T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIÇANLARDA D-GALAKTOZAMİN ile OLUŞTURULAN BEYİN HASARINDA U VİTAMİNİNİN ROLÜ

Dastagul MAHMARZAYEVA

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Bertan Boran BAYRAK

II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Özlem SAÇAN

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Haziran, 2022

TEZ KABUL VE ONAYI

Dastagul MAHMARZAYEVA tarafından, **Dr. Öğr. Üyesi Bertan Boran BAYRAK** danışmanlığında hazırlanan **" SIÇANLARDA D-GALAKTOZAMİN ile OLUŞTURULAN BEYİN HASARINDA U VİTAMİNİNİN ROLÜ "** başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **21/06/2021** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

		İmza	**Sonuç**
DANIŞMAN	Dr. Öğr. Üyesi Bertan Boran BAYRAK İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Sevim TUNALI İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret

Aileme ithaf ediyorum…

BÜTÇE DESTEKLERİ

SIÇANLARDA D-GALAKTOZAMİN ile OLUŞTURULAN BEYİN HASARINDA U VİTAMİNİNİN ROLÜ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: FYL-2020-35312

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenim süresi boyunca engin bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı hocam Sayın Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek Lisans tez çalışmalarımın yürütülmesi sırasında ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimi ile yol gösteren danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Bertan Boran BAYRAK'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca bilgisi ile beni aydınlatan, benden yardımlarını ve manevi desteğini esirgemeyen II. danışman hocam Sayın Prof. Dr. Özlem SAÇAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca, hocam Sayın Prof. Dr. Sevim TUNALI'ya, Dr. Öğr. Üyesi İsmet Burcu TÜRKYILMAZ'a, Arş. Gör. Dr. Onur ERTİK ve Arş. Gör. Dr. Eda DAĞSUYU'na ve diğer çalışma arkadaşlarıma laboratuvarda bana gösterdikleri ilgiden dolayı yürekten teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve beni bu günlere getiren sevgili aileme teşekkür ederim.

Çalışmamın uygulama kısmını destekleyen İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Haziran 2022 **Dastagul MAHMARZAYEVA**

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI ..... **ii**
BEYAN ..... **iii**
BÜTÇE DESTEKLERİ ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **x**
TABLO LİSTESİ ..... **xi**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xii**
ÖZET ..... **xiv**
ABSTRACT ..... **xv**
1. GİRİŞ **1**
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE **3**
2.1. BEYİN 3
2.1.1. Beyin Anatomisi (Yapı ve Fonksiyonu) 3
2.1.2. Beyin Metabolizması 7
2.2. SERBEST RADİKALLER 8
2.2.1. Serbest Radikallerin Türleri 9
2.2.2. Serbest Radikal Kaynakları 10
2.2.3. Serbest Radikallerin Yararları 11
2.2.4. Serbest Radikallerin Zararları ve Oksidatif Stres 11
2.3. ANTİOKSİDANLAR 12
2.3.1. Antioksidanların Sınıflandırılması 13
2.4. D-GALAKTOZAMİN 14
2.4.1. GalN'nin Toksisite Mekanizması 15
2.5. U VİTAMİNİ 17
2.5.1. U Vitamini ile İlgili Yapılan Araştırmalar 18
3. YÖNTEM **21**
3.1. DENEYLERDE KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER 21

3.2. DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASALLAR 22
3.3. DENEY HAYVANLARI 23
3.4. DENEY HAYVANLARINDA BEYİN HASARININ OLUŞTURULMASI 23
3.5. BEYİN DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI 24
3.6. BEYİN DOKU HOMOJENATLARININ HAZIRLANMASI 24
3.7. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA GLUTATYON (GSH) MİKTAR TAYİNİ 24
3.8. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA İLERİ OKSİDE PROTEİN ÜRÜNLERİNİN (AOPP) TAYİNİ 26
3.9. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN (ROS) TAYİNİ 26
3.10. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA TOTAL OKSİDAN SEVİYESİNİN (TOS) TAYİNİ 27
3.11. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA TOTAL ANTİKOSİDAN SEVİYENİN (TAS) TAYİNİ 29
3.12. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA OKSİDATİF STRES İNDEKSİNİN (OSİ) TAYİNİ 31
3.13. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA KATALAZ (CAT) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ 31
3.14. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ 32
3.15. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA GLUTATYON PEROKSİDAZ (GPx) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ 33
3.16. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA GLUTATYON REDÜKTAZ (GR) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ 35
3.17. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA GLUTATYON-S-TRANSFERAZ (GST) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ 36
3.18. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA LAKTAT DEHİDROJENAZ (LDH) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ 37
3.19. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA MİYELOPEROKSİDAZ (MPO) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ 38
3.20. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA KSANTİN OKSİDAZ (XO) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ 39
3.21. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA ASETİLKOLİNESTERAZ (AChE) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ 40
3.22. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA ARİL ESTERAZ (ARE) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ 41
3.23. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA KARBONİK ANHİDRAZ (CA) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ 42

3.24. BEYiN DOKU HOMOJENATLARINDA TOTAL PROTEİN MİKTARI TAYİNİ.43
3.25. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....45
4. BULGULAR 46
5. TARTIŞMA.....50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 59
KAYNAKLAR.....61
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 79
ETİK KURUL İZİN YAZISI 80
KURUM İZNİ YAZILARI.....82
ÖZGEÇMİŞ 83

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: İnsan beyni ve sıçan beyninin anatomik görüntüleri (Cryan ve Holmes, 2005). 4

Şekil 2.2: Ön beyin, orta beyin ve arka beyin görüntüsü (Bailey, 2020; Eid, 2021). 4

Şekil 2.3: Beynin farklı lobları (Lim ve diğ. 2018). 5

Şekil 2.4: GalN'nin kimyasal yapısı (PubChem, 2022). 15

Şekil 2.5: GalN'nin Leloir yolundaki metabolizması (Holden ve diğ. 2003). 16

Şekil 2.6: SMM ve SAM'ın Kimyasal Yapıları (Augspurger ve diğ. 2005). 18

Şekil 4.1: Tüm gruplara ait GSH ve AOPP seviyeleri. 46

Şekil 4.2: Tüm gruplara ait ROS, TOS, TAS seviyeleri ve OSİ değerleri. 47

Şekil 4.3: Tüm gruplara ait CAT, SOD, GPx, GR ve GST aktiviteleri. 48

Şekil 4.4: Tüm gruplara ait LDH, MPO ve XO aktiviteleri. 49

Şekil 4.5: Tüm gruplara ait AChE, ARE ve CA aktiviteleri. 49

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Beynin farklı loblarının işlevleri (Lim ve diğ. 2018; Bui ve Das, 2021). 5

Tablo 2.2: Oksijen merkezli serbest radikal ve radikal olmayan reaktif türler (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Valko ve diğ. 2007). 9

Tablo 2.3: Azot merkezli çeşitli serbest radikal ve radikal olmayan reaktif türler (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Valko ve diğ. 2007). 10

Tablo 2.4: Vücuttaki oksijen ve azot merkezli serbest radikallerin kaynakları (Mohammed ve diğ. 2015). 10

Tablo 2.5: Hücresel serbest radikallerin etkilediği moleküller (Pryor, 1986; Goldstein ve diğ. 1994). 12

Tablo 3.1: Deney sırasında kullanılan kimyasallar. 22

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
α	: Alfa
β	: Beta
λ	: Delta (Dalga boyu)
ºC	: Derece, santigrat
γ	: Gama
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
nM	: Nanomolar

Kısaltmalar	Açıklama
2',7'-DCFDA	: 2',7'-Diklorofloresin diasetat
4-AAP	: 4-Aminoantipirin
ABTS	: 2,2′-Azino-bis-(3-etil benzotiyazolin-6-sulfonik asid) diamonyum tuzu
AChE	**:** Asetilkolinesteraz
ANSA	: 1-Amino-2-naftol-4-sülfonik asit
AOPP	: İleri okside protein ürünleri
ARE	**:** Aril esteraz
ATP	: Adenozin 5'-trifosfat
CA	**:** Karbonik anhidraz
CAT	: Katalaz
CDNB	**:** 1-Kloro-2,4-dinitrobenzen
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DTNB	: 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit

EDTA : Etilendiamintetraasetik asit

GPx : Glutatyon peroksidaz

GR : Glutatyon redüktaz

GSH : Glutatyon

GSSG : Okside glutatyon

GST : Glutatyon-S-transferaz

HDL **:** Yüksek dansiteli lipoprotein

LDH : Laktat dehidrojenaz

LPS **:** Lipopolisakkarit

MPO **:** Miyeloperoksidaz

NADH+H$^+$: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit

NADPH+H$^+$: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

OSİ : Oksidatif stres indeksi

PNFA : *p*-Nitrofenil asetat

RNA : Ribonükleik asit

RNS : Reaktif azot türleri

ROS : Reaktif oksijen türleri

SAM : S-Adenozilmetiyonin

SMM : S-Metilmetiyonin

SOD : Süperoksit dismutaz

TAS **:** Total antioksidan seviyesi

TCA : Trikloroasetik asit

TOS **:** Total oksidan seviyesi

TRİS **:** Tris(hidroksimetil)aminometan

UDP **:** Üridin difosfat

UMP **:** Üridin monofosfat

UTP **:** Üridin trifosfat

UV **:** Ultraviyole

XO **:** Ksantin oksidaz

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIÇANLARDA D-GALAKTOZAMİN İLE OLUŞTURULAN BEYİN HASARINDA U VİTAMİNİNİN ROLÜ

Dastagul MAHMARZAYEVA
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Bertan Boran BAYRAK

II. Danışman : Prof. Dr. Özlem SAÇAN

Toksik maddeler özellikle karaciğer başta olmak üzere bir çok dokuda çeşitli enzimlerin aktivitesinde ve hücrelerin yapısına katılan makromoleküllerde yapısal değişikliklere neden olur. Ayrıca, fazla miktarda serbest radikal üretimine katkıda bulunarak dokularda oksidatif stresi arttırır. Böylece hücrelerdeki düzenleyici mekanizmaların bozulmasına yol açarak hücrenin yapı ve işlevinde değişikliklere yol açabilmektedir. Beyin dokusu, yüksek oranda oksijen tüketen ve diğer organlara kıyasla oksidatif hasara karşı daha zayıf antioksidan savunma sistemine sahiptir.

D-Galaktozamin (GalN), seçici bir hepatotoksindir ve diğer dokularda tutulumu oksidatif hasara yol açmaktadır. U vitamini (U vit.), esansiyel bir amino asit olan L-metiyonin türevidir.

Çalışmamızda GalN kaynaklı oksidatif beyin hasarına karşı U vit.'in rolü araştırıldı. Sonuçlara göre, indirgenmiş glutatyon, toplam antioksidan durum seviyeleri ve antioksidan enzimler, arilesteraz ve karbonik anhidraz aktiviteleri önemli ölçüde azalırken, ileri oksitlenmiş protein ürünleri, reaktif oksijen türleri, toplam oksidan durumu, oksidatif stres indeks seviyeleri ve miyeloperoksidaz, asetilkolinesteraz, laktat dehidrojenaz ve ksantin oksidaz aktiviteleri, kontrol sıçanlara kıyasla GalN grubunda önemli ölçüde yükseldi. Buna karşılık, U vit.'in GalN grubuna uygulanması tüm bu değişiklikleri tersine çevirdi. Sonuç olarak, U vit.'nin sıçanlarda GalN kaynaklı beyin toksisitesine karşı koruyucu etkileri olduğu ileri sürülebilir.

Haziran 2022 , 98 sayfa.

Anahtar kelimeler: Galaktozamin, U vitamini, beyin, antioksidan etki, oksidatif stres

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

[THE ROLE OF VITAMIN U ON D-GALACTOSAMINE-INDUCED BRAIN DAMAGE OF RATS

DASTAGUL MAHMARZAYEVA

Istanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Biochemistry, Thesis Master's Program, (Formal Education)

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Bertan Boran BAYRAK

Co-Supervisor: Prof. Dr. Ozlem SACAN

Toxic substances cause structural alterations in the activity of various enzymes in many tissues, especially in the liver, and in macromolecules that participate in the structure of cells. It also increases oxidative stress in tissues by contributing to the overproduction of free radicals. Brain tissue has a higher oxygen consumption and a weaker antioxidant defense system against oxidative damage compared to other organs.

D-Galactosamine (GalN) is a selective hepatotoxin and its uptake in other tissues brings about oxidative damage. Vitamin U (vit. U) is a derivative of L-methionine (an essential amino acid).

In our study, the role of vit. U against GalN-induced oxidative brain damage was investigated. According to the results, reduced glutathione, total antioxidant status levels, and antioxidant enzymes, arylesterase, and carbonic anhydrase activities remarkably declined whereas advanced oxidized protein products, reactive oxygen species, total oxidant status, oxidative stress index levels, and myeloperoxidase, acetylcholinesterase, lactate dehydrogenase, and xanthine oxidase activities significantly elevated in GalN group compared to intact rats. In contrast, the administration of vit. U to the GalN group reversed all these changes. Consequently, it may be put forward that vit. U has protective effects against GalN-induced brain toxicity in rats.

June 2022, 98 pages.

Keywords: Galactosamine, vitamin U, brain, antioxidant effect, oxidative stress

1. GİRİŞ

Toksik maddeler özellikle karaciğer başta olmak üzere bir çok dokuda çeşitli enzimlerin aktivitesinde ve hücrelerin yapısına katılan makromoleküllerde bazı değişliklerin meydana gelmesine neden olur. Bu değişiklikler, hücrelerdeki düzenleyici mekanizmaların bozulmasına yol açarak hücrenin yapı ve işlevinde değişikliklere yol açabilmektedir (Decker ve Keppler, 1974; Singh ve Sharma, 2022).

D-Galaktozamin (GalN), karaciğerdeki galaktoz metabolitik yolunda metabolize edilen bir amino şeker türevi olup, deneysel hayvan modellerinde insandakine benzer bir viral hepatite (fulminant hepatite) neden olduğu gösterilen seçici bir karaciğer toksinidir (Newsome ve diğ. 2000; Kemelo ve diğ. 2014). GalN, hücresel üridin trifosfat (UTP) konsantrasyonunu azaltmak suretiyle RNA ve protein sentezini inhibe ederek hücre nekrozuna neden olur (Decker ve Keppler, 1974). Endojen lipidlerin peroksidasyonunun, GalN 'nin sitotoksik etkilerindeki en önemli faktörlerden biri olduğu gösterilmiştir (Sakaguchi ve diğ. 1995). Karaciğer hasarı için uygun deneysel bir model olan GalN, deneysel hayvan modellerinde tek başına kullanılabilir. Hücrede lipit peroksidasyonuna yol açan serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Bu durumda, düşük oranda apoptoza ve yüksek oranda nekroza neden olduğu bildirilmiştir (Tapalaga ve diğ. 2002; Gujral ve diğ. 2003). Apoptoz, hücre proliferasyonunu (hücre çoğalmasını) stabilize edebilen ve gelişim sırasında dokuları aktif olarak yeniden şekillendirebilen karmaşık ve kritik bir mekanizmaya dönüşmüştür. Lipit hidroksiperoksit konsantrasyonu arttıkça karaciğer hücreleri üzerindeki tümör nekroz faktör-alfa (TNF-α) miktarı da artar; bu da karaciğer hücrelerini apoptoza daha duyarlı hale getirir (Osawa ve diğ. 2001). Bununla birlikte, lipopolisakkarit (LPS) gibi başka bir toksinle birlikte kullanıldığında karaciğerde meydana gelen hasarın şiddeti de arttırmaktadır (Sugimoto ve diğ 1999; Gujral ve diğ. 2003; Ahmedy ve diğ. 2022).

U vitamini (U vit.), vitamin sınıflandırılmasına dahil edilmemesine rağmen vitamine benzer etki göstermesi nedeni ile araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Brassica tedavisi veya U vit.. içeren lahana kaynakları kullanılarak yapılan terapi antik çağlardan beri uygulanmaktadır. Başlıca besin kaynağı çiğ lahana olan U vit., bu bitkinin yapraklarında ve diğer yeşil sebzelerde bulunmaktadır (Patel ve Prajapati, 2012). 1950'li yıllarda yapılan araştırmalar, karaciğer ve

mide-bağırsak mukozası üzerindeki tanınmış koruyucu etkisi nedeniyle kullanıldığını göstermektedir (Cheney, 1949). Özofagogastrik lezyonlar, kronik mide ülseri, kronik gastrit, ülseratif kolit, diyafram hernileri ve peptik ülserlerin tedavisinde etkili olduğu rapor edilmiş (Cheney ve diğ. 1956) ve gastrik mukusun önemli bir bileşeni olan müsin salgılanmasının uyarılmasına katkıda bulunarak sitoprotektif özellik gösterdiği ileri sürülmüştür (Ichikawa ve diğ. 2009).

Çalışmamızda, GalN'nin neden olduğu oksidatif beyin hasarı üzerine U vit.'nin koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. BEYİN

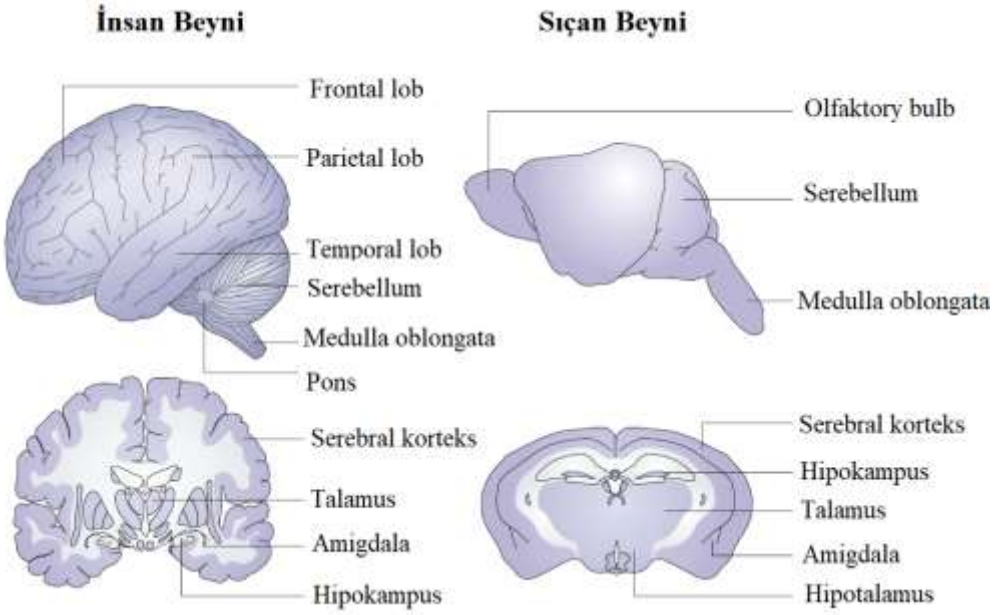
Merkezi sinir sisteminin kafatası boşluğunda bulunan kısmına beyin (ensefal) denir. Fransızca kökenli bir kelime olup, ensefali-tüm beyin anlamına gelir. Türlerin beyinleri şekil ve boyut olarak büyük farklılıklar gösterebilir. Ortak özellikleri belirlemek genellikle zordur (Shepherd, 1994). Bazı yönlerden birçok hayvan türünün beyin yapıları hemen hemen aynıdır. Ancak, "gelişmiş beyin", gelişmiş organizmaları ilkel organizmalardan ayırır veya omurgalılarla omurgasızları ayırt etmek için kullanılır (Başar, 2010).

Beyin, bir organizmada meydana gelen kimyasal reaksiyonları düzenleyen ve kontrol eden, düşünme, hafıza, duygu, dokunma, motor beceriler, görme, konuşma, solunum, vücut sıcaklığı, reflekslerin kontrolü, açlık ve benzeri davranışların koordinasyonunu sağlayan karmaşık bir organdır (Standring ve diğ. 2008; Colledge ve diğ. 2010).

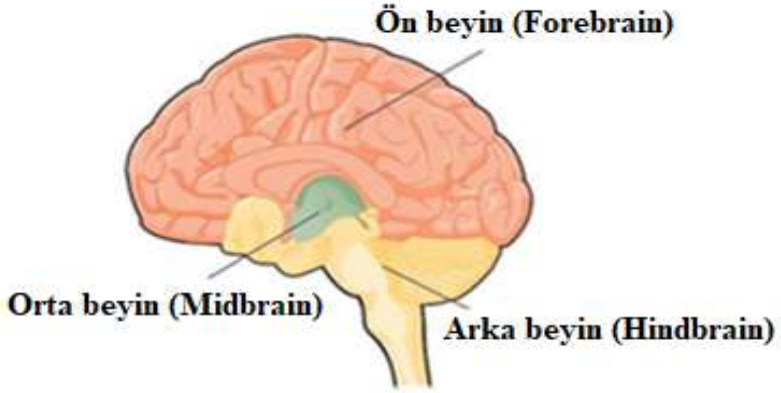
2.1.1. Beyin Anatomisi (Yapı ve Fonksiyonu)

Beyin, organizmanın ana kontrol merkezinde önemli rollere sahip olan kompleks yapılı bir organdır. Merkezi sinir sisteminin en önemli kısmı olan beyin, beş duyu organından gelen tüm bilgileri alır, işler, yönlendirir ve vücuttaki ilgili organlara gerekli olan iletiyi gönderir. İnsan beyni ile sıçan beyninin anatomik görüntüleri Şekil 2.1.'de gösterilmiştir (Cryan ve Holmes, 2005).

Beyin, Latince korpus kallozum (sert cisim) olarak isimlendirilen bir sinir ağı (lif bandı) tarafından sol ve sağ yarım kürelere ayrılır. Anatomik olarak farklı şekillerde sınıflandırılabilse de genel olarak beynin her biri belirli işlevlere sahip üç ana kısma ayrılır. Beynin başlıca kısımları ön beyin (forebrain), orta beyin (midbrain) ve arka beyindir (hindbrain) (Şekil 2.2) (Bailey, 2020; Eid, 2021).



Şekil 2.1: İnsan beyni ve sıçan beyninin anatomik görüntüleri (Cryan ve Holmes, 2005).

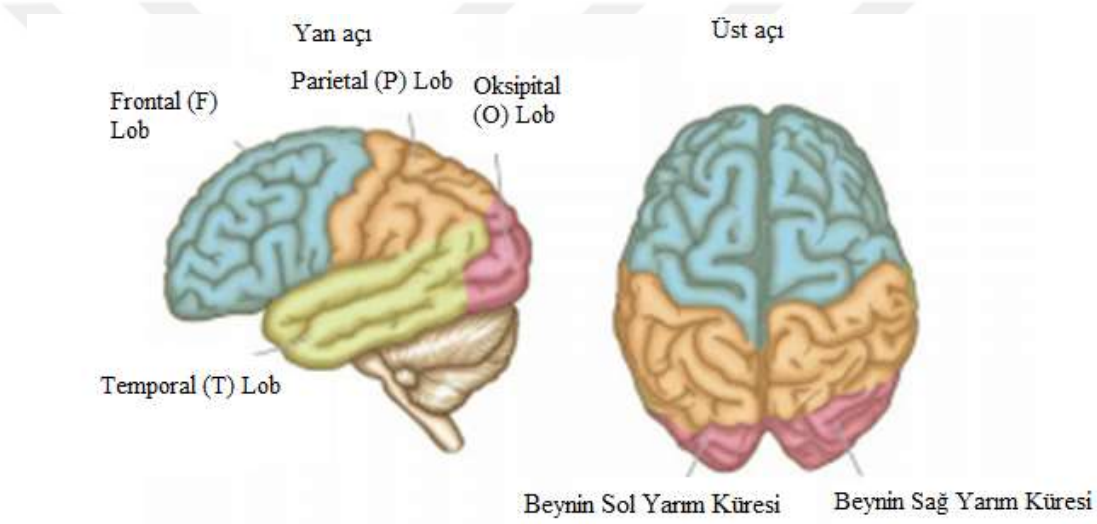


Şekil 2.2: Ön beyin, orta beyin ve arka beyin görüntüsü (Bailey, 2020; Eid, 2021).

2.1.1.1. Ön Beyin (Forebrain)

Ön beyin, beyindeki en gelişmiş ve evrilmiş yapı olmasının yanı sıra, en karmaşık üst düzey organizasyona sahiptir (Xiang ve diğ. 2021). Telensefalon ve diensefalon olarak iki kısma ayrılan ön beynin dış yüzeyi (tabakası), beyin korteksidir ve bu kısım gri maddeden oluşur. Telesefalon kısmının önemli bir bileşeni olan beyin korteksi, beyinde girus adı verilen girintiler ve sulkus adı verilen katlanmış oluklar içerir (Bailey, 2020). Beyin korteksinin işlevleri arasında duyusal bilgilerin işlenmesi, motor işlevlerin kontrol edilmesi, herhangi bir konuda fikir sahibi olunması ve sorunların çözülmesi gibi üst düzey işlevlerin yerine getirilmesi yer alır. Ön beyin, beynin toplam kütlesinin üçte ikisini oluşturan serebral hemisferlerden (yarım kürelerden) oluşur.

Her bir yarım küre sol ve sağ yarım küreler olarak iki kısma ayrılmaktadır. Sol yarım küre dil, mantık ve matematik becerilerinde daha baskındır. Sağ yarım küre daha yaratıcıdır, sanatsal ve müzikal durumlarda ve sezgide baskındır (Thau ve diğ. 2022). Her bir yarım küre, frontal, parietal, temporal ve oksipital loblar şeklinde başlıca dört loba bölünmekte, her lop da farklı bir işlevi yerine getirmektedir (Şekil 2.3) (Bui ve Das, 2021; AANS, 2022). Bunlar, üzerlerinde bulunan kafatası kemiklerine göre isimlendirilir (Standring ve diğ. 2008). İki yarım küreyi ayıran yarık veya oluğa büyük boylamasına yarık denir. Beynin iki tarafı altta korpus kallozum tarafından birleştirilir. Korpus kallozum, beynin iki yarısını birbirine bağlar ve beynin bir yarısından diğerine mesajlar iletir. Beynin farklı loblarına ait aktiviteler Tablo 2.1'de gösterilmiştir (Lim ve diğ. 2018).



Şekil 2.3: Beynin farklı lobları (Lim ve diğ. 2018).

Tablo 2.1: Beynin farklı loblarının işlevleri (Lim ve diğ. 2018; Bui ve Das, 2021).

Beyin Lobları	**İşlevleri**
Frontal	Planlama, karar verme ve problem çözme, hareket ve duygular
Oksipital	Görsel işlemeye dahil işlevler
Parietal	Tanıma, uyaranların algılanmasına dahil olan, hareket ve yönelim
Sol	Zamansal sözel hatıraların işlenmesiyle ilgili işlevler
Sağ	Zamansal sözel olmayan sözlerin işlenmesiyle ilgili işlevler

Diensefalon, duyusal bilgileri ileten ve hormonal sistemin bileşenleri ile sinir sistemi arasındaki bağlantıyı oluşturan beynin bölgesidir. Diensefalon, otonomik, hormonal ve motor işlevler gibi çeşitli işlevlerin düzenlenmesinden sorumludur. Duyusal algıda da görevi bulunmaktadır. Talamus, hipotalamus ve epifiz bezi (pineal bez) diensefalonun bileşenlerini oluşturmaktadır (Bailey, 2020).

Talamus, serebral korteksin hareket ve duyusal algılarla ilgili bölümlerini beynin ve omuriliğin diğer bölümleriyle birleştiren bir limbik sistem yapısıdır. Ayrıca, gece-gündüz döngüsü değişikliklerinin kontrolünde de görev almaktadır (Bailey, 2020). Vücuttaki hemen hemen tüm kanallardan gelen sinyalleri ilettiğinden normal sinir işlevi için gerekli olan derin bir beyin yapısıdır. (Bordes ve diğ. 2020).

Hipotalamus, beynin en küçük parçalarından biri olsa da homeostazın korunmasında hayati önem taşır. Hipotalamus, merkezi sinir sistemini endokrin sisteme bağlar. Solunum, kalp atış hızı, kan basıncı, iştah, susuzluk, vücut sıcaklığının düzenlenmesi ve çeşitli hormonların salınımından sorumludur (Kropotov, 2016). Ayrıca, antidiüretik hormonun, kortikotropin salgılatıcı hormonun, gonadotropin salgılatıcı hormonun, büyüme hormonu salgılatıcı hormonun, prolaktin inhibe edici hormonun, tiroit salgılatıcı hormonun ve oksitosinin salgılanması veya inhibe edilmesi için hipofiz bezi üzerinde etkili olan hormonları salgılar (Thau ve diğ. 2022).

