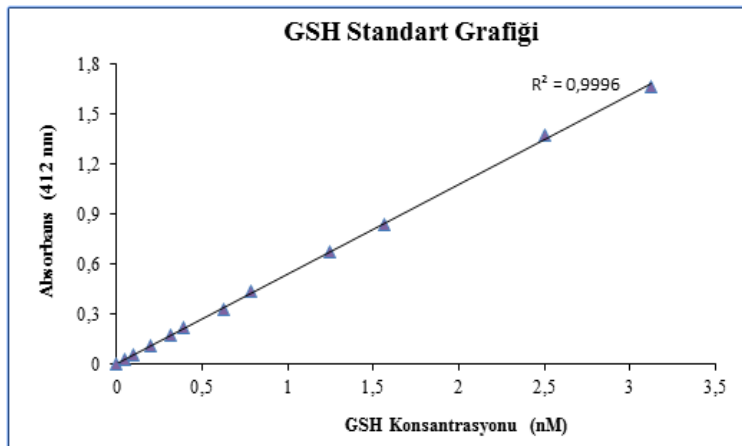
- %10' luk TCA
- Tris (hidroksimetil) aminometan: 48.46 gr alınarak distile suda çözündürölüp toplam hacim 1000 ml distile su ile tamamlandı ve pH: 8.9'a ayarlandı.
- 5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik) asit'den (DTNB) 0.099 g alındı 25 mL metanol'de çözölldü.

Deneyin yapılışı

- 0.5 mL doku homojenatı alınarak deney tüpüne aktarıldı. Deney tüpünün üzerine 2 mL TCA eklendi 20 saniye vortekste karıştırıldı.
- 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatanttan 0.5 mL alındı.
- Üzerine 2 mL Tris Tamponu eklendi, sonrasında 0.1 mL DTNB solüsyonu eklendi.
- Karıştırılan tüpler 5 dakika bekletildikden sonra 412 nm dalga boyunda distile suya karşı okundu.

Hesaplama

Sonuçlar GSH standart grafiğinden hesaplandı. Sonuçlar nmol g⁻¹ doku olarak verildi.



Şekil 2.2. GSH standart grafiği

2.2.5.3. SOD Tayini

Hazırlanan homojenatta SOD aktivitesinin ölçümü Sun ve ark. (1988) yöntemine göre ölçüldü.

SOD aktivitesinin ölçüldüğü bu deney ksantin-ksantin oksidaz sistemiyle üretilen süperoksit radikalının NBT'ü indirgemesiyle oluşan renk esasına dayanmaktadır. Oluşan bu renkli çözelti 560 nm'de mavi renkli formazon oluşumuyla maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda indirgenme maksimum olduğu için koyu mavi renk oluşumu gözlenir. SOD bulunduğu ortamda ise enzim, süperoksit anyonunu H_2O_2 'e dönüştürerek NBT indirgenmesini azaltmakta ve renk değişimi gözlenmektedir. Formazonun oluşumu enzim konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Formazonun 560 nm'de vermiş olduğu absorbans ile SOD aktivitesi hesaplanmış olur.

Analizde Kullanılan Reaktifler

SOD Ölçüm Karışımı

- 0.6 mmol L^{-1} Na_2EDTA : 23 mg Na_2EDTA tartılıp distile suda çözündürülüp toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- 400 mmol L^{-1} Na_2CO_3 : 2.54 g Na_2CO_3 : 2.54 g Na_2CO_3 tartılıp distile suda çözündürülüp toplam hacim 60 mL'ye tamamlandı.
- 0.3 mmol L^{-1} Ksantin: 9.13 mg Ksantin tartılarak distile suda çözündürüldü ve toplam hacim 200 mL'ye tamamlandı.
- 150 μ mol L^{-1} Nitroblue tetrazolyum (NBT): 12.3 mg NBT tartılarak distile suda çözündürüldü ve toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- 1 g L^{-1} Bovine Serum Albumin (BSA): 30 mg BSA tartılarak distile suda çözündürüldü ve toplam hacim 30 mL'ye tamamlandı.

Ksantin oksidaz ($167 U L^{-1}$); Mililitresinde 0.167 U olacak şekilde $(NH_4)SO_4$ içinde çözündürüldü.

2M $(NH_4)SO_4$; 2.64 g amonyum sülfat tartılarak distile suyla 10 mL'ye distile suyla tamamlandı

0.08 mmol L⁻¹ CuCl₂; 13.6 mg CuCl₂ tartılarak distile suda çözdürüldü ve toplam hacim distile suyla 100 mL'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

Tablo 2.2. SOD aktivitesinin ölçümü

	Kör (mL)	Örnek (mL)
Reaksiyon çözeltisi	2.85	2.85
Süpernatant	-	0.10
Distile su	0.10	-
Ksantin oksidaz	0.05	0.05

20 dakika oda ısısında inkübasyondan sonra tüplerin hepsine 1 mL CuCl₂ ilave edildi ve reaksiyon durduruldu. 560 nm'de okundu.

Hesaplama

$$U \text{ g}^{-1} \text{ protein} = \frac{\text{Kör (O.D)} - \text{Örnek (O.D)}}{\text{Kör (O.D)}}$$

2.2.5.4. CAT Tayini

Karaciğer dokularında CAT aktivitesi Aebi'nin (1983) metoduna göre ölçüldü. CAT, H₂O₂ yıkımını katalize eder. CAT tarafından H₂O₂'in yıkım hızı, H₂O₂' in 240 nm'de ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Analizde Kullanılan Reaktifler

- 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.0)

- 30 mM H₂O₂: 0.34 mL %30'luk H₂O₂ fosfat tampon ile 100 mL'ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

Tablo 2.3. CAT aktivitesinin ölçümü

	Kör (mL)	Örnek (mL)
Fosfat tampon	1	-
Hidrojen peroksit	-	1
Homojenat	2	2

Kör ile 240 nm'de numunelerin kinetik ölçümü ile 0. (Abs1) ve 30. (Abs2) saniyelerdeki absorbans farkı ölçülmesiyle CAT aktivitesi hesaplanır.

Hesaplama

$$k = (2.3/30) \times (\log A1/A2) \times \text{Dilüsyon}$$

Doku için spesifik aktivite: k g⁻¹ protein olarak verildi.

2.2.5.5. GSH-Px Tayini

Hazırlanan homojenatta GSH-Px düzeyinin ölçümü Matkovics ve ark., (1988) yöntemine göre ölçüldü.

Analizde Kullanılan Reaktifler

- Tampon A: Tris-HCl tamponu (50 mM, pH: 7.6): 6.057 g tris hidroksimetil aminometan, 0.372 g Na₂EDTA tartıldı ve 3.90 mL HCl balon jojeye alınarak hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

- Tampon B: Tris Tamponu (0.4 M pH:8.9): 48.46 g tris hidroksimetil aminometan alındı ve hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı pH'sı 8.9'a ayarlandı.
- Trikloroasetik asit çözeltisi (TCA): 10 g TCA tartıldı distile su ile 100 mL'ye tamamlandı (%10'luk, w/v).
- Red GSH çözeltisi: 6 mg Red GSH alınarak Tampon A ile hacim 10 mL'ye tamamlandı.
- Cumen Hidrojen Peroksit (CHPO) çözeltisi: CHPO 5µL alınarak Tampon A ile 10 mL'ye tamamlandı ve renkli şişede +4 °C'de saklandı.
- 5-5-Dithio-bis, 2-nitrobenzoik asid (DTNB) solüsyonu: 0.099 g DTNB alındı ve hacim absolut metanol ile 25 mL'ye tamamlandı ve renkli şişede +4 °C'de saklandı.

Deneyin Yapılışı

Tablo 2.4. GSH-Px Aktivitesinin Ölçümü

	Kontrol (mL)	Örnek (mL)
Süpernatant	0.5	0.5
Tampon	0.3	0.3
CHPO	-	0.1
Red GSH	0.1	0.1
37 °C' de 10 dakika bekleme	+	+
TCA	1	1

Tüpler karıştırıldıktan sonra;

- 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant'dan 1 mL alınarak hazırlanan yeni tüplere konuldu.
- Tüplere 2 mL tampon B eklendi.
- 0.1 mL DTNB ilave edildi.
- Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek 412 nm'de distile suya karşı okundu.
- Sonuçlar U g⁻¹ protein olarak verildi.

Hesaplama

$$[\text{Abs(kontrol)} - \text{Abs(örnek)}] \times 0.76989 \text{ g}^{-1} \text{ protein}$$

2.2.5.6. Arginaz Tayini

Arginaz aktivitesi; Tiyosemikarbazid-Diasetil Monoksim Üre (TDMU) yöntemi esas alınarak ölçülmüştür (Geyer ve Dabich, 1971) Diasetilmonoksim, asitli ortamda ısının etkisiyle diasetil ve hidroksilamine hidroliz olur. Diasetil, asitli ortamda üre ile birleşerek sarı renkli diazin'i oluşturur. Oluşan sarı rengi kararlı hale getirmek için Tiyosemikarbazid ve Fe^{2+} iyonları kullanılır (Pesce ve Kaplan, 1987).

Analizde Kullanılan Reaktifler

- 10 mM MnCl_2 Çözeltisi;
- 10 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Molekül Ağırlığı: 197.9 g mol^{-1}) tartılarak distile su da çözüldü ve distile su ile 500 mL'ye tamamlanarak $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı. Çalışma için kullanılacak olan bu çözeltiden sulandırılarak istenilen konsantrasyon da kullanıldı.
- Üre Standartı ($0.1 \mu\text{mol üre mL}^{-1}$); 3 mg üre (Mol. Ağ. 60.06 g mol^{-1}), 100 mL 0.016 M Benzoik asit içinde çözüldü. Hazırlanan bu çözelti, deney de 1/5 oranında sulandırıldıktan sonra $0.1 \mu\text{mol üre mL}^{-1}$ (0.6 mg dL^{-1})'lik üre standartı elde edildi.
- Renk Ayırıcı; 0.0036 M Tiyosemikarbazid (TSC, Mol. Ağ. 91.14 g mol^{-1}) ve 0.0617 M Diasetilmonoksim (DAM, Mol. Ağ. 101.1 g mol^{-1})'den oluşur. 6.23 g DAM ve 0.328 g TCS distile su da çözüldü ve 1000 mL'ye tamamlanarak koyu renkli reaktif şişesinde, oda ısısında saklandı.
- Karbonat Tampon Çözeltisi ($200 \text{ mM NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$);
- 1.68 g NaHCO_3 (Mol. Ağ. 84.01 g mol^{-1}) alındı ve distile suda çözülürülerek 100 mL'ye tamamlandı.

- 2.12 g Na_2CO_3 (Mol. Ağ. 105.99 g mol^{-1}) alındı ve distile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.
- Karbonat Tamponu hazırlanırken 200 mM'lık NaHCO_3 çözeltisi bir behere konulur Na_2CO_3 ile pH' sı 9.5'e ayarlanır ve +4 °C'de saklanır.

120 mM L-Arginin Çözeltisi; 2.52 g L- arginin monohidroklorit (Mol. Ağ. 210.66 g mol^{-1}) alındı ve distile suyla 100 mL tamamlanarak pH'sı 9.5'e ayarlandı.

Asit Karışımı;

- 0.120 M FeCl_3 / %56.7 H_3PO_4 , 3.24 g FeCl_3 (Mol. Ağ. 270.3 g mol^{-1}) distile su ile çözdürüldü ardından 66.7 mL % 85'lik H_3PO_4 'den ($d=1.71$, Mol. Ağ. 98.0 g mol^{-1}) eklendi ve distile suyla 100 mL'ye tamamlanıp oda ısısında muhafaza edildi.
- 999 ml %20 (v/v)'lik H_2SO_4 ($d=1.84$, Mol. Ağ. 98.08 g mol^{-1}) alınarak üzerine 1.0 mL üstte hazırlanan 0.120 M FeCl_3 / % 56.7 H_3PO_4 çözeltisinden eklenerek oda ısısında muhafaza edilir.

Deneyin Yapılışı

Öğütölüp hazırlanan karaciğer doku örneklerinden 0.050 mg tartıldı ve üzerine 250 μL distile su eklendi. (sulandırma 1/6). Örnekler Tissuelyser II'de homojenize edildi. Elde edilen homojenat +4 °C'de 12000 rpm'de 14 dakika santrifüj edildi. Bu işlemten sonra örneklerin süpernatantları ve peletleri (çöken kısım) birbirinden ayrıldı, süpernatant kısım enzim kaynağı olarak kullanıldı. Her bir arginaz aktivitesi 2 örnek 2 zero tüpü kullanılarak çalışıldı. Örnekler daha sonra 2 mM MnCl_2 çözeltisiyle 1/50 oranında sulandırılarak 58 °C'de 13 dakika su banyosunda tutuldu ve preinkübasyon işlemi sağlandı. Preinkübasyondan sonra örnekler enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Tüp içerisindeki enzimatik karışım 1 mL olup 120 mM'lık L-arginin'den 0.3 mL 200 mM'lık karbonat tamponundan 0.4 ml içerecek şekilde düzenlendi. Tüplere önce L-arginin sonra karbonat tamponu sonra da üzerine preinkübasyona tabii tutulan enzim kaynağından 0.3 mL eklenerek 37 °C'de 10 dakika su banyosunda tutularak enzimatik tepkime başlatıldı. Su banyosundan çıkarılan tüplere 3 mL asit karışımı eklenerek

enzimatik tepkime durduruldu. Asit eklenmesinin sonrasında tüplere 2'şer mL renk ayırıcı eklenmiş ve tüpler vorteksle karıştırıldıktan sonra 10 dakika kaynar su banyosunda tutulup renk oluşumu sağlandı.

Kaynar su banyosundan çıkarılan tüpler soğutma işlemine tabi tutulduktan sonra 520 nm dalga boyunda okundu.

Çalışmada, 1 ünite enzim: 1 saatte 37 °C'de L-argininden 1 µmol üre oluşturan enzim miktarı olup, spesifik aktivite µmol üre/ saat / g protein olarak ifade edildi.

Sonuçlar U g⁻¹ protein olarak verildi.

Tablo 2.5. Karaciğer dokusunda arginaz aktivitesi ölçümü

	Örnek (mL)	Zero (mL)	Standart (mL)	Kör (mL)
L-Arginin	0.3	0.3	-	-
Karbonat	0.4	0.4	-	-
Tamponu				
Enzim Kaynağı	0.3	0.3	-	-
Üre Std. Sol.	-	-	1	-
Distile Su	-	-	-	1
37 °C'de 10 dk	+	-	-	-
Asit Karışımı	3	3	3	3
Renk Ayırıcı	2	2	2	2

2.2.5.7. Nitrik Oksit (NO) Seviyesinin Ölçülmesi

Karaciğer Dokusu Nitrik Oksit (NO) düzeyleri ticari kit (Enzo Life Sciences, (ELS) AG, Industriestrasse 17 CH-4415 Lausen-İsviçre) kullanılarak ölçüldü.

Kit İçeriği;

- Mikrotiter Plakası

- Nitrat Redüktaz
- Nitrat Redüktaz Depolama Tamponu
- NADH
- Nitrat Standardı (1.000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 'de bir sodyum nitrat çözeltisi)
- Reaksiyon Tampon
- Griess Reaktifi I, (2M hidroklorik asitte bir sülfanilamid çözeltisi)
- Griess Reaktifi II, (M hidroklorik asit içinde bir N-(1-Naphthyl) etilendiamin çözeltisi)

Deneyin Yapılışı

Tüm reaktifler açılmadan önce en az 30 dakika oda sıcaklığına getirildi.

Tablo 2.6. NO⁻ düzeyinin ölçümü

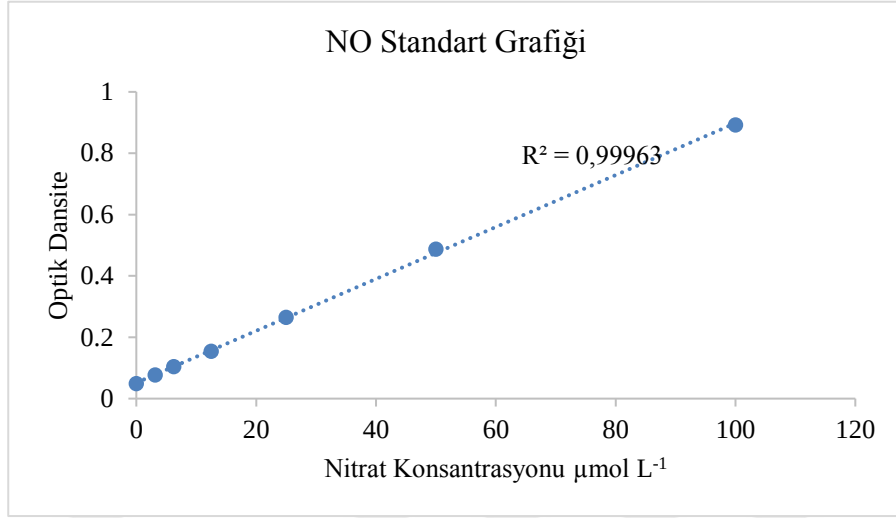
	Kör (μL)	Zero (μL)	Standart (μL)	Örnek (μL)
Reaksiyon Tamponu	200	50	-	-
Standart	-	-	50	-
Örnek	-	-	-	50
NADH	-	25	25	25
Nitrat Redüktaz	-	25	25	25

37°C de 30 dk inkübasyon

Griess Reaktifi I	-	50	50	50
Griess Reaktifi II	-	50	50	50

10 Dakika oda ısısında bekletilir ve 540-570 nm' de okunur.

Sonuçlar standart grafikten hesaplandı ve n mol g⁻¹ doku olarak verildi.



Şekil 2.3. NO standart grafiği

2.2.5.8. Protein Tayini

Karaciğer dokularında protein tayini modifiye Lowry (1951) metoduna göre belirlendi. Alkali bakır tartarat ayırıcı peptit bağları ile kompleks oluşturur. Fenol ayırıcı, bakır ile işleme tabi tutulmuş karışıma eklendiğinde mor-mavi renk oluşumu gözlenmektedir. Oluşan bu renk 650 nm dalga boyunda okundu.

Analizde Kullanılan Reaktifler

Protein Standartı; 50 µg BSA/mL

Alkali Bakır Ayırıcı; 10 g Na₂CO₃, 0.1 g Potasyum tartarat ve 0.05 g bakır sülfat, 0.5 N NaOH içinde çözündürülür ve 100 mL'ye tamamlanır. Bu çözelti oda ısısında renkli şişe de 30 gün dayanıklıdır.

Fenol Ayırıcı; 2 N Folin-Ciocalteu-Fenol ayırıcından 3.75 mL alındı ve distile su ile 67.5 mL'ye tamamlandı. Fenol ayırıcı çalışmanın örnek sayısına göre hesaplanıp günlük olarak hazırlanmalıdır.

Örnek: Analizi yapılmak istenen serum, plazma veya süpernatant.

Deneyin Yapılışı

Tablo 2.7. Protein ölçümü

		Kör (mL)	Standart (mL)	Örnek (mL)
Alkali	Bakır	1.0	1.0	1.0
Ayırıcı				
Protein Standartı		-	1.0	-
Örnek		-	-	1.0
Distile su		1.0	-	-

- Tüpler karıştırılır ve 10 dakika oda ısısında bekletildi.
- Fenol ayırıcı tüm tüplere 4 mL eklendi.
- Tüpler karıştırılır ve su banyosunda 5 dakika 55 °C’ de bekletildi.
- İnkübasyon sonrası tüpler soğutulur ve 650 nm’de kör tüpüne karşı okundu.

Hesaplama

$$\mu\text{g protein mL}^{-1} = (\text{Örnek Abs.} / \text{Std. Abs.}) \times \text{Std. Konsantrasyonu}$$

2.2.5.9. Histopatolojik İnceleme

Ratlara, ötenazi sonrası yapılan nekropsi sonucu histopatolojik değerlendirme amacıyla alınan doku örnekleri %10’luk formalin solüsyonunda 48 saat tespit edildi. Rutin doku takip işlemleri sonucu parafin bloklara gömüldü. Her bloktan 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Histopatolojik inceleme için hazırlanan preparatlar hematoxilen-eozin (HE) ile boyanıp ışık mikroskobu ile incelendi (Leica DM 1000, Germany). Kesitler immun pozitifliklerine göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi

2.2.5.10. İstatistiksel Analiz

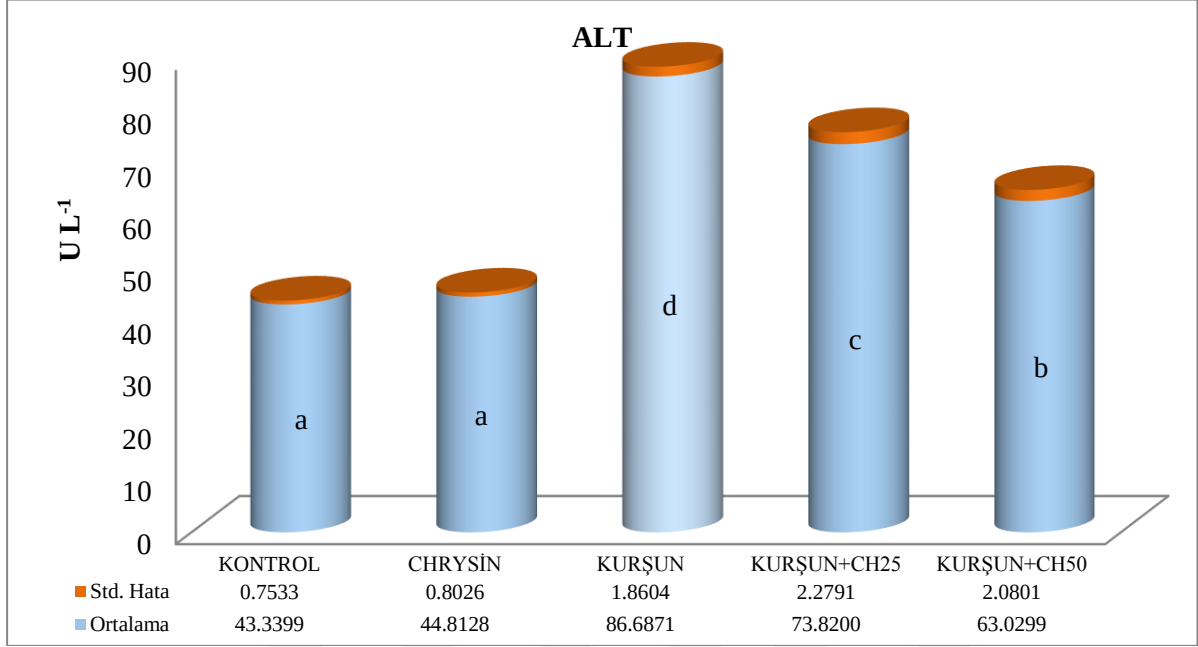
Bu çalışmanın biyokimyasal parametreleri için istatistiksel analizleri SPSS 20.0 yazılım programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analiz yöntemi uygulanmadan önce verilere normal dağılım testi uygulandı. Bütün ölçümlerde istatistiksel

farklılıklar ve önem seviyeleri “One-way Analysis of Variance (One- way MANOVA)” testi ile belirlendi ve istatistiksel farklılıkların hangi gruplar arasında gerçekleştiğini belirlemek amacıyla Tukey testi uygulandı ($p<0.05$).

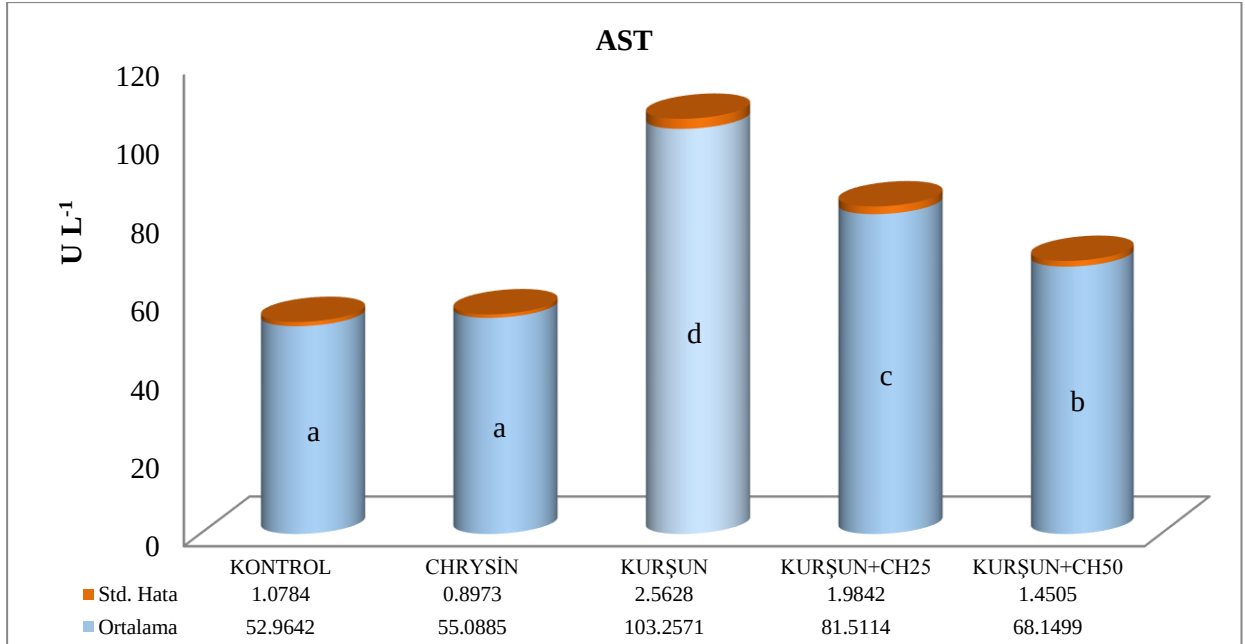
Histopatolojik incelemede semikantitatif olarak elde edilen verilerin gruplar arasındaki farklılıkların analizi için nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis testi, ikili grupların mukayesesi için Mann Whitney U testi kullanıldı ($p<0.05$). Bu istatistik analizleri için SPSS 13.0 paket programı kullanıldı.