Epifiz bezi ise serotonin ve melatonin hormonlarını üretir. Melatonin hormonunun biyosentezi, gece-gündüz döngülerinin düzenlenmesi için oldukça kritik bir öneme sahiptir ve ayrıca seksüel gelişimi de etkiler. Epifiz bezi, merkezi sinir sistemine gelen bilgileri taşıyan ve periferik sinir sisteminden gönderilen iletileri hormonal iletilere dönüştürerek, sinir sistemi ile hormonal sistem arasındaki bağlantıyı oluşturur (Bailey, 2020).

2.1.1.2. Orta Beyin (Midbrain)

Orta beyin, ön beyin ile arka beyin arasındaki bağlantıyı sağlayan beyin bölgesi olup, arka beyin ile beraber brainstem adı verilen beyin sapını oluşturur. Beyin sapı, omurilik ile beyinciği beyin ile birleştirir (Basinger ve Hogg, 2022). Orta beyin hareketlerin ayarlanmasına, işitsel ve görsel bilgilerin işlenmesine katkıda bulunur. Ayrıca göz hareketinden de sorumludur (Bailey, 2020; Eid, 2021).

2.1.1.3. Arka Beyin (Hindbrain)

Arka beyin başın arkasında bulunur ve omuriliğin bir uzantısı gibi görünür. Arka beyin, kendiliğinden gerçekleşen fonksiyonların ayarlanmasına, dengenin sağlanmasına ve korunmasına, hareketlerin uyum içinde olmasına ve duyusal bilgilerin aktarılmasına katkıda bulunur. Medulla oblongata, pons ve beyincik kısımlarını içerir.

- Basitçe medulla olarak da bilinen medulla oblongata, beyin sapının en alt kısmı ve sinir sistemiyle birincil bağlantıdır. Kemoreseptörler kullanarak vücudun solunum sistemini izler. Aynı zamanda kardiyovasküler ve vazomotor bir merkezdir. Medulla oblongata, vücudun ihtiyaçlarına göre vücudun kan basıncını, nabzını ve kalp kasılmalarını düzenleyebilir. Son olarak, kusma, yutma, öksürme ve hapşırma gibi refleksleri kontrol eder (Bailey, 2020; Eid, 2021; Thau ve diğ. 2022).

- Pons, Latince "köprü" anlamına gelir, orta beynin hemen altında ve medullanın hemen üstünde yer alır. Uyarılma, uyku, motor kontrol ve kas tonusunda yer alan bir sinir grubudur (Patel ve Sugano, 2020).

- Beyincik (serebellum), Latince "küçük beyin" anlamına gelir. Beyine göre çok daha fazla sinir hücresi yoğunluğuna sahip olan beyincik, beyin korteksiyle sürekli iletişim halindedir. Vücudun denge kontrolünün ana merkezini oluşturur, postürü ve koordinasyonu korur, kas tonusunu ve istemli kas aktivitesini kontrol eder, ancak kas kasılmasını başlatamaz (Jimsheleisvili ve Dididse, 2022). Hareketi kontrol etmek ve ince motor öğrenmeyi kolaylaştırmak için kulaktaki kaslardan, tendonlardan, eklemlerden ve yapılardan mesajlar alır (Delgado-Garcia, 2001; Thau ve diğ. 2022).

2.1.2. Beyin Metabolizması

Diğer organlarla karşılaştırıldığında beyin, insan vücudu tarafından tüketilen enerjinin %20'ye yakın kısmını tüketir. İnsan vücudunda, glukoz çoğu hücre için ana enerji kaynağıdır ve birçok dokunun olduğu gibi beynin de normal işlevi için gereklidir. İnsan beyni, oruç tutan veya hareketsiz insanlarda glukozun yaklaşık %60'ını tüketir (Swaminathan, 2008).

Uzun zincirli yağ asitleri kan-beyin bariyerini geçemez ve keton cisimcikleri üretmek için yalnızca karaciğer bu yağ asitlerini parçalayabilir. Buna karşın, 2, 3 ve 4 karbonlu yağ asitleri

ile 7 ve 8 karbonlu yağ asitleri kan-beyin bariyerini geçebilir ve beyin hücreleri tarafından yakıt olarak kullanılabilir (Obel ve diğ. 2012).

Vücudun toplam ağırlığının yalnızca %2'sini oluşturan insan beyni, kalp debisinin %15'ini, sistemik oksijen tüketiminin %20'sini ve sistemik glukoz kullanımının %25'ini gerçekleştirmektedir (Clarke ve Sokoloff, 1999).

Beyin esas olarak enerji için glukoz kullanır. Ancak, hipogliseminin geliştiği durumlarda glukoz eksikliği nedeniyle kafa karışıklığı gözlenebilir (Mrsulja, 2012). Beynin enerji tüketimi zamanla çok fazla değişmez, sadece korteksin aktif alanlarındaki enerji tüketimi hareketsiz alanlara kıyasla biraz daha fazladır; ki bu da beyin görüntüleme teknolojisi olan Pozitron Emisyon Tomografisi ve fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme işlevlerinin temelini oluşturur (Raichle ve Gusnard, 2002). Yapılan bir ön çalışma ile insan beyninin metabolik ihtiyaçlarının beş yaş civarında zirveye ulaştığı sonucuna ulaşılmıştır (Kuzawa ve diğ. 2014). Bununla birlikte, uyku işlevi tam olarak anlaşılmamıştır. Ancak, uykunun beyindeki metabolik atıkların atılmasını artırabileceğine dair kanıtlar vardır, bunların bazıları potansiyel olarak nörotoksiktir ve aynı zamanda onarılabilir de olabilir. Kanıtlar, uyku sırasında artan metabolik atığın temizlenmesinin lenfatik sistemin artan işlevinden kaynaklandığını göstermektedir (Bacyinski ve diğ. 2017).

2.2. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller, atomik veya moleküler orbitallerindeki en dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla sayıda tek (paylaşılmayan) elektron bulunduran oldukça reaktif moleküller veya moleküler gruplar olarak tanımlanabilir. Paylaşılmayan bu elektronlar, serbest radikallere karakteristik kimyasal özellikler kazandırmakla kalmaz, aynı zamanda onları hem kararsız hem de oldukça reaktif hale getirir (Avcı ve diğ. 2008; Engwa ve diğ. 2022). Yüksek reaktivitelerinden dolayı serbest radikaller, çevrelerinde bulunan oldukça önemli biyomoleküllerle (DNA, RNA, proteinler, lipidler ve karbohidratlar) etkileşime girerek hücrelerde, dokularda ve hatta organlarda hasar meydana getirirler (Di Mascio ve diğ. 2019). Bu hasar yaşlanmayı hızlandırdığı gibi kardiyovasküler hastalıklar, farklı kanser türleri, zayıflamış bağışıklık sistemi, katarakt ve sinir sisteminin dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa neden olabilmektedir (Singh ve dig. 2022).

2.2.1. Serbest Radikallerin Türleri

Serbest radikallerin kaynağı oksijen veya azot olabilir. Oksijenden türetilen serbest radikaller reaktif oksijen türleri (ROS) ve azottan türetilenler de reaktif azot (RNS) türleri olarak isimledirilir. Oksijen merkezli serbest radikar türleri Tablo 2.2'de, azot merkezli serbest radikal türleri ise Tablo 2.3'te gösterilmiştir (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Valko ve diğ. 2007).

Tablo 2.2: Oksijen merkezli serbest radikal ve radikal olmayan reaktif türler (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Valko ve diğ. 2007).

Oksijen Merkezli Serbest Radikaller ve Radikal Olmayan Reaktif Türler			
Radikal Türler		**Radikal Olmayan Reaktif Türler**	
Süperoksit	$O_2^{\bullet -}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil	HO•	Hipokloröz asit	HOCI
Peroksil	ROO•	Hipobromöz asit	HOBr
Alkoksil	RO•	Tekli oksijen	$^1O_2$
Hidroperoksil	HOO•	Ozon	O_3
Lipit peroksil	LOO•		

- ✓ Süperoksit anyonu ($\bullet O_2^-$): Mitokondride, kardiyovasküler sistemde ve diğerlerinde üretilir.
- ✓ Hidroksil radikalleri (HO•): Fenton reaksiyonunda üretilen en reaktif oksijen merkezli radikaldir.
- ✓ Peroksil (ROO•): Oksijenin alkil radikalleri (R•) ile reaksiyonu sonucu meydana gelmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1985). Reaktif türler üretmek için geçiş metal iyonlarıyla reaksiyona girer.
- ✓ Hidroperoksil (HOO•): Vücutta çok sayıda reaksiyon sonucu oluşur. Reaktivitesi çok düşük ve moleküler hasar yeteneği zayıftır (Mohammed ve diğ. 2015).
- ✓ Lipit peroksil (LOO•): Reaktiftir ve lipidlerden, DNA'dan, proteinlerden vb. oluşur.
- ✓ Tekli oksijen ($^1O_2$): Fotosensitizasyon ve kimyasal reaksiyonlar sırasında oluşur, oldukça reaktiftir. Tekli oksijen radikal olmayan reaktif bir oksijen molekülüdür ve ortaklanmamış elektronu yoktur (Akagün, 2009). Yarılanma ömrü kısadır.
- ✓ Ozon (O_3): Atmosferde doğal olarak mevcuttur (Mohammed ve diğ. 2015).
- ✓ Nitrik oksit (NO•): Nörotransmitter ve tansiyon düzenleyicisidir. NO•, organizmada, O_2 ve L-arginin amino asidinden nitrik oksit sentaz katalizörlüğünde sentezlenir. Hem ekstraselüler boşluğa taşınan hem de intraselüler NO• derişimi oldukça sıkı şekilde kontrol

edilmektedir. Çünkü az miktardaki NO• metabolizma için faydalı iken fazlası ise oldukça tehlikelidir (Akagün, 2009).

- ✓ Peroksinitrit ($ONOO^-$): Süperoksit ve nitrik oksitten oluşur (Mohammed ve diğ. 2015).
- ✓ Nitrojen dioksit ($•NO_2$): Atmosferik kirlilik sırasında oluşur (Mohammed ve diğ. 2015).

Tablo 2.3: Azot merkezli çeşitli serbest radikal ve radikal olmayan reaktif türler (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Valko ve diğ. 2007).

Azot Merkezli Serbest Radikaller ve Radikal Olmayan Reaktif Türler			
Radikaller		**Radikal Olmayan Reaktif Türler**	
Nitrik oksit	NO•	Nitrik asit	HNO_2
Nitrojen dioksit	NO_2•	Nitrosil katyonu	NO^+
		Nitroksil anyonu	NO^-
		Dinitrojen tetroksit	N_2O_4
		Dinitrojen trioksit	N_2O_3
		Peroksinitrit	ONOO-
		Peroksinitrik asit	ONOOH
		Nitronyum katyonu	NO_2^+
		Nitril klorid	NO_2CI
		Alkil peroksinitrit	ROONO

2.2.2. Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikaller, endojen ve eksojen kaynaklar tarafından üretilir. En önemli endojen üretim yeri mitokondridir. Dış kaynaklar ise ultraviyole ışık (UV), fiziksel kaynaklar, çeşitli kimyasal ve biyolojik maddelerdir (Karabulut ve Karakuş 2016). Serbest radikaller insan vücudunda iki şekilde üretilir. Bunlar endojen ve eksojen hücrelerde ortaya çıkan oksijen veya azot merkezli serbest radikallerdir. Vücutta oluşan bu serbest radikaller Tablo 2.4'te gösterilmiştir. Bu serbest radikaller hücrelerde ve çevrede var olmaya devam ederler (Sarma ve diğ. 2010).

Tablo 2.4: Vücuttaki oksijen ve azot merkezli serbest radikallerin kaynakları (Mohammed ve diğ. 2015).

Kaynaklar	**Açıklama**
Endojen	NADPH oksidazlar Mitokondri Ksantin oksidoredüktaz Sitokrom P450 oksidazlar Nitrik oksit sentaz Peroksizomlar
Eksojen	Fiziksel ajanlar Ksenobiyotikler Biyolojik ajanlar

2.2.3. Serbest Radikallerin Yararları

ROS ve RNS'lerin düşük konsantrasyonlarda olduğunda faydalı etkilerinden bahsedilebilir. $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 ve NO üretimi hücrede pek çok hücresel yanıta karşı normal fizyolojik fonksiyonlar olarak bilinir. Ayrıca bazı hücreler ise etkilerini ROS ve RNS salım sistemini uyararak da gösterirler.

ROS ve RNS'nin düşük konsantrasyonlarda bulunduklarında, faydalı aktivitelerinden bazılarına aşağıdakiler örnek gösterilebilir:

- Fagositoz yoluyla enfeksiyona karşı savunma
- Sitotoksik lenfositler
- Makrofajlar yoluyla kanser hücrelerinin öldürülmesi
- Sitokrom P450 yoluyla ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu
- Hücre büyümesi
- Mitokondride ATP üretimi
- Düşük konsantrasyonlarda mitotik yanıt
- ROS ve RNS'nin nükleer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu
- Hücrelerde depolanan Ca'un salınımı
- Tirozin amino asidinin fosforilasyon aktivasyonu
- Tirozin kinazlar, bazı sitokin ve büyüme faktörü sinyallerini aktive eder. Reaktif oksijen türleri, prostaglandinler ve tiroksin gibi moleküllerin biyosentezine katılır ve bu süreçlerin gelişimini uyarır.
- Reaktif oksijen hücrelerde çözülür ve guanilat siklaz aktivitesi ve gen transkripsiyonu gibi önemli aktiviteleri düzenlemek için kullanılır.

Bu gibi hücre içi durumlarda, serbest radikallerin önemli bir rol oynadığından bahsedilebilir. Ancak bu serbest radikallerin birikimi arttıkça zararlı etkileri ortaya çıkabilir (Schreck ve Baeuerle, 1991; Lander, 1997; Dröge, 2002; Fang ve diğ. 2002; Devasagayam ve diğ. 2004; Valko ve diğ. 2007).

2.2.4. Serbest Radikallerin Zararları ve Oksidatif Stres

Hücre ve dokuların yapısal bütünlüğünü ve normal işlevlerini sürdürmek açısından oksidanlar ve antioksidan sistemler arasındaki dengeyi korumak çok önemlidir. Oksidatif denge sağlandığı sürece canlı organizması serbest radikallerden etkilenmeyecektir. Ancak, çeşitli nedenlerle savunma mekanizması tarafından temizlenen serbest radikallerden daha fazla serbest radikal oluşumu oksidatif strese neden olabilir. Metabolizmada kullanılan oksijen, birçok faktörün

etkisi altında ROS'ların yapısına katılır. Aşırı ROS oluşumu, ardından bunların birikmesi sonucunda hücrelerin bileşimine katılan oldukça önemli biyolojik makromoleküllerde fonksiyon bozukluğuna (örneğin, lipidlerde peroksidasyona, proteinlerde ditirozin kalıntılarının ve/veya denatürasyonun meydana gelmesine, DNA'da ise 8-hidroksiguanozin oluşumuna) neden olan yapısal değişikllikler meydana gelebilmektedir (Singh ve diğ. 2022). Bu biyolojik makromoleküllerdeki değişimler Tablo 2.5'te gösterilmiştir.

Tablo 2.5: Hücresel serbest radikallerin etkilediği moleküller (Pryor, 1986; Goldstein ve diğ. 1994).

Etkilenen bileşik	Sonuçlar
Doymamış amino asitler ve kükürt içeren amino asitler	Protein denatürasyonu Çapraz bağlanma Enzim inhibisyonu Organ ve hücre geçirgenliğinde değişmeler
Nükleik asit bazları	Hücre gelişiminde değişmeler Mutasyon
Karbohidratlar	Hücre yüzey reseptörlerinde değişim
Doymamış lipidler	Kolesterol ve yağ asitlerinin oksidasyonu
Kofaktörler	Nikotinamit ve flavin içeren kofaktörlerin aktifliğinde azalma Askorbat ve porfirin oksidasyon
Antioksidanlar	α-tokoferol ve β-karoten gibi antioksidanların aktifliğinin azalması
Proteinler	Denatürasyon Peptit zincirinde kırılmalar
DNA	Baz modifikasyonları Zincirde kırılmalar
Hiyaluronik asit	Sinovyal sıvının vizkozitesinde değişim

Oksidanlar ve bunların ortadan kaldırılmasını sağlayan maddeler arasındaki hassas biyokimyasal denge oksidanlar tarafına kaydığında (yani, reaktif türlerin organizmadaki konsantrasyonu arttığında), oksidatif hasara neden olabilen "oksidatif stres" koşulları ortaya çıkar (Sies, 2020). Oksidatif stresin diyabet, ateraskleroz, hipertansiyon, solunumsal hastalıklar, artritler, katarakt, kanser, kardiovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların patojenezinde önemli rolleri olduğu bildirilmiştir (Engwa ve diğ. 2022).

2.3. ANTİOKSİDANLAR

Antioksidanlar, serbest radikal zincir oksidasyon mekanizmasında kararlı ara ürünlerin oluşumuna, yani zincir reaksiyonunun kırılmasına katkıda bulunan maddeler olarak tanımlanabildiği gibi (Sherwin, 1978; Dziezak, 1986), doğrudan ROS'u temizleyen veya

antioksidan savunmaların yukarı yönlü regülasyonunu veya ROS üretiminin inhibisyonunu sağlamak için dolaylı olarak hareket eden bir madde olarak da tanımlanabilir (Gulcin, 2020).

Antioksidanlar, kararsız bir serbest radikale bir elektron (veya hidrojen) transfer edebilen ve o radikalin oksidatif/toksik etkisinin nötralizasyonunu sağlayabilen, böylece yıkıcı gücünü azaltan, moleküllerdir. Bu antioksidanlar, esas olarak serbest radikal temizleme özellikleri sayesinde hücre hasarını geciktirir veya engellerler (Engwa ve diğ. 2022). Bu düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar, serbest radikallerle güvenli bir şekilde etkileşime girebilir ve hayati sayılabilecek moleküllere zarar vermeden zincir reaksiyonlarını sonlandırabilirler (Kumar, 2014).

2.3.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Doğada, çeşitli antioksidanlar gıdalarda yaygın olarak bulunur. Literatür, konumlarına, etki biçimlerine (koruma ve düzenleme), yapısal ve biyokimyasal özelliklerine göre çok çeşitli antioksidanların yapısını ve sınıflandırmasını önermektedir (Pérez ve Aguilar, 2013).

Endojen antioksidanlar, eksojen antioksidanlar (diyet antioksidanları) ve sentetik antioksidanlar en yaygın antioksidanlar olarak kabul edilirler. Sentetik antioksidanlar, gıda muhafazasında önemli rol oynarlar (Yadav ve diğ. 2016).

2.3.1.1. Endojen Antioksidanlar

Organizma, serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarına karşı kendisini korumak için çeşitli endojen savunma mekanizmalarına sahiptir. Bunlar da enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar olarak ikiye ayrılabilir. Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon-S-transferaz olup, oksidatif toksik ara maddeleri metabolize eder ve en iyi katalitik aktiviteyi elde etmek için selenyum, demir, bakır, çinko ve manganez gibi mikro besin kofaktörlerine ihtiyaç duyar. Bu eser minerallerin yetersiz bir diyetle alınmasının, bu antioksidan savunma mekanizmalarının etkinliğini tehlikeye atabileceği öne sürülmüştür (Percival, 1998; Yadav ve diğ. 2016). Non-enzimatik antioksidanlar ise hücre içi ve hücre dışı non-enzimatik antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir.

- Hücre içi non-enzimatik antioksidanlar, ferritin, miyoglobin, metallotiyoneinler koenzim-Q_{10}, glutatyon, melatonin ve poliaminlerdir.
- Hücre dışı non-enzimatik antioksidanlar ise transferrin, laktoferrin, albumin, seruloplazmin, ürik asit ve bilirubindir (Mirończuk-Chodakowska ve diğ. 2018).

2.3.1.2. Eksojen Antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar, organizmada sentezlenemediğinden gıda ve besin kaynaklarından alınmaktadır. Bunlar, aynı zamanda diyet antioksidanları olarak da bilinir. Eksojen (diyet) antioksidanlar C ve E vitaminleri, karotenoidler (β-karoten, likopen, zeksantin, astaksantin, lutein vb.), fenolik bileşikler (flavonoidler, fenolik asit türevleri, stilben türevleri ve lignanlar), çinko ve selenyum gibi bazı mineral bileşiklerdir (Percival,1998; Pisoschi ve diğ. 2021). Bitkilerde flavonoidler, çeşitli çevresel stres faktörlerine karşı koruyucu ajanlar olarak işlev görürken, insanlarda "biyolojik yanıt düzenleyiciler" olarak işlev görürler. Flavonoidlerin antienflamatuvar, antialerjik, antiviral, antiaging ve antikanser aktiviteleri olduğu gösterilmiştir (Yadav ve diğ. 2016).

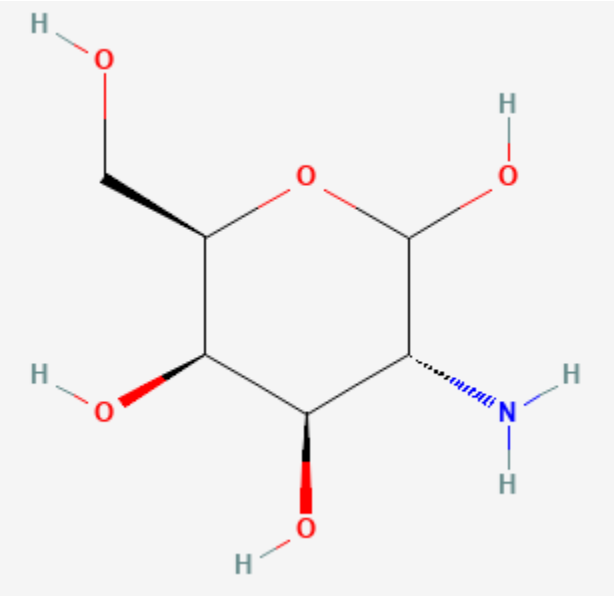
2.3.1.3. Sentetik Antioksidanlar

Sentetik antioksidanlar, doğal antioksidanlarla karşılaştırmak ve gıdaya dahil edilmek üzere standart bir antioksidan aktivite ölçüm sistemine sahip olacak şekilde geliştirilmiştir. Paketlenmiş gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmaları ve çeşitli işlemlere ve koşullara dayanabilmeleri nedeniyle gıdalara eklenirler. Bu sentetik antioksidanlar, katı ve sıvı yağların ve lipit içeren gıdaların işlenmesi ve depolanması sırasında lipit oksidasyonunun başlamasını önlemek veya geciktirmek için ürünlere bilinçli olarak eklenir. En fazla kullanılan sentetik antioksidanlar fenolik yapılı bileşiklerdir. Bunlar: bütillenmiş hidroksitoluen, bütillenmiş hidroksianisol, propil gallat, dodesil gallat ve tersiyer butilhidrokinondur (Pérez ve Aguilar, 2013; Gulcin, 2020).

2.4. D-GALAKTOZAMİN

GalN, canlı hücreler için gerekli olan, glikoproteinlerin de önemli bir bileşeni olan galaktozun bir amino türevidir. Molekül ağırlığı 179,17112 g/mol ve kapalı formülü $C_6H_{13}NO_5$'dir. GalN'nin kimyasal yapısı Şekil 2.4'te gösterilmiştir (PubChem, 2022). Kondrozamin, D-Kondrozamin, D-2-Amino-2-deoksigalaktoz, 2-Amino-2-deoksi-D-galaktoz gibi isimleri de bulunan bu amino şeker, aynı zamanda folikül uyarıcı hormon ve luteinize edici hormon gibi bazı glikoprotein yapılı hormonların bir bileşenidir. İnsan organizması, bu bileşiği sentezlemek için bir öncü olarak üridin difosfat (UDP)-N-asetil-D-glukozamin kullanır ve organizmada çoğunlukla N-asetil-D-GalN formunda bulunur. En önemlisi, GalN, güçlü bir su bağlayıcı ajan olan hiyaluronik asidin bir bileşenidir. İnsan vücudundaki birçok farklı doku türü, eklemlerin sinovyal sıvısında ve bağ dokularında kayganlaştırıcı bir madde olarak işlev gören hiyaluronik asit içerir. Hiyaluronik asit ayrıca göz küresinin vitröz (camsı) kısmında kayganlaştırıcı bir

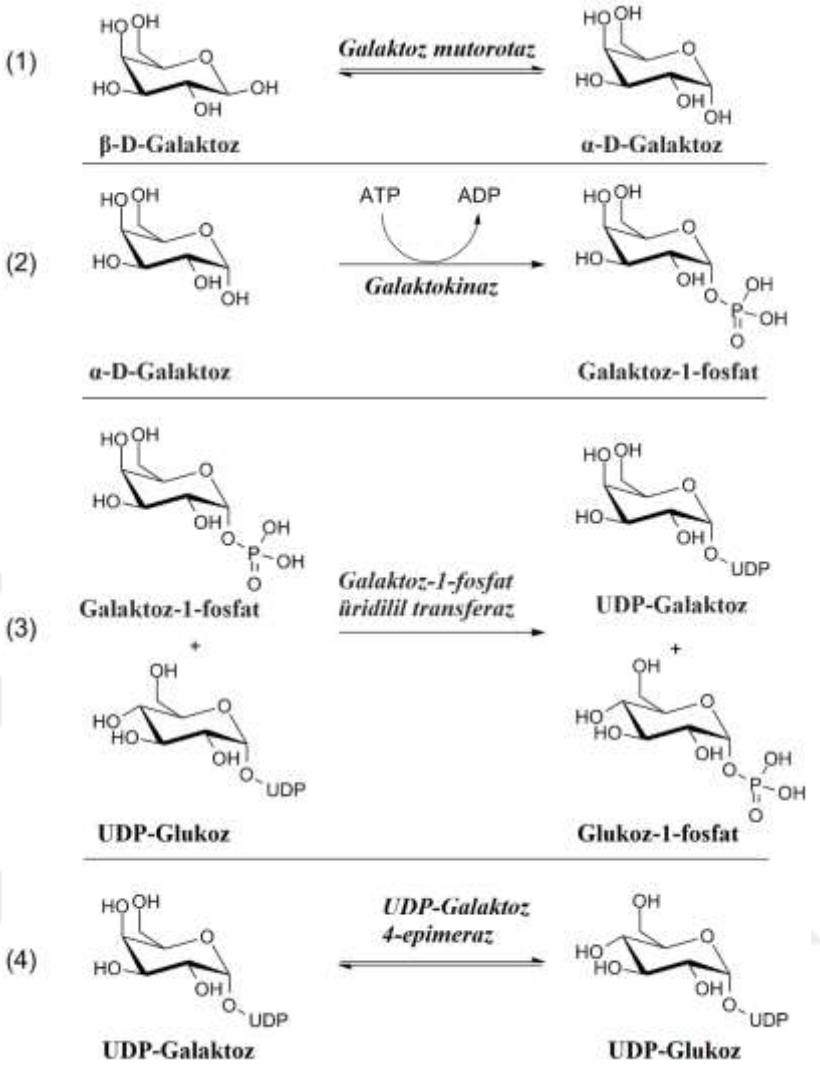
madde görevi görür. Hiyaluronik asit önemli tıbbi değere sahiptir; genellikle yara iyileşmesinde, yanık pansumanlarında, osteoartrit tedavisinde, katarakt veya kornea nakli ameliyatlarında ve çeşitli plastik cerrahi ameliyatlarında kullanılır (Apte ve Harihara, 2005; Apte, 2014; PubChem, 2022).



Şekil 2.4: GalN'nin kimyasal yapısı (PubChem, 2022).

2.4.1. GalN'nin Toksisite Mekanizması

Deneysel modelde kullanılan çeşitli ajanlara bağlı karaciğer toksisitesi insanlarda nadiren görülür. Bu nedenle, etil alkol ve GalN gibi insanlarla daha ilgili olan hepatotoksik ajanların kullanılması önemlidir (Radhiga ve diğ. 2016). Karaciğer hasarı, alkol, bakteri ve virüsler dahil olmak üzere çeşitli kimyasallar tarafından indüklenir. Karbon tetraklorür (CCl_4), asetaminofen, LPS ve GalN gibi çeşitli kimyasallar deneysel hayvan modellerinde akut karaciğer hasarı oluşturmak için kullanılmıştır (Hsu ve diğ. 2012; Park ve diğ. 2018; 2020; Gungor ve diğ. 2022). GalN, hücrelerde RNA ve protein sentezi için gerekli olan üridin havuzuna müdahaleler ederek karaciğerde hasar oluşumunu tetikler. GalN, galaktoz metabolizmasının Leloir yolu yoluyla metabolize edilir ve GalN'nin üridin türevlerinin üretimine yol açar. Leloir yolunun iki enzimi, galaktokinaz ve UDP-galaktoz uridililtransferaz, düşük substrat spesifiteleri nedeniyle GalN'yi galaktozamin-1-fosfat ve UDP-galaktozamine dönüştürür. UDP-galaktozamin, Leloir yolundaki son enzim olan UDP-galaktoz-4' epimerazı bloke ederek hücrelerde UDP-galaktozamin birikmesine neden olur (Şekil 2.5) (Holden ve diğ. 2003). Bu, RNA ve protein sentezi için gerekli olan UTP, UDP, üridin monofosfat (UMP), UDP-glukoz ve UDP-galaktoz gibi üridin şeker türevlerinin tükenmesiyle sonuçlanır (Apte, 2014).