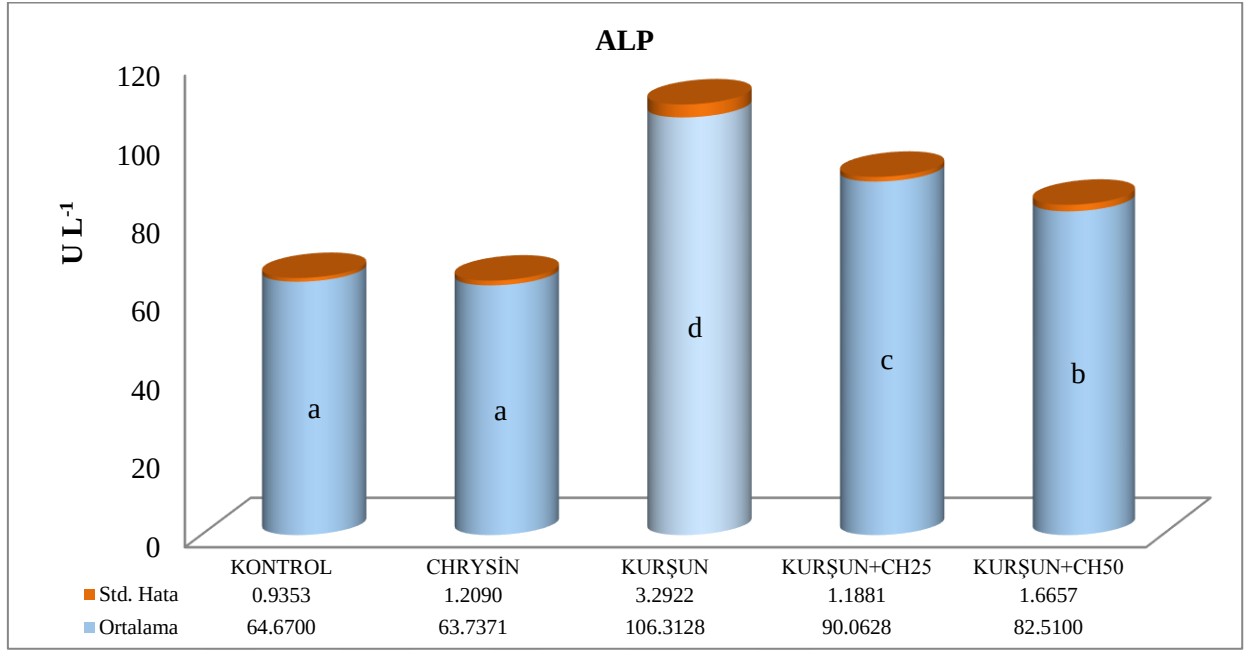
3. BULGULAR VE TARTIŞMA



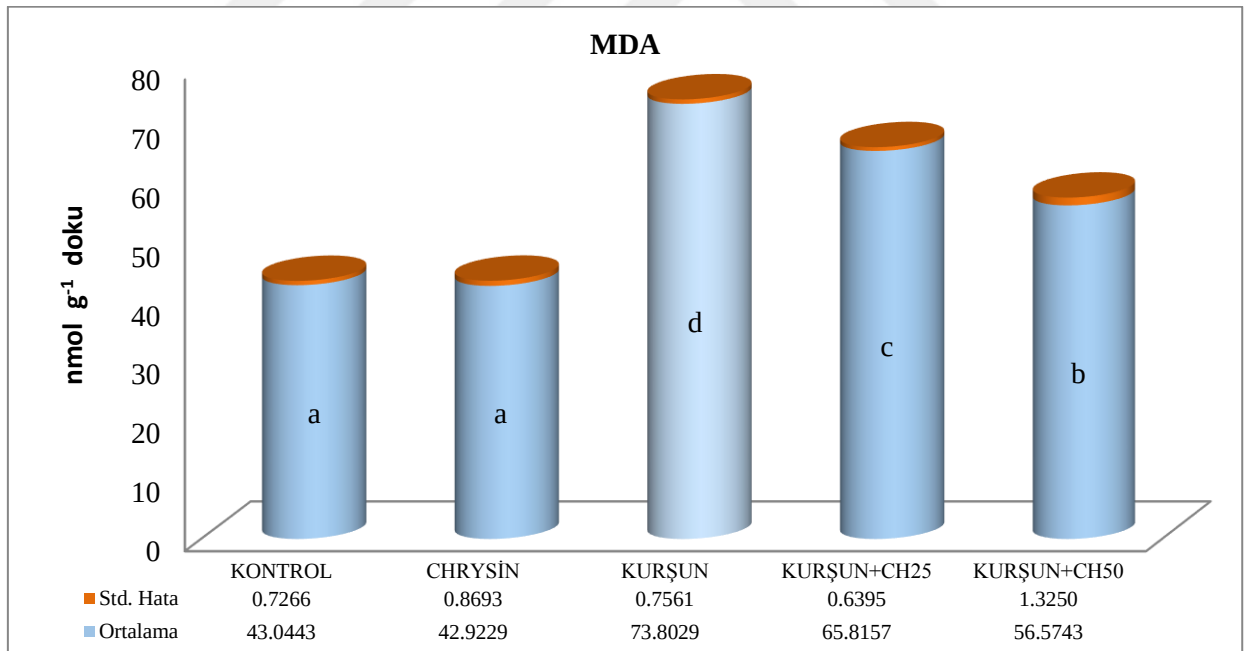
Şekil 3.1. Serum ALT aktivitesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir).



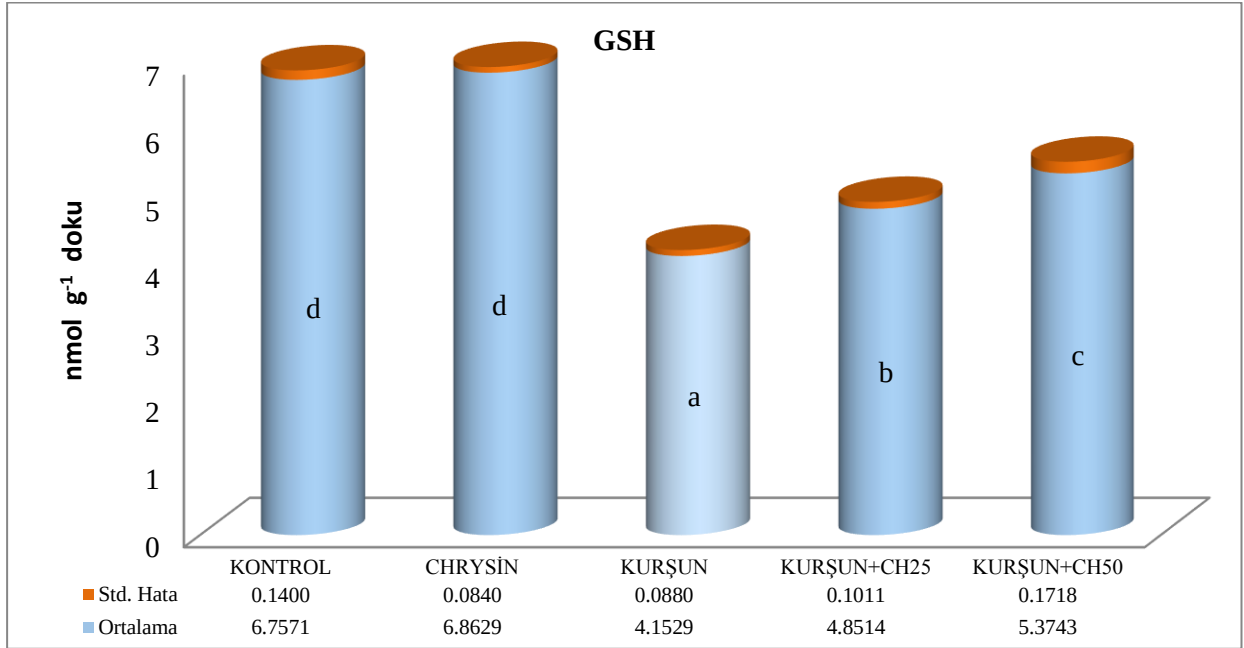
Şekil 3.2. Serum AST aktivitesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir).



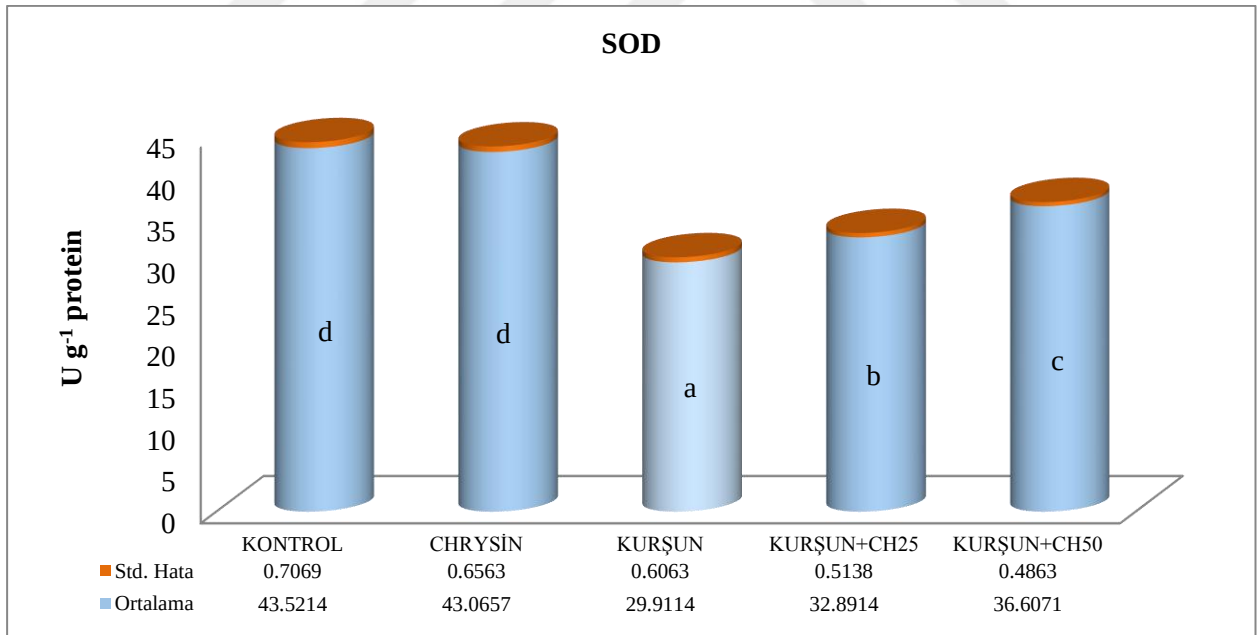
Şekil 3.3. Serum ALP aktivitesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir).



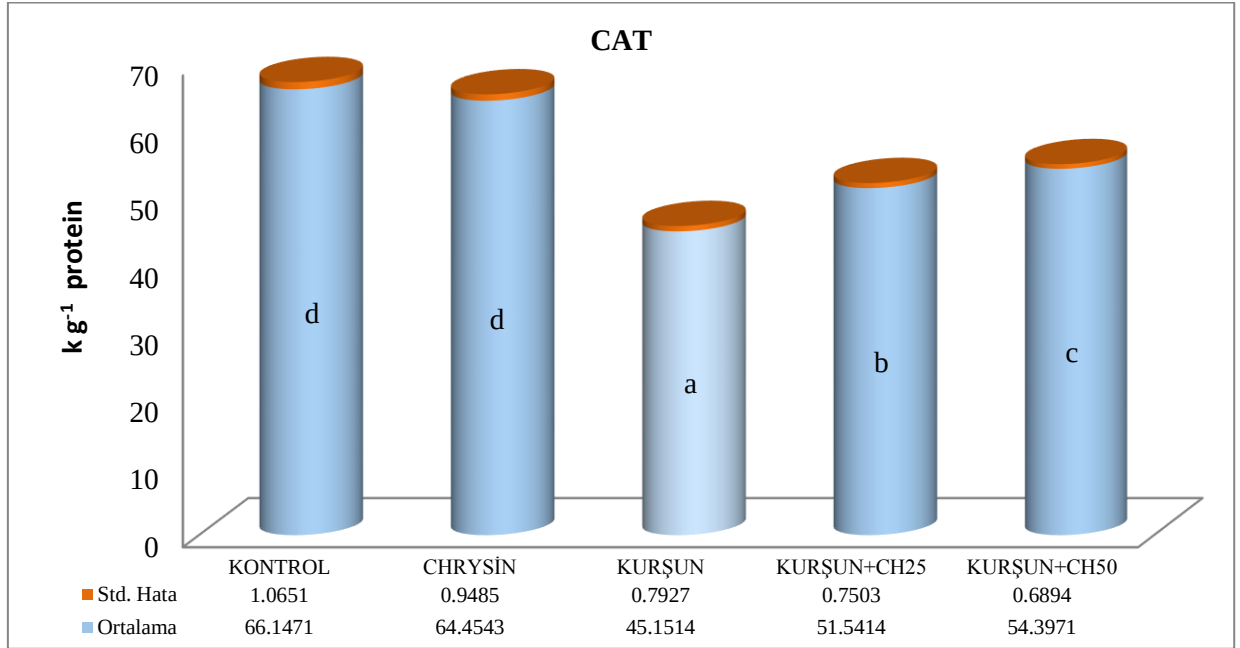
Şekil 3.4. Karaciğer MDA düzeyi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir).



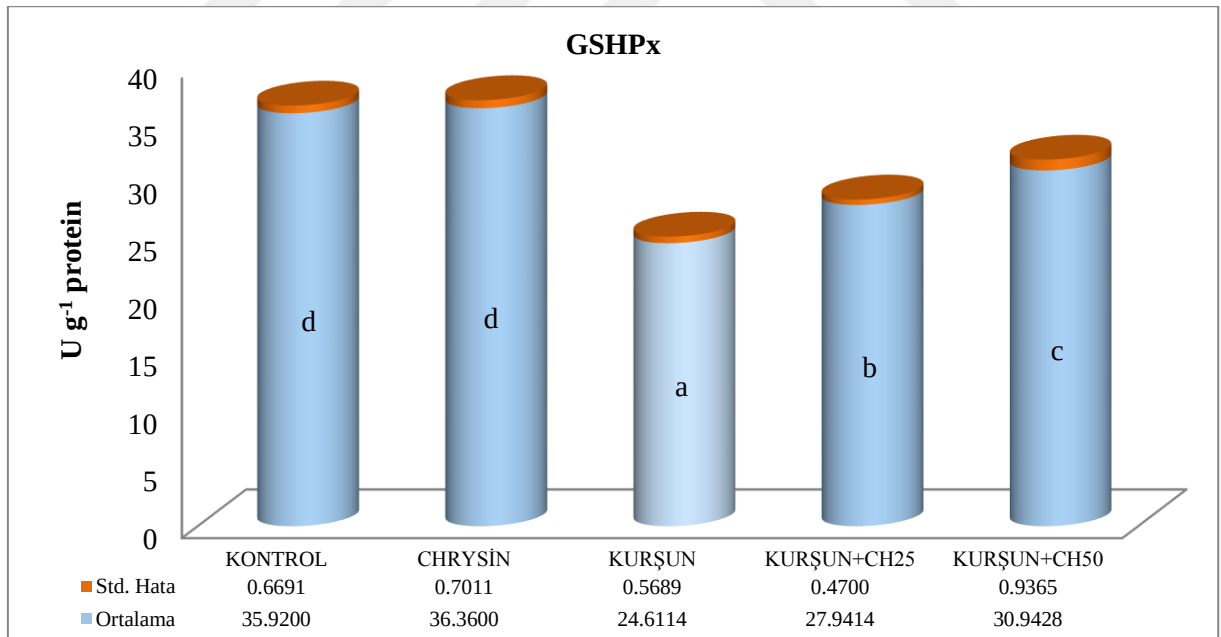
Şekil 3.5. Karaciğer GSH düzeyi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir).



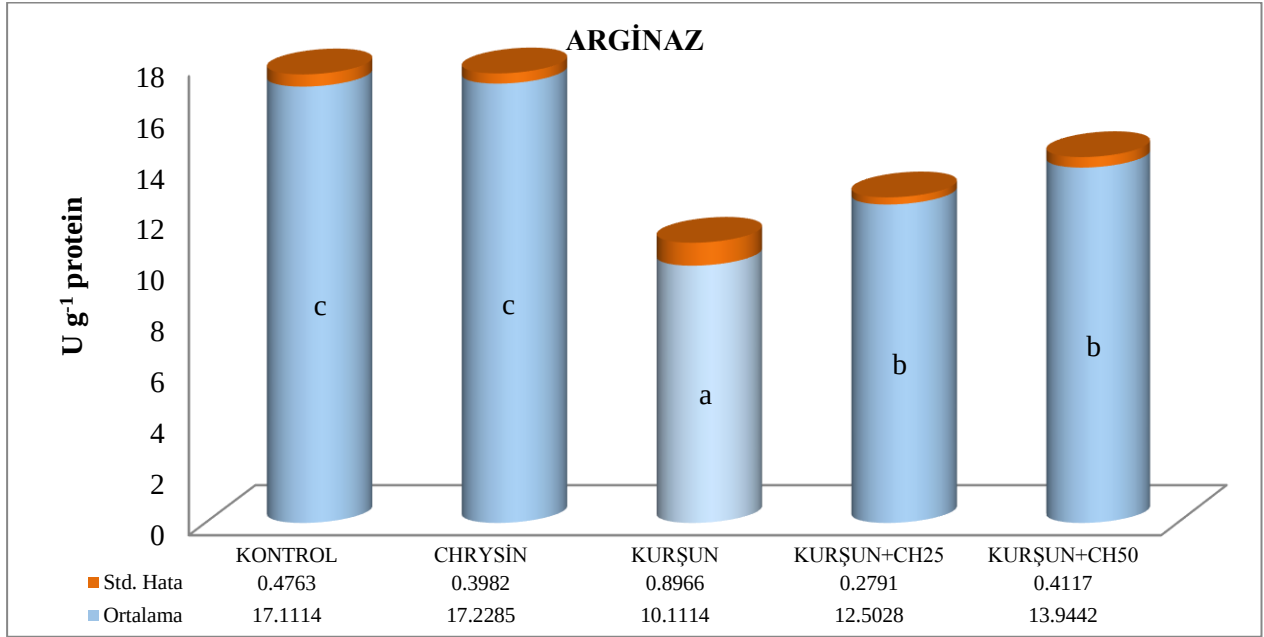
Şekil 3.6. Karaciğer SOD aktivitesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir).



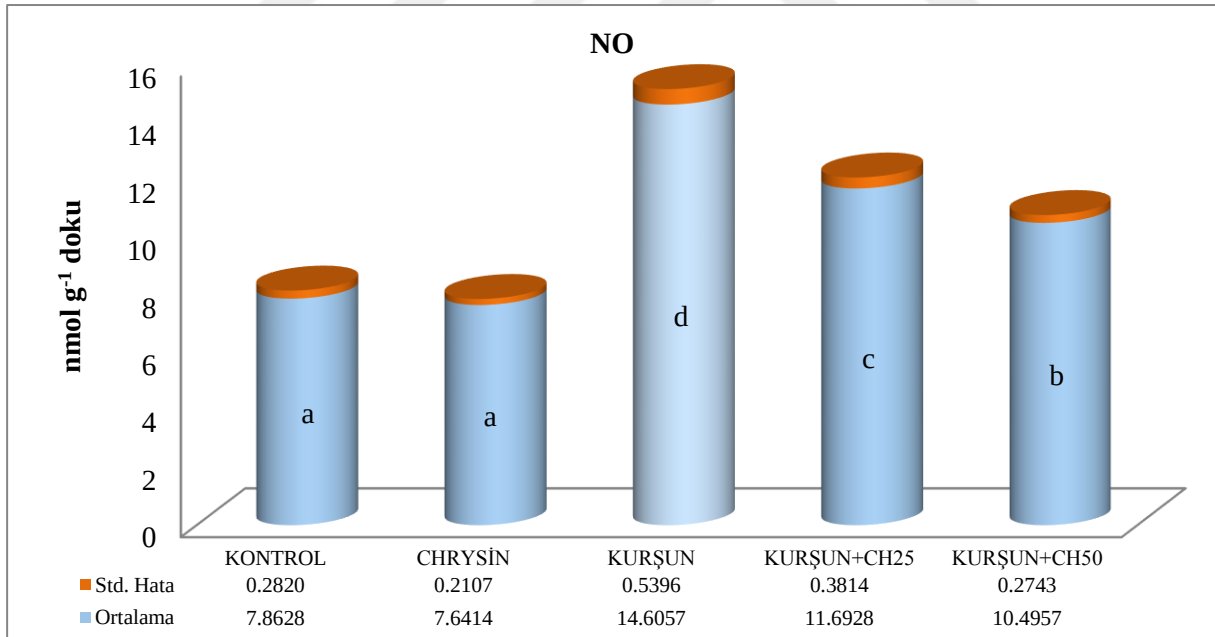
Şekil 3.7. Karaciğer CAT aktivitesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir).



Şekil 3.8. Karaciğer GSH-Px aktivitesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir).



Şekil 3.9. Karaciğer arginaz aktivitesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir).



Şekil 3.10. Karaciğer NO⁻ düzeyi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir).

Histopatolojik Bulgular

1. Grup (Kontrol); Bu grupta bulunan ratların karaciğer dokuları incelendiğinde, serozanın ve paranşim dokunun normal histolojik görünümde olduğu belirlendi (Şekil 3.11).

2. Grup (CH 50); Bu grupta bulunan ratların karaciğer dokuları incelendiğinde normal histolojik yapıda olduğu gözlemlendi (Şekil 3.12).

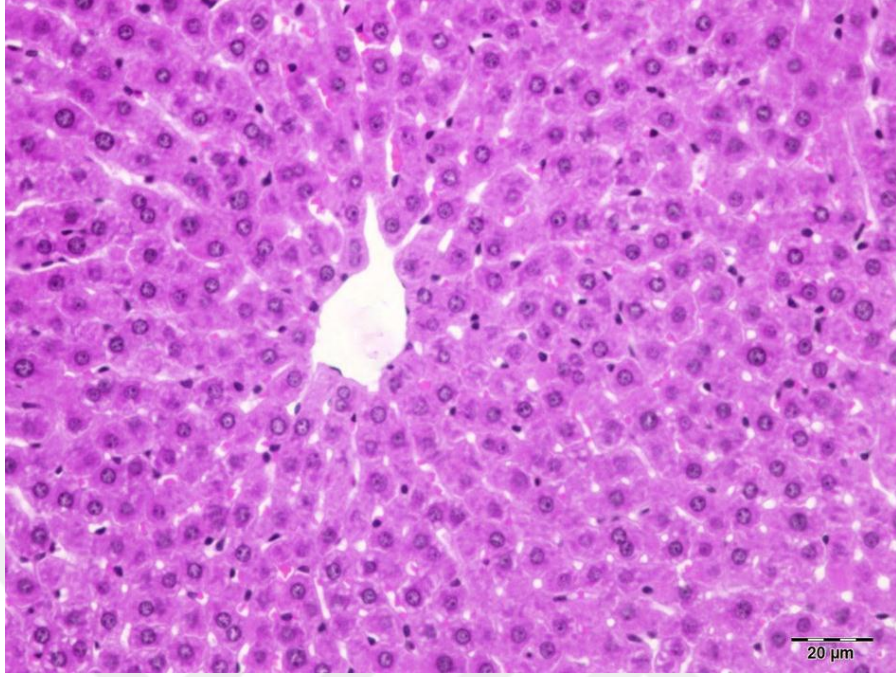
3. Grup (PbA); Bu grupta, hepatositlerde çok şiddetli düzeyde hidropik dejenerasyon ve nekroz, özellikle portal bölgede yoğun mononükleer hücre infiltrasyonları, kupfer hücre proliferasyonu ve damarlarda şiddetli hiperemi gözlemlendi (Şekil 3.13).

4. Grup (PbA+CH 25); Bu grupta, hepatositlerde orta şiddette hidropik dejenerasyon ve portal ve sinüzoidal aralıklarda mononükleer hücre infiltrasyonları, damarlarda hiperemi ve kupfer hücre proliferasyonları gözlemlendi (Şekil 3.14).

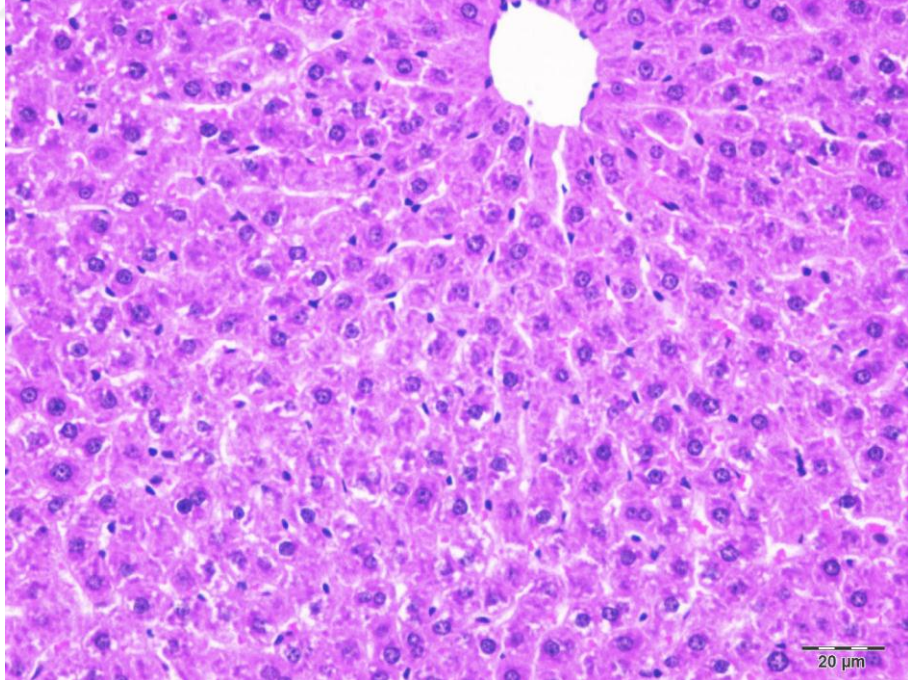
5. Grup (PbA+CH 50); Bu grupta bulunan ratların karaciğer dokuları incelendiğinde, hepatositlerde hafif düzeyde hidropik dejenerasyon, damarlarda hiperemi ve hafif düzeyde kupfer hücre infiltrasyonu ve mononükleer hücre infiltrasyonu belirlendi (Şekil 3.15). Histopatolojik bulgular tablo 3.1 de özetlendi.