Şekil 2.5: GalN'nin Leloir yolundaki metabolizması (Holden ve diğ. 2003).

2.4.1.1. Akut Toksisite

Farelerde ölümcül doz (LD_{50}), intraperitoneal uygulama yolu ile 2660 mg/kg'dir. GalN, adenozin trifosfat (ATP), sitidin trifosfat (CTP) veya guanozin trifosfat (GTP) gibi diğer nükleotidlerle etkileşime girmeden yüksek enerji gerektiren prosesleri seçici olarak yürütmek için gerekli olan UTP'nin tükenmesine neden olur. Böylece, hepatositlerde glikojen sentezi ve RNA üretiminde kritik rol oynayan UDP-glukoz ve UDP-galaktoz gibi önemli üridin türevlerinin miktarı azalır.

GalN'nin, Kupffer hücrelerinin aktivasyonuna yol açarak tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-α) gibi proenflamatuvar sitokinlerin salgılanmasına neden olduğu bilinmektedir. Artan TNF-α seviyeleri, karaciğerde nötrofilik infiltrasyona ve sitotoksisiteye yol açar (Yang ve diğ. 2016).

Son yıllarda LPS, enflamatuvar reaksiyonları ve nötrofil aracılı karaciğer hasarını incelemek için GalN ile kombinasyon halinde yaygın olarak kullanılmıştır (Yang ve diğ. 2016; Ansari ve diğ. 2021; Rakshit ve diğ. 2021).

GalN ve GalN + LPS ile indüklenen hepatit, kemirgenlerde yüksek oranda tekrarlanabilir ve iyi çalışılmış deneysel hepatit modelleridir. Kemirgenlerde deneysel hepatiti indüklemek için tek başına 400-1000 mg/kg GalN dozu veya 0.01-0.1 mg/kg LPS ile kombinasyon halinde 300-700 mg/kg D-GalN dozu başarıyla kullanılmıştır (Apte, 2014; Rakshit ve diğ. 2020; 2021).

GalN'nin sıçanlardaki hepatotoksik etkisinin yaşa bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir. Yenidoğan (5 günlük) ve yaşlı sıçanların (24 aylık), artan karaciğer dokusu onarımı nedeniyle GalN kaynaklı karaciğer hasarına yetişkin sıçanlara (5 aylık) kıyasla daha az duyarlı oldukları bildirilmiştir. Yaşlı sıçanlardan izole edilen primer hepatositlerin karaciğerde daha yüksek bazal UTP, UDP ve UMP seviyeleri sergiledikleri gösterilmiş ve bunun da yaşlı sıçanlar tarafından gözlemlenen korumada rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Apte, 2014).

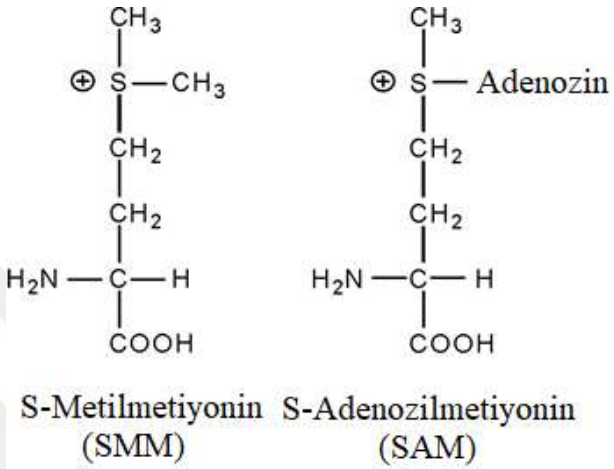
2.4.1.2. Kronik Toksisite

GalN'nin yüksek dozlarda ve kronik uygulanmasının karaciğer hücrelerinde mutajenik/genotoksik bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Üç ila dört aylık GalN maruziyetinin kronik ilerleyici hepatiti indüklediği, 8-10 aylık maruz kalma sonrasında ise hepatoma ve fibrozise yol açtığı belirlenmiştir (Apte, 2014). Son yapılan çalışmalardan birinde, Wistar sıçanlara 3 ay süreyle ve haftada 3 gün 500 mg/kg olacak şekilde GalN uygulanmasının serum alanin amino transferaz, serum aspartat amino transferaz, serum alkalin fosfataz, serum total ve direkt bilirubin ile doku lipit peroksidasyon ve nitrit oksit seviyelerini arttırdığı, dokudaki indirgenmiş glutatyon (GSH) seviyelerini ise azalttığı gösterilmiştir (Reshi ve diğ. 2021).

2.5. U VİTAMİNİ

1940'ların sonunda, mide ülseri şikayeti olan hastalara lahana suyu içirilmiş, sonrasında hastaların şikayetlerinin gerilemesine neden olan bir bileşiği tanımlamak için U vitamini (U vit.) terimi kullanılmıştır. U vit. gerçek bir vitamin olmayıp, esansiyel bir amino asit olan L-metiyoninin (Met) bir türevidir (Choi, 2019). U vit. olarak da bilinen S-metilmetiyonin (SMM), 164.25 g/mol moleküler ağırlığa sahiptir. SMM, Met'den homosistein metiltransferaz, Met metiltransferaz ve diğer enzimler yoluyla sentezlenen kükürt metabolizmasının önemli bir ara

maddesidir (Bourgis ve diğ. 1999; Watanabe ve diğ. 2000; Augspurger ve diğ. 2005; Lee ve diğ. 2012; Ogawa ve Mitsuya, 2012). Esas olarak *Brassicaceae* (turpgiller) familyasında (brokoli, lahana, kereviz, karnabahar), domates, mısır, sarımsak, ıspanak ve diğer gıdalarda ve ayrıca birçok çiçekli bitkinin yapraklarında, köklerinde ve diğer organlarında bulunur (Augspurger ve diğ. 2005; Racz ve diğ. 2008; García-López ve diğ. 2012; Sokmen ve diğ. 2012). SMM ve S-adenozilmetiyoninin (SAM) kimyasal yapıları Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6: SMM ve SAM'ın Kimyasal Yapıları (Augspurger ve diğ. 2005).

U vit., vitamin sınıflandırmasına dahil edilmemesine rağmen, vitaminlere benzer etkiler göstermesi nedeni ile vitamin olarak kabul edilir. Kükürt, U vit.'in bir bileşenidir ve bitkilerde büyüme, klorofil üretimi, antioksidan üretimi, protein sentezi gibi önemli süreçlere katılır. (Jander ve Joshi, 2010). SMM, çiçekli bitkilerde serbest amino asit havuzunun bir bileşeni olarak kabul edilmiştir (Yu ve diğ. 2022).

Tüm çiçekli bitkiler Met'den SMM üretir ve SMM'yi dönüştürmek için bağımsız bir mekanizmaya sahiptir.

2.5.1. U Vitamini ile İlgili Yapılan Araştırmalar

Peptik ülserli on üç hastaya, içerisinde bir antipeptik ülser faktörü (U vit.) içeren taze lahana suyunun verildiği bir çalışmada, duodenum ülseri olan bu hastalardan 7'sinin ortalama krater iyileşme süresinin 10.4 gün olduğu, buna karşın standart tedavi uygulanan 62 hastada ortalama iyileşme süresinin ise 37 gün olduğu tespit edilmiştir. Lahana suyu ile tedavi edilen mide ülserli 6 hastada ise ortalama krater iyileşme süresi, standart tedavi ile uygulanan 6 hasta için belirlenen 42 gün ile karşılaştırıldığında 7.3 gün olarak bulunmuştur. Cheney (1949) tarafından

yapılan bu çalışma ile, günde yaklaşık 1 litre taze lahana suyu ile tedavi edilen 13 hastada radyolojik ve gastroskopik olarak gözlenen peptik ülserlerin hızlı iyileşmesi, insanlarda peptik ülser oluşumunda antipeptik ülser diyet faktörünün önemli bir rol oynayabileceği gösterilmiştir.

Kaliforniya/ABD'deki bir hapishanede peptik ülser tedavisinde konsantre lahana suyunun etkinliğini değerlendirmek amacı ile yapılan başka bir çalışmada, gastrik veya duodenal ülser krateri teşhisi konan hastalar/mahkumlar çift kör kontrol deneyi ile tedavi edilmiştir. Bu hastalara konsantre lahana suyu ya da plasebo faksimile (renk, koku, görünüm ve miktar olarak konsantre lahana suyu ile özdeş, ancak lahana içermeyen) karışım verilmiştir. Bu tedavinin başarısının değerlendirilmesi, ülser kraterinin tekrarlanan X-ışını incelemelerine dayanmaktadır. Bu çalışmada, mide veya duodenal ülser krateri iyileşme süresi için 22 günlük bir süre tanınmıştır (Cheney ve diğ. 1956).

Diyetle indüklenmiş hiperlipidemili sıçanlarda ve tavşanlarda, oral U vit. uygulanmasının hipolipidemik etkiler gösterdiği; bu hayvanların plazma toplam kolesterol, beta-lipoprotein ve fosfolipit seviyelerini de düşürdüğü rapor edilmiştir. Ancak, hipolipidemik etki gösteren U vit.'nin plazma trigliserit seviyelerini kayda değer bir şekilde değiştirmediği bildirilmiştir (Seri ve diğ. 1980). Başka bir klinik çalışmada hiperkolesterolemi olgusuna sahip 26 hastaya 8 hafta süreyle 1500 mg/gün oral U vit. verilmesiyle, bu hastaların serum total kolesterol değerlerinin % 9.7 oranında düştüğü, serum yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) değerlerinin ise yükseldiği rapor edilmiştir (Nakamura ve diğ. 1981). U vit.'nin lipit peroksidasyon düzeylerini düşürmekle kalmayıp aynı zamanda monoamin oksidaz enzimini de inhibe ederek orta düzeyde fotokoruyucu etkiler gösterebildiği rapor edilmiştir (Gessler ve diğ. 1996). Bir başka araştırmada ise U vit.'nin 3T3-L1 pre-adiposit hücre soyları üzerine antiobezite etki gösterdiği bulunmuştur. U vit.'nin bu etkileri, konsantrasyona bağımlı şekilde hücre içi trigliserit düzeylerini düşürerek, gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz enzimini inhibe ederek, adipojenik transkripsiyon faktörlerinin aşağı yönlü regülasyonunu ve ayrıca aktive edilmiş mitojen protein kinazın yukarı yönlü regülasyonunu sağlayarak gösterdiği rapor edilmiştir (Lee ve diğ. 2012). Yapılan diğer çalışmalar sonucunda, in vivo olarak uygulanan U vit.'nin hem yara iyileştirici hem de ultraviyole-B (UVB) ışınlarına karşı fotokoruyucu etkiler gösterdiği ortaya çıkarılmış ve bu bileşiğin kozmetik alanında bir hammadde olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Kim ve diğ. 2015). U vit.'nin kimyasal olarak sentezlenen iki türevinin UV ışınlarına maruz bırakılan dermal fibroblast hücreleri üzerinde *in vitro* koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Kim ve diğ. 2018). Öte yandan, farklı kimyasal ajanlarla (amiodaron, valproik asit, GalN vb.) karaciğer,

böbrek, akciğer ve lens gibi dokularda oluşturulan toksisite modellerinde U vit.'nin antioksidan (Sokmen ve diğ. 2012; Tunali ve diğ. 2015; Baş ve diğ. 2016), antienflamatuvar (Gezginci-Oktayoglu ve diğ. 2016), antiepileptik (Oktay ve diğ. 2018) ve antifibrotik (Oztay ve diğ. 2020) etkilere sahip olduğu belirtilmiştir. Abouzed ve diğ. (2021) tarafından yapılan çalışmada, dietil nitrozamin ve CCl_4 ile karaciğer kanseri oluşturulmuş Wistar sıçanlarda artmış olan TNF-α, interlökin-6 (IL-6) ve IL-10 seviyelerinin U vit. verilmesi sonucunda anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda, GalN'nin organizmada meydana getirdiği hasarlara karşı, oldukça çeşitli biyofonksiyonlara sahip olan U vit.'nin olası koruyucu/önleyici etkilerinin olup olmadığının incelenmesi amacıyla, sıçanlara tek doz (500 mg/kg) olarak intraperitonal yolla verilen GalN'nin neden olduğu oksidatif beyin hasarına karşı U vit.'nin rolü araştırılmıştır.

3. YÖNTEM

3.1. DENEYLERDE KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

Buzdolabı: Arçelik

Çalkalayıcı Su Banyosu: Memmert WB 14

Çalkalayıcı Su Banyosu: Memmert WNB 14

Derin Dondurucular: New-Brunswick Scientific -76 °C, Beko -20 °C

Distile Su Cihazı: Brand MonoDest 3000

Etüv: Memmert UNB 500

Floresans Okuyucu: BioTek FLx800 Fluoresans Microplate Reader

Mikroplayt Okuyucu: BioTek ELx808 Absorbance Microplate Reader

pH Metre: Hanna pH/ORPvMeter HI 2211

Santrifüj Cihazı: Denley BS400

Soğutmalı Santrifüj: Sigma Laboratory Centrifuges 3K30

Spektrofotometre: Shimadzu UV-Visible Mini UV-1240 Spectrophotometer

Spektrofotometre: Shimadzu UV-1700 UV-Visible Spectrophotometer

Sonikatör: Bandelin Sonorex

Terazi: Radwag XA 60/220/X Hassas terazi

Terazi: Radwag XA AS 220/C/2 Hassas terazi

UV: DESAGA MinUVIS Abnehmbar Removable UV 254/366 nm (Duo-UV-Source for Thin layer and Column chromatography)

Vorteks: Fisons Whirlimixer

3.2. DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASALLAR

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler, katalog numaraları ile birlikte liste halinde Tablo 3.1'de sunulmuştur.

Tablo 3.1: Deney sırasında kullanılan kimyasallar.

Madde Adı/Kapalı formülü	Marka/Katalog Numarası
1-Kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ($C_6H_3ClN_2O_4$)	Fluka 24440
2,2′-Azino-bis-(3-etil benzotiyazolin-6-sulfonik asid diamonyum tuzu) (ABTS) [$C_{18}H_{16}N_4O_6S_4$-$(NH_4)_2$]	Sigma 11557
2',7'-Diklorofloresin diasetat (2',7'-DCFDA) ($C_{24}H_{16}Cl_2O_7$)	Sigma D6883
4-Aminoantipirin (4-AAP) ($C_{11}H_{13}N_3O$)	Sigma A4382
5,5'-Ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ($C_{14}H_8N_2O_8S_2$)	Sigma 218200
Albumin	Merk 112018
Amonyum demir (II) sülfat [$NH_4Fe(SO_4)_2$]	Merk 3781
Asetiltiyokoliniyodür ($C_{17}H_{16}INOS$)	Sigma A5751
Bakır (II) sülfat ($CuSO_4$)	Panreac
Derişik asetik asit (CH_3COOH)	Merk 100063
Dimetil sülfoksit (DMSO) $(CH_3)_2SO$)	Merk 802912
Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)	Merck A116773847
Dipotasyum tartarat ($C_4H_4K_2O_6$)	Merck 5160
Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	Fluka 71642
Etil alkol (C_2H_5OH)	Riedel de Häen 32221
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)	Merck 8421
Etopropazin hidroklorür ($C_{19}H_{25}ClN_2S$)	Sigma 3167
Fenil asetat ($C_8H_8O_2$)	Fluka 46040
Fenol	Merk 5559
Fosforik asit (H_3PO_4)	Merck 100563
Gliserol ($C_3H_8O_3$)	Merk 4091
Glutatyon redüktaz (GR)	Sigma G3664
HEPES ($C_8H_{18}N_2O_4S$)	Sigma H3375
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Merck 108600
Hidroklorik asit (HCl)	Merck 100314
İndirgenmiş glutatyon (GSH) ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$)	Fluka 49750
İndirgenmiş nikotinamit adenin dinükleotit ($NADH+H^+$) ($C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$)	Fluka 43420
İndirgenmiş nikotinamit adenin dinükleotit fosfat ($NADPH+H^+$) ($C_{21}H_{29}N_7O_{17}P_3$)	Sigma N1630
Kalsiyum klorür ($CaCl_2$)	Fluka 21085
Ksantin ($C_5H_4N_4O_2$)	Sigma 626
Ksilenol oranj ($C_{31}H_{32}N_2O_{13}S$)	Merk 108677
Laktik asit	Sigma L1250
Lityum sülfat ($LiSO_4$)	Riedel de Häen 13029
Metafosforik asit (HPO_3)	Carlo Erba 407465
Monopotasyum dihidrojenfosfat (KH_2PO_4)	Merck 105101
o-Dianisidin dihidroklorür ($C_{14}H_{16}N_2O_2.2HCl$)	Sigma D3252
p-Nitrofenil asetat (PNFA)($CH_3CO_2C_6H_4NO_2$)	Fluka 4601
Potasyum iyodür (KI)	Mallinckrodt 9688
Potasyum klorür (KCl)	Merk 4935
Riboflavin ($C_{17}H_{20}N_4O_6$)	Sigma 47861
SOD (süperoksit dismutaz)	Sigma S7571

Tablo 3.1 (devam):

Madde Adı/Kapalı formülü	Marka/Katalog Numarası
6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit (Troloks) ($C_{14}H_{18}O_4$)	Sigma 3167
Sodyum asetat ($C_2H_3NaO_2$)	Merk 6265
Sodyum azit (NaN_3)	Fluka 71289
Sodyum hidroksit (NaOH)	Fluka 71691
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	Analar 10240
Sodyum klorür (NaCI)	Merck 106400
Sodyum molibat (Na_2MoO_4)	Riedel de Haën 13315
Sodyum pirofosfat ($Na_2H_2P_2O_7$)	Merck 6619
Sodyum tungstat (Na_2WO_4)	Merck 6672
Sülfat asidi (H_2SO_4)	Merck 100713
Tris(hidroksimetil)aminometan (Tris) (C14H11NO3)	Merck 108382
Trisodyum sitrat	Merk 6432
Yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) ($C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$)	Sigma G4376

3.3. DENEY HAYVANLARI

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 26.10.2020 tarih ve 53.2020.mar sayılı Etik Kurul Raporu kapsamında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda, 22 adet Sprague-Dawley cinsi 6-6,5 aylık ve 200-250 g ağırlığında olan dişi sıçanlar kullanıldı. Deney süresince sıçanlar, standart çelik kafeslerde tutuldu, hazır yem ile beslendi ve sıçanların çeşme suyuna serbestçe erişimine izin verildi. Rastgele seçilen ve deney öncesinde bir gece aç bırakılan sıçanlar aşağıdaki gibi dört gruba ayrıldı.

Grup I: Kontrol grubu sıçanlar (n=5)

Grup II: U vit. verilen sıçanlar (n=6)

Grup III: Deney grubu; GalN verilen sıçanlar (n=5)

Grup IV: GalN ve U vit. verilen sıçanlar (n=6)

3.4. DENEY HAYVANLARINDA BEYİN HASARININ OLUŞTURULMASI

Grup I (n=5): Kontrol grubu sıçanlara %0,9 NaCl (serum fizyolojik) verildi. Grup II (n=6): Sıçanlara üç gün süre ile gavaj yöntemi kullanılarak 50 mg/kg'lık U vit. verildi. U vit. distile suda çözülerek hazırlandı (Sokmen ve diğ. 2012). Grup III (n=5): Deney grubu sıçanlara intraperitonal yolla tek doz olarak 500 mg/kg GalN enjekte edildi. GalN, % 0.9 NaCl içerisinde çözülerek hazırlandı (Catal ve diğ. 2010; Bayrak ve diğ. 2016). Grup IV (n=6): GalN + U vit.

grubu sıçanlara aynı doz ve zamanda GalN ve U vit. verildi. Sıçanlara U vit., GalN enjeksiyonundan 1 saat önce gavaj yöntemi ile verildi.

3.5. BEYİN DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

Üçüncü günde GalN uygulamasından 6 saat sonra tüm sıçanlar anestezi altında sakrifiye edildi. Bu işlemin ardından hayvanların kafaları -76°C'lik derin dondurucuda deney gününde kullanılmak üzere saklandı.

3.6. BEYİN DOKU HOMOJENATLARININ HAZIRLANMASI

-76ºC'de bulunan bulunan sıçan kafaları, beyin dokularının çıkarılmasından 1 gün önce 4-5 saat süre ile -18ºC'de tutulduktan sonra +4ºC'de bekletildi. Ertesi gün, kafatasları açılarak beyin dokuları çıkarıldı. Dokuların tümü tartıldıktan sonra homojenizasyon işlemine geçildi. Her bir doku uygun hacimde soğuk % 0.9'luk NaCl çözeltisi ile soğuk ortamda ve cam homojenizatör yardımı ile % 10'luk (ağırlık/hacim) olacak şekilde seri olarak homojenize edildi. Hazırlanan homojenatlar +4 ºC'de soğutmalı santrifüjde 10.000 x g'de 10 dakika santrifüje edildi. Elde edilen süpernatantlarda glutatyon (GSH), ileri okside protein ürünleri (AOPP), reaktif oksijen türleri (ROS), toplam oksidan seviyesi (TOS) ve toplam antioksidan seviyesi (TAS), oksidatif stres indeksi (OSİ), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon-S-transferaz (GST), laktat dehidrojenaz (LDH), miyeloperoksidaz (MPO), ksantin oksidaz (XO), asetilkolin esteraz (AChE), aril esteraz (ARE), karbonik anhidraz (CA) aktiviteleri ve total protein miktarları tayin edildi.

3.7. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA GLUTATYON (GSH) MİKTAR TAYİNİ

Beyin dokusunda GSH miktarını belirlemek için Beutler (1975) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı. Bu yöntemin temeli, Ellman ayıracı olarak bilinen DTNB'nin örnek içerisindeki sülfidril (-SH) grupları ile oluşturduğu sarı rengin 412 nm'de spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır.

Kullanılan Çözeltiler:

Çöktürme Reaktifi: 1.67 g *m*-fosforik asit, 0.2 g EDTA-disodyum tuzu (ya da EDTA-dipotasyum tuzu) ve 30 g NaCl ayrı ayrı beherlerde tartıldı, metal iyonları içermeyen distile suda çözüldükten sonra, toplam hacim balon jojede distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Sodyum Sitrat Çözeltisi: %1'lik olacak şekilde, 1.0 g trisodyum sitrat bir beher içerisinde tartıldı. Distile suda çözüldükten sonra hacmi balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

Ellman (DTNB) Ayıracı: %40 mg olacak şekilde, 40 mg DTNB bir beher içerisinde tartıldı ve az miktarda %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözüldü. Son hacmi aynı çözelti kullanılarak balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

Na_2HPO_4 Çözeltisi: 0.3 M derişimde olacak şekilde, 8.5176 g Na_2HPO_4 bir beher içerisinde tartılıp, distile su ile çözüldü ve son hacmi balon jojede 200 mL'ye tamamlandı.

GSH Stok Standart Çözeltisi: %100 mg olacak şekilde, 10 mg GSH bir beher içerisinde tartıldı. Az miktarda distile su ile çözüldü ve son hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

GSH Çalışma Standartları: %100 mg'lık GSH stok standart çözeltisinden distile su seyreltilerek %2.5 mg; %5 mg; %7.5 mg ve %10 mg GSH olacak şekilde çalışma standardı çözeltileri hazırlandı. Çalışma standardı çözeltileri ile dokudaki GSH miktarını hesaplayabilmek için gerekli olan GSH standart grafiği çizildi. Deneyler üçer defa tekrarlandı.

Deneyin Yapılışı: Santrifüj tüpüne 0.5 mL beyin homojenatı ilave edildikten sonra üzerine 0.75 mL çöktürme reaktifi eklenip iyice karıştırıldı. 4000 rpm'de 5 dakika santrifüje edildi. Daha sonra süpernatant dikkatli bir şekilde çökelti fazından ayrıldı ve deneye devam edildi.

Kör tüpüne, 0.5 mL distile su + 2 mL 0.3 M Na_2HPO_4 çözeltisi + 0.25 mL Ellman ayıracı,

Standart tüpüne, 0.5 mL çalışma standardı + 2 mL 0.3 M Na_2HPO_4 çözeltisi + 0.25 mL Ellman ayıracı,

Örnek tüpüne ise, 0.5 mL doku homojenatı + 2 mL 0.3 M Na_2HPO_4 çözeltisi + 0.25 mL Ellman ayıracı ilave edildi. Bu şekilde hazırlanan tüpler karıştırdıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Tüplerdeki absorbans değerleri spektrofotometrede köre karşı 412 nm dalga boyunda seri şekilde ölçüldü. Beyin dokusundaki GSH miktarını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı.

GSH Miktarı (nmol GSH/mg protein) = $(\Delta OD_{örnek}/\Delta OD_{St})$ x $[(2.5 \times A) / 307.3] \times 10^6 / P$

307.3 g/mol = GSH'ın molekül kütlesi; A = % mg cinsinden standart konsantrasyonu; P = % mg cinsinden dokudaki total protein miktarı

3.8. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA İLERİ OKSİDE PROTEİN ÜRÜNLERİNİN (AOPP) TAYİNİ

Beyin dokusundaki AOPP'nin kantitatif tayini için Witko-Sarsat ve diğ. (1996) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı.

Kullanılan Çözeltiler:

KP_i Tampon Çözeltisi: Derişimleri 20'şer mM olacak şekilde, KH_2PO_4'ten 0.544 g, K_2HPO_4'ten 0.568 g farklı beherlere tartılıp, ayrı ayrı balon jojelerde bir miktar distile suda çözüldükten sonra hacimleri 200'er mL'ye tamamlandı. KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 çözeltileri pH değeri 7.4 olacak şekilde (2:8) oranında karıştırıldı.

Potasyum İyodür Çözeltisi: 1.16 M derişimde olacak şekilde, 1.9256 g KI bir beher içerisinde tartılıp, distile su ile çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

Asetik Asit Çözeltisi: Derişik asetik asit çözeltisi direkt olarak orijinal şişesinden kullanıldı.

Deneyin Yapılışı: Deneyler spektrofotometre küveti içerisinde, aşağıda belirtildiği gibi yapıldı.

Kör küvetine, 2 mL 20 mM KP_i tampon çözeltisi + 0.1 mL 1.16 M KI çözeltisi,

Örnek küvetine ise, 1.6 mL 20 mM KP_i tampon çözeltisi + 0.4 mL doku homojenatı + 0.1 mL 1.16 M KI çözeltisi ilave edildi.

Hazırlanan çözeltiler, spektrofotometrede ve karanlıkta 2 dakika bekletildi. Bu sürenin bitiminde her iki küvete de 0.2'şer mL derişik asetik asit ilave edilerek hemen karıştırıldı ve spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda köre karşı absorbans ölçümü yapıldı. Beyin dokusundaki AOPP miktarının hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı.

AOPP miktarı (nmol/mg protein) $=[(\Delta OD_{örnek}/261) \times (V_T/V_N) \times f] / \text{mg protein}$

261 $M^{-1}cm^{-1}$ = Ekstinksiyon katsayısı; V_T= Toplam çözelti hacmi; V_N = Numune hacmi;

f = Seyreltme faktörü

3.9. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN (ROS) TAYİNİ

Beyin dokusundaki reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyeleri, Zhang ve diğ. (2018) tarafından geliştirilen spektroflorometrik yöntem kullanılarak tayin edildi. Floresan probu olarak 2′,7′-DCFDA kullanıldı.

Kullanılan Çözeltiler:

HEPES Tampon Çözeltisi: 20 mM HEPES tampon çözeltisinin hazırlanması için aşağıda verilen maddeler kullanıldı.

119.15 mg HEPES (20 mM), 192.85 mg NaCI (132 mM), 6.52 mg KCI (3.5 mM), 2.77 mg $CaCI_2$ (1 mM) ve 7.62 mg $CaCI_2$ (1.5 mM) olacak şekilde ayrı ayrı beherlere tartıldı. Ardından çok az miktarta destile suda çözüldü. 2 M NaOH çözeltisi yardımıyla bu çözeltinin pH değeri 7.25'e ayarlandı ve son hacim 25 mL'ye distile su ile tamamlandı.

2′,7′-DCFDA Çözeltisi: 20 µM derişimde olacak şekilde, 0.97 mg 2′,7′-DCFDA bir beher içerisinde tartıldı ve 1 mL DMSO çözeltisinde içerisinde çözüldü. Deneyde kullanılacağı zaman DMSO çözeltisi ile 100 kat seyreltildi. Deneyden hemen önce taze olarak hazırlandı.