Tablo.3.1. Histopatolojik bulgular

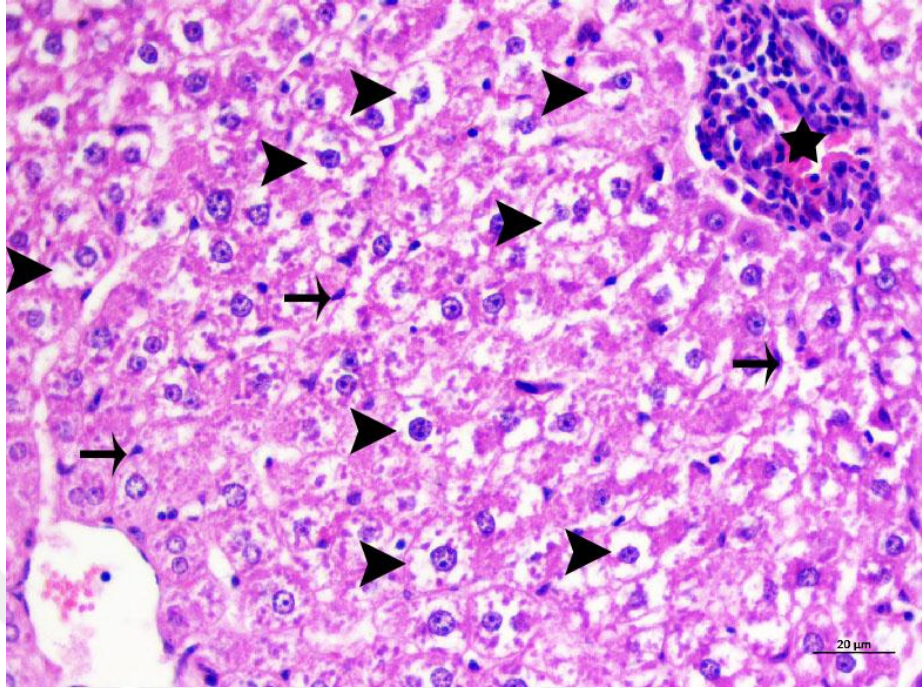
	kontrol	CH 50	PbA	PbA+CH 25	PbA+CH 50
Hepatositlerde hidropik dejenerasyon	-	-	+++	++	+
Mononükleer hücre infiltrasyonu	-	-	+++	++	+
Damarlarda hiperemi	-	-	+++	+++	++
Kupfer hücrelerinde proliferasyon	-	-	+++	++	+



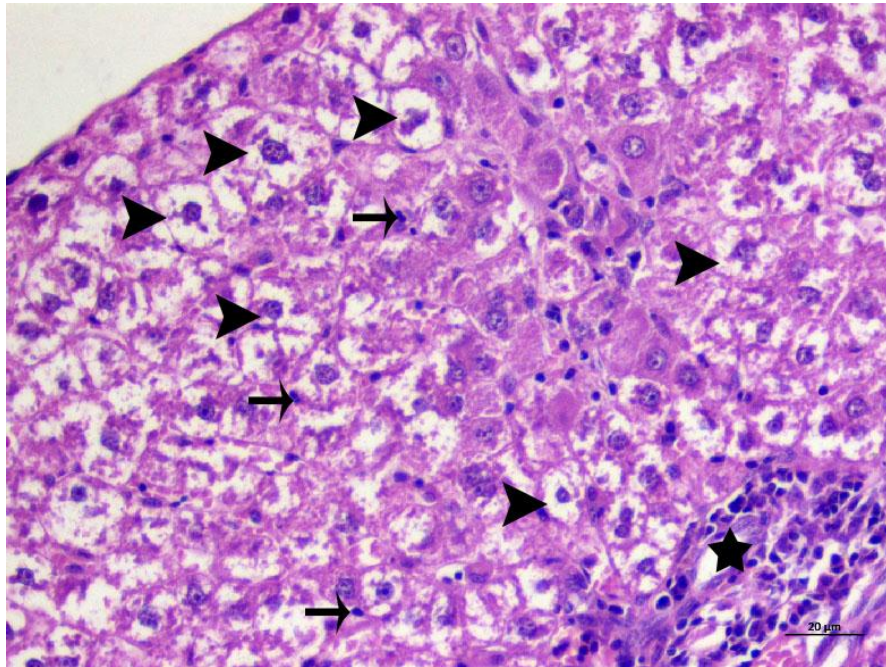
Şekil 3.11; Kontrol Grup, Karaciğer dokusu, normal histolojik görünümü, H&E, Bar:20μm



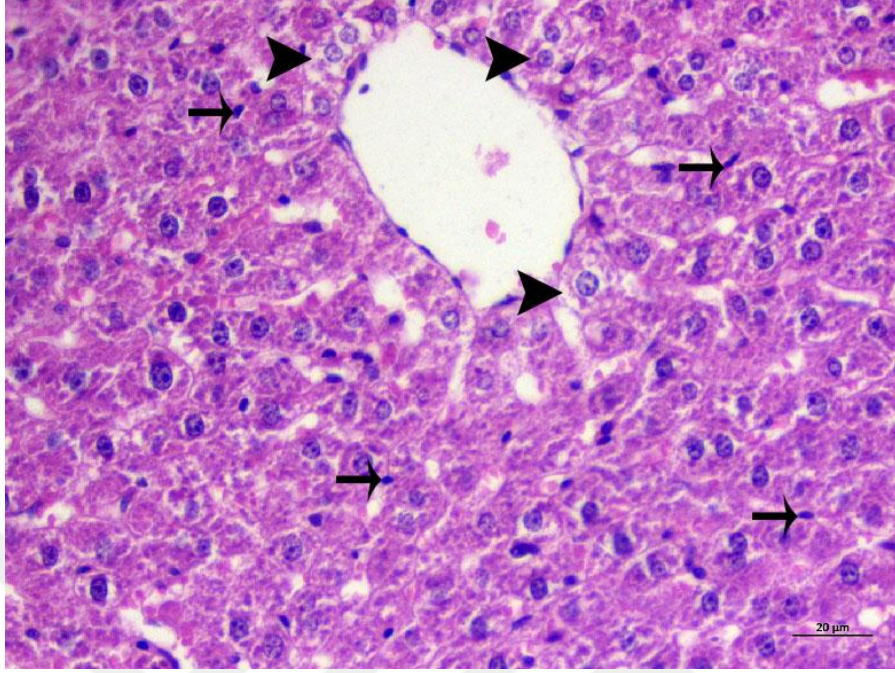
Şekil 3.12. CH 50 Grup, Karaciğer dokusu, normal histolojik görünümü, H&E, Bar:20μm.



Şekil 3.13. PbA Grup, Karaciğer dokusu, hepatositlerde şiddetli hidropik dejenerasyon (okbaşları), kupfer hücrelerinde proliferasyon (oklar), şiddetli düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonu (yıldız), damarlarda hiperemi H&E, Bar:20µm.



Şekil 3.14.; PbA+CH 25 Grup, Karaciğer dokusu, hepatositlerde hidropik dejenerasyon (okbaşları), kupfer hücrelerinde proliferasyon (oklar), orta düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonu (yıldız), H&E, Bar:20µm



Şekil 3.15. PbA+CH 50 Grup, Karaciğer dokusu, hepatositlerde hafif düzeyde hidropik dejenerasyon (okbaşları), kupfer hücrelerinde proliferasyon (oklar), H&E, Bar:20µm

Yapılan Korelasyon analiz sonucuna göre;

Çalışmamızda MDA ile GSH, SOD, CAT, GSH-Px ve Arginaz arasında negatif, MDA ile ALT, AST, ALP ve NO[•] arasında ise pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür. GSH ile SOD, CAT, GSH-Px ve Arginaz arasında pozitif, GSH ile ALT, AST, ALP ve NO[•] arasında ise negatif bir korelasyon görülmüştür. ALT ile AST, ALP ve NO[•] arasında pozitif, ALT ile arginaz arasında ise negatif bir korelasyon görülmüştür.

Önemli bir çevre kirliliği nedeni olan ve özellikle egzoz gazlarından kaynaklanan Pb'un yağmur yağmasıyla birlikte su kaynaklarına karışması sonucunda canlılar, bu elementi daha çok içme suyu yoluyla vücutlarına almaktadırlar (Bilgili, ve Şanlı, 1997). Pb zehirlenmesi eski zamanlardan beri bilinmektedir ve Pb ile zehirlenme sorunu, 18. yüzyılda bu metalin nitelikleri nedeniyle en çok kullanılan endüstriyel metallere biri olmaya başladığı sanayi devriminden günümüze kadar devam etmektedir. O zamandan beri tüm dünyada Pb maruziyetine karşı önlem olarak kurşunlu benzin, kurşunlu boyalar ve kurşun pigmentlerinin yasaklanması şeklinde tedbirler alınmaya başlanmıştır. Bu önlemler

sonucunda Avrupa ve diğer ülkelerdeki insan popülasyonun kanında Pb konsantrasyonlarında azalmalar olduğu gözlenmiştir. Pb' ye kazara maruz kalan çocuklar arasından rastgele alınan kan örneklerinden yapılan analizler sonucu, Pb kan seviyeleri ile oksidatif stresin biyokimyasal göstergeleri arasında güçlü bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Çocukların kanındaki Pb düzeyindeki artışa MDA seviyesindeki artış ve GSH seviyesindeki azalma eşlik etmiştir. Bununla birlikte kandaki Pb varlığında artmış olan H₂O₂ seviyeleri nedeniyle CAT aktivitesinde de bir artış gözlenmiştir. (Ahamed ve ark., 2005). Pb toksisitesi, çocukların bu toksik metale karşı aşırı derecede savunmasız olmaları nedeniyle özel bir ilgiyi hak etmektedir (Matović ve ark., 2015).

Karaciğer, vücut homeostazının korunmasında birinci derecede rol oynayan çok işlevli hayati bir organdır. Karaciğer, vitaminlerin ve besin maddelerinin kan dolaşımından alınmasından, dağıtılmasından ve depolanmasından sorumlu olmasının yanı sıra, çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) seviyelerini ve kan glukoz düzeylerini korumakla da görevlidir. Karaciğer plazma proteinleri üretmesi ve sağlamlasının yanısıra, çok sayıda toksik maddeleri bağlar ve indirger, fakat aşırı miktardaki toksik maddeler tarafından harap edilebilir. Yapılan çalışmalar karaciğer hastalıklarının patogenezisinde nükleer faktör-kappa B (NF-kB) sinyal yollarının (Sun ve Karin, 2008; Lee ve ark., 2010) ve oksidatif stresin (Caraglia ve ark., 2011; Tanaka ve ark., 2013) rolünün olduğunu ve bu hastalıkların iyileştirilmesinde gıda kaynaklı antioksidanların etkili olduğunu göstermiştir (Bishayee ve ark., 2010).

CH'in ve diğer doğal olarak oluşan fitokimyasalların faydalı etkileri, biyolojik kullanılabilirlikleri ve çözünürlüklerine bağlıdır. Bir dizi in vitro ve in vivo çalışmalar, CH'nin çeşitli hastalıklara karşı tedavi edici etkilerini ortaya koymuştur. Genel olarak CH, antioksidan, antienflamatuar, antikanser ve antiviral aktiviteler dahil olmak üzere birçok biyolojik aktivite ve farmakolojik etkiler sergilemektedir (Mani ve Natesan, 2018).

CH'in histamin salınımını ve proinflamatuar sitokin ekspresyonunu bloke etmek suretiyle anti-enflamatuar etki gösteren aktif bir flavonoid olduğu ispatlanmıştır (Bae ve ark., 2011). Günlük beslenmemizdeki düşük flavonoid dozları insan tüketiminde güvenli olsa da, daha yüksek dozlarda alım yapılması toksisiteye neden olabilir. CH'e bağlı sitotoksiste, CH'in hepatositlerdeki peroksidaz benzeri aktivitenin varlığına bağlı olarak, toksik ürünler oluşturmak üzere CH'in oksidasyonuna yol açmasıyla ilişkilendirilmiştir (Tsuji ve Walle, 2008). CH'in önerilen günlük dozu 0,5-3 g'dır (Mani ve Natesan, 2018).

CH ratlarda hepatoprotektif ve antihiperlipidemik etkilerini trigliseritler, serbest yağ asitleri, toplam kolesterol, fosfolipitler, düşük yoğunluklu lipoprotein-C, çok düşük yoğunluklu lipoprotein-C seviyelerindeki azalmalara ilaveten plazmadaki yüksek yoğunluklu lipoprotein-C seviyelerindeki artışlarla göstermektedir (Pushpavalli ve ark. 2010).

Hücrel hasar, enzim kaçağı ile iyi bir korelasyon göstermektedir (Sehrawat ve Sultana, 2006). Serum AST, ALT, LDH (Lactate Dehydrogenase), BUN (Blood Urea Nitrogen) ve kreatinin karaciğer ve böbrek hasarının tanısında kullanılan en hassas belirteçlerdendir (Sallie ve ark. 1991). Karaciğer, Pb toksisitesi için ana hedef organ olarak kabul edilir. ALT ve AST aktivitesi, akut hepatik nekrozun hassas göstergeleridir (Modesto ve ark., 2013). Lombardi ve ark. (2008), plazmadaki AST ve ALT aktivitelerinin, hücre sızıntısının ve karaciğerdeki hücre zarının işlevsel bütünlüğünün kaybına işaret ettiğini bildirmiştir.

Eldutar ve ark. (2017) tarafından ratlarda karaciğer hasarı üzerine CH'in etkilerinin araştırıldığı çalışmada, serumda AST, ALT, ALP değerlerinde ve karaciğer MDA düzeyinde karaciğer hasarına bağlı olarak bir artış olduğu, antioksidan enzim düzeylerinde ise azalma olduğu görülmüştür. CH uygulaması serum AST, ALT, ALP ile karaciğer MDA düzeyindeki artışı düşürmüş, buna karşılık azalan antioksidan enzim düzeylerinde ise artışa neden olmuştur.

Yapmış olduğumuz çalışmada karaciğer hasarının belirteçlerinden olan serum ALT (Şekil 3.1), AST (Şekil 3.2) ve ALP (Şekil 3.3) aktiviteleri incelendiğinde her üç grafikte de kontrol ve CH gruplarının en düşük düzeylerde olduğu ve bu iki grup arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülmüştür. Pb uygulanan ratlarda her üç parametrede de kontrole ve CH grubuna kıyasla bir artış meydana geldiği gözlenmiştir. Karaciğer doku hasarına bağlı olarak meydana gelen bu serum enzim aktivitelerindeki artışlar üzerine CH'in önleyici etkisi olduğu görülmüştür. Serum AST, ALT ve ALP değerleri üzerine CH 25 etkili olurken, üç grupta da CH 50 daha etkili olmuştur. Her üç şekilde de CH uygulanmasının PbA hasarına bağlı olarak meydana gelen enzim aktivitelerini kontrol düzeyine getiremediği görülmüştür.