Deneyin Yapılışı: Deneyler siyah renkli 96 kuyucuklu mikroplayt içerisinde yapıldı. Kuyucuklara kör ve örnekler aşağıda gösterildiği gibi ilave edildi.

Kör için, 5 µL DMSO + 55 µL 20 mM HEPES tampon çözeltisi + 90 µL 20 µM 2′,7′-DCFDA çözeltisi,

Örnek için, 5 µL doku homojenatı + 55 µL 20 mM HEPES tampon çözeltisi + 90 µL 20 µM 2′,7′-DCFDA çözeltisi ilave edildi.

Deneyde ROS kaynağı olarak doku homojenatı kullanıldı. Bu şekilde hazırlanan örneklerin ve körün floresans yoğunlukları, 37 °C'de 0. dakikada eksitasyon λ=480 nm ve emisyon λ=535 nm değerlerinde spektroflorometrik olarak ölçüldü. Bu ölçüm sonrasında mikroplayt'in üzeri folyo ile kapatıldı, 37 °C'de 30 dakika daha inkübe edildikten sonra tekrar ölçüm alındı.

AFU/mg protein = $[(I_{30}) -(I_0)]$ / mg protein; I_{30} = 30. dakikadaki floresans yoğunluğu

I_0 = 0. dakikadaki floresans yoğunluğu

3.10. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA TOTAL OKSİDAN SEVİYESİNİN (TOS) TAYİNİ

Erel (2005) tarafından geliştirilen bu yönteme göre, örnekte bulunan oksidan moleküllerinin tümü demir (II) iyonu ve o-dianisidin kompleksini demir (III) iyonuna oksitler. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan gliserol molekülleri tarafından

güçlendirilir. Demir (III) iyonunun, asidik bir ortamda ksilenol oranj ile oluşturduğu renkli kompleksin yoğunluğu, örnekte bulunan toplam oksidan seviyesi (TOS) ile ilgilidir.

Kullanılan Çözeltiler:

Gliserol Çözeltisi: Direkt olarak orijinal şişesinden kullanıldı.

H_2SO_4 Çözeltisi: 25 mM derişimde olacak şekilde %98'lik derişik H_2SO_4 çözeltisinden 136 µL alındı ve içerisinde bir miktar distile su bulunan balon jojeye ilave edildikten sonra son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Reaktif I Çözeltisi: Derişimi 150 mM olacak şekilde, 11.4 mg ksilenol oranj ve 140 mM olacak şekilde de 0.818 g NaCI ayrı ayrı beherlere tartıldı. Bu maddeler, 90 mL 25 mM H_2SO_4 içerisinde çözüldü. Son hacim balon jojede 100 mL'ye gliserol ile tamamlandı. Hazırlanan bu çözeltinin pH değeri 1.75 olmalıdır.

Reaktif II Çözeltisi: Derişimi 5 mM olacak şekilde, 0.0196 g ferro amonyum sülfat ve 10 mM olacak şekilde de 0.0317g *o*-dianisidin.2HCl ayrı ayrı beherlere tartıldı. Bu maddeler, 25 mM H_2SO_4 içerisinde çözüldü ve son hacmi aynı çözelti ile 10 mL'ye tamamlandı.

H_2O_2 Stok Standart Çözeltisi: Derişimi 200 mM olacak şekilde, %35'lik H_2O_2 çözeltisinden 172 µL alındı ve son hacmi 10 mL'ye tamamlandı. Deney günü taze olarak hazırlandı.

H_2O_2 Çalışma Standart Çözeltileri: H_2O_2 stok çözeltisi distile su ile seyreltilerek 12.5 µM; 25 µM; 50 µM; 100 µM ve 200 µM H_2O_2 olacak şekilde çalışma standart çözeltileri deney günü taze olarak hazırlandı. Çalışma standart çözeltileri ile dokudaki TOS miktarını hesaplayabilmek için gerekli olan TOS standart grafiği çizildi. Deneyler üçer defa tekrarlandı.

Deneyin yapılışı: 96 kuyucuklu mikroplayt kullanıldı. Kuyucuklara kör, standartlar ve örnekler aşağıda gösterildiği gibi ilave edildi.

Kör için, 225 µL Reaktfi I çözeltisi + 35 µL distile su + 11 µL Reaktif II çözeltisi,

Standartlar için, 225 µL Reaktfi I çözeltisi + 35 µL çalışma standardı + 11 µL Reaktif II çözeltisi,

Örnek için, 225 µL Reaktfi I çözeltisi + 35 µL doku homojenatı + 11 µL Reaktif II çözeltisi kullanıldı.

Mikroplayt içerisine pipetlenen tüm çözeltiler, 37 ℃'de 10 dakika inkübe edildi ve 630 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Ölçüm havaya karşı yapıldı. Kör absorbansı 0 µM olarak kabul edildi. Örnek absorbansları, TOS standart grafiğinde yerine koyularak doku homojenatlarındaki TOS miktarı µmol H_2O_2/L cinsinden hesaplandı. Elde edilen bu sonuçlar ise mg/mL protein değerlerine bölündü.

3.11. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA TOTAL ANTİKOSİDAN SEVİYENİN (TAS) TAYİNİ

İndirgenmiş ABTS molekülü, asidik ortamda (30 mM asetat tamponunda, pH: 3.6) tek başına H_2O_2 kullanılarak radikal katyon formuna ($ABTS^{\bullet+}$) oksitlenir. Asetat tampon çözeltisinde, yoğun ve koyu yeşil renkli $ABTS^{\bullet+}$ molekülleri uzun süre daha stabil kalır. Bu çözelti, yüksek pH değerlerindeki (0.4 M asetat tamponu, pH: 5.8) çözeltiyle seyreltilirken, renk kendiliğinden ve yavaş yavaş ağarır. Örnekte bulunan antioksidanlar, konsantrasyonlarıyla orantılı olarak rengin ağarma hızını arttırır. Spektrofotometrik olarak izlenebilen bu reaksiyonda, $ABTS^{\bullet+}$ moleküllerinin ağartılma hızı, numunenin TAS değerleri ile ters orantılıdır (Erel, 2004).

Kullanılan Çözeltiler:

Asetik Asit Çözeltisi: Derişimi 0.4 M olacak şekilde, derişik asetik asit çözeltisinden 2.28 mL alındı ve içerisinde bir miktar distile su bulunan balon jojeye ilave edildikten sonra son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Reaktif I Çözeltisi: Derişimi 0.4 M olacak şekilde 3.28 g sodyum asetat bir beher içerisinde tartıldı ve distile su ile çözüldükten sonra son hacmi balon jojede100 mL'ye tamamlandı. 0.4 M sodyum asetat çözeltisinden 94 mL alındı ve 6 mL 0.4 M asetik asit çözeltisi ile karıştırıldı. Hazırlanan bu çözeltinin pH değeri 5.8 olmalıdır.

Asetik Asit Çözeltisi: Derişimi 0.03 M olacak şekilde, derişik asetik asit çözeltisinden 170 µL alındı ve içerisinde bir miktar distile su bulunan balon jojeye ilave edildikten sonra son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Asetat Tampon Çözeltisi: Derişimi 0.03 M olacak şekilde, 0.246 g sodyum asetat bir beher içerisinde tartıldı ve distile su ile çözüldükten sonra son hacmi balon jojede 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 7.5 mL alındı ve 92.5 mL 0.03 M asetik asit çözeltisi ile karıştırıldı. Hazırlanan bu çözeltinin pH değeri 3.6 olmalıdır.

H_2O_2 Çözeltisi: Derişimi 2 mM olacak şekilde, %35'lik H_2O_2 çözeltisinden 204 µL alındı ve 0.03 M asetat tamponu ile son hacmi 10 mL'ye tamamlandı. Aynı çözelti yardımı ile 100 kat seyreltildi.

Reaktif II Çözeltisi: Derişimi 10 mM olacak şekilde, 54.59 mg ABTS bir beher içerisinde tartıldıktan sonra 0.03 M asetat tamponunda hazırlanmış olan 2 mM H_2O_2 çözeltisinde çözüldü ve aynı çözelti yardımıyla son hacmi 10 mL'ye tamamlandı. Bu şekilde hazırlanmış olan Reaktif II çözeltisi, oda sıcaklığında ve karanlıkta en az 12 saat bekletildi.

Fosfat Tamponu: Derişimleri 30'ar mM olacak şekilde, 0.4082 g KH_2PO_4 ve 0.4259 g Na_2HPO_4 ayrı ayrı beherlere tartıldı. Bu maddeler, çok az distile suda çözüldü ve son hacimleri balon jojede 100'er mL'ye tamamlandı. KH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 çözeltileri pH değeri 7.4 olacak şekilde (2:8) oranında karıştırıldı.

Troloks Stok Standart Çözeltisi: Derişimi 30 mM olacak şekilde, 7.51 mg Troloks bir beher içerisinde tartıldıktan sonra 30 mM fosfat tamponunda çözüldü ve aynı çözelti yardımıyla son hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

Troloks Çalışma Standart Çözeltileri: Troloks stok çözeltisinden fosfat tamponu ile seyreltilerek 0.1 mM; 0.5 mM; 1 mM; 2 mM ve 3 mM Troloks olacak şekilde çalışma standart çözeltileri deney günü taze olarak hazırlandı. Çalışma standart çözeltileri ile dokudaki TAS miktarını hesaplayabilmek için gerekli olan TAS standart grafiği çizildi. Deneyler üçer defa tekrarlandı.

Deneyin yapılışı: 96 kuyucuklu mikroplayt kullanıldı. Kuyucuklara kör, standartlar ve örnekler aşağıda gösterildiği gibi ilave edildi.

Kör için, 200 µL Reaktfi I çözeltisi + 5 µL distile su + 20 µL Reaktif II çözeltisi,

Standartlar için, 200 µL Reaktfi I çözeltisi + 5 µL çalışma standardı + 20 µL Reaktif II çözeltisi,

Örnek için, 200 µL Reaktfi I çözeltisi + 5 µL doku homojenatı + 20 µL Reaktif II çözeltisi kullanıldı.

Mikroplayt içerisine pipetlenen tüm çözeltiler, 37 °C'de 5 dakika inkübe edildi ve 630 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Ölçüm havaya karşı yapıldı. Kör absorbansı 0 mM olarak kabul edildi. Örnek absorbansları, TAS standart grafiğinde yerine koyularak doku

homojenatlarındaki TAS miktarı mmol Troloks/L cinsinden hesaplandı. Elde edilen bu sonuçlar ise mg/mL protein değerlerine bölündü.

3.12. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA OKSİDATİF STRES İNDEKSİNİN (OSİ) TAYİNİ

Beyin homojenatlarında, TOS değerinin TAS değerine oranı yardımıyla OSİ değerlerinin hesaplanmasında kullanılan formül aşağıda gösterildi (Yumru ve diğ. 2009).

Oksidatif stres indeksi (OSİ) = [(TOS, µmol/g protein)/(TAS, µmol/g protein)x100].

3.13. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA KATALAZ (CAT) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Beyin homojenatlarındaki CAT aktivitesi Aebi (1984) yöntemine göre ölçüldü. Bu yöntemin temelini, CAT enziminin H_2O_2'nin H_2O'ya oksidasyonunu katalize ederken örneğin absorbansındaki düşüşün 240 nm dalga boyunda spektofotometrik olarak ölçülmesi oluşturur.

Kullanılan Çözeltiler

Serum Fizyolojik Çözeltisi: Derişimi %0.9 olacak şekilde 9 g NaCl bir beher içerisinde tartıldı, çok az distile suda çözüldü ve son hacmi distile suyla balon jojede 1 L'ye tamamlandı.

Fosfat Tamponu: Derişimleri 50'şer mM olacak şekilde 0.6804 g KH_2PO_4 ve 0.7098 g Na_2HPO_4 ayrı ayrı beherlere tartıldı. Bu maddeler, çok az distile suda çözüldü ve son hacimleri balon jojede 100'er mL'ye tamamlandı. KH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 çözeltileri pH değeri 7.0 olacak şekilde (4:6) oranında karıştırıldı.

Substrat Çözeltisi: Derişimi 30 mM olacak şekilde, 258 µL %35'lik H_2O_2 çözeltisinden alınıp son hacmi 50 mM fosfat tamponu ile balon jojede 100 mL'ye tamamlandı. Günlük ve deneyden hemen önce taze olarak hazırlandı.

Deneyin Yapılışı: Beyin homojenatlarındaki CAT aktivitesini belirlemek için kör ve örnek tüpleri aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı.

Kör tüpüne, 0.5 mL serum fizyolojik + 2 mL substrat çözeltisi,

Örnek tüpüne ise, 0.5 mL doku homojenatı + 2 mL substrat çözeltisi ilave edildi.

Reaksiyon, substrat çözeltisi ilave edilmesi ile başlatıldı. Örneğin 0. ve 1. dakikadaki absorbans değerleri 240 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Beyin dokusundaki CAT aktivitesi aşağıda gösterilen formül yardımıyla hesaplandı.

CAT Spesifik Aktivitesi (U/mg protein) = [((ΔOD) / 0.0436) x (V_T / $V_Ö$) x f] / P

V_T= Toplam hacim; $V_Ö$ = Örnek hacmi; f = Seyreltme faktörü ; P = Doku örneğindeki total protein miktarı (mg/mL)

3.14. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Beyin dokusunda SOD enziminin katalitik aktivitesini belirlemek için Mylroie ve diğ. (1986) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı. SOD enziminin katalitik aktivitesi riboflavin ile duyarlı hale getirilmiş *o*-dianisidinin UV ışık altında fotooksidasyon hızını arttırma kabiliyeti ölçülerek belirlenir. UV ışığın etkisi altında riboflavin tarafından oluşturulan süperoksit radikali, reaksiyon karışımında SOD enziminin katalitik etkisiyle H_2O_2'ye dönüştürülür. SOD aktivitesi, H_2O_2 ve *o*-dianisidinin reaksiyonu sonucunda oluşan renkli ürün ile doğru orantılıdır. Bu oluşan renkli ürünün absorbans değeri 460 nm'de spektrofotometrede ölçülür.

Kullanılan Çözeltiler

SOD Tampon Çözeltisi: Derişimleri 50'şer mM olacak şekilde 1.7011 g KH_2PO_4 ve 1.7745 g Na_2HPO_4 ayrı ayrı beherler içerisinde tartılıp, bir miktar distile su ile çözüldü ve ardından farklı balon jojelerde son hacimleri 250'şer mL'ye distile su ile tamamlandı. Hazırlanan Na_2HPO_4 ve KH_2PO_4 çözeltileri, pH değeri 7.8 olacak şekilde (9.5:0.5) oranında karıştırıldı. Daha sonra derişimi 0.1 mM olacak şekilde 9.3 mg EDTA başka bir behere tartıldı ve bu tamponda çözüldükten sonra son hacmi balon jojede 250 mL'ye tamamlandı.

Riboflavin Çözeltisi: Derişimleri 10'ar mM olacak şekilde 0.142 g Na_2HPO_4 ve 0.136 g KH_2PO_4 ayrı ayrı beherler içerisinde tartılıp, bir miktar distile su ile çözüldü ve ardından farklı balon jojelerde son hacimleri 100'er mL'ye tamamlandı. Hazırlanan Na_2HPO_4 ve KH_2PO_4 çözeltileri, pH değeri 7.5 olacak şekilde (9:1) oranında karıştırıldı. Bu çözelti riboflavin çözeltisinin hazırlanmasında kullanıldı. Derişimi 0.2 mM olacak şekilde 1.83 mg riboflavin bir beher içerisinde tartıldı ve bu tamponda çözüldükten sonra son hacmi balon jojede hacmi 25 mL'ye tamamlandı.

***o*-Dianisidin.2HCl Çözeltisi:** Derişimi 6 mM olacak şekilde 19 mg *o*-dianisidin.2HCl bir beher içerisinde tartılıp, çok az distile suda çözüldü ve son hacmi 10 mL'ye tamamlandı. Günlük ve taze olarak hazırlandı.

SOD Stok Standart Çözeltisi: 120 U/L olacak şekilde bir beher içerisinde tartılan liyofilize SOD enzimi, aktivite kaybını önlemek için soğuk distile suda çözüldü. +4 °C'de muhafaza edildi.

SOD Çalışma Standart Çözeltisi: SOD stok standart çözeltisi sırası ile 2 U/L; 4 U/L; 6 U/L; 8 U/L ve 10 U/L olacak şekilde soğuk distile su ile seyreltildi. Çalışma standartları kullanılarak dokudaki SOD aktivitesini hesaplamak için gerekli olan SOD standart eğrisi çizildi. Deneyler üçer defa tekrarlandı.

Deneyin Yapılışı: Beyin homojenatları, kör ve SOD çalışma standartları aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı.

Kör tüpüne, 2.7 mL SOD tamponu + 0.1 mL *o*-dianisidin.2HCl + 0.2 mM riboflavin çözeltisi,

Standart tüpüne, 2.6 mL SOD tamponu + 0.1 mL *o*-dianisidin.2HCl + 0.1 mL çalışma standardı + 0.2 mM riboflavin çözeltisi,

Örnek tüpüne ise, 2.6 mL SOD tamponu + 0.1 mL *o*-dianisidin.2HCl + 0.1 mL doku homojenatı + 0.2 mM riboflavin çözeltisi ilave edildi.

Riboflavin çözeltisi 30 saniye aralıklarla test tüplerine ilave edildi. Bunların her biri vorteks yardımıyla iyice karıştırıldı ve spektrofotometrede köre karşı 460 nm'de 0. dakikadaki (ilk) absorbans değerleri ölçüldü. Tüpler daha sonra 8 dakika boyunca bir floresan lamba altında ve karanlıkta tutuldu. 8 dakika sonunda test tüplerinin ikinci absorbans değerleri köre karşı tekrar ölçüldü. 0. ve 8. dakikalar arasındaki absorbans farkları hesaplandı. Numunelerin SOD aktivitesi (U/L) standart grafikten elde edilen doğru denklem yardımıyla hesaplandı. Elde edilen değerler, spesifik aktivite (U/g protein) cinsinden hesaplandı.

3.15. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA GLUTATYON PEROKSİDAZ (GPx) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Beyin dokusundaki glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi Paglia ve Valentine (1967) tarafından geliştirilen ve Wendel (1981) tarafından modifiye edilen metoda göre ölçüldü. GPx, H_2O_2 varlığında GSH'ın oksidasyonunu sağlar. Bunun sonucunda okside glutatyon (GSSG) oluşur.

Elde edilen GSSG, bir indirgeme substratı olarak NADPH+H^+'nın kullanıldığı ve glutatyon redüktaz (GR) tarafından katalizlenen reaksiyon ile yeninden GSH'ye indirgenir. Meydana gelen bu reaksiyonlar sırasında koenzimin oksidasyonu, oluşan absorbans değerinde azalmaya yol açar. GPx aktivitesi, spektrofotometre ile 366 nm dalga boyunda absorbans değişimi ölçülerek hesaplanır.

Kullanılan Çözeltiler

KP_i Tampon Çözeltisi: Derişimleri 0.25'er M olacak şekilde, KH_2PO_4'ten 3.40 g ve K_2HPO_4'ten 3.55 g ayrı ayrı beherlerde tartıldı ve bir miktar distile suda çözüldü. Ardından her iki çözeltinin de son hacmi iki farklı balon jojede distile suyla 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 çözeltileri pH değeri 7.0 olacak şekilde (4:6) oranında karıştırıldı. Derişimleri 2.5 mM olacak şekilde 9.3 mg EDTA ve 16.2 mg NaN_3 tartıldı ve hazırlanan KP_i tampon çözeltisinde çözüldü. Böylece deneyde kullanılacak KP_i tampon çözeltisi hazırlanmış oldu.

GSH Çözeltisi: Derişimi 10 mM olacak şekilde 3.07 mg GSH bir beher içerisinde tartıldı ve 1 mL distile suda çözüldü. Bu çözelti deneyden hemen önce ve taze olarak hazırlandı. +4 ℃'de muhafaza edildi.

NADPH+H^+ Çözeltisi: Derişimi 2.5 mM olacak şekilde, 2.1 mg NADPH+H^+ bir beher içerisinde tartıldı ve 1 mL distile suda çözüldü. Bu çözelti deneyden hemen önce ve taze olarak hazırlandı. +4 ℃'de muhafaza edildi.

GR Çözeltisi: Aktivitesi 6 U/mL olacak şekilde 13.3 µL GR enzimi, çok az miktarda KP_i tampon çözeltisinde çözüldü ve son hacmi 1 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti deneyden hemen önce hazırlandı. +4 ℃'de muhafaza edildi.

H_2O_2 Çözeltisi: Derişimi 12 mM olacak şekilde, %35'lik H_2O_2'den 5 µL alınıp son hacmi distile suyla 5 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti deneyden hemen önce ve taze olarak hazırlandı. Işıktan muhafaza edildi.

Deneyin Yapılışı: Beyin dokusundaki GPx aktivitesini tayin etmek amacıyla örnek ve kör tüpleri aşağıdaki tabloya göre hazırlandı.

Kör tüpüne, 0.6 mL KP_i tampon çözeltisi + 0.1 mL 10 mM GSH çözeltisi + 0.1 mM 2.5 mM NADPH+H^+ çözeltisi çözeltisi + 0.1 mL GR enzimi (6 U/mL) + 0.1 mL 12 mM H_2O_2 çözeltisi,

Örnek tüpüne, 0.4 mL KP_i tampon çözeltisi + 0.2 mL doku homojenatı +0.1 mL 10 mM GSH çözeltisi + 0.1 mM 2.5 mM $NADPH+H^+$ çözeltisi çözeltisi + 0.1 mL GR Enzimi (6 U/mL) + 0.1 mL 12 mM H_2O_2 çözeltisi ilave edildi.

Substrat ilave edildikten hemen sonra reaksiyon başlatıldı. Örnekteki absorbans azalması köre karşı 366 nm dalga boyunda 5 dakika boyunca dakikada bir ölçüldü. Bu deneyde $NADPH+H^+$ için belirlenen ekstinksiyon katsayısı 6.22 mM^{-1} cm^{-1} olarak kullanıldı ve GPx aktivitesi aşağıdaki formül ile hesaplandı.

GPx Spesifik Aktivitesi (U/g protein) = $[((\Delta OD/dk) /6.022) x10^3 x (V_T/V_Ö) x f] / P$

ΔOD= 0. ve 5. dk arasındaki absorbans farkı; V_T= Toplam çözelti hacmi; $V_Ö$ = Örnek hacmi; f= Seyreltme miktarı; P = Doku örneğindeki total protein miktarı (mg/mL)

3.16. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA GLUTATYON REDÜKTAZ (GR) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Beyin dokularındaki GR enzim aktivitelerini belirlemek için Beutler (1971) yöntemi kullanıldı. Bu yöntemin temeli, GR enziminin katalitik etkisi ile GSSG'nin indirgenirken $NADPH+H^+$'nın yükseltgenmesine dayanmaktadır. Bu reaksiyonun bir sonucu olarak, $NADPH+H^+$'nın yükseltgenen miktarı, örnekteki absorbans değerinin azalmasıyla takip edilir.

Kullanılan Çözeltiler

HCl Çözeltisi: Derişimi 100 mM olacak şekilde, 414 µL %37'lik HCl çözeltisi içerisinde az miktarda distile su bulunan balon jojeye ilave edildi ve son hacmi distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Tris-HCl Tampon Çözeltisi: Derişimi 100 mM olacak şekilde, 1.2114 g Tris bir beher içerisinde tartıldı ve az miktarda distile suda çözüldükten sonra son hacmi balon jojede 50 mL'ye distile su ile tamamlandı. Hazırlanan bu Tris çözeltisinin 50 mL'sine, 29.2 mL 100 mM HCl çözeltisi ilave edildi. pH değeri 8.0'a ayarlandıktan sonra son hacmi balon jojede distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Böylece 50 mM Tris-HCl pH: 8.0 tamponu elde edildi. Daha sonra 37.2 mg EDTA'nın bu tamponda çözülmesi ile deneyde kullanılacak Tris-HCl tamponu hazırlanmış oldu.

$NADPH+H^+$ Çözeltisi: Derişimi 2 mM olacak şekilde, 1.66 mg $NADPH+H^+$ bir beher içerisinde tartıldı ve 1 mL Tris-HCl tamponunda çözüldü. Çözelti deneyden hemen önce taze hazırlandı. +4 ℃'de muhafaza edildi.

GSSG Çözeltisi: Derişimi 20 mM olacak şekilde 12.3 mg GSSG bir beher içerisinde tartıldı ve 1 mL Tris-HCl tamponunda çözüldü. Çözelti deneyden hemen önce taze hazırlandı. +4 ℃'de muhafaza edildi.

Deneyin Yapılışı: Beyin homojenatlarındaki GR aktivitesini tayin etmek amacıyla örnek ve kör tüpleri aşağıdaki tabloya göre hazırlandı.

Kör tüpüne, 900 µL Tris-HCl tampon çözeltisi + 50 µL 2 mM $NADPH+H^+$ çözeltisi + 50 µL 20 mM GSSG çözeltisi,

Örnek tüpüne, 870 µL Tris-HCl tampon çözeltisi + 50 µL 2 mM $NADPH+H^+$ çözeltisi + 50 µL 20 mM GSSG çözeltisi + 30 µL doku homojenatı ilave edildi.

Doku homojenatının ilave edilmesiyle birlikte reaksiyon başlatıldı. Örnek absorbansındaki azalma, 5 dakika boyunca dakikada bir 340 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü. Bu deneyde ekstinksiyon katsayısı $NADPH+H^+$ için 6.22 mM^{-1} cm^{-1} olarak alındı ve GR aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplandı.

GR Spesifik Aktivitesi (U/g protein) = $[((\Delta OD/dk)/6.022) \times (V_T/V_Ö) \times f] / P$

ΔOD= 0. ve 5. dk arasındaki absorbans farkı; V_T= Toplam çözelti hacmi; $V_Ö$ = Örnek hacmi, f= Seyreltme miktarı; P = Doku örneğindeki total protein miktarı (mg/mL)

3.17. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA GLUTATYON-S-TRANSFERAZ (GST) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Beyin dokusunda GST enzim aktivitesi tayininde Habig ve Jakoby (1981) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı. Bu yöntemin prensibi, GST katalizi altında GSH'ın CDNB ile konjugasyonu sonucu oluşan ürünün absorbansının 340 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır.

Kullanılan Çözeltiler

KP_i Tampon Çözeltisi: Derişimleri 20'şer mM olacak şekilde 2.7218 g KH_2PO_4 ve 3.4836 g K_2HPO_4 ayrı ayrı beherlerde tartılıp, bir miktar distile suda çözüldü. Ardından her iki çözeltinin

de son hacmi farklı balon jojelerde 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 çözeltileri pH değeri 6.6 olacak şekilde (6:4) oranında karıştırıldı.

GSH Çözeltisi: Derişimi 60 mM olacak şekilde 18.44 mg GSH bir beher içerisinde tartılıp, 1 mL distile suda çözüldü. Bu çözelti deneyden hemen önce ve taze olarak hazırlandı. +4 ℃'de muhafaza edildi.

CDNB Çözeltisi: Derişimi 60 mM olacak şekilde 12.1 mg CDNB bir beher içerisinde tartılıp, 1 mL mutlak etil alkol ile çözüldü. Çözelti deneyden önce ve taze olarak hazırlandı.

Deneyin yapılışı: Beyin homojenatlarındaki GST aktivitesini tayin etmek amacıyla örnek ve kör tüpleri aşağıdabelirtildiği gibi hazırlandı.

Kör tüpüne, 2 mL KP_i Tampon çözeltisi + 0.05 mL 60 mM GSH çözeltisi + 0.05 mL 60 mM CDNB çözeltisi + 0.9 mL distile su,

Örnek tüpüne, 1.5 mL KP_i tampon çözeltisi + 0.5 mL doku homojenatı + 0.05 mL 60 mM GSH çözeltisi + 0.05 mL 60 mM CDNB çözeltisi + 0.9 mL distile su ilave edildi.

Distile su ilave edildikten hemen sonra örnek absorbansındaki artış köre karşı 340 nm dalga boyunda 25ºC'de ve 3 dakika boyunca dakikada bir ölçüldü. Bu deneyde GSH-CDNB konjugatı için belirlenen ekstinksiyon katsayısı 9.6 $mM^{-1}cm^{-1}$ olarak alındı ve GST aktivitesi aşağıdaki formül ile hesaplandı.

GST Spesifik Aktivitesi (U/g protein) = $[((\Delta OD/dk) / 9.6) \times (V_T/V_Ö) \times f] / P$

ΔOD= 3. ve 0. dk arasındaki absorbans farkı; V_T= Toplam çözelti hacmi; $V_Ö$ = Örnek hacmi; f= Seyreltme miktarı; P = Doku örneğindeki total protein miktarı (mg/mL)

3.18. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA LAKTAT DEHİDROJENAZ (LDH) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Beyin dokusundaki LDH enzim aktivitesinin belirlenmesinde Wroblewski (1957) metodu kullanıldı. Bu yöntemde LDH enzimi NAD^+ varlığında (substrat tamponunda) laktik asidin piruvata dönüşümünü katalize eder.