Serbest radikaller, yapılarında eşlenmemiş elektron bulunduran ve yarı ömürleri çok kısa olan, oldukça reaktif bir ara kimyasal varlık sınıfını temsil etmektedirler (Cui ve ark., 2004). Pb'un oksidatif strese sebep olma yeteneği ve antioksidan savunma sisteminin

enzimatik ya da non enzimatik bileşenleri üzerine etkisi birçok epidemiyolojik ve hayvansal çalışmalarla gösterilmiştir. Pb'un kanda oksidatif strese neden olma yeteneğinden sorumlu olabilecek birkaç mekanizma mevcuttur. Pb, diğer birçok toksik metal gibi, Aminolevulinat dehidrataz (ALAD) ve GR gibi enzimlerin fonksiyonel -SH gruplarına bağlanarak bu enzimlerin aktivitelerini baskılar ve onları işlevsiz kılar (Ahamed ve ark., 2005; Gurer-Orhan ve ark., 2004). ALAD' nin inhibisyonu, H_2O_2 , O_2^- ve $OH^\cdot$ üretimine yol açan Aminolevulinat (ALA) seviyelerini arttırırken (Bechara, 1996), GR inhibisyonu ise GSH seviyelerinde eş zamanlı olarak azalmaya yol açmaktadır. Pb intoksikasyonu sonucu artmış olan ROS, oksihemoglobin ile Pb'un oksidasyona uğramasını tetikleyebilir (Gürer ve Ercal, 2000).

Okside glutatyon (GSSG), pentoz fosfat yolu tarafından sağlanan NADPH' yi kullanan GR enzimi ile redükte glutatyona (GSH) indirgenir (Blankenberg ve ark., 2003). Pb, GSH-Px için ortak bir kofaktör olan selenyumun yerini alarak onu etkisiz hale getirmekte, bunun sonucunda H_2O_2 'nin detoksifiye edilememesine bağlı olarak serbest radikallerin miktarında artma meydana gelmektedir. Bu durum GSH-Px'in selenyum içeren bir enzim olması gerçeğinden kaynaklanmaktadır. GSH serbest radikal ve diğer oksidan türlerine karşı temel bir rol oynayan hücre içi antioksidan savunma sistemi olarak bilinmektedir. GSH sistemi, GSH ile birlikte çalışan GSH-Px, glutation-s-transferaz (GST) ile GR'dan oluşur ve bunlar GSH ile birlikte H_2O_2 ve diğer organik hidroperoksitlerin yıkımını sağlarlar (Chen ve ark., 2009). Pb sadece GSH seviyelerini azaltan ve GSH' nin antioksidan aktivitesine müdahale edebilen -SH grubuna bağlanabilir (Saxena ve ark., 2005).

Karaciğerdeki Pb' un neden olduğu oksidatif stresin en önemli sonucu, membran bütünlüğünün ve yağ asidi bileşiminin (Lawton ve Donaldson, 1991) değişmesine neden olan ve MDA seviyesindeki artışla ilişkili (Jurczuk ve ark., 2007; Liu ve ark., 2012; Xu ve ark., 2008) olan lipid peroksidasyonudur (Flora ve ark., 2003; Omobowale ve ark., 2014; Valverde ve ark., 2001). Hepatosit hücre zarlarının Pb'a belirgin hassasiyeti, Pb'un araşidonik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri üzerindeki etkisiyle açıklanabilir (Lawton ve Donaldson, 1991).

Yapmış olduğumuz çalışmada serbest radikal hasarının en iyi göstergelerinden biri olan MDA düzeyleri PbA verilen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır. CH uygulanmasının PbA'a bağlı doku hasarını azalttığı ancak bu

hasarı azaltmada CH'in yüksek dozunun (CH 50) daha da etkili olduğu görülmüştür (Şekil 3.4).

Ratlarda 9 hafta boyunca içme suyuna 2000 ppm Pb katılarak yapılan çalışmada, eritrosit, lenfosit ve kan CAT aktivitelerinin belirgin derecede arttığı gözlenmiştir. Bu subkronik maruz kalma aynı zamanda kan MDA seviyesini artırırken, GSH seviyesinde ise azalmaya sebep olmuştur (Tandon ve ark., 2002). Emiliminden sonra kana geçen Pb, eritrositlerde birikir. Pb birçok organa dağılır, tercihen karaciğer ve böbreklere ve vücut yükünün % 90' ından fazlasını oluşturan kemiklerde birikir (Matović ve ark., 2015). Pb'un kandaki antioksidan SOD ve CAT enzimlerinin düzeylerini bu toksik metale maruz kalma süre ve seviyesine bağlı olarak artırdığı ya da azalttığı gösterilmiştir. Yüksek seviyede Pb'a maruz kalma, artan ROS üretiminin bir sonucu olarak bu enzimlerin aktivitesinde artışlara neden olabilirken, bu enzim aktivitelerinin baskılanması ise Pb'un, bu enzimlerin önemli ko-faktörleri olarak görev yapan biyolojik elementler ile yer değiştirme kabiliyetleriyle açıklanmaktadır (Flora ve ark., 2012).

Pb' un kanda oksidatif strese neden olma yeteneğinin, Pb ile ilişkili patolojilerin altında yatan moleküler mekanizma ile ilgili olduğu ileri sürülmektedir. Ratlarda Pb kaynaklı hipertansiyonun etiyolojisini araştırmak amacıyla yapılan çalışmalarda Pb'un serbest radikal üretimine neden olduğu ve düşük antioksidan rezervlerinin vazokonstriksiyonla direkt ilişkili olarak hipertansiyona yol açtığı bildirilmiştir (Vaziri ve ark., 1999). Pb'a maruz kalan ratlarda meydana gelen hipertansiyonun ROS tarafından oksitlenen NO⁻ düzeyindeki azalma, yani endotel gevşetici faktördeki bir azalmayla ilgili olabileceği ileri sürülmüştür (Patrick, 2006). Hematolojik sistem, bu toksik etkiler için önerilen mekanizmalardan biri olan oksidatif stres indüksiyonlu Pb toksisitesinin önemli bir hedefidir. Gerçekten de, Pb maruziyeti ile indüklenen eritrosit hemolizi kısmen eritrosit membranlarındaki lipid peroksidasyonunun bir sonucu olabilir (Lawton ve Donaldson, 1991).

Pb antioksidan enzimlerden SOD, GPx, CAT ve G6PD'a bağlanma yeteneğine sahiptir (Patra ve ark., 2011). Sivaprasad ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, 5 hafta süreyle içme suyuyla % 0.2 oranında Pb verilen ratların karaciğerinde bakılan tüm enzimlerin (CAT, SOD, GSH-Px, GR, G6PD ve GST) aktivitesinde ve GSH düzeyinde azalma olduğu gözlenmiştir. Omobowale ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada ratlara 6 hafta süreyle Pb verilerek karaciğer ve kan parametrelerine bakılmıştır. Ratların

Pb'a maruz kalması karaciğer ve eritrosit GSH-Px, GST, CAT, SOD ve GSH içeriğinde belirgin bir şekilde düşüşe yol açarken, MDA ve H₂O₂ konsantrasyonlarında ise belirgin bir şekilde artışa sebep olmuştur. Ayrıca, daha önce yapılan diğer çalışmalar CAT ve SOD aktivitelerinin Pb verilen sıçanlarda belirgin şekilde azaldığını göstermiştir (Liu ve ark., 2010). SOD, süperoksit anyonunun hidrojen peroksit'e dönüşümünü katalize eden bir enzimler grubudur. Birkaç SOD tipinin fonksiyonel grupları bakır / çinko, manganez ve demir gibi geçiş metallerinden oluşur. SOD, H₂O₂ oluşumunu süperoksit radikallerinden ve hidrojen iyonlarından katalize eder. GSH-Px'in inhibisyonunda olduğu gibi, Pb varlığı bakır SOD'un aktivitesini düşürmesine neden olur.

Yapmış olduğumuz çalışmada, antioksidan savunma sistemlerinden GSH düzeyleri (Şekil 3.5) ile SOD (Şekil 3.6), CAT (Şekil 3.7), GSH-Px (Şekil 3.8) aktivitelerinde PbA uygulaması sonucu meydana gelen düşüşler PbA'nın antioksidan sistemi zayıflattığı şeklinde yorumlanabilir. PbA'a bağlı olarak meydana gelen bu düşüşler üzerine CH'in her iki dozunun da artırıcı yönde etki gösterdiği ve yüksek dozun daha etkili olduğu görülmüştür. Ancak uygulanan bu dozların her ikisi de kontrol grubundaki düzeye getirmek için yeterli olamamıştır.

Bununla birlikte, ratların daha düşük seviyelerde (içme suyunda % 0.1 Pb) daha uzun süreyle (3 ay) Pb'a maruz kalmaları, karaciğer GSH seviyesi ile CAT aktivitesinde belirgin bir şekilde azalış, GSH-Px aktivitesinde ise artışa neden olmuştur. GSH-Px aktivitesindeki bu artışın GSH-Px reaksiyonu yoluyla lipid peroksitlerin uzaklaştırılmasıyla ilgili olabileceği düşünülmüştür (Flora ve ark., 2003).

GSH-Px, SOD ve CAT, özellikle metal, çinko, bakır ve selenyum gibi eser metallerin varlığına bağlı olduğu için toksisiteye karşı özellikle hassastır. Hsu ve Guo (2002) tarafından, Pb'un bu enzimlerin sülfhidril grubuna geri dönüşümsüz olarak bağlanabildiği ve bu durumun enzim fonksiyonlarında aktivite kaybına sebep olduğu bildirilmiştir. CAT hem grubu içeren tetramerik yapıya sahip bir enzim olup, Pb'dan olumsuz etkilenmektedir. Pb hem sentezinin bir inhibitörü olduğu için CAT aktivitesini ve üretimini düşürmektedir (Patil ve ark., 2006). Pb'un kronik olarak alınması, karaciğer GSH seviyelerinde önemli bir azalmaya neden olur (Wang ve ark., 2007).

Ratlar üzerinde yapılan deneyde, Pb 4 hafta boyunca 10, 50 ve 100 mg/canlı ağırlık olarak verilmesi sonucunda karaciğerde ROS ve MDA seviyelerinin kademeli olarak arttığı DNA hasarı ve apoptozis sayesinde izlenmiştir (Xu ve ark., 2008).

Liu ve ark., (2012), 75 gün boyunca içme suyu yoluyla 500 mg /L Pb çözeltisi ile ratları muamele etmiş ve ROS düzeyleriyle ilişkili olarak 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) seviyelerinin, Pb ile muamele edilmiş sıçanların karaciğerinde belirgin bir şekilde artmış olduğunu görmüşler ve bunun da DNA'nın karaciğerde ROS kaynaklı hasarın bir göstergesi olduğunu düşünmüşlerdir. Pb kaynaklı DNA hasarı ve azalmış karaciğer RNA içeriği karaciğerde protein sentezi oranının azaldığını işaret etmektedir (Shalana ve ark., 2005). Pb ile muamele edilmiş ratlarda GSH-Px, GST ve GR aktivitelerindeki düşüşler daha önceki çalışmaları desteklemektedir, Pb kaynaklı hepatotoksisite karaciğerde ROS artışıyla kendisini gösteren oksidatif stresle ilgilidir. Zn ve Pb üretim tesislerinde Pb'a maruz kalan popülasyonlar üzerine yapılan bir çalışmada, Pb seviyesi ile eritrosit ve lökosit MDA düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür (Kasperczyk ve ark., 2014).

Yapmış olduğumuz çalışmada, PbA kullanımına bağlı olarak ratların karaciğer dokusunda MDA düzeyinde artış, enzimatik ve non enzimatik enzim aktivitesinde ise azalmalar olduğu görülmüştür. Artan MDA ve azalan antioksidan enzim aktiviteleri üzerine CH'in olumlu etki yaptığı, ancak CH'in her iki dozunun da meydana gelen bu değişimleri kontrol seviyesine getiremediği görülmüştür.

L-arginin arginaz ve NOS tarafından ortaklaşa kullanılan bir amino asittir. Arginaz enzimi L-arginini üre ve L-ornitin çevirirken, nitrik oksit sentaz (NOS) ise L-sitrülin ve NO'ye dönüştürür. Renksiz ve son derece zehirli bir gaz olan NO serbest radikal olmasından dolayı yarı ömrü çok kısa olup lipofilik özellik göstermektedir. Oksijensiz ortamda oldukça stabildir ve suda erir (Moncada ve ark., 1989; Palmer ve Moncada, 1989). Düşük konsantrasyonlarda bile, ortamda oksijen varlığında stabilitesini koruyabilen NO bilinen en düşük molekül ağırlıklı, reaktif (biyoaktif) memeli hücresi sekresyon ürünüdür (Grisham, 1997). Düşük konsantrasyonlarda iken NO toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevlerin gerçekleşmesinde rol oynar.

Arginaz karaciğerde çok miktarda bulunur, bir dereceye kadar eritrositlerde ve ince bağırsaklarda ve çok az miktarda böbrek ve beyinde de bulunur. İnsan arginazının neredeyse sadece karaciğerde mevcut olması nedeniyle, dolaşımdaki karaciğer tipi arginazın, karaciğer hasarı için daha spesifik bir belirteç olarak hizmet etmesi beklenir. Arginaz enzimi hepatoselüler hasarın mükemmel bir göstergesidir ve aynı zamanda, karaciğer fonksiyon testlerinden daha iyi bir şekilde prognostik tanı göstergesidir (Ikemoto

ve ark., 1989). Üre dışında arginaz, prolin, glutamat ve poliaminler için bir ana bileşik olan ornitinin biyosentezinde yer alır. Birçok önemli biyokimyasal yola dahil olduğundan, arginaz çeşitli patolojik süreçlerin gelişiminde anahtar rol oynayabilir (Chrzanowska ve ark., 2009).