Kullanılan Çözeltiler

NaOH Çözeltisi: Derişimi 1 M olacak şekilde 2 g NaOH bir beher içerisinde tartılıp, az miktarda distile suda çözüldü. Son hacmi distile su ile balon jojede 50 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti substrat çözeltisinin pH değerininin ayarlanmasında kullanıldı.

Substrat Tamponu: Bir beher içerisinde 0.62 g sodyum pirofosfat tartılıp, çok az miktarda sıcak distile suda çözüldü. Üzerine 0.2 mL DL-laktik asit çözeltisi ilave edildi. Daha sonra bu karışıma ayrı bir beherde tartılan 0.097 g NAD^+ ilave edildi. 1 M NaOH çözeltisi kullanılarak hazırlanan bu çözeltinin pH değeri 8.8'e getirildi ve son hacmi 28 mL'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı: Beyin homojenatlarındaki LDH aktivitesini tayin etmek amacıyla örnek ve kör tüpleri aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı.

Kör tüpüne, 2.8 mL substrat tamponu + 0.2 mL doku homojenatı,

Örnek tüpüne, 2.8 mL substrat tamponu + 0.2 mL distile su ilave edildi.

Tüpler karıştıldı ve 30 sn süre ile 2 dk boyunca 340 nm'de absorbans artışı spektrofotometrede kaydedildi. Beyin dokusundaki LDH aktivitesini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı.

LDH Spesifik Aktivitesi (U/mg protein) = [(ΔOD/dk) x 5000)] / P

ΔOD= 2. ve 0. dk arasındaki absorbans farkı; P = Doku örneğindeki total protein miktarı (mg/mL)

3.19. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA MİYELOPEROKSİDAZ (MPO) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Wei ve Frenkel (1991) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak beyin dokusundaki MPO enziminin katalitik aktivitesi tayin edildi. Bu yöntem, MPO enziminin katalitik etkisiyle 4-AAP/fenol içeren reaksiyon ortamında H_2O_2 molekülünün bozunması esasına dayanmaktadır.

Kullanılan Çözeltiler:

Fenol Çözeltisi: Derişimi %2 olacak şekilde, 1 g fenol bir beher içerisinde tartılıp, az miktarda distile suda çözüldü ve son hacmi balon jojede 50 mL'ye tamamlandı.

Substrat Çözeltisi: Derişimi 25 mM olacak şekilde, 0.2541 g 4-AAP bir beher içerisinde tartılıp, çok az %2'lik fenol içerisinde çözüldü ve son hacmi balon jojede aynı çözeltiyle 50 mL'ye tamamlandı.

H_2O_2 Çözeltisi: Derişimi 1.7 mM olacak şekilde, %35'lik H_2O_2'den 36 µL alınıp, son hacmi balon jojede distile suyla 250 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti deneyden hemen önce ve taze olarak hazırlandı.

Deneyin yapılışı: Beyin dokusunda MPO aktivitesini tayin etmek amacıyla kör ve örnek tüpleri aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Kör tüpüne, 1.3 mL substrat çözeltisi + 1.5 mL 1.7 mM H_2O_2 ilave edildi. Tüp karıştırıldı 3-4 dakika bekletildi. Bazal hıza erişildikten sonra üzerine 0.2 mL distile su ilave edildi.

Örnek tüpüne, 1.3 mL substrat çözeltisi + 1.5 mL 1.7 mM H_2O_2 ilave edildi. Tüp karıştırıldı 3-4 dakika bekletildi. Bazal hıza erişildikten sonra üzerine 0.2 mL doku homojenatı ilave edildi.

Örnek tüpündeki absorbans artışı, 510 nm dalga boyunda, 5 dakika boyunca dakikada bir spektrofotometrede ölçüldü. Beyin dokusundaki MPO aktivitesini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı.

MPO Aktivitesi (U/g doku) = [ΔOD / dk] / g doku

ΔOD = 5. ve 0. dk arasındaki absorbans farkı

3.20. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA KSANTİN OKSİDAZ (XO) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Beyin dokusundaki ksantin oksidaz (XO) aktivitesi, Corte ve Stirpe (1968) tarafından geliştirilen yönteme göre ölçüldü. XO enzimi, ksantinin ürik aside dönüşümünü katalize eden bir enzimdir. Reaksiyon sonucu oluşan ürik asidin absorbansı 286 nm'de ölçülür. Ölçülen bu değer XO aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Kullanılan Çözeltiler:

Fosfat Tamponu: Derişimleri 30'ar mM olacak şekilde, 0.6804 g KH_2PO_4 ve 0.7098 g Na_2HPO_4 ayrı ayrı beherlere tartıldı. Bu maddeler, çok az distile suda çözüldü ve son hacimleri farklı balon jojelerde 100'er mL'ye tamamlandı. KH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 çözeltileri pH değeri 7.4 olacak şekilde (2:8) oranında karıştırıldı.

EDTA Çözeltisi: Derişimi 3 mM olacak şekilde, 5.5 mg EDTA bir beher içerisinde tartıldı, az miktarda distile su ile çözüldü ve son hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

Ksantin Çözeltisi: Derişimi 2 mM olacak şekilde, 1.52 mg ksantin bir beher içerisinde tartıldı, çok az miktarda 50 mM fosfat tamponunda süspanse edildi ve 50 mM fosfat tamponuyla son hacmi 5 mL'ye tamamlandı. Sonikatörde en az 5 dakika bekletildi.

Deneyin yapılışı: Beyin dokusunda XO aktivitesini tayin etmek amacıyla kör ve örnek tüpleri aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Kör tüpüne, 880 µL fosfat tampon çözeltisi + 33 µL 3 mM EDTA çözeltisi + 33 µL 2 mM ksantin çözeltisi,

Deney tüpüne, 10 µL doku homojenatı + 880 µL fosfat tampon çözeltisi + 33 µL 3 mM EDTA çözeltisi + 33 µL 2 mM ksantin çözeltisi ilave edildi.

Tüplerin ilk absorbans değerleri 0. dakikada 286 nm'de köre karşı spektrofotometrik olarak ölçüldü. Daha sonra 10 dakika boyunca 24 ºC'de su banyosunda inkübe edildi ve 286 nm'de köre karşı tekrar absorbans ölçümü yapıldı. Beyin dokusunda XO aktivitesi tayini aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

XO Spesifik Aktivitesi (U/mg protein) = [(ΔOD / dk) / P]

ΔOD = 0. ve 10. dk arasındaki absorbans farkı; P = Doku örneğindeki total protein miktarı (mg/mL)

3.21. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA ASETİLKOLİNESTERAZ (AChE) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Bu yöntemin presibi, asetiltiyokolinin (AChE) aktivitesini belirlemek için asetilkolinin AChE tarafından tiyokolin ve asetata hidrolizine dayanmaktadır. AChE aktivitesi, 412 nm dalga boyunda tiyokolin ve DTNB'nin reaksiyonuyla üretilen 5-tiyo-2-nitrobenzoik asidin verdiği sarı rengin absorbansı spektrofotometrik olarak ölçülerek belirlenir (Ellman ve diğ. 1961).

Kullanılan Çözeltiler:

Fosfat Tamponu: Derişimleri 100'er mM olacak şekilde, 1.36 g KH_2PO_4 ve 1.42 g Na_2HPO_4 ayrı ayrı beherlerde tartılıp, bir miktar distile suda çözüldü. Ardından her iki çözeltinin de son hacmi ayrı ayrı balon jojelerde 100'er mL'ye tamamlandı. KH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 çözeltileri pH değeri 8.0 olacak şekilde (0.5:9.5) oranında karıştırıldı.

DTNB Çözeltisi: Derişimi 10 mM olacak şekilde 0.020 g DTNB bir beher içerisinde tartıldı ve hazırlanan fosfat tampon çözeltisinde çözüldü ve son hacmi 5 mL'ye tamamlandı.

Etopropazin: Derişimi 8.52 mM olacak şekilde 0.015 g etopropazin bir beher içerisinde tartıldı ve çok az distile suda çözüldükten sonra son hacmi 5 mL'ye tamamlandı.

Asetiltiyokoliniyodür: Derişimi 15 mM olacak şekilde 0.0434 g asetiltiyokoliniyodür bir beher içerisinde tartıldı ve çok az distile suda çözüldükten sonra son hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı: Beyin dokusunda AChE aktivitesini tayin etmek amacıyla kör ve örnek tüpleri aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Kör tüpüne, 2700 µL fosfat tampon çözeltisi + 200 µL doku homojenatı + 100 µL 100 mM DTNB ilave edildi. İyice çalkalandı, ardından 30 °C'de 5 dakika inkübe edildi.

Örnek tüpüne, 2550 µL fosfat tampon çözeltisi + 200 µL doku homojenatı + 100 µL 100 mM DTNB + 50 µL 8.52 mM etopropazin ilave edildi. İyice çalkalandı, ardından 30 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Tüpün içerisine 100 µL 15 mM asetiltiyokoliniyodür ilave edildi.

Örnek tüplerinin absorbans değerleri 5 dakika süre ile dakikada bir 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede köre karşı ölçüldü. AChE aktivitesini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı.

AChE Spesifik Aktivitesi (U/mg protein) = [(ΔOD/dk) x (V_T/$V_Ö$) x 13.6] / P

ΔOD = 0. ve 5. dakikadaki absorbans farkı; V_T= Toplam çözelti hacmi; $V_Ö$ = Örnek hacmi;

f= Seyreltme miktarı; P = Doku örneğindeki total protein miktarı (mg/mL)

3.22. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA ARİL ESTERAZ (ARE) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Gan ve diğ. (1991) tarafından geliştirilen bu yöntemde, beyin dokusundaki ARE aktivitesini belirlemek için substrat olarak kullanılan fenil asetatın hidrolizi ile oluşan fenol miktarına ait absorbans değeri 270 nm dalga boyunda ölçülür.

Kullanılan Çözeltiler

HCI Çözeltisi: Derişimi 40 mM olacak şekilde, 332 µL %37'lik HCl çözeltisi, içerisinde az miktarda distile su bulunan balon jojeye ilave edildi ve son hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Tris-HCl Tampon Çözeltisi: Derişimi 40 mM olacak şekilde, 0.2423 g Tris bir beher içerisinde tartıldı ve az miktarda distile suda çözüldükten sonra son hacmi balon jojede 50 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan bu Tris çözeltisinin 25 mL'sine 14.5 mL 40 mM HCl çözeltisi ilave edildi. pH değeri 8.0'a ayarlandıktan sonra son hacmi balon jojede distile su ile 50 mL'ye tamamlandı. Böylece deneyde kullanılacak Tris-HCl tamponu hazırlanmış oldu.

Çalışma Ayıracı: Derişimi 0.9 mM olacak şekilde 5 mg $CaCI_2$ bir beher içerisinde tartıldı ve az miktarda Tris-HCl tamponunda çözüldü. Üzerine, derişimi 1 mM olacak şekilde 6.3 µL fenil asetat ilave edildi ve çözeltinin son hacmi aynı tampon çözelti ile 50 mL'ye tamamlandı. Böylece içerisinde 0.9 mM $CaCI_2$ ve 1 mM fenil asetat içeren çalışma ayıracı çözeltisi hazırlanmış olur. Bu çözelti deney günü tazel olarak hazırlandı ve kullanılmadan önce 30 dk çalkalandı.

Deneyin Yapılışı: Beyin dokusunda ARE aktivitesini tayin etmek amacıyla kör ve örnek tüpleri aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Kör tüpüne, 1.5 mL çalışma ayıracı + 10 µL distile su,

Örnek tüpüne, 1.5 mL çalışma ayıracı + 10 µL doku homojenatı ilave edildi.

Örnek ilavesi ile reaksiyon başlatıldı. Örnekteki absorbans artışı, köre karşı 25 °C'de 2 dakika boyunca 270 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü. Bu deneyde fenil asetat için ekstinksiyon katsayısı 1.31 $M^{-1}cm^{-1}$ olarak alındı ve beyin dokularındaki ARE aktivitesi aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

ARE Spesifik Aktivitesi (U/g protein) = [((ΔOD/dk) / 1.31) x ($V_T/V_Ö$) x 1000 x f] / P

ΔOD = 2. ve 0. dakikadaki absorbans farkı; V_T= Toplam çözelti hacmi; $V_Ö$ = Örnek hacmi;

f= Seyreltme miktarı; P = Doku örneğindeki total protein miktarı (g/L)

3.23. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA KARBONİK ANHİDRAZ (CA) ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Verpoorte ve diğ. (1967) tarafından geliştirilen bu yöntemin esası, CA enziminin esteraz aktivitesine dayanmaktadır. CA enzimi, substrat olarak kullanılan PNFA'yı ortamın pH değerine bağlı olarak *p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolata hidrolize eder ve oluşan ürün (*p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolat) 349 nm dalga boyunda absorpsiyon vermektedir. Bu nedenle, fenol grubundaki H^+ iyonunun ayrışıp ayrışmadığının ölçüm üzerinde fazla bir etkisi yoktur.

Kullanılan Çözeltiler:

H_2SO_4 Çözeltisi Derişimi 0.5 M olacak şekilde, 679 µL derişik H_2SO_4, içerisinde az miktarda distile su bulunan balon jojeye dikkatli bir şekilde ilave edildi ve çözeltinin son hacmi distile su ile balon jojede 25 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan bu çözelti, 10 kat seyreltildikten sonra, Tris-SO_4 tampon çözeltisinin hazırlanmasında kullanıldı.

Tris-SO_4 Tampon Çözeltisi: Derişimi 100 mM olacak şekilde, 1.2114 g Tris bir beher içerisinde tartıldı ve az miktarda distile suda çözüldükten sonra son hacmi balon jojede 100 mL'ye distile su ile tamamlandı. Bu Tris çözeltisinin üzerine 50 mM H_2SO_4 çözeltisi yavaş yavaş ilave edilerek pH değeri 7.4'e ayarlandı ve tampon çözeltinin son hacmi distile su ile 200 mL'ye tamamlandı. Böylece deneyde kullanılacak Tris-SO_4 tamponu elde edildi.

PNFA Substratı: Derişimi 3 mM olacak şekilde, 27.2 mg PNFA bir beher içerisinde tartıldı ve 1 mL asetonda çözüldükten sonra son hacmi distile su ile balon jojede 50 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti deneyden hemen önce taze olarak hazırlandı ve deney sırasında buzun içerisinde bekletildi.

Deneyin Yapılışı: Beyin dokusunda CA aktivitesini tayin etmek amacıyla kör ve örnek tüpleri aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Kör tüpüne, 1.5 mL Tris-SO_4 tampon çözeltisi (pH: 7.4) + 1.5 mL 3 mM PNFA substratı,

Örnek tüpüne, 1.4 mL Tris- SO_4 tampon çözeltisi (pH: 7.4) + 0.1 mL doku homojenatı + 1.5 mL 3 mM PNFA substratı ilave edildi.

Substrat ilavesiyle reaksiyon başlatıldı. Örnekteki absorbans artışı, köre karşı 5 dakika boyunca dakikada bir 348 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü. Beyin dokularındaki CA aktivitesi aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

CA Spesifik Aktivitesi (U/mg protein) = $[((\Delta OD/dk) \times 1000) \times (V_T/V_Ö)] / P$

ΔOD = 5. ve 0. dakikadaki absorbans farkı; V_T= Toplam çözelti hacmi; $V_Ö$ = Örnek hacmi;

P = Doku örneğindeki total protein miktarı (mg/mL)

3.24. BEYİN DOKU HOMOJENATLARINDA TOTAL PROTEİN MİKTARI TAYİNİ

Beyin dokularındaki total protein miktarı Lowry metoduna göre tayin edildi (Lowry ve diğ. 1951). Bu yöntemin temeli, proteinlerin yapısındaki tirozin ve triptofan gibi aromatik amino

asitlerin alkali koşullar altında bakır (II) iyonları ile oluşturduğu kompleksin Folin reaktifini (fosfomolibdotungstik asidi) indirgemesi sonucunda mavi renkli ürün oluşturmasına dayanmaktadır. Mavi rengin şiddeti, örnekteki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Kullanılan Çözeltiler:

NaOH Çözeltisi: Derişimi 0.1 N olacak şekilde, 1 g NaOH bir beher içerisinde tartıldı ve az miktarda distile suda çözüldükten sonra son hacmi balon jojede 250 mL'ye distile su ile tamamlandı. Bu çözelti A reaktifinin hazırlanması için kullanıldı.

A Reaktifi: Derişimi %2 olacak şekilde, 5 g Na_2CO_3 bir beher içerisinde tartıldı ve hazırlanan 0.1 N NaOH çözeltisi ile çözüldü. Bu reaktifin son hacmi aynı çözelti ile balon jojede 250 mL'ye tamamlandı.

Dipotasyum Tartarat Çözeltisi: Derişimi %1 olacak şekilde, 0.1 g dipotasyum tartarat bir beher içerisinde tartıldı ve az miktarda distile suda çözüldükten sonra hacmi 10 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti B reaktifinin hazırlanması için kullanıldı.

B Reaktifi: Derişimi %0.5 olacak şekilde, 10 mg $CuSO_4$ bir beher içerisinde tartıldı ve az miktarda % 1 dipotasyum tartarat içerisinde çözüldükten sonra hacmi 2 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti deneyden hemen önce taze olarak hazırlandı.

C Reaktifi: 50 mL A reaktifi ve 1mL B reaktifi karıştırılarak hazırlandı. Bu reaktif deneyden hemen önce taze olarak hazırlandı.

E Reaktifi: Yuvarlak dipli bir balon içerisine 25 g sodyum tungstat, 6.25 g sodyum molibdat, 175 mL distile su, 12.5 mL %85 fosforik asit ve 25 mL derişik HCl ilave edildi. Geri soğutucu altında 10 saat reflüks edildi. Daha sonra balona sırasıyla 37.5 g $LiSO_4$ ve12.5 mL distile su ilave edildi. Ardından içerisine 1-2 damla brom damlatıldı. Bromun fazlası uçana kadar reflüks işlemine devam edildi. Soğutulduktan sonra bir balon jojeye alındı ve son hacmi distile su ile 250 mL'ye tamamlandı (Bu şekilde hazırlanan çözelti stok Folin çözeltisidir. Deneyde kullanılacağı zaman distile su ile 1:2 oranında seyreltildi).

NaCl Çözeltisi: Derişimi %0.9 olacak şekilde, 0.9 g NaCl bir beher içerisinde tartıldı ve az miktarda distile su ile çözüldükten sonra son hacmi balon jojede distile su ile 100 mL'ye tamamalandı.

Protein Stok Standart Çözeltisi: Derişimi %10 mg olacak şekilde, 10 mg albumin bir beher içerisinde tartıldı ve %0.9 NaCl çözeltisinde çözüldü, son hacmi aynı çözelti ile 10 mL'ye tamamlandı.

Protein Çalışma Standart Çözeltisi: %100 mg albümin içeren stok çözeltiden %2.5 mg, %5 mg, %7.5 mg ve %10 mg olacak şekilde %0.9 NaCl ile seyreltilerek çalışma standart çözeltileri hazırlandı. Çalışma standart çözeltileri ile dokudaki total protein miktarını hesaplayabilmek için gerekli olan % mg total protein standart grafiği çizildi. Deneyler üçer defa tekrarlandı.

Deneyin Yapılışı: Beyin dokusunda total protein miktar tayini yapabilmek için kör, standart ve örnek tüpleri aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Kör tüpüne, 0.5 mL %0.9 NaCl çözeltisi + 2.5 mL C reaktifi ilave edildi.

Standart tüpüne, 0.5 mL standart çözelti + 2.5 mL C reaktifi ilave edildi.

Örnek tüpüne, 0.5 mL doku homojenatı + 2.5 mL C reaktifi ilave edildi.

Bütün tüpler karıştırılıp oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Ardından tüplerin içerisine 0.25'er mL E reaktifi ilave edildi. Karıştırılıp oda sıcaklığında 30 dakika daha bekletildi.

İnkübasyon süresinin ardından örnekleri ve standartları absorban değerleri 500 nm dalga boyunda spektrofoterede köre karşı ölçüldü. Örnekteki total protein miktarı, standart grafiği yardımıyla %mg cinsinden hesaplandı.

3.25. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

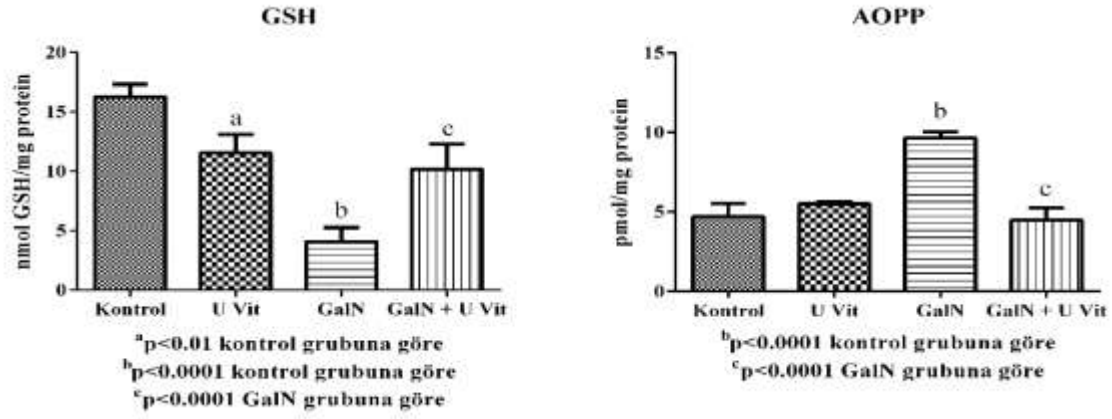
Yapılan deneylerden elde edilen bulguların istatistiksel analizi GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, California. ABD) paket programı aracılığıyla yapıldı. Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak ifade edildi. Sonuçlar, eşleşmemiş t-testi (unpaired t-test) ve tek yönlü varyans analizinin (ANOVA) ardından Tukey çoklu karşılaştırma testleri ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırı $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmada GalN ile oluşturulan beyin hasarına U vit.'nin etkileri araştırıldı. Sıçanların beyin dokularında incelenen biyokimyasal parametrelerin sonuçları aşağıda gösterildiği gibidir.

Kontrol ve deney gruplarına ait GSH ve AOPP seviyeleri Şekil 4.1'de verildi.

Elde edilen verilere göre, tüm grupların beyin GSH ve AOPP seviyeleri birbiri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edildi (P_{ANOVA}=0.0001) (Şekil 4.1). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hem U vit. verilen grubun hem de GalN enjekte edilen grubun GSH seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldı ($p<0.01$ ve $p<0.0001$). Buna karşılık, kontrol grubu ile mukayese edildiğinde GalN verilen sıçanların AOPP seviyeleri ise anlamlı bir şekilde yükseldi ($p<0.0001$). GalN grubuna U vit. verilmesi, GalN grubuna ait GSH ve AOPP seviyelerindeki değişmeleri anlamlı bir şekilde tersine çevirdi ($p<0.0001$) (Şekil 4.1).

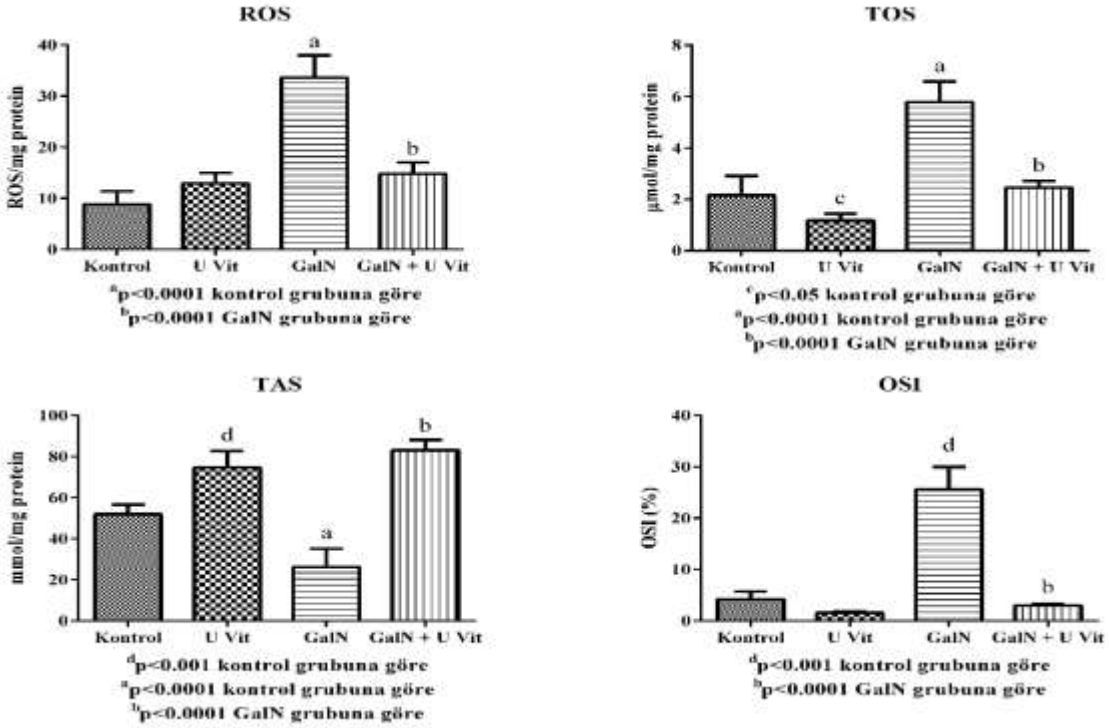


Şekil 4.1: Tüm gruplara ait GSH ve AOPP seviyeleri.

Deney ve kontrol grubu sıçanlarının beyin dokusuna ait ROS, TOS, TAS seviyeleri ve OSİ değerleri Şekil 4.2'de verildi.

Grafikteki verilere göre tüm gruplara ait beyin dokusu homojenatlarının ROS, TOS, TAS seviyeleri ve OSİ değerleri birbiri ile kıyaslandığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edildi (P_{ANOVA}=0.0001) (Şekil 4.2). Kontrol grubu ile kıyaslandığında,

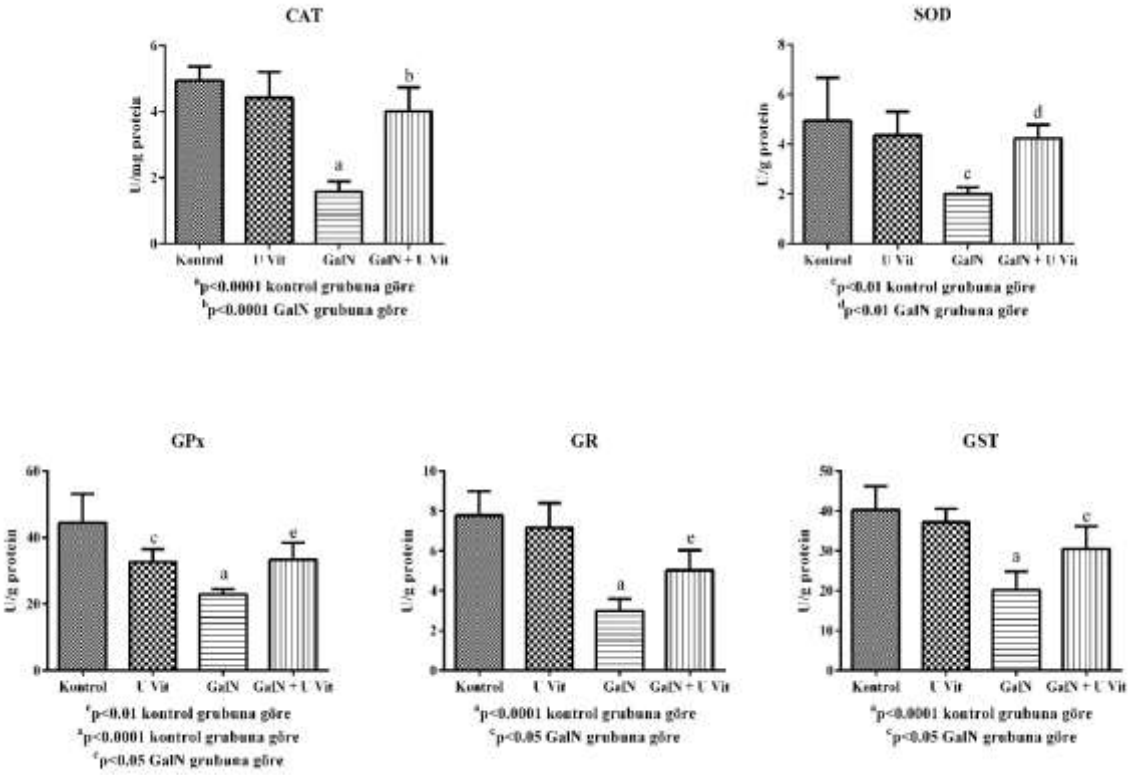
GalN verilen grubun ROS seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttı ($p<0.0001$). Buna karşılık, U vit. verilen gruptaki TOS seviyeleri anlamlı olarak azalırken ($p<0.05$), TAS seviyeleri ise anlamlı şekilde arttı ($p<0.001$). GalN verilen gruptaki TOS seviyeleri ve OSİ değerlerinin ise anlamlı olarak yükseldiği ($p<0.0001$ ve $p<0.001$), TAS seviyelerinin ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi ($p<0.0001$) (Şekil 4.2). U vit. uygulanmasının sonucunda, GalN grubundaki artmış ROS, TOS seviyelerinin ve OSİ değerlerinin anlamlı bir şekilde azaldığı ($p<0.0001$), TAS seviyelerinin ise anlamlı bir şekilde arttığı görüldü ($p<0.0001$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Tüm gruplara ait ROS, TOS, TAS seviyeleri ve OSİ değerleri.

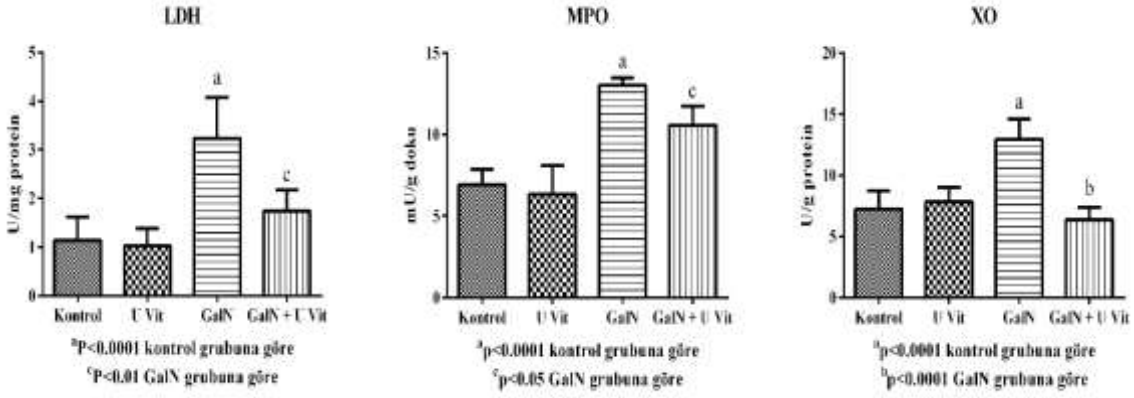
Tüm gruplardaki sıçanların beyin dokularına ait CAT, SOD, GPx, GR ve GST aktivite değerleri Şekil 4.3'te gösterildi. Grafikteki verilere göre, kontrol ve deney gruplarının beyin dokularında CAT, GPx, GR ve GST aktiviteleri kendi aralarında birbiri ile kıyaslandığında, dört grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlendi ($P_{ANOVA}=0.0001$). Bununla birlikte, beyin dokusundaki SOD aktivitelerinin de kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa sahip olduğu tespit edildi ($P_{ANOVA}=0.0011$) (Şekil 4.3). GalN verilen grup, kontrol grubu ile kıyaslandığında, CAT, SOD, GPx, GR ve GST aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş tespit edildi ($p<0.0001$ ve $p<0.01$). U vit. verilen grup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise GPx aktivitesinde anlamlı bir azalma görüldü ($p<0.01$). Tam tersine,

GalN grubuna U vit. verilmesi ile birlikte, GalN grubundaki azalmış enzim aktivitelerinde anlamlı derecede artış olduğu belirlendi ($p<0.0001$, $p<0.01$ ve $p<0.05$) (Şekil 4.3).



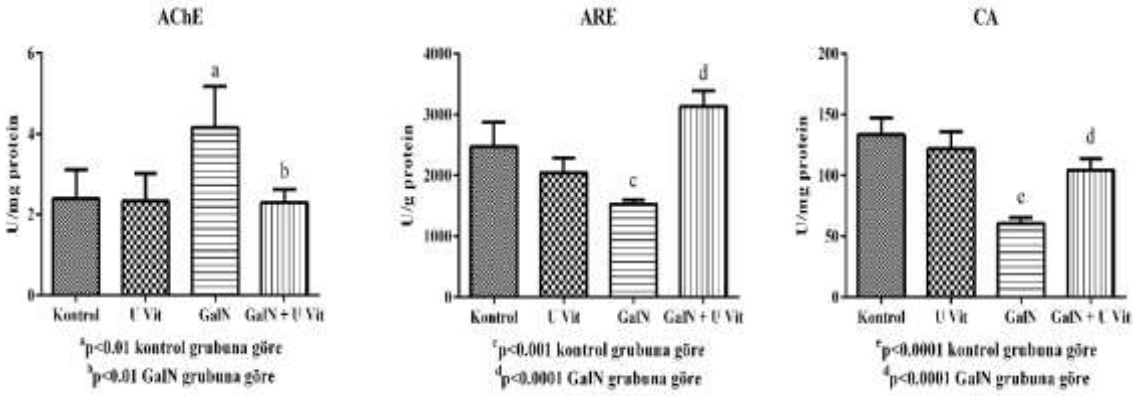
Şekil 4.3: Tüm gruplara ait CAT, SOD, GPx, GR ve GST aktiviteleri.

Deney ve kontrol grubu sıçanlarının beyin dokularına ait LDH, MPO ve XO aktivite değerleri Şekil 4.4'te verildi. Hesaplanan değerlere göre, dört grubun beyin LDH, MPO ve XO aktiviteleri kendi aralarında birbiri ile kıyaslandığında, kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılıklar olduğu bulundu ($P_{ANOVA}=0.0001$) (Şekil 4.4). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, GalN enjekte edilen grubun LDH, MPO ve XO aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı bulundu ($p<0.0001$). Buna karşılık, deney grubuna U vit. verilmesi ile birlikte, yükselmiş LDH, MPO ve XO aktivitelerinin de kayda değer bir derecede düşmüş olduğu tespit edildi ($p<0.01$, $p<0.05$ ve $p<0.0001$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Tüm gruplara ait LDH, MPO ve XO aktiviteleri.

Deney ve kontrol grubu sıçanlarının beyin dokusularına ait AChE, ARE ve CA aktivite değerleri Şekil 4.5'te verildi. Hesaplanan değerlere göre, dört grubun beyin dokularına ait AChE aktiviteleri kendi aralarında birbiri ile kıyaslandığında ise dört grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu tespit edildi (P_{ANOVA}=0.0011) (Şekil 4.5). Beyin dokusu ARE ve CA aktiviteleri kendi aralarında birbiri ile kıyaslandığında, kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılıklar olduğu bulundu (P_{ANOVA}=0.0001) (Şekil 4.5). GalN enjekte edilen grubun AChE aktiviteleri, kontrol grubu ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p<0.01$). Tam tersine, GalN verilen sıçanların ARE ve CA aktivitelerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu bulundu ($p<0.001$ ve $p<0.0001$). Ancak, U vit. verilmesinin ardından GalN grubuna ait yükselmiş AChE aktivitelerinin anlamlı şekilde azaldığı ($p<0.01$), azalmış ARE ile CA aktivitelerinin ise kayda değer bir derecede arttığı bulundu ($p<0.0001$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Tüm gruplara ait AChE, ARE ve CA aktiviteleri.

5. TARTIŞMA

Hepatotoksik bir molekül olan GalN sıçanlarda karaciğer hasarı oluşturmak için kullanılan bir heksozamin türevidir. GalN, karaciğerin hem morfolojik hem de fonksiyonel özellikleri bakımından tıpkı insanlarda olduğu gibi ciddi ve akut karaciğer hastalığına (viral hepatite) benzer klinik tablo ortaya çıkarmaktadır (Ansari ve diğ. 2021; Singh ve Sharma, 2022). Sıçanlara tek doz olarak intraperitonal yoldan enjekte edilen GalN, hepatositlerdeki urasil içeren nükleozidlerin tüketilmesine, ardından RNA sentezinin inhibisyonuna ve dolayısıyla protein sentezinin de kesintiye uğramasına neden olur. Ayrıca, serbest radikal oluşumunu tetikleyerek oksidatif ve nitrozatif strese, antioksidan enzimlerin aktivitelerinde azalmaya, proenflamatuvar sitokinlerin [interlökin-1β (IL-1β), IL-6 ve TNF-α vb.] uyarılması sonucunda hepatoselüler nekrozun gelişmesine katkıda bulunur (Das ve diğ. 2012; Ganaii ve diğ. 2015; Park ve diğ. 2020). Toksisite mekanizması üzerine yapılan çalışmalarda, karaciğer yağlanmasına; GalN'nin hücresel iyon pompalarında aktivite kaybına ve hücresel membran geçirgenliğinin artmasına neden olarak, enzim salınımına ve hücresel ölümden sorumlu olduğu düşünülen hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunda bir artışa yol açtığı ortaya çıkarılmıştır (Ahmad ve Tabassum, 2012; Simeonova ve diğ. 2014; Delgado-Montemayor ve diğ. 2015). GalN etkisi ile ortaya çıkan karaciğer fonksiyon bozukluğu 500'den fazla metabolik süreci etkileyebilir, detoksifikasyon sürecini tehlikeye atabilir ve daha sonra diğer ana organların zarar görmesine neden olabilir (Rouf ve diğ. 2021). Yapılan bir çalışmada, 2 gün süre ile 1100 mg/kg GalN enjeksiyonunun da akut karaciğer yetmezliğine ve hatta bunun sonucunda akut böbrek hasarına sebebiyet verdiği rapor edilmiştir (Saracyn ve diğ. 2012; Saracyn ve diğ. 2015). Diğer yandan, sıçanlara 3 gün süre ile 500 mg/kg olacak şekilde GalN verilmesi ile akut karaciğer yetmezliği ve ardından beyin hasarının oluştuğu bildirilmiştir (Tunali ve diğ. 2019). Son yapılan çalışmalardan birinde ise, 4 hafta süreyle haftada 3 kez 350 mg/kg'lık enjeksiyonunun, farelerde karaciğer hasarının ardından beyin dokusunu etkilediği, psiyatrik değişikliklere ve anksiyete durumunun ortaya çıkmasına neden olduğu gösterilmiştir (Yan ve diğ. 2021).

U vit., ilk olarak peptik ülserli hastalar üzerinde taze lahana suyu ekstresinin olası koruyucu etkilerinin araştırılması sırasında keşfedilmiştir (Cheney, 1949). Sonraki yıllarda, peptik ülserli 100 hastaya U vit. kaynağı olarak taze lahana suyu verilmesi ile yapılan klinik çalışmada, bu

hastaların 86'sında herhangi bir ilaç tedavisi almadan ve sık sık yemek yemeden ağrılarında azalma yaşadıkları rapor edilmiştir. Bu hastaların ayrıca hem mide hem de on iki parmak bağırsağı ülserlerinin de hızlı bir şekilde iyileştiği bildirilmiştir (Cheney, 1952; Cheney ve diğ. 1956).

Besinsel kaynağı başlıca çiğ lahana olan U vit.'nin diğer lahana türlerinin yapraklarında, bazı Citrus türlerinde ve yeşil sebzelerde de bulunduğu tespit edilmiştir (Sakamoto ve diğ. 1996). Bununla birlikte, sıçanlarda ve tavşanlarda diyetle indüklenen hiperlipidemi üzerine yapılan çalışmalarda, oral U vit. uygulanmasının hiperlipidemiyi belirgin şekilde normal seviyelere geri getirdiği; plazma toplam kolesterol, beta-lipoprotein ve fosfolipit seviyelerini de düşürücü etkiler gösterdiği; buna karşılık, plazma trigliseridleri üzerine ise önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Seri ve diğ. 1980). Benzer bir klinik çalışmada, hiperkolesterolemili 26 hastaya oral yoldan U vit. (1500 mg/gün) verilmesinin bu hastaların serum lipit profili değerlerinin önemli ölçüde düzelttiği rapor edilmiştir (Nakamura ve diğ. 1981). Bir başka araştırmada ise U vit.'nin 3T3-L1 pre-adiposit hücre soyları üzerine antiobezite etki gösterdiği bulunmuştur (Lee ve diğ. 2012). Tüysüz albino sıçanlara in vivo olarak uygulanan U vit.'nin hem yara iyileştirici hem de ultraviyole-B (UVB) ışınlarına karşı fotokoruyucu etkiler gösterdiği, in vitro testlerde ise keratinosit ve fibroblast hücrelerinde apoptozu önlediği ortaya çıkarılmış ve bu bileşiğin kozmetik alanında bir hammadde olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Kim ve diğ. 2015). U vit.'nin kimyasal olarak sentezlenen iki türevinin UV ışınlarına maruz bırakılan insan dermal fibroblast ve keratinosit hücre hatları üzerinde in vitro koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Kim ve diğ. 2018). Öte yandan, çeşitli kimyasal ajanlarla (amiodaron, valproik asit, GalN vb.) karaciğer, böbrek, akciğer ve lens gibi dokularda oluşturulan toksisite modellerinde U vit.'nin antioksidan (Sokmen ve diğ. 2012; Tunali ve diğ. 2015; Baş ve diğ. 2016), antienflamatuvar (Gezginci-Oktayoglu ve diğ. 2016), antiepileptik (Oktay ve diğ. 2018) ve antifibrotik (Oztay ve diğ. 2020) etkilere sahip olduğu belirtilmiştir. Abouzed ve diğ. (2021) tarafından yapılan çalışmada, dietil nitrozamin ve CCl_4 ile karaciğer kanseri oluşturulmuş Wistar sıçanlarda artmış olan TNF-α, IL-6 ve IL-10 seviyelerinin U vit. verilmesi sonucunda anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir.

Bu çalışma, klinik anlamda oldukça önemli olan biyokimyasal parametrelerin sıçanlarda GalN ile oluşturulan beyin hasarına karşı U vit.'nin koruyucu özelliğinin olup olmadığını belirlemek için planlandı.

Normal koşullarda, hücrelerin mitokondrilerindeki normal biyokimyasal reaksiyonlarda sürekli olarak ROS'lar üretilmektedir. Ancak, ROS'ların üretimi ve bunların ortadan kaldırılması da sıkı bir şekilde dengelenmiştir. Bu dengenin ROS lehine bozulması, oksidatif strese neden olmaktadır (Villanueva-Paz ve diğ. 2021).

İndirgenmiş GSH, memeli hücrelerinde yaygın olarak bulunan ve yapısında tiyol grubu olan düşük molekül ağırlıklı bir tripeptittir. GSH, organizmada ilk olarak γ-glutamilsistein sentetazın katalitik etkisi ile glutamat ve sisteinden γ-glutamilsistein oluşur ve ardından, substrat olarak γ-glutamilsistein ve glisini kullanan GSH sentetaz aktivitesi ile sentezlenir. GSH'nin sentezi ve metabolizması hücre içinde gerçekleşirken, katabolizması bir dizi enzimatik ve plazma zarı taşıma adımıyla hücre dışında gerçekleşir. Oldukça çeşitli biyokimyasal fonksiyonlara sahip olan GSH, hücrenin antioksidan savunması sistemi, DNA sentezinin ve onarımının düzenlenmesi, proteinlerdeki tiyol gruplarının korunması, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ve hücre sinyalizasyonu (gen ekspresyonu, apoptoz ve hücre çoğalmasının düzenlenmesi) dahil olmak üzere birçok hücresel reaksiyona katılır (Sies,1999; Gu ve diğ. 2015; Iskusnykh ve diğ. 2022). Organizmada GSH/yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) oranındaki artışın diyabetik komplikasyonlar, kanser, AIDS ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere birçok patolojik durumun ortak bir özelliği olduğu da gösterilmiştir. Ek olarak, GSH katabolizmasının, sinyal iletim basamaklarının redoksa duyarlı bileşenlerini modüle ettiği yakın zamanda bildirilmiştir (Aoyama, 2021). Çalışmamızda, GalN verilmesinin ardından sıçanların beyin dokularındaki GSH seviyelerinde kayda değer bir azalma tespit edilmiştir. Bunun nedeni, GalN'nin ROS üretimini arttırmasına ve beyin dokusundaki antioksidan ihtiyacına karşı verilen cevap olabilir. Bunun sonucunda GSH'taki -SH grubu, yüksek ROS seviyelerinde kolaylıkla oksidasyona uğrayarak disülfit köprülerini (GSSG'nin) meydana getirebilir. GalN'nin de aralarında bulunduğu çeşitli kimyasallarla yapılan toksisite çalışmalarında ROS aracılı oksidatif stresin hücre içi GSH seviyelerinin azalmasına neden olduğu belirtilmiştir (Elkomy ve diğ. 2020; Park ve diğ. 2020; Reshi ve diğ. 2021; Jiang ve diğ. 2021). Beyin de dahil olmak üzere farklı dokularda GalN ile oluşturulan oksidatif hasar neticesinde çalışmamızdaki bulgularla uyumlu sonuçlar rapor edilmiştir (Das ve diğ. 2012; Yoshida ve diğ. 2015; Tunali ve diğ. 2019). Çalışmamızda, GalN verilen sıçanlara U vit. verilmesi GSH seviyelerinde anlamlı bir yükselmeye neden olmuştur. U vit., yapısında bulunan kükürt atomu sayesinde antioksidan özellik göstererek, GalN kaynaklı oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı beyin dokusunu

korumuş; bunu da serbest radikalleri nötralize ederek gerçekleştirmiş olabilir (Patel ve Prajapati, 2012; Oztay ve diğ. 2020).

Birçok biyolojik sistemin ana bileşenlerinden olan proteinler, çok sayıda oksidan molekül ile kolayca reaksiyona girebilir. Bu nedenle de ROS'ların zararlı etkilerine karşı oldukça hassastır (Hawkins ve Davies, 2019). Proteinlerin ROS ile etkileşmesi, söz konusu proteinlerin peptit omurgasında bulunan tirozin gibi spesifik amino asidlerin oksidasyonuna neden olarak AOPP adı verilen ve ditirozin kalıntıları içeren çapraz bağlı ürünleri meydana getirir. Bununla birlikte, AOPP'ler sıklıkla oksidatif olarak hasar görmüş albümin agregatlarının oluşmasına da katkıda bulunur (Obradovic ve diğ. 2021). Esas olarak karaciğer ve dalak tarafından elimine edilen AOPP'ler, organizmada yaşam boyunca küçük miktarlarda oluşur. Ancak, bunların miktarı yaşlanmayla birlikte artar. İn vitro koşullarda oksidatif stresin belirlenmesinde önemli bir biyobelirteç olan AOPP'ler, prooksidan-antioksidan dengesinin ve hastalık durumunun değerlendirilmesinde önemlidir. Proenflamatuvar ve prooksidan olarak da bilinen AOPP'lerin diyabet, metabolik sendrom, romatoit artrit ve ateroskleroz gibi bazı hastalıkların gelişmesindeki patolojik süreçlerde de görev aldığı bildirilmiştir (Baskol ve diğ. 2006; Piwowar, 2014; Bagyura ve diğ. 2022). Öte yandan, beyin dokusu bol oksijen tüketmesi, çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin olması, redoks aktif geçiş metal iyonlarını içermesi ve nispeten daha düşük antioksidan enzim aktivitelerine sahip olması nedeniyle oksidatif hasara karşı muhtemelen daha savunmasızdır (Banji ve diğ. 2013). Oksidatif stres, bu nedenle, beyindeki felç, travmatik beyin hasarı veya nörodejeneratif hastalıklar gibi hem akut hem de kronik patolojilerin patofizyolojisinde önemli bir rol oynar (Jelinek ve diğ. 2021). Çalışmamızda, GalN verilen sıçanların beyin dokularında AOPP seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, AOPP seviyelerindeki artışa GSH seviyelerindeki azalış da eşlik etmiştir. Bu durum, yaygın olarak oksidatif stresin en önemli göstergelerinden biri olarak kabul edilmektedir (Coimbra-Costa ve diğ. 2017). Diğer taraftan, U vit. verilen grupta AOPP seviyelerinde azalma GSH seviyelerinde ise artış tespit edilmiştir. U vit.'nin, en önemli endojen antioksidanlardan biri olan GSH seviyelerini arttırması ve GalN-kaynaklı serbest radikal oluşumunu sınırlandırabilmesi, beyin dokusundaki ditirozin kalıntıları içeren çapraz bağlanmaları önleyebileceğini ve sonuç olarak AOPP seviyelerinin düşmesini açıklayabilir. Çalışmamızdaki bu sonuçlar, U vit.'nin radikal süpürücü etkisinin gösterildiği ve Celik ve diğ. (2021) tarafından yapılan çalışma ile uyumludur.

Normal şartlar altında, organizmada serbest radikal üretimi ve bunların detoksifikasyonu arasında bir denge söz konusudur. Oksidatif stres ise genel olarak organizmanın detoksifikasyon kapasitesini aşan ROS üretimi nedeniyle meydana gelmektedir. Yüksek oksijen ihtiyacı nedeniyle beyin dokusu, ROS etkilerine ve oksidatif strese karşı oldukça hassastır (Żebrowska ve diğ. 2019). Bununla birlikte, oksidatif stres çeşitli nörodejeneratif bozukluklar için (Alzheimer ve Parkinson hastalığı, şizofreni ve diğer bilişsel bozukluklar vb.) önemli bir patojenik faktör olarak kabul edilmektedir (Mitra ve diğ. 2017; Maciejczyk ve diğ. 2018). Oksidatif stresin neden olduğu hücresel ve/veya doku hasarının derecesini belirlemek için hem biyolojik sıvılarda hem de dokularda oksidan/antioksidan miktarının ölçülmesi faydalı olabilir. Ancak, oksidanların ve antioksidanların ayrı ayrı ölçülmesi maliyetli olduğu gibi zor ve zaman alıcıdır (Uzar ve diğ. 2012). Çalışmamızda, beyin dokusunda ROS, TOS, TAS seviyeleri ve OSİ değerleri tayin edilmiştir. TOS seviyesi, GalN toksisitesi ile ilişkili oksidatif strese neden olan tüm serbest radikallerin seviyesini gösterebilir. Aynı şekilde, TAS seviyesi de GalN'nin neden olduğu oksidatif stres kaynaklı beyin hasarının belirlenmesinde önemli bir faktör olabilir. Bununla birlikte, toplam oksidan/toplam antioksidan oranının (OSİ'nin) belirlenmesi, oksidatif stresin organizmadaki kümülatif etkisini ifade etmek için altın standart olarak değerlendirilmektedir (Skutnik-Radziszewska ve diğ. 2020). Çalışmamızda, GalN enjekte edilen deney grubunda ROS, TOS seviyelerinde ve OSİ değerlerinde istatiktiksel olarak anlamlı bir artış, TAS seviyesinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edilmiştir. Beyin dokusundaki TOS ve TAS seviyelerinin bu şekildeki değişimi, GalN enjeksiyonunun ardından beyin dokusunda oksidan/antioksidan dengesinin bozulduğunu ve oksidatif stresin meydana geldiğini göstermektedir. GalN gibi, çoklu organ hasarının indüklenmesi için tek başına veya GalN ile kombinasyon halinde kullanılan bir kimyasal ajan olan LPS ile yapılan bazı araştırmalarda, çalışmamızdaki ile uyumlu olan ve oksidan/antioksidan dengenin bozulduğuna işaret eden sonuçlar bildirilmiştir (Aslankoc ve diğ. 2018; Rakshit ve diğ. 2020; Savran ve diğ. 2020; Aslankoc ve Ozmen, 2022; Ozdamar Unal ve diğ. 2022). Çalışmamızda, tek doz GalN enjeksiyonu sonucunda sıçanların beyin dokularındaki bozulmuş oksidan/antioksidan dengesinin, bu sıçanlara 3 gün süreyle 50 mg/kg/gün U vit. verilmesi ile birlikte düzeldiği tespit edilmiştir Bu durum, lahana türlerinde de bulunan ve alfa-lipoik asit gibi kükürt içeren önemli bir bileşik olan U vit.'nin, antioksidan özellik göstererek GalN verilen gruptaki oksidan miktarını azaltıp, antioksidan seviyesini artırarak oksidan/antioksidan dengesinin yeniden kurulmasına katıka bulunduğunu gösterebilir (Saleh ve diğ. 2017; Tibullo ve diğ. 2017; Turkyilmaz ve diğ. 2020).

Hücrelerin redoks durumu, düşük molekül ağırlıklı enzimatik olmayan antioksidanlar (yani GSH, ürat ve askorbat) ve ayrıca CAT, SOD, GPx, GR ve GST dahil olmak üzere karmaşık antioksidan enzim sistemi tarafından sıkı bir şekilde kontrol altında tutulmaktadır. Bunların tümü, hücrelerin serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı korunmasından sorumludur (Pisoschi ve diğ. 2021). Çalışmamızda, oksidatif stresin en önemlli belirteçlerinden olan ilk hat savunma sistemine ait olan antioksidan enzimlerin (CAT, SOD, GPx, GR ve GST) aktiviteleri tayin edilmiştir. Çalışmamızdan elde edilen verilere göre, deney grubu sıçanlarına tek doz (500 mg/kg) GalN enjeksiyonu sonucunda ilk hat savunma sistemindeki bu antioksidan enzim aktivitelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşmesine neden olduğu görülmüştür. Oksidan/antioksidan dengesi serbest radikaller lehine bozulduğunda, antioksidan enzimlerin aktiviteleri değişebilmektedir. Öte yandan, karaciğere ve diğer majör organlara oranla daha zayıf bir antioksidan savunma sistemine sahip olan beyin dokusunun serbest radikallerin/oksidatif stresin zararlarına karşı daha hassas olduğu söylenebilir (Cobley ve diğ. 2018). Çalışmamızda, GalN verilen sıçanlarda CAT ile birlikte SOD aktivitesinin de azaldığı görülmüştür. Bu enzimlerin aktivitelerindeki azalma, beyin dokusunda hem süperoksit radikalinin hem de H_2O_2 konsantrasyonunun yükselmesine; dolayısıyla oksidatif hasarın derecesinin de artmasına neden olabilir. Bunun yanısıra, beyindeki antioksidan savunma sisteminin majör bileşeni GSH'tır. Bu nedenle, beyin dokusundaki GSH seviyelerinin değişmesinin, GPx, GR ve GST enzimlerinin aktivitelerinde de değişime yol açtığı ve nörodejeneratif hastalıklarda önemli bir belirteç olabileceği belirtilmiştir (Gu ve diğ. 2015; Iskusnykh ve diğ. 2022). Bu bağlamda, çalışmamızdaki gibi GalN kaynaklı oksidatif stresin GSH seviyesini düşürmesinin GSH ile ilgili enzim aktivitelerindeki azalmayı teşvik etmesi olağan bir sonuçtur.

GalN'nin çeşitli dokular üzerindeki zararlı etkilerini belirlemek ile ilgili yapılan farklı çalışmalardan elde edilen sonuçlar, çalışmamızdaki bulgularla uyumludur (Ghosh ve diğ. 2012; Rakshit ve diğ. 2021; Yan ve diğ. 2021). Ayrıca, beyin dokusunda oksidatif hasarın göstergesi olarak değerlendirdiğimiz ROS, TOS seviyelerinin ve OSİ değerlerinin yükselmesi; buna karşılık, TAS seviyesinin de düşmesi, hücresel antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki düşüş ile uyumludur. Mevcut bulgular, sıçanlara U vit. verilmesinin bu enzimlerin aktivitelerini normalleştirdiğini ve böylece U vit.'nin beyin dokusu üzerinde oksidatif hasara karşı iyileştirici etkileri olduğunu göstermiştir. U vit.'nin akciğer ve karaciğer dokuları üzerindeki koruyucu etkileri ile ilgili benzer sonuçlar diğer araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Sokmen ve diğ.

2012; Oztay ve diğ. 2020; Abouzed ve diğ. 2021). Bu bulgular, U vit. verilmesinin ROS'ların nötralizasyonu yoluyla oksidatif stresin önlenmesinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. U vit.'nin antioksidan enzimlerin aktivitelerini uyarma yeteneği, antioksidan etkilerinin ortaya çıkmasında hayati öneme sahip olabilir.