Arginaz enziminin kinetik özellikleri üzerine yapılan araştırmalarda Pb'un enzim aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Colombo ve Konarska, 1984; Kandemir ve Ozdemir, 2008; Demir ve ark., 2015).

Mevcut çalışmada, üre döngüsü enzimlerinden olan arginaz enzim aktivitesinin kontrol grubu ile CH grubunda aynı düzeyde olduğu görülmüştür. PbA uygulaması arginaz aktivitesinin kontrole oranla düşürmüş ve PbA ile birlikte uygulanan CH'in her iki dozunun da arginaz aktivitesini artırdığı görülmüştür. Ancak bu artış kontrol seviyesine getirmeye yeterli olamamıştır (Şekil 3.9).

Nitrik oksit metabolizmasının, hem oksidatif stres kaynaklı hipertansiyon hem de Pb kaynaklı hipertansiyonun patogeneğinde merkezi bir rol oynadığı gösterilmiştir (Vaziri ve Sica, 2004). Endotel bağımlı vazodilatasyon, düz kas hücre proliferasyonunun inhibisyonu, trombosit agregasyonu ve monosit adezyonu için nitrik oksit seviyelerinin yeterli olması gerekmektedir (Boger ve Ron, 2005). Endotel gevşetici faktör olarak da bilinen NO[•], ROS tarafından etkili bir şekilde inaktive edilir (Vaziri ve ark., 1998). ROS'un, vasküler endotel hücrelerinde nitrik oksidi oksitlediği, bir nitrik oksit eksikliği yarattığı, lipitlere ve DNA'ya zarar verebilecek oldukça aktif bir ROS olan peroksinitriti ürettiği gösterilmiştir (Halliwell, 1997). Glutasyon tükenmesi ve Pb maruziyetinin bağımsız olarak nitrik oksidi baskıladığı ve hayvan modellerinde hipertansiyona neden olduğu gösterilmiştir (Vaziri ve ark., 2000; Vaziri ve ark., 1997).

Mevcut çalışmada karaciğer NO[•] düzeylerinin kontrol ve CH grubunda aynı olduğu, PbA uygulamasının NO[•] düzeyini kontrole göre artırdığı ve bu artışı azaltmada CH'in her iki dozunun da etkili olduğu görülmüştür (Şekil 3.10). Çalışmada arginaz aktivitesinin düşmüş, NO seviyesinin artmış olması L-arginini ortak substrat olarak kullanan arginaz ve NOS arasındaki dengenin NOS tarafına kaydığı şeklinde yorumlanabilir.

Histopatolojik olarak incelendiğinde kontrol ve CH gruplarındaki ratların karaciğer dokuları normal histolojik görünümdeydi (Şekil 3.11, Şekil 3.12). PbA grubunda hepatositlerde şiddetli düzeyde nekrotik değişiklikler, hidropik dejenerasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonları gözlemlendi (Şekil 3.13). PbA+CH 25 grubunda da

hepatositlerde şiddetli düzeyde nekrotik değişiklikler, hidropik dejenerasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü (Şekil 3.14). Fakat PbA+CH 50 grubunda görülen hepatositlerde görülen nekrotik değişiklikler ve hidropik dejenerasyonların PbA ve PbA+CH 25 grubuna göre daha hafif düzeyde olduğu belirlendi (Şekil 3.15).

Ratlarda subkronik zehirlenme ile karaciğer hasarı oluşturulan bir çalışmada (Çay, 2012) toksik grubun karaciğer doku kesitlerinde apoptotik hücreler olduğu, hepatositlerin değişime uğradığı, Kupffer hücre sayısında artış olduğu ve histopatolojik hasarların meydana geldiği tespit edilmiştir. CH uygulamasının Kupffer hücre sayısında azalma ve histopatolojik değişikliklerde düzelmeye neden olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda PbA'ın sebep olduğu histopatolojik değişimlerin yüksek doz CH uygulaması ile (PbA+CH 50) hafiflemeye başladığı tespit edilmiştir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada, PbA ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda, CH'in antioksidan etkileri araştırılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar kısaca aşağıda belirtilmiştir.

1. Çalışma sonucunda PbA uygulanan ratlarda karaciğer hasarının göstergesi olarak serum AST, ALT düzeyleri artmıştır. Ayrıca serum ALP düzeyi de PbA kullanımına bağlı olarak artış göstermiştir. Serbest radikal hasarının göstergesi olarak karaciğer dokusunda MDA düzeyinde artış ile enzimatik ve non enzimatik antioksidanlarda azalma gözlenmiştir.
2. PbA kaynaklı hasarı gidermek için verilen CH dozlarının (25 ve 50 mg kg⁻¹) MDA seviyesinde azalmaya, CAT, SOD, GSH-Px aktivitelerinde ve GSH seviyelerinde artışa neden olduğu, böylece CH'in antioksidan özellik gösterdiği belirlenmiştir.
3. PbA kullanımına bağlı olarak NO[•] düzeyinde artış, arginaz enzim aktivitesinde ise bir azalma gözlenmiştir. CH kullanımına bağlı olarak NO[•] düzeyinde azalma, arginaz aktivitesindeki artış CH'in hasara bağlı değişiklikleri düzeltmede başarılı olduğu görülmüştür.
4. CH'in PbA'ın meydana getirdiği karaciğer hasarlarını azaltmada faydalı olabileceği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)**, 2007. Toxicological Profile for Lead. U.S. Department of health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.
- Ahamed, M., Verma, S., Kumar, A., Siddiqui, M.K.**, 2005. Environmental exposure to lead and its correlation with biochemical indices in children. *Science of the Total Environment* 346:48-55.
- Anesini, C., Perez, C.**, 1993. Screening of plants used in argentine folk medicine for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology.*, 39:119-128.
- Bae, Y., Lee, S., Kim, S.H.**, 2011. Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor-kB. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254:56-64.
- Bagchi, K., Puri, S.**, 1998. Free radicals and antioxidants in health and disease: a review. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 4(2):350-360.
- Bechara, E.J.**, 1996. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29:841-851.
- Beecher, G.R.**, 2003. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *Journal of Nutrition*, 133:3248-3254.
- Bilgili, A., Şanlı, Y.**, 1997. Sığırlarda kurşunun sebep olduğu zehirlenme. *Etlik Mikrobiyoloji Dergisi*, 9(1):22- 30.
- Bishayee, A., Darvesh, A.S., Politis, T., McGory, R.**, 2010. Resveratrol and liver disease: from bench to bedside and community. *Liver International*, 30:1103-1114.
- Blankenberg, S., Rupprecht, H.J., Bickel, C., Torzewski, M., Hafner, G., Tiret, L., Smieja, M., Cambien, F., Meyer, J., Lackner, K.J.**, 2003. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine*, 349:1605–1613.
- Boger, R.H., Ron, E.S.**, 2005. L-arginine improves vascular function by overcoming the deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. *Alternative medicine review*, 10:14-23.
- Caraglia, M., Giuberti, G., Marra, M., Addeo, R., Montella, L., Murolo, M., Sperlongano, P., Vincenzi, B., Naviglio, S., Prete, S.D., Abbruzzese, A., Stiuso, P.**, 2011. Oxidative stress and ERK1/2 phosphorylation as predictors of outcome in

hepatocellular carcinoma patients treated with sorafenib plus octreotide LAR. *Cell Death & Disease*, 2:e-150,1-7.

- Chan, H.W.S.**, 1971. Singlet oxygen analogs in biological systems: coupled oxygenation of 1,3-dienes by soybean lipoxidase. *Journal of the American Chemical Society*, 93(9):2357–2358.
- Chen, Y., Ji, L., Wang, H., Wang, Z.**, 2009. Intracellular glutathione plays important roles in pyrrolizidine alkaloids-induced growth inhibition on hepatocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28:357–362.
- Cho, H., Yun, C.W., Park, W.K., Kong, J.Y., Kim, K.S., Park, Y., Lee, S., Kim, B.K.**, 2004. Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives. *Pharmacological Research*, 49:37-43.
- Chrzanowska, A., Gajewska, B., Barańczyk-Kuźma, A.** 2009. Arginase isoenzymes in human cirrhotic liver. *Acta Biochimica Polonica*, 56:465–469.
- Colombo, J.P., Konarska, L.**, 1984. Arginase. In: Bergmayer GM. (Editor). *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd Edition, Weinheim: *Verlag Chemie*, 285-294.
- Coskun, T.**, 2005. Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 48:69-84.
- Cui, K., Luo, X., Xu, K., Ven Murthy, M.R.**, 2004. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 28(5):771-799.
- Çay, M.**, 2012. Ratlarda subkronik formaldehit zehirlenmelerinin karaciğerde neden olduğu hasara karşı chrysin'in etkileri. *Yüksek Lisans Tezi*, İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 45s.
- De Souza, R.F.V., de Giovani, W.F.**, 2004. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Report*, 9(2):97-104.
- De Vries, J.H., Janssen, P.L., Hollman, P.C., Van Staveren, W.A., Katan, V.**, 1997. Consumption of quercetin and kaempferol in free living subjects eating a variety of diets. *Cancer Letters*, 114: 141-144.
- Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M.J.**, 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal*, 324:1–18.
- Demir, F., Ozan, G., Temizer Ozan, P. S.**, 2015. Ratlara Uygulanan Kurşun Asetatın Karaciğer Arginazına Etkisi ve Enzimin Bazı Kinetik Özellikleri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 29, (1):37-43.

- Eldutar, E., Kandemir, F.M., Kucukler, S., Caglayan, C.,** 2017. Restorative effects of Chrysin pretreatment on oxidant–antioxidant status, inflammatory cytokine production, and apoptotic and autophagic markers in acute paracetamol-induced hepatotoxicity in rats: An experimental and biochemical study. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, e21960.
- Engwa, G.A.,** 2018. Free Radicals and the Role of Plant Phytochemicals as Antioxidants Against Oxidative Stress-Related Diseases. <https://cdn.intechopen.com/pdfs/60884.pdf>, 10 Haziran 2019.
- Farr, S.B., Kogoma, T.,** 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 55(4):561-585.
- Fiorentino, T.V., Priolella, A., Zuo, P., Folli, F.,** 2013. Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 19:5695-5703.
- Flora, G., Gupta, D., Tiwari, A.,** 2012. Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdisciplinary Toxicology*, 5:47-58.
- Flora, S.J., Pande, M., Mehta, A.,** 2003. Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication. *Chemico-Biological Interactions*, 145:267-280.
- Gibson, D.G., Hawrylko, J., McCay, P.B.,** 1985. GSH-dependent inhibition of lipid peroxidation: Properties of a potent cytosolic system which protects cell membranes. *Lipids*, 20(10):704.
- Grisham, M.B.,** 1997. Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 169:70-75.
- Gurer, H., Ercal, N.,** 2000. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radical Biology and Medicine*, 29:927-945.
- Gurer-Orhan, H., Sabir, H.U., Ozgüneş, H.,** 2004. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology*, 195:147-154.
- Gülçin, Y., Can, G., Şahin, Ü.,** 2002. Çocuklarda asemptomatik kurşun zehirlenmesi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 33:197-204.
- Halliwell, B.,** 1997. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrate formation *in vivo*. *FEBS Letters*, 411:157-160.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.,** 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219: 1-14.

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.,** 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, 186: 1-85.
- Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C.,** 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92(9):3007–3017.
- Hayaishi, O., Nozaki, M.,** 1969. Nature and mechanisms of oxygenases. *Science*, 164:389–96.
- Herrera, E., Barbas, C.,** 2001. Vitamin E: Action, metabolism and perspectives. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 57:43-56.
- Hodnick, W.F., Milosavljevic, E.B., Nelson, J.H., Pardini, R.S.,** 1988. Electrochemistry of flavonoids: relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration and production of oxygen radicals by flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, 37: 2607-2611.
- Hsu, P.C., Guo, Y.L.,** 2002. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology*, 180: 33–44.
- Ikemoto, M., Tabata, M., Murachi, T., Totani, M.,** 1989. Purification and properties of human erythrocyte arginase. *Annals of Clinical Biochemistry*, 26(6):547-553.
- Imlay, J.A., Linn, S.,** 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 240 (4857):1302-1309.
- Jaganathan, S., K., Mandal, M.,** 2009. Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 728:107–118.
- Jurczuk, M., Brzóška, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J.,** 2007. Hepatic and renal concentrations of vitamins E and C in lead- and ethanol-exposed rats. An assessment of their involvement in the mechanisms of peroxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*, 45:1478-1486.
- Kandemir, F. M., Özdemir, N.,** 2008. Sığır Dalak Doku Arginazının Bazı Kinetik Özellikleri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 22 (3):153-158.
- Kandhare, A.D., Shivakumar, V., Rajmane, A., Ghosh, P., Bodhankar, S.L.,** 2014. Evaluation of the neuroprotective effect of chrysin via modulation of endogenous biomarkers in a rat model of spinal cord injury. *Journal of Natural Medicines*, 68:586-603.
- Kanofsky, J.R.,** 1983. Singlet oxygen production by lactoperoxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 258(10):5991–5993.