LDH, oksidoredüktaz sınıfı bir enzim olup H^+ transferinden sorumludur. Tüm ana dokularda bulunan LDH enzimi, NADH+H^+'nin NAD^+'ye oksidasyonu ile birlikte piruvatın laktata reversibl dönüşümünü katalize eder. Ayrıca bu enzimin aktivitesi, yüksek ROS konsantrasyonundan veya GalN'nin varlığından etkilenebilir (Okada ve diğ. 2011). Bununla birlikte, iyi bilinen bir doku hasar belirteci olan artmış LDH aktivitesi genellikle kimyasalların veya toksinlerin neden olduğu karaciğer, kalp, beyin vb. organ toksisitesinin değerlendirilmesi için kullanılmaktadır (El-Beshbishy ve diğ. 2012; Sokmen ve diğ. 2012; Klein ve diğ. 2020). MPO enzimi hem grubu içeren ve memelilerin nötrofil granüllerinde bulunan bir enzim olup, fagosite edilmiş bakterilerin ortadan kaldırılmasında önemli bir rol oynar. Bu enzim, organizmada çeşitli patojenler nedeniyle aşırı ve kontrolsüz ROS üretimi/salınımı sonucunda hem oksidatif stresi hem de nöroenflamasyonu tetikleyen kritik bir enflamatuvar enzimdir. MPO, çeşitli uyarılara yanıt olarak aktive edilebilir. Bunun sonucunda MPO, hipokloröz asit (HOCl) üretmek üzere klorür ve H_2O_2 ile reaksiyona girer. Böylece, serbest radikal üretimini tetikleyerek oksidatif strese aracılık eder (Barbosa ve diğ. 2020; Chen ve diğ. 2020). XO, memelilerde pürin metabolizmasının son basamağı olan hipoksantinin ksantine oksidatif hidroksilasyonunu ve ardından ksantinin ürik aside hidroksilasyonunu katalize eder. XO tarafından katalizlenen bu reaksiyon, aynı zamanda H_2O_2 ve hidroksil radikallerinin oluşumuna da yol açar (Puzio ve diğ. 2022).

Çalışmamızda, tek doz GalN enjeksiyonunun ardından sıçanların beyin dokularında doku hasarı ve oksidatif stres belirteçlerinden olan LDH, MPO ve XO aktivitelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı artışların olduğu görülmüştür. Bunun nedeni, GalN'nin beyin dokusunda serbest radikallerin oluşumunu arttırması, dolayısıyla oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı beyin hücrelerinin adaptasyon süreci ile ilgili olabilir. Bu süreçte, ilk hat savunma enzimlerinin beyin dokusundaki aşırı ROS üretimini elimine edemediği gibi, artmış MPO ve XO aktiviteleri de halihazırda ROS oluşumunu daha da arttırmış olabilir. Çalışmamızdaki bu veriler beyin, karaciğer, akciğer, böbrek, dalak ve testis dokularında oksidatif stresin neden olduğu hasarı gösteren çalışmalar ile uyumludur (Catal ve diğ. 2010; Usende ve diğ. 2018; Tunali ve diğ. 2019). Mevcut çalışmada, U vit. verilmesi sadece LDH, MPO ve XO aktivitelerini azaltmakla

kalmayıp, aynı zamanda antioksidan enzimlerin aktivitelerini de artırarak beyin dokularındaki GalN aracılı oksidatif hasarı hafifletmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler, U vit.'nin beyin dokularında yukarıda bahsedilen enzimatik aktiviteleri olumlu yönde etkilediğini ve anormal ROS oluşumunu azaltarak GalN aracılı oksidatif stresin zararlı etkilerini hafiflettiğini göstermektedir. Ayrıca, U vit.'nin tüm bu etkileri, antioksidan etkisinin bir sonucu olabilir.

AChE enzimi, esas olarak nöromuskuler kavşaklarda ve kolinerjik beyin sinapslarında bulunmaktadır. Bu enzimin birincil fonksiyonu nörotransmitter olan asetilkolinin asetata ve koline hidrolizidir; ki, bu da kolinerjik sinyal iletiminin sonlanmasına neden olur (Phyu ve Tangpong, 2014). AChE, aynı zamanda nörodejeneratif bozukluklar için kritik bir enzimdir. Bir nörotoksisite biyobelirteci olan AChE enziminin aktivitesindeki veya konsantrasyonundaki değişiklikler de nörotoksisite derecesinin tayin edilmesinde kullanılabilmektedir (Kalafatakis ve diğ. 2015; Turkyilmaz ve diğ. 2021). ARE, hidrolaz sınıfı bir enzimdir. Bu enzim aynı zamanda paraoksonaz (PON1) enziminin 3 farklı katalitik aktivitesinden biri olan fosfor grubu içermeyen aril esterlerin hidrolizini katalizlemektedir. Çoğunlukla ARE aktivitesindeki değişiklikler, koroner arter ve vasküler demans gibi vasküler hastalıkların yanı sıra Parkinson ve geç başlangıçlı nörodejeneratif hastalıklarla (Alzheimer gibi) da ilişkilendirilmiştir (Castellazzi ve diğ. 2016). CA enzimi, çinko içeren bir metalloprotein olup, CO_2 ve suyun hızlı ve reversibl olarak bikarbonat ve protona dönüşümünü sağlayan bir biyokatalizördür. CO_2/HCO_3^- karşılıklı dönüşümünü katalizlemek suretiyle CO_2'nin atılımı, pH homeostazı, elektrolitlerin salgılanması, glukoneogenez, lipogenez ve üregenez, kemik rezorpsiyonu ve kalsifikasyonu gibi fizyolojik fonksiyonlara sahiptir (Zamanova ve diğ. 2019; Lemon ve diğ. 2021). CA enziminin sitozolik, mitokondriyal, membrana bağlı ve tükrükte olmak üzere 15 tane izoenzimi bulunmaktadır. Bunlardan bazıları memeli beyninde nöbet aktivitesi, beyin-omurilik sıvısının oluşumu, pH ve iyonik bileşenlerinin düzenlenmesi, biyosentetik reaksiyonlar için bikarbonat üretimi gibi bir dizi fizyolojik sürece sahiptir (Çelik ve diğ. 2020). Sitozolik CA izoenziminin aktif bölgesindeki spesifik sülfhidril gruplarının, enzimin aktivite gösterebilmesi için gerekli olduğu, esas olarak iskelet kası, karaciğer ve beyin gibi yüksek oksijen tüketim oranı ile karakterize edilen dokularda bulunan ve burada oksidatif hasarı önleyen hücre savunma süreçlerine katılabileceği gösterilmiştir (Monti ve diğ. 2017; Di Fiore ve diğ. 2018). Çalışmamızda, 500 mg/kg'lık GalN enjeksiyonunun, sıçanların beyin dokularında AChE aktivitesinde anlamlı olarak artışa; buna karşılık, ARE ve CA aktivitelerinde ise anlamlı olarak azalışa neden olduğu görülmüştür. Bu enzimlerin aktivitelerindeki değişikliklerin nedeni,

GalN'nin öncelikle karaciğerde fonksiyon bozukluğuna (detoksifikasyon reaksiyonlarında ve hepatositlerde redoks dengesinin bozulması vb.) neden olarak aşırı ve kontrolsüz ROS oluşumunu arttırması; bunun sonucunda da beyin dokusundaki oksidatif hasarı tetiklemesi olabilir (Rouf ve diğ. 2021). Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulguların, Kirbas ve diğ. (2014) tarafından yapılan Parkinson hastalarındaki oksidatif stres parametreleri ile PON1-ARE aktivitelerindeki azalmayla uyumlu olduğu görülmektedir. Bir başka çalışmada, bir çeşit böcek ilacı olan sipermetrinin gökkuşağı alabalıklarının beyin dokularında antioksidan enzimlerin (CAT, SOD, GPx) aktiviteleri ile AChE ve ARE aktivitelerini düşürdüğü; buna karşılık, MPO aktivitesini ise arttırdığı bildirilmiştir (Alak ve diğ. 2019). Öte yandan, çalışmamızda sıçanların beyin dokularındaki CA aktiviteleri, GalN enjeksiyonunun ardından azalmıştır. CA aktivitelerindeki azalmanın nedeni, GalN-aracılı ve beynin nötralizasyon kapasitesini aşan ROS oluşumu ile ilişkili olabileceği gibi fazla miktarda oksijen tüketen beyin gibi organlarda ROS artışına cevap olarak CA enziminin aktif bölgesinde yer alan spesifik sülfhidril gruplarının (-SH), GSH ile konjugasyon meydana getirmesi de olabilir (Di Fiore ve diğ. 2018). Mevcut çalışmada U vit., beyin dokularında GalN-aracılı oksidatif hasar durumunda AChE, ARE ve CA aktivitelerinin geri kazanılmasını sağlamıştır. U vit., bu etkisini CAT, SOD, GPx, MPO enzimlerinin aktivitelerini ve TAS seviyelerini arttırarak ve ayrıca TOS seviyesini ve OSİ değerlerini de azaltarak göstermiş olabilir. U vit., antioksidan özelliği sayesinde kontrolsüz ROS oluşumunu dengeleyerek/sınırlandırarak GalN'nin neden olduğu serebral hasarı azaltabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızdan elde edilen verilen verilere göre 500 mg/kg'lık tek doz GalN enjeksiyonu, deney gruplarının beyin dokularındaki oksidan/antioksidan dengesinin oksidanlar lehine bozulmasına neden olmuştur. Bunun sonucunda ise,

- En önemli non-enzimatik antioksidan molekül olan tripeptit yapısındaki GSH seviyesinin ve organizmanın total antioksidan durumunun önemli bir göstergesi olan TAS seviyelerinin azalmasına; AOPP, ROS ve TOS seviyeleri ile OSI değerlerinin artmasına sebep olduğu tespit edilmiştir.
- GalN-aracılı oksidatif stresin yıkıcı etkilerine karşı hücrelerin ilk hat antioksidan savunma mekanizmasında yer alan CAT, SOD, GPx, GR ve GST enzimlerinin aktivitelerinin azaldığı bulunmuştur.
- GalN-aracılı ROS oluşumu neticesinde, dokulardaki oksidatif stres belirteçlerinden olan LDH aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, hücre içi redoks dengesinin bozulması sonucunda, hem önemli bir enflamasyon belirteci olan MPO enziminin hem de katalitik etkisindeki artış ile birlikte daha fazla serbest radikal oluşumuna katkıda bulunan XO enziminin aktivitesinde yükselme olduğu belirlenmiştir.
- Beyin dokusundaki toksisitenin önemli belirteçlerinden olan AChE aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış, ARE ve CA enzimlerinin aktivitelerinde ise kayda değer bir azalış görülmüştür.

Buna karşılık, GalN enjeksiyonundan önce 3 gün süreyle 50 mg/kg'lık U vit. verilmesi,

- ✓ Azalmış GSH ve TAS seviyelerinin, artmış AOPP, ROS ve TOS seviyeleri ile OSİ değerlerinin tersine çevrilmesini sağlamıştır.
- ✓ Bozulan ilk hat savunma enzim aktivitelerinin (CAT, SOD, GPx, GR ve GST) geri kazanılmasında etkili olmuştur.
- ✓ LDH, MPO ve XO enzim aktivitelerinin kayda değer oranda düşmesini sağlamıştır.
- ✓ GalN'nin bu toksik etkileri, U vit.'nin koruyucu etki göstermesi sonucunda oranda ortadan kaldırılmıştır.

Çalışmamızdan elde edilen verilerin sonuçlarına dayanarak, GalN kaynaklı oksidatif beyin hasarı neticesinde meydana gelen hem non-enzimatik hem de enzimatik biyokimyasal değişikliklerin U vit. verilmesi ile tersine çevrildiği; bunun da U vit.'nin antioksidan savunma sistemi üzerinde koruyu etki göstermesi ile ilişkili olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

AANS, 2022, *Anatomy of the brain,* https://www.aans.org/Patients/Neurosurgical- Conditions-and-Treatments/Anatomy-of-the-Brain, [Ziyaret tarihi: 22 Nisan 2022]

Abouzed, T.K., Althobaiti, F., Abdelkhlek, N.A., Eldomany, E.B., Nasr, N.E., Sadek, K.M., El-Shazly, S.A., Kahilo, K.A., Dorghamm, D.A., 2021, Antitumor and antioxidant activity of S-methyl methionine sulfonium chloride against liver cancer induced in Wistar albino rats by diethyl nitrosamine and carbon tertrachloride, *International Journal of Environmental Research and Public Health,* 18 (18), 9726.

Aebi, H., 1984, Catalase in vitro, *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.

Ahmad, F., Tabassum, N., 2012, Experimental models used for the study of antihepatotoxic agents, *Journal of Acute Disease,* 1(2), 85-89.

Ahmedy, O.A., Salem, H.H., Sayed, N.H., Ibrahim, S.M., 2022, Naringenin affords protection against lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver failure: Role of autophagy, *Archives of Biochemistry and Biophysics,* 717, 109121.

Akagün G., 2009, *Alabaş (Brassica oleracea var. Gongylodes) bitkisinin antioksidan aktivitesinin incelenmesi,* Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

Alak, G., Yeltekin, A.Ç., Özgeriş, F.B., Parlak, V., Uçar, A., Keleş, M.S., Atamanalp, M., 2019, Therapeutic effect of N-acetyl cysteine as an antioxidant on rainbow trout's brain in cypermethrin toxicity, *Chemosphere,* 221, 30-36.

Ansari, M.A., Raish, M., Bin Jardan, Y.A., Ahmad, A., Shahid, M., Ahmad, S.F., Haq, N., Khan, M.R., Bakheet, S.A., 2021, Sinapic acid ameliorates D-galactosamine/ lipopolysaccharide-induced fulminant hepatitis in rats: Role of nuclear factor erythroid-related factor 2/heme oxygenase-1 pathways, *World Journal of Gastroenterology,* 27 (7), 592-608.

Aoyama, K., 2021, Glutathione in the brain, *International Journal of Molecular Sciences,* 22 (9), 5010.

Apte, U.M., Harihara M.M., 2005, *Galactosamine,* Encyclopedia of Toxicology, In: Wexler, P. (ed.), 2nd ed., Cambridge, Elsevier, USA, 399-400.

Apte, U., 2014, *Galactosamine,* Encyclopaedia of Toxicology, In: Wexler, P. (ed.), 3rd ed., Cambridge, Elsevier, USA, 689-690.

Aslankoc, R., Savran, M., Ozmen, O., Asci, S., 2018, Hippocampus and cerebellum damage in sepsis induced by lipopolysaccharide in aged rats - Pregabalin can prevent damage, *Biomedicine and Pharmacotherapy,* 108, 1384-1392.

Aslankoc, R., Ozmen, O., 2022, Hippocampal damage in sepsis induced by lipopolysaccharide: The neuroprotective effects of pregabalin in a rat model, *Annals of Medical Research,* 29 (1), 77-82.

Augspurger, N.R., Scherer, C.S., Garrow, T.A., Baker, D.H., 2005, Dietary S-methylmethionine, a component of foods, has choline-sparing activity in chickens, *The Journal of Nutrition,* 135 (7), 1712-1717.

Avcı, G., Küçükkurt, İ., Fidan, F., Eryavuz, A., Aslan, R., Dündar, Y., 2008, Nakil işlemine tabi tutulan koyunlarda vitamin C ve ksilazın uygulamasının kortizol ve lipid peroksidasyon ile bazı biyokimyasal parametrelere etkisi, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi,* 22 (3), 147-152.

Bacyinski, A., Xu, M., Wang, W., Hu, J., 2017, The paravascular pathway for brain waste clearance: Current understanding, significance and controversy, *Frontiers in Neuroanatomy,* 11, 101.

Bagyura, Z., Takács, A., Kiss, L., Dósa, E., Vadas, R., Nguyen, T.D., Dinya, E., Sóos, P., Szelid, Z., Láng, O., Pállinger, E., Kőhidai, L., Merkely, B., 2022, Level of advanced oxidation protein products is associated with subclinical atherosclerosis, *BMC Cardiovascular Disorders,* 22, 5.

Bailey, R., 2020, *Divisions of the brain: Forebrain, midbrain, hindbrain,* https://www.thoughtco.com/divisions-of-the-brain-4032899, [Ziyaret tarihi: 18 Nisan 2022]

Banji, D., Banji, O.J.F., Dasaroju, S., Kranthi Kumar, C.H., 2013, Curcumin and piperine abrogate lipid and protein oxidation induced by D-galactose in rat brain, *Brain Research,* 1515, 1-11.

Barbosa, M.L., de Meneses, A.A.P.M., de Aguiar, R.P.S., de Casto e Sousa, J.M., de Carvalho Melo Cavalcante, A.A., Weidner, S., Maluf, S.W., 2020, Oxidative stress, antioxidant defense and depressive disorders: A systematic review of biochemical and molecular markers, *Neurology, Psychiatry and Brain Research,* 36, 65-72.

Baş, S.S., Türkyılmaz, İ.B., Bolkent, Ş., Yanardağ, R., 2016, The influence of vitamin U supplementation on liver injury of amiodarone-administered rats, *Europen Journal of Biology*, 75 (1), 1-10.

Başar, E., 2010, *Brain body mind oscillations in scope of uncertainty principle*, 1st ed., Springer, New York, ISBN: 978-1441961358.

Basinger, H., Hogg, J.P., 2022, *Neuroanatomy, brainstem,* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544297/, [Ziyaret tarihi: 21 Nisan 2022]

Baskol, G., Demir, H., Baskol, M., Kilic, E., Ates, F., Karakukcu, C., Ustdal, M., 2006, Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis, *Cell Biochemistry and Function,* 24 (4), 307-311.

Bayrak, B.B, Çatal, T., Öztay, F., Yanardağ, R., Bolkent, Ş., 2016, Efficacy of antioxidant vitamins (vitamin C, vitamin E, beta-carotene) and selenium supplement on D-galactosamine-induced lung injury, *IUFS Journal of Biology,* 75(1), 11-18.

Beutler, E., 1971, *Red cell metabolism: a manuel of biochemical methods,* Vol.12, Academic Press, London, 68-70.

Beutler, E., 1975, *Glutathione in red cell metabolism: a manuel of biochemical methods,* 2nd ed., Grune and Stratton, New York, 112-114.

Bordes, S., Werner, C., Mathkour, M., McCormack, E., Iwanaga, J., Loukas, M., Lammle, M., Aaron, S.D., Tubbs, R.S., 2020, Arterial supply of the thalamus: A comprehensive review, *World Neurosurgery,* 137, 310-318.

Bourgis, F., Roje, S., Nuccio, M.L., Fisher, D.B., Tarczynski, M.C., Li, C., Herschbach, C., Rennenberg, H., Pimenta, M.J., Shen, T.L., Gage, D.A., Hanson, A.D., 1999, S-methylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase, *The Plant Cell*, 11 (8), 1485-1497.

Bui, T., Das, J.M., 2021, *Neuroanatomy, cerebral hemisphere,* https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31747196/ [Ziyaret tarihi: 15 Eylül 2021].

Castellazzi, M., Trentini, A., Romani, A., Valacchi, G., Bellini, T., Bonaccorsi, G., Fainardi, E., Cavicchio, C., Passaro, A., Zuliani, G., Cervellati, C., 2016, Decreased arylesterase activity of paraoxonase-1 (PON-1) might be a common denominator of neuroinflammatory and neurodegenerative diseases, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology,* 81, 356-363.

Catal, T., Sacan, O., Yanardag, R., Bolkent, S., 2010, Protective effects of antioxidant combination against D-galactosamine-induced kidney injury in rats, *Cell Biochemistry and Function,* 28 (2), 107-113.

Celik, E., Tunali, S., Gezginci-Oktayoglu, S., Bolkent, S., Can, A., Yanardag, R., 2021, Vitamin U prevents valproic acid-induced liver injury through supporting enzymatic antioxidant system and increasing hepatocyte proliferation triggered by inflammation and apoptosis, *Toxicology Mechanisms and Methods,* 31(8), 600-608.

Çelik, H., Kucukler, S., Çomaklı, S., Özdemir, S., Caglayan, C., Yardım, A., Kandemir, F.M., 2020, Morin attenuates ifosfamide-induced neurotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, neuroinflammation and neuronal apoptosis, *NeuroToxicology,* 76, 126-137.

Chen, S., Chen, H., Du, Q., Shen, J., 2020, Targeting myeloperoxidase (MPO) mediated oxidative stress and inflammation for reducing brain ischemia injury: Potential application of natural compounds, *Frontiers in Physiology,* 11, 433.

Cheney G., 1949, Rapid healing of peptic ulcers in patients receiving fresh cabbage juice, *California Medicine,* 70 (1), 10-15.

Cheney G., 1952, Vitamin U therapy of peptic ulcer, *California Medicine,* 77 (4), 248-252.

Cheney, G., Waxler, S.H., Miller, I.J., 1956, Vitamin U therapy of peptic ulcer; experience at *San Quentin Prison, California Medicine,* 84 (1), 39-42.

Choi, E.H., Lee, S.B., Lee, D.Y., Kim, G.T., Shim, S.M., Park, T.S., 2019, Increased intestinal absorption of vitamin U in steamed graviola leaf extract activates nicotine detoxification, *Nutrients,* 11 (6), 1334.

Clarke, D.D., Sokoloff, L., 1999, *Circulation and energy metabolism of the brain,* Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects, 6th ed., In: Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Brady, S.T., Price, D.L., (eds.), Chapter 31, Lippincott-Raven, Philadelphia, USA, 651-652.

Cobley, J.N., Fiorello, M.L., Bailey, D.M., 2018, 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress, *Redox Biology,* 15, 490-503.

Coimbra-Costa, D., Alva, N., Duran, M., Carbonell, T., Rama, R., 2017, Oxidative stress and apoptosis after acute respiratory hypoxia and reoxygenation in rat brain, *Redox Biology,* 12, 216-225.

Colledge, N.R., Walker, B.R., Ralston, S., Davidson, S., 2010, *Davidson's principles and practice of medicine*, 21st ed., Churchill Livingstone/Elsevier, Edinburgh, New York, ISBN: 9780702030857.

Corte E.D., Stirpe F., 1968, Regulation of xanthine oxidase in rat liver: Modifications of the enzyme activity of rat liver supernatant on storage at 20 degrees, *Biochemical Journal*, 108 (2), 349-351.

Cryan, J.F., Holmes, A., 2005, The ascent of mouse: Advances in modelling human depression and anxiety, *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 775-790.

Das, J., Ghosh, J., Roy, A., Sil, P.C., 2012, Mangiferin exerts hepatoprotective activity against D-galactosamine induced acute toxicity and oxidative/nitrosative stress via Nrf2–NFκB pathways, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 260 (1), 35-47.

Decker, K., Keppler, D., 1974, *Galactosamine hepatitis: Key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death*, Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology Volume 71, In: Adrian, R.H., Helmreich, E., Holzer, H., Jung, R., Kramer, K., Krayer, O., Lynen, F., Miescher, P.A., Rasmussen, H., Renold, A.E., Trendelenburg, U., Ullrich, K., Vogt, W., Weber, A., (eds.), Chapter 2, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 77-106.

Delgado-García, J.M., 2001, Estructura y función del cerebelo [Structure and function of the cerebellum], *Revista de Neurologia*, 33 (7), 635-642.

Delgado-Montemayor, C., Cordero-Pérez, P., Salazar-Aranda, R., Waksman-Minsky, N., 2015, Models of hepatoprotective activity assessment, *Medicina Universitaria*, 17 (69), 222-228.

Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Boloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R.D., 2004, Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects, *Journal of the Association of Physicians of India*, 52, 794-804.

Di Fiore, A., Monti, D.M., Scaloni, A., De Simone, G., Monti, S.M., 2018, Protective role of carbonic anhydrases III and VII in cellular defense mechanisms upon redox unbalance, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 2018306.

Di Mascio, P., Martinez, G.R., Miyamoto, S., Ronsein, G.E., Medeiros, M.H.G., Cadet, J., 2019, Singlet molecular oxygen reactions with nucleic acids, lipids, and proteins, *Chemical Reviews*, 119 (3), 2043-2086.

Dröge, W., 2002, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiological Reviews*, 82 (1), 47-95.

Dziezak, J.D., 1986, Preservatives: Antioxidants. The ultimate answer to oxidation, *Food Technology (Chicago),* 40 (9), 94-102.

Eid, D., 2021, *Forebrain, midbrain and hindbrain. Simply psychology,* https://www.simplypsychology.org/forebrain-midbrain-hindbrain.html, [Ziyaret tarihi: 18 Nisan 2022]

El-Beshbishy, H.A., Hassan, M.H., Aly, H.A.A., Doghish, A.S., Alghaithy, A.A.A., 2012, Crocin "saffron" protects against beryllium chloride toxicity in rats through diminution of oxidative stress and enhancing gene expression of antioxidant enzymes, *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 83, 47-54.

Elkomy, A., Abdelhiee, E.Y., Fadl, S.E., Emam, M.A., Gad, F.A.M., Sallam, A., Alarifi, S., Abdel-Daim, M.M., Aboubakr, M., 2020, L-Carnitine mitigates oxidative stress and disorganization of cytoskeleton intermediate filaments in cisplatin-induced hepato-renal toxicity in rats, *Frontiers in Pharmacology,* 11, 574441.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Featherstone, R.M., 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetycholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology,* 7, 88-95.

Engwa, G.A., Enweke, F.N., Nkeh-Chungag, B.N., 2022, Free radicals, oxidative stress-related diseases and antioxidant supplementation, *Alternative Therapies in Health and Medicine,* 28 (1), 114-128.

Erel, O., 2004, A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation, *Clinical Biochemistry,* 37 (4), 277-285.

Erel, O., 2005, A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clinical Biochemistry,* 38 (12), 1103-1111.

Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G., 2002, Free radicals, antioxidants, and nutrition, *Nutrition,* 18 (10), 872-879.

Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W., La Du, B.N., 1991, Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities, *Drug Metabolism and Disposition,* 19 (1), 100-106.

Ganai, A.A., Khan, A.A., Malik, Z.A., Farooqi, H., 2015, Genistein modulates the expression of NF-κB and MAPK (p-38 and ERK1/2), thereby attenuating D-galactosamine induced fulminant hepatic failure in Wistar rats, *Toxicology and Applied Pharmacology,* 283 (2), 139-146.

García-López, E., González-Gallardo, A., Antaramián, A., González-Dávalos, M.L., Shimada, A., Varela-Echavarria, A., Mora, O., 2012, In vitro conversion of β-carotene to retinal in bovine rumen fluid by a recombinant β-carotene-15, 15-monooxygenase, *International Journal for Vitamin and Nutrition Research,* 82 (2), 94-103.

Gessler, N.N, Kharchenko, L.I., Pavlovskaia, T.E., Bykhovskiĭ, V.I, 1996, Radiation-protective effect of S-methylmethionine (vitamin U), *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia,* 32 (6), 666-668.

Gezginci-Oktayoglu, S., Turkyilmaz, I.B., Ercin, M., Yanardag, R., Bolkent, S., 2016, Vitamin U has a protective effect on valproic acid-induced renal damage due to its anti-oxidant, anti-inflammatory, and anti-fibrotic properties, *Protoplasma,* 253, 127-135.

Ghosh, M., Das, J., Sil, P.C., 2012, D(+) galactosamine induced oxidative and nitrosative stress-mediated renal damage in rats via NF-κB and inducible nitric oxide synthase (iNOS) pathways is ameliorated by a polyphenol xanthone, mangiferin, *Free Radical Research*, 46 (2), 116-132.

Goldstein, S., Czapski, G., Cohen, H., Meyerstein, D., 1994, Free radicals induced peptide damage in the presence of transition metal ions: A plausible pathway for biological deleterious processes, *Free Radical Biology and Medicine,* 17 (1), 11-18.

Gu, F., Chauhan, V., Chauhan, A., 2015, Glutathione redox imbalance in brain disorders, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metobolic Care,* 18 (1), 89-95.

Gujral, J.S., Farhood, A., Jaeschke, H., 2003, Oncotic necrosis and caspase-dependent apoptosis during galactosamine-induced liver injury in rats, *Toxicology and Applied Pharmacology,* 190 (1), 37-46.

Gulcin, I., 2020, Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview, *Archives of Toxicology,* 94, 651-715.

Gungor, H., Ekici, M., Ates, M.B., 2022, Lipid-lowering, anti-inflammatory, and hepatoprotective effects of isorhamnetin on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice, *Drug and Chemical Toxicology,* https://doi.org/10.1080/01480545.2022.2069256

Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981, Assays for differentiation of glutathione S-transferases, *Methods in Enzymology*, 77, 398-405.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1985, The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases, *Molecular Aspects of Medicine*, 8 (2), 89-193.

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.

Hawkins, C.L., Davies, M.J., 2019, Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications, *The Journal of Biological Chemistry*, 294 (51), 19683-19708.

Holden, H.M., Rayment, I., Thoden, J.B., 2003, Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism, *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (45), 43885-43888.

Hsu, L.S., Ho, H.H., Lin, M.C., Chyau, C.C., Peng, J.S. Wang, C.J., 2012, Mulberry water extracts (MWEs) ameliorated carbon tetrachloride-induced liver damages in rat, *Food and Chemical Toxicology*, 50 (9), 3086-3093.

Ichikawa, T., Ito, Y., Saegusa, Y., Iwai, T., Goso, Y., Ikezawa, T., Ishihara, K., 2009, Effects of combination treatment with famotidine and methylmethionine sulfonium chloride on the mucus barrier of rat gastric mucosa, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24, 488-492.