- Kanovasky, J.R.**, 1989. Singlet oxygen production by biological systems. *Chemico-Biological Interactions*, 70(1–2):1–28.
- Kasperczyk, S., Dobrakowski, M., Kasperczyk, A., Machnik, G., Birkner, E.**, 2014. Effect of Nacetylcysteine administration on the expression and activities of antioxidant enzymes and the malondialdehyde level in the blood of lead-exposed workers. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37:638–647.
- Kirkman, H.N., Galiano, S., Gaetani, G.F.**, 1987. The function of catalase-bound NADPH. *The Journal of Biological Chemistry*, 26 (2):660–665.
- Kontos, H.A., Wei, E.P., Ellis, E.F., Jenkins, L.W., Povlishock, J.T., Rowe, G.T.**, 1985. Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circulation Research* 57(1):142–51.
- Kumar, S.**, 2011. Free Radicals and Antioxidants: Human and Food System. *Advances in Applied Science Research*, 2 (1):129–135.
- Kunwar, A., KI, P.**, 2011. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Medical and Allied Science*, 1(2):53–60.
- Kuppusamy, P., Zweier, J.L.**, 1989. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *Journal of Biological Chemistry*, 264(17):9880–9884.
- Lawton, L.J., Donaldson, W.E.**, 1991. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biological Trace Element Research*, 28:83–97.
- Lee, K.H., Yeh, M.H., Kao, S.T., Hung, C.M., Liu, C.J., Huang, Y.Y., Yeh, C.C.**, 2010. The inhibitory effect of hesperidin on tumor cell invasiveness occurs via suppression of activator protein 1 and nuclear factor-kappaB in human hepatocellular carcinoma cells. *Toxicology Letters*, 194:42–49.
- Liou, W., Chang, L.Y., Geuze, H.J.**, 1993. Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. *Free Radical Biology & Medicine*, 14:201–207.
- Liu, C.M., Ma, J.Q., Sun, Y.Z.**, 2012. Puerarin protects the rat liver against oxidative stress-mediated DNA damage and apoptosis induced by lead. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64:575–582.
- Livrea, M.A., Tesoriere, L., Bongiorno, A., Pintauro, A.M., Ciaccio, M., Riccio, A.**, 1995. Contribution of vitamin A to the oxidation resistance of human low density lipoproteins. *Free Radical Biology & Medicine*, 18:401–409.
- Lombardi, M.E., Ladman, B.S., Alphin, R.L., Benson, E.R.**, 2008. Inactivation of avian influenza virus using common detergents and chemicals. *Avian Diseases*, 52:118–123.

- Lowenstein, C.J., Dinerman, J.L., Snyder, S.H.,** 1994. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Annals of Internal Medicine*, 120:227-237.
- Mandal, S., Yadav, S., Nema, R.K.,** 2009. Antioxidants. *Journal of chemical and pharmaceutical research*, 1(1):102-104.
- Mani, R., Natesan, V.,** 2018. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochemistry*, 145:187-196.
- Mantawy, E.M., Esmat, A., El-Bakly, W.M., Salah ElDin, R.A., El-Demerdash, E.,** 2017. Mechanistic clues to the protective effect of chrysin against doxorubicin-induced cardiomyopathy, plausible roles of p53, MAPK and AKT pathways. *Scientific Reports*, 7:4795.
- Marklund, S.,** 1982. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79:7634-7638.
- Marletta, M.A.,** 1987. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide and N-nitrosating agents. *Chemical Research in Toxicology*, 249-257.
- Marnett, L.J.,** 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3):361–370.
- Matović, V., Buha, A., Đukić-Čosić, D., Bulat, Z.,** 2015. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys, *Food and Chemical Toxicology*, 78:130-140.
- McIntyre, M., Bohr, D.F., Dominiczak, A.F.,** 1999. Endothelial function in hypertension. *Hypertension*, 34:539–545.
- Modesto Dos Santos, V., Da Costa Arruda Jr., Z., De Farias Polcheira, M., Da Silva De Souza, D.W., Rodrigues Oliveira Santos, A.M., Santos Corrêa Da Costa, M.,** 2013. Acute hepatitis due to infectious mononucleosis in a 21-year-old-man. *Revista Médica de Chile*, 141:917–921.
- Modesto, C., Ter Haar, N., Lachmann, H., Ozen, S., Woo, P., Uziel, Y.,** 2013. Treatment of autoinflammatory diseases: results from the Eurofever Registry and a literature review. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 72:678–685.
- Monaghan, B.R., Schmitt, F.O.,** 1932. The effects of carotene and of vitamin A on the oxidation of linoleic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 96:387-395.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A.,** 1989. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochemical Pharmacology*, 38:1709-1715.

- Munoz, V.A., Ferrari, G.V., Sancho, M.I., Montana, M.P.,** 2016. Spectroscopic and thermodynamic study of chrysin and quercetin complexes with Cu (II). *Journal of Chemical & Engineering Data*, 61:987-995.
- Nakane, T., Asayama, K., Kodera, K.,** 1998. Effect of selenium deficiency on cellular and extracellular glutathione peroxidases. Immunochemical detection and mRNA analysis in rat kidney and serum. *Free Radical Biology & Medicine*, 2(5):504-511.
- Oh, C., Li, M., Kim, E., Park, J.S., Lee, J., Ham, S.W.,** 2010. Antioxidant and radical scavenging activities of ascorbic acid derivatives conjugated with organogermanium. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 31:3513-3514.
- Omobowale, T.O., Oyagbemi, A.A., Akinrinde, A.S., Saba, A.B., Daramola, O.T., Ogunpolu, B.S., Olopade, J.O.,** 2014. Failure of recovery from lead induced hepatotoxicity and disruption of erythrocyte antioxidant defence system in Wistar rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37:1202-1211.
- Ozbolat, G., Tuli, A.,** 2016. Effects of Heavy Metal Toxicity on Human Health. *Archives Medical Review Journal*, 25(4):502-521.
- Ozkaya, A., Şahin, Z., Kuzu, M., Saglam, Y.S., Ozkaraca, M., Uckun, M., Yologlu, E., Comakli, V., Demirdag, R., Yologlu, S.,** 2018. Role of geraniol against lead acetate-mediated hepatic damage and their interaction with liver carboxylesterase activity in rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 124(1):80-87.
- Ozkaya, M., Ozdemir, N.,** 2003. Koyun Meme Doku Arjinazının Bazı Biyokimyasal Özellikleri. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27:719-725.
- Palmer, R.M.J., Moncada, S.,** 1989. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 158:348-352.
- Patil, A.J., Bhagwat, V.R., Patil, J.A., Dongre, N.N., Ambekar, J.G., Jaiikhani, R., Das, K.K.,** 2006. Effect of lead (Pb) exposure on the activity of superoxide dismutase and catalase in battery manufacturing workers (BMW) of Western Maharashtra (India) with reference to heme biosynthesis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 3:329–337.
- Patra, R.C., Rautray, A.K., Swarup, D.,** 2011. Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *Veterinary Medicine International*, 45:7327.
- Patrick, L.,** 2006. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Alternative Medicine Review*, 11:114-127.

- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C.,** 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2):89–96.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L.,** 2015. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1):11–26.
- Pietta, P.G.,** 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63:1035–1042.
- Piomelli, S.,** 2002. Childhood lead poisoning. *Pediatric Clinics of North America*, 49:285–304.
- Pushpavalli, G., Kalaiarasi, P., Veeramani, C., Pugalendi, K. V.,** 2010. *European Journal of Pharmacology*, 631:36–41.
- Pusz, J., Nitka, B., Zielinska, A., Wawer, I.,** 2000. Synthesis and physicochemical properties of the Al(III), Ga(III) and In(III) complexes with chrysin. *Microchemical Journal*, 65:245.
- Rather, S., Horecher, B.L.,** 1976. Farnohian and Clearge on C-N bonds in Arginine and Urea Biosynthesis. Cornudella, Reflections on Biochemistry, Pergamon Press, Oxford, 227-233s.
- Reiter, R.J.,** 1995. Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. *The Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9:526-533.
- Robards, K., Antolovich, M.,** 1997. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: review. *The Analyst*, 3: 122-130.
- Roxborough, H.E., Mercer, C., McMaster, D.,** 1999. Plasma glutathione peroxidase activity is reduced in haemodialysis patients. *Nephron*, 81:278-283.
- Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Giacomo, C.D., Virgata, G., Barcellona, M.L., Vanella, A.,** 2000. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biology and Toxicology*, 16:91-98.
- Sallie, R., Tredger, J.M., Willam, R.,** 1991. Drugs and the liver. *Biopharm Drug Dispos.*, 12:251–259.
- Saxena, G., Pathak, U., Flora, S.J.S.,** 2005. Beneficial role of monoesters of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid in the mobilization of lead and recovery of tissue oxidative injury in rats. *Toxicology*, 214:39–56.
- Sehrawat, A., Sultana, S.,** 2006. Evaluation of possible mechanisms of protective role of Tamarix gallica against DEN initiated and 2-AAF promoted hepatocarcinogenesis in male Wistar rats. *Life Sciences*, 79:1456–65.

- Senturkler, S., Dizdaroglu, M.,** 1999. The effect of experimental conditions on the levels of oxidatively modified bases in DNA as measured by gas chromatography-mass spectrometry:: How many modified bases are involved. Prepurification or not. *Free Radical Biology and Medicine*, 27:370-380.
- Shalana, M.G., Mostafa, M.S., Hassouna, M.M., Hassab El-Nabi,S.E., El-Refaie, A.,** 2005. Amelioration of lead toxicity on ratliver with vitamin C and silymarin supplements. *Toxicology*, 206:1–15.
- Sies, H., Menck, C.F.,** 1992. Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutation Research*, 275:367–375.
- Sivaprasad, R., Nagaraj, M., Varalakshmi, P.,** 2004. Combined efficacies of lipoic acid and 2,3- dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15:18-23.
- Stadtman, E.R., Levine, R.L.,** 2000. Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899:191–208.
- Stahl, W., Sies, H.,** 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24:345-351.
- Sultan, S.,** 2014. Reviewing the protective role of antioxidants in oxidative stress caused by free radicals. *Asian Pacific Journal of Health Sciences*, 1(4):401-406.
- Sun, B., Karin, M.,** 2008. NF-kB signaling, liver disease and hepatoprotective agents. *Oncogene*, 27:6228-6244.
- Tanaka, J., Tajima, S., Asakawa, K., Sakagami, T., Moriyama, H., Takada, T., Suzuki, E., Narita, I.,** 2013. Preventive effect of irbesartan on bleomycin-induced lung injury in mice. *Respiratory Investigation*, 51:76-83.
- Tandon, S.K., Singh, S., Prasad, S., Srivastava, S., Siddiqui, M.K.,** 2002. Reversal of lead-induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant, or their combination in the rat. *Environmental Research*, 90:61-66.
- Tegeli, V., Karpe, P., Katve,V.,** 2014. Importance Of Free Radical And Antioxidant On Human Health. *International Journal Of Pharmaceutical, Chemical And Biological Sciences*, 4(4):1038-1050.
- Trefts, E., Gannon, M., Wasserman D.H.,** 2017. The liver. *Current Biology*, 27:1141-1155.

- Tsuji, P.A., Walle, T.,** 2008. Cytotoxic effects of the dietary flavones chrysin and apigenin in a normal trout liver cell line. *Chemico-Biological Interactions*, 171:37-44.
- Valverde, M., Trejo, C., Rojas, E.,** 2001. Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? *Mutagenesis*, 16(3):265-270.
- Vaziri, N.D., Ding, Y., Ni, Z.,** 1999. Nitric oxide synthase expression in the course of lead-induced hypertension. *Hypertension*, 34:558-562.
- Vaziri, N.D., Ding, Y., Ni, Z., Gonick, H.C.,** 1997. Altered nitric oxide metabolism and increased oxygen free radical activity in lead-induced hypertension: effect of antioxidant therapy. *Kidney International*, 52:1042-1046.
- Vaziri, N.D., Oveis, F., Ding, Y.,** 1998. Role of increased oxygen free radical activity in the pathogenesis of uremic hypertension. *Kidney International*, 53:1748- 1754.
- Vaziri, N.D., Sica, D.A.,** 2004. Lead-induced hypertension: role of oxidative stress. *Current Hypertension Reports*, 6:314-320.
- Vaziri, N.D., Wang, X.Q., Oveis, F., Rad, B.,** 2000. Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension*, 36:142-146.
- Vincent, A.M., Russell, J.W., Low, P., Feldman, E.L.,** 2004. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews*, 25:612-628.
- Wang, G., Fowler, B.A.,** 2008. Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 233:92-99.
- Weisiger, R.A., Fridovich, I.,**1973. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial location. *The Journal of Biological Chemistry*, 248(8):4793-4796.
- Woodman, O.L., Chan, E.C.H.,** 2004. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 31:786-790.
- Xu, J., Lian, L.J., Wu, C., Wang, X.F., Fu, W.Y., Xu, L.H.,** 2008. Lead induces oxidative stress, DNA damage and alteration of p53, Bax and Bcl-2 expressions in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 46:1488-1494.
- Yallampalli, D.V.M., Smith, M.B., Sharon, M.S.,** 1994. Steroid hormones modulate the production of NO and cGMP in the rat uterus. *Endocrinology*, 134:1971-1974.
- Yla-Herttuala, S.,** 1999. Oxidized LDL and atherogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 874:134–137.

Young, I. S., Woodside, J. V., 2001. Antioxidants in Health and Disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54:176-186.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

12 Aralık 1987 tarihinde HATAY/Antakya’da doğdum. 1994- 2001 yılları arası Hatay Bedii Sabuncu İlköğretim Okulunda, 2001- 2004 yılları arası 23 Temmuz Merkez Lisesi’nde il ve ortaöğretimimi tamamladım.

2008- 2010 yılları arası Adıyaman Üniversitesi Meslek Yüksek Okulu/ Gıda Teknolojisi Bölümü’den, 2011- 2015 yılları arası Munzur Üniversitesi / Gıda Mühendisliği Bölümü’nden mezun oldum.

2016- 2019 yılları arası Munzur Üniversitesi/ Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı.

İş Deneyimi

2017 yılında Dersim Süt ve Süt Ürünleri’nde ve 2018’den bu yana KYK Munzur Yurt Müdürlüğü’nde Gıda Mühendisi olarak çalışmaktayım.