Iskusnykh, I.Y., Zakharova, A.A., Pathak, D., 2022, Glutathione in brain disorders and aging, *Molecules*, 27 (1), 324.

Jander, G., Joshi, V., 2010, Recent progress in deciphering the biosynthesis of aspartate derived amino acids in plants, *Molecular Plant*, 3 (1), 54-65.

Jelinek, M., Jurajda, M., Duris, K., 2021, Oxidative stress in the brain: Basic concepts and treatment strategies in stroke, *Antioxidants*, 10 (12), 1886.

Jiang, X., Xing, X., Zhang, Y., Zhang, C., Wu, Y., Chen, Y., Su, J., 2021, Lead exposure activates the Nrf2/Keap1 pathway, aggravates oxidative stress, and induces reproductive damage in female mice, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, 111231.

Jimsheleisvili, S., Dididse, D., 2022, *Neuroanatomy, cerebellum*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538167/, [Ziyaret tarihi: 21 Nisan 2022]

Kalafatakis, K., Gkanti, V., Scott, C.A.M.G., Zarros, A., Baillie, G.S., Tsakiris, S., 2015, Acetylcholinesterase activity as a neurotoxicity marker within the context of experimentally-simulated hyperprolinaemia: An *in vitro* approach, *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*, 6 (Suppl 1), S98-S101.

Karabulut, H., Gülay, M.Ş., 2016, Serbest radikaller, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4 (1), 50-59.

Kemelo, M.K., Wojnarová, L., Kutinová Canová, N., Farghali, H., 2014, D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity downregulates sirtuin 1 in rat

liver: Role of sirtuin 1 modulation in hepatoprotection, *Physiological Research,* 63 (5), 615-623.

Kim, W.S., Seo, H.M., Kim, W.K., Choi, J.S., Kim, I., Sung, J.H., 2015, The photoprotective effect of S-methylmethionine sulfonium in skin, *International Journal of Molecular Sciences,* 16 (8), 17088-17100.

Kim, W.S., Kim, W.K., Choi, N., Suh, W., Lee, J., Kim, D.D., Kim, I., Sung, J.H., 2018, Development of S-methylmethionine sulfonium derivatives and their skin-protective effect against ultraviolet exposure, *Biomolecules and Therapeutics,* 26 (3), 306-312.

Kirbas, A., Kirbas, S., Cure, M.C., Tufekci, A., 2014, Paraoxonase and arylesterase activity and total oxidative/anti-oxidative status in patients with idiopathic Parkinson's disease, *Journal of Clinical Neuroscience,* 21 (3), 451-455.

Klein, R., Nagy, O., Tóthová, C., Chovanová, F., 2020, Clinical and diagnostic significance of lactate dehydrogenase and its isoenzymes in animals, *Veterinary Medicine International*, 2020, 5346483.

Kropotov, J., 2016, *Functional neuromarkers for psychiatry: Applications for diagnosis and treatment*, 1st ed., Academic Press, London, ISBN: 978-0-12-410513-3.

Kumar, S., 2014, The importance of antioxidants and their role in pharmaceutical science-A review, *Asian Journal of Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences,* 1 (1), 27-44.

Kuzawa, C.W., Chugani, H.T., Grossman, L.I., Lipovich, L., Muzik, O., Hof, P.R., Wildman, D.E., Sherwood, C.C., Leonard, W.R., Lange, N., 2014, Metabolic costs and evolutionary implications of human brain development, *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 111 (36), 13010-13015.

Lander, H.M., 1997, An essential role for free radicals and derived species in signal transduction, *The FASEB Journal,* 11 (2), 118-124.

Lee, N.Y., Park, K.Y., Min, H.J., Song, K.Y., Lim, Y.Y., Park, J., Kim, B.J., Kim, M.N., 2012, Inhibitory effect of vitamin U (S-methylmethionine sulfonium chloride) on differentiation in 3T3-L1 pre-adipocyte cell lines, *Annals of Dermatology,* 24 (1), 39-44.

Lemon, N., Canepa, E., Ilies, M.A., Fossati, S., 2021, Carbonic anhydrases as potential targets against neurovascular unit dysfunction in Alzheimer's disease and stroke, *Frontiers in Aging Neuroscience,* 13, 772278.

Lim, S.H., Nisar, H., Thee, K.W., Yap, V.V., 2018, A novel method for tracking and analysis of EEG activation across brain lobes, *Biomedical Signal Processing and Control*, 40, 488-504.

Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, *The Journal of Biological Chemistry*, 193 (1), 265-275.

Maciejczyk, M., Żebrowska, E., Zalewska, A., Chabowski, A., 2018, Redox balance, antioxidant defense, and oxidative damage in the hypothalamus and cerebral cortex of rats with high fat diet-induced insulin resistance, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 6940515.

Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A.M., Zujko, M.E., 2018, Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body, *Advances in Medical Sciences*, 63 (1), 68-78.

Mitra, S., Natarajan, R., Ziedonis, D., Fan, X., 2017, Antioxidant and anti-inflammatory nutrient status, supplementation, and mechanisms in patients with schizophrenia, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 78, 1-11.

Mohammed, M.T., Kadhim, S.M., Jassimand, A.M.N., Abbas, S.I., 2015, Free radicals and human health, *International Journal of Innovation Sciences and Research*, 4 (6), 218-223.

Monti, D.M., De Simone, G., Langella, E., Supuran, C.T., Di Fiore, A., Monti, S.M., 2017, Insights into the role of reactive sulfhydryl groups of carbonic anhydrase III and VII during oxidative damage, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32 (1), 5-12.

Mrsulja, B.B., 2012, *Pathophysiology of cerebral energy metabolism*, Springer Science and Business Media (Verlag), New York, ISBN: 978-1-4684-3348-7.

Mylroie, A.A., Collins, H., Umbles, C., Kyle, J., 1986, Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 82 (3), 512-520.

Nakamura, N., Uzawa, H., Kanazawa, K., Tamai, Y., Tashiro, Y., Koide, M., 1981, Hypolipidemic effect of L-form S-methylmethionine sulfonium chloride in man, *Arzneimittel-Forschung*, 31 (4), 725-729.

Newsome, P.N., Plevris, J.N., Nelson, L.J., Hayes, P.C., 2000, Animal models of fulminant hepatic failure: A critical evaluation, *Liver Transplantation*, 6 (1), 21-31.

Obel, L.F., Müller, M.S., Walls, A.B., Sickmann, H.M., Bak, L.K., Waagepetersen, H.S., Schousboe, A., 2012, Brain glycogen—new perspectives on its metabolic function and regulation at the subcellular level, *Frontiers in Neuroenergetics*, 4, Article 3.

Obradovic, D., Andjelic, T., Ninkovic, M., Dejanovic, B., Kotur-Stevuljevic, J., 2021, Superoxide dismutase (SOD), advanced oxidation protein products (AOPP), and disease-modifying treatment are related to better relapse recovery after corticosteroid treatment in multiple sclerosis, *Neurological Sciences*, 42, 3241-3247

Ogawa, S., Mitsuya, S., 2012, S-methylmethionine is involved in the salinity tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants at germination and early growth stages, *Physiologia Plantarum*, 144 (1), 13-19.

Okada, T., Kawakami, S., Nakamura, Y., Han, K.H., Ohba, K., Aritsuka, T., Uchino, H., Shimada, K.I., Sekikawa, M., Ishii, H., Fukushima, M., 2011, Amelioration of D-galactosamine-induced acute liver injury in rats by dietary supplementation with betaine derived from sugar beet molasses, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75 (7), 1335-1341.

Oktay, S., Bayrak, G., Alev, B., Ipekci, H., Ustundag, U.V., Turkyilmaz, I.B., Pisiriciler, R., Emekli-Alturfan, E., Tunali-Akbay, T., Yanardag, R., Yarat, A., 2018, The effect of vitamin U on the lung tissue of pentyleneterazole-induced seizures in rats, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 391, 177-184.

Osawa, Y., Nagaki, M., Banno, Y., Yamada, Y., Imose, M., Nozawa, Y., Moriwaki, H., Nakashima, S., 2001, Possible involvement of reactive oxygen species in D galactosamine-induced sensitization against tumor necrosis factor-α-induced hepatocyte apoptosis, *Journal of Cellular Physiology*, 187 (3), 374-385.

Ozdamar Unal, G., Asci, H., Erzurumlu, Y., Ilhan, I., Hasseyid, N., Ozmen, O., 2022, Dexpanthenol may protect the brain against lipopolysaccharide induced neuroinflammation via anti-oxidant action and regulating CREB/BDNF signaling, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 44 (2), 186-193.

Oztay, F., Tunali, S., Kayalar, O., Yanardag, R., 2020, The protective effect of vitamin U on valproic acid-induced lung toxicity in rats via amelioration of oxidative stress, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 34 (12), e22602.

Paglia D.E., Valentine W.N., 1967, Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70 (1) 158-169.

Park, S., Kim, D.S., Wu, X., Q.J., 2018, Mulberry and dandelion water extracts prevent alcohol-induced steatosis with alleviating gut microbiome dysbiosis, *Experimental Biology and Medicine,* 243 (11), 882-894.

Park, S., Zhang, T., Wu, X., Qiu, J.Y., 2020, A mixture of mulberry and silk amino acids protected against D-galactosamine induced acute liver damage by attenuating oxidative stress and inflammation in HepG2 cells and rats, *Experimental and Therapeutic Medicine,* 19 (6), 3611-3619.

Patel, A.D., Prajapati, N.K., 2012, Review on biochemical importance of vitamin-U, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research,* 4 (1), 209-215.

Patel, H., Sugano, Y., 2020, *The pons,* https://teachmeanatomy.info/neuroanatomy/brainstem/pons/, [Ziyaret tarihi: 22 Nisan 2022]

Percival, M., 1998, Antioxidants clinical nutrition insights, *Advances in Nutrition,* 31, 201-205.

Pérez, J.A.M., Aguilar, T.A.F., 2013, *Chemistry of natural antioxidants and studies performed with different plants collected in Mexico,* Oxidative stress and chronic degenerative diseases-A role for antioxidants, In: Morales-González, J. A., (ed.), Chapter 2, IntechOpen [Online], ISBN: 978-953-51-1123-8.

Phyu, M.P., Tangpong, J., 2014, Neuroprotective effects of xanthone derivative of *Garcinia mangostana* against lead-induced acetyl cholinesterase dysfunction and cognitive impairment, *Food and Chemical Toxicology,* 70, 151-156.

Pisoschi, A.M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., Serban, A.I., 2021, Oxidative stress mitigation by antioxidants-An overview on their chemistry and influences on health status, *European Journal of Medicinal Chemistry,* 209, 112891.

Piwowar, A., 2014, Biochemical and clinical aspects of advanced oxidation protein products in kidney diseases and metabolic disturbances, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej,* 68, 179-190.

Pryor, W.A., 1986, Oxy-radicals and related species, their formation, lifetimes and reactions, *Annual Review of Physiology,* 48, 657-667.

PubChem, 2022, *D-Galactosamine,* https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Galactosamine [Ziyaret tarihi: 12 Ocak 2022].

Puzio, M., Moreton, N., O'Connor, J.J., 2022, Neuroprotective strategies for acute ischemic stroke: Targeting oxidative stress and prolyl hydroxylase domain inhibition in synaptic signalling, *Brain Disorders,* 5, 100030.

Quistorff, B., Secher, N.H., Van Lieshout, J.J., 2008, Lactate fuels the human brain during exercise, *The FASEB Journal*, 22 (10), 3443-3449.

Racz, I., Páldi, E., Szalai, G., Janda, T., Pál, M., Lásztity, D., 2008, S-methylmethionine reduces cell membrane damage in higher plants exposed to low-temperature stress, *Journal of Plant Physiology*, 165 (14), 1483-1490.

Radhiga, T., Sundaresan, A., Viswanathan, P. Pugalendi, K.V., 2016, Effect of protocatechuic acid on lipid profile and DNA damage in D-galactosamine-induced hepatotoxic rats, *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 27 (5), 505-514.

Raichle, M.E., Gusnard, D.A., 2002, Appraising the brain's energy budget, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (16), 10237-10239.

Rakshit, S., Nirala, S.K., Bhadauria, M., 2020, Gallic acid protects from acute multiorgan injury induced by lipopolysaccharide and D-galactosamine, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 21 (14), 1489-1504.

Rakshit, S., Shukla, P., Verma, A., Nirala, S.K., Bhadauria, M., 2021, Protective role of rutin against combined exposure to lipopolysaccharide and D-galactosamine-induced dysfunctions in liver, kidney, and brain: Hematological, biochemical, and histological evidences, *Food Biochemistry*, 45 (2), e13605.

Reshi, M.R., Gulati, K., Akhtar, J., Khan, A.A., Ray, A., 2021, Dawa-Ul-Kurkum, a unani polyherbal preparation as a hepatoprotective in D-galactosamine induced liver cirrhosis in rats and its possible mechanisms, *EC Pharmacology and Toxicology*, 9 (12), 3-13.

Rouf, A., Das, A.K., Khatoon, M.S.T.M., Mitu, N.L., Shahriar, M., 2021, Evaluation of hepatoprotective effects of arogyavardhini against D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 10 (1), 12-19.

Sakaguchi, S., Furusawa, S., Yokota, K., Sasaki, K., Takayanagi, Y., 1995, Depressive effect of a traditional chinese medicine (Sho-saiko-to) on endotoxin-induced nitric oxide formation in activated murine macrophage J774A.1 cells, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 18 (4), 621-623.

Sakamoto, K., Inoue, A., Nakatani, M., Kozuka, H., Ohta, H., Osajima, Y., 1996, S-methylmethionine sulfonium in fruits of citrus hybrids, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60 (9), 1486-1487.

Saleh, H.M., El-Sayed. Y.S., Naser, S.M., Eltahawy, A.S., Onoda, A., Umezawa, M., 2017, Efficacy of α-lipoic acid against cadmium toxicity on metal ion and oxidative

imbalance, and expression of metallothionein and antioxidant genes in rabbit brain, *Environmental Science and Pollution Research,* 24, 24593–24601.

Saracyn, M., Patera, J., Kocik, J., Brytan, M., Zdanowski, R., Lubas, A., Kozłowski, W., Wańkowicz, Z., 2012, Strain of experimental animals and modulation of nitric oxide pathway: Their influence on development of renal failure in an experimental model of hepatorenal syndrome, *Archives of Medical Science,* 8 (3), 555-562.

Saracyn, M., Zdanowski, R., Brytan, M., Kade, G., Nowak, Z., Patera, J., Dyrla, P., Gil, J., Wańkowicz, Z., 2015, D-Galactosamine intoxication in experimental animals: Is it only an experimental model of acute liver failure? *Medicinal Science Monitor,* 21, 1469-1477.

Sarma, A.D., Mallick, A.R., Ghosh, A.K., 2010, Free radicals and their role in different clinical conditions: An overview, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research,* 1 (3), 185-192.

Savran, M., Aslankoc, R., Ozmen, O., Erzurumlu, Y., Savas, H.B., Temel, E.N., Kosar, P.A., Boztepe, S., 2020, Agomelatine could prevent brain and cerebellum injury against LPS-induced neuroinflammation in rats, *Cytokine,* 127, 154957.

Schreck R, Baeuerle, P.A., 1991, A role for oxygen radicals as second messengers, *Trends in Cell Biology,* 1 (2-3), 39-42.

Seri, K., Matsuo, T., Taniguchi, T., Amemiya, K., Kudo, M., Saito, G., Kato, T., 1980, Hypolipidemic effects of S-methylmethionine (vitamin U) using various experimental procedures, *Arzneimittel-Forschung,* 30 (10), 1694-1703.

Shepherd, G.M., 1994, *Neurobiology,* 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, ISBN: 978-0195088434.

Sherwin, E.R., 1978, Oxidation and antioxidants in fat and oil processing, *Journal of the American Oil Chemists' Society,* 55 (11), 809-814.

Sies, H., 1999, Glutathione and its role in cellular functions, *Free Radical Biology and Medicine,* 27 (9-10), 916-921.

Sies, H., 2020, Oxidative stress: Concept and some practical aspects. *Antioxidants,* 9 (9), 852.

Simeonova, R., Kondeva-Burdina, M., Vitcheva, V., Mitcheva, M., 2014, Some *in vitro/in vivo* chemically-induced experimental models of liver oxidative stress in rats, *BioMed Research International,* 2014, 706302.

Singh, A., Kukreti, R., Kukreti, S., 2022, *Oxidative stress and cellular dysfunction in neurodegenerative disease,* Neurodegenerative diseases biomarkers, neuromethods,

Vol.173, In: Peplow, P.V., Martinez, B., Gennarelli, T.A., (eds.), Humana, New York, USA, 121-154.

Singh, G., Sharma, R., 2022, *Animal models for hepatotoxicity*, Advances in animal experimentation and modeling, In: Sobti, R.C., (ed.), Chapter 13, Academic Press, USA, 195.

Skutnik-Radziszewska, A., Maciejczyk, M., Fejfer, K., Krahel, J., Flisiak, I., Kołodziej, U., Zalewska, A., 2020, Salivary antioxidants and oxidative stress in psoriatic patients: Can salivary total oxidant status and oxidative status index be a plaque psoriasis biomarker? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 9086024.

Sokmen, B.B., Tunali, S., Yanardag, R., 2012, Effects of vitamin U (S-methyl methionine sulphonium chloride) on valproic acid induced liver injury in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 50 (10), 3562-3566.

Standring, S., Ellis, H., Healy, J., Williams, A., 2008, *Gray's anatomy: Anatomical basis of clinical practice*, 40th ed., Edinburgh: Churchill Livingstone, London, ISBN: 978-0-8089-2371.

Sugimoto, Y., Tarumi, T., Kaneko, Y., Isayama, S., Kawai, N., Sugimoto, H., Yamada, H., Kamei, C., 1999, Effect of propolis extract on D-galactosamine-induced hepatic injury in rats, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 22 (11), 1237-1239.

Swaminathan, N., 2008, *Why does the brain need so much power?* https://www.scientificamerican.com/article/why-does-the-brain-need-s/# [Ziyaret tarihi: 18 Aralık 2021]

Tapalaga, D., Tiegs, G., Angermüller, S., 2002, NFκB and caspase-3 activity in apoptotic hepatocytes of galactosamine-sensitized mice treated with TNF-alpha, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 50 (12), 1599-1609.

Thau, L., Reddy, V., Singh, P., 2022, *Anatomy, central nervous system*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542179/, [Ziyaret tarihi: 24 Nisan 2022]

Tibullo, D., Li Volti, G., Giallongo, C., Grasso, S., Tomassoni, D., Anfuso, C.D., Lupo, G., Amenta, F., Avola, R., Bramanti, V., 2017, Biochemical and clinical relevance of alpha lipoic acid: antioxidant and anti-inflammatory activity, molecular pathways and therapeutic potential, *Inflammation Research*, 66 (11), 947-959.

Tunali, S., Kahraman, S., Yanardag, R., 2015, Vitamin U, a novel free radical scavenger, prevents lens injury in rats administered with valproic acid, *Human and Experimental Toxicology*, 34 (9), 904-910.

Tunali, S., Catal, T., Bolkent, S., Yanardag, R., 2019, The effects of vitamins and selenium mixture against brain tissue induced by D-galactosamine, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 33 (8), e22347.

Turkyilmaz, I.B., Sokmen, B.B., Yanardag, R., 2020, Alpha-lipoic acid prevents brain injury in rats administered with valproic acid, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 34 (11), e22580.

Turkyilmaz, I.B., Altas, N., Arisan, I., Yanardag, R., 2021, Effect of vitamin B_6 on brain damage in valproic acid induced toxicity, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35 (9), e22855.

Usende, I.L., Olopade, J.O., Emikpe, B.O., Oyagbemi, A.A., Adedapo, A.A., 2018, Oxidative stress changes observed in selected organs of African giant rats (*Cricetomys gambianus*) exposed to sodium metavanadate, *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6 (1), 80-89.

Uzar, E., Alp, H., Cevik, M.U., Fırat, U., Evliyaoglu, O., Tufek, A., Altun, Y., 2012, Ellagic acid attenuates oxidative stress on brain and sciatic nerve and improves histopathology of brain in streptozotocin-induced diabetic rats, *Neurological Sciences*, 33, 567-574.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39 (1), 44-84.

Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T., 1967, Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C, *The Journal of Biological Chemistry*, 242 (18), 4221-4229.

Villanueva-Paz, M., Morán, L., López-Alcántara, N., Freixo, C., Andrade, R.J., Lucena, M.I., Cubero, F.J., 2021, Oxidative stress in drug-induced liver injury (DILI): From mechanisms to biomarkers for use in clinical practice, *Antioxidants*, 10 (3), 390.

Watanabe, T., Ohara, S., Miyazawa, S., Saigenji, K., Hotta, K., 2000, Augmentative effects of L-cysteine and methylmethionine sulfonium chloride on mucin secretion in rabbit gastric mucous cells, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15 (1), 45-52.

Wei, H., Frenkel, K., 1991, *In vivo* formation of oxidized DNA bases in tumor promoter-treated, *Cancer Research*, 51 (16), 4443-4449.

Wendel, A., 1981, Glutathione peroxidase, *Methods in Enzymology*, 77, 325-333.

Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P., Descamps-Latscha, B., 1996, Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia, *Kidney International*, 49 (5), 1304-1313.

Wroblewski, F., 1957, Clinical significance of serum enzyme alterations associated with myocardial infarction, *American Heart Journal*, 54 (2), 219-224.

Xiang, Y., Cakir, B., Park, I.H., 2021, Deconstructing and reconstructing the human brain with regionally specified brain organoids, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 111, 40-51.

Yadav, A., Kumari, R., Yadav, A., Mishra, J.P., Srivatva, S., Prabha, S., 2016, Antioxidants and its functions in human body-A review, *Research in Environment and Life Sciences*, 9 (11), 1328-1331.

Yan, T., Li, F., Xiong, W., Wu, B., Xiao, F., He, B., Jia, Y., 2021, Nootkatone improves anxiety- and depression-like behavior by targeting hyperammonemia-induced oxidative stress in D-galactosamine model of liver injury, *Environmental Toxicology,* 36 (4), 694-706.

Yang, P., Zhou, W., Li, C., Zhang, M., Jiang, Y., Jiang, R., Ba, H., Li, C., Wang, J., Yin, B., Gong, F., Li, Z., 2016, Kupffer-cell-expressed transmembrane TNF-α is a major contributor to lipopolysaccharide and D-galactosamine-induced liver injury, *Cell and Tissue Research*, 363, 371-383.

Yoshida, K., Ushida, Y., Ishijima, T., Suganuma, H., Inakuma, T., Yajima, N., Abe, K., Nakai, Yuji., 2015, Broccoli sprout extract induces detoxification-related gene expression and attenuates acute liver injury, *World Journal of Gastroenterology*, 21(35), 10091–10103

Yu, P., Yang, Y., Sun, J., Jia, X., Zheng, C., Zhou, Q., Huang, F., 2022, Identification of volatile sulfur-containing compounds and the precursor of dimethyl sulfide in cold-pressed rapeseed oil by GC–SCD and UPLC–MS/MS, *Food Chemistry*, 367, 130741.

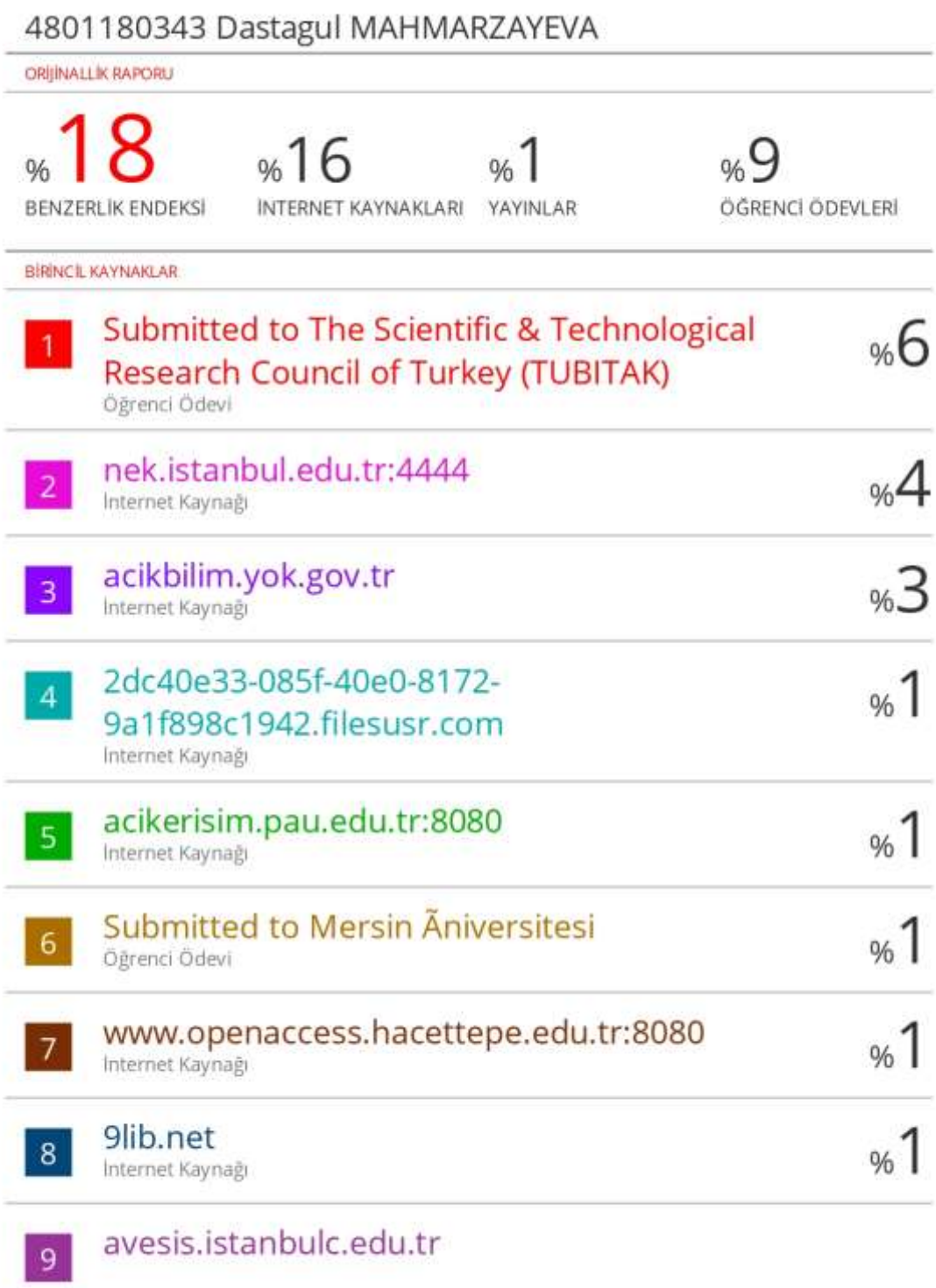
Yumru, M., Savas, H.A., Kalenderoglu, A., Bulut M., Celik, H., Erel, O., 2009, Oxidative imbalance in bipolar disorder subtypes: A comparative study, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry,* 33 (6), 1070-1074.

Zamanova, S., Shabana, A.M., Mondal, U.K., Ilies, M.A., 2019, Carbonic anhydrases as disease markers, *Expert Opinion on Therapeutic Patents,* 29 (7), 509-533.

Żebrowska, E., Maciejczyk, M., Żendzian-Piotrowska, M., Zalewska, A., Chabowski, A., 2019, High protein diet induces oxidative stress in rat cerebral cortex and hypothalamus, *International Journal of Molecular Sciences,* 20 (7), 1547.

Zhang, Y., Chen, J., Ji, H., Xiao, Z.G., Shen, P., Xu, L.H., 2018, Protective effects of Danshen injection against erectile dysfunction via suppression of endoplasmic reticulum stress activation in a streptozotocin-induced diabetic rat model, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18, 343.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



4801180343 Dastagul MAHMARZAYEVA

ORİJİNALLİK RAPORU

%18	%16	%1	%9
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%6
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%4
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%3
4	2dc40e33-085f-40e0-8172-9a1f898c1942.filesusr.com İnternet Kaynağı	%1
5	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
6	Submitted to Mersin Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
7	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
8	9lib.net İnternet Kaynağı	%1
9	avesis.istanbulc.edu.tr	

ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

☒ **Etik Kurul izni gerekmektedir.**

☐ **Etik Kurul izni gerekmemektedir.**

Dastagul MAHMARZAYEVA

ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

☒ **Etik Kurul izni gerekmektedir.**

☐ **Etik Kurul izni gerekmemektedir.**

Dastagul MAHMARZAYEVA

KURUM İZNİ YAZILARI

☐ **Kurum izni gerekmektedir.**

☒ **Kurum izni gerekmemektedir.**

Dastagul MAHMARZAYEVA