



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**LPS İLE İNDÜKLENMİŞ İNFLAMASYON OLUŞTURULAN
RATLARDA PEPİNO EKSTRAKTININ ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ezgi ERDOĞAN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. İ. Özkan ALATAŞ**

Nisan-2019



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**LPS İLE İNDÜKLENMİŞ İNFLAMASYON OLUŞTURULAN
RATLARDA PEPİNO EKSTRAKTININ ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ezgi ERDOĞAN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. İ. Özkan ALATAŞ**

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ezgi ERDOĞAN'ın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "LPS ile indüklenmiş inflamasyon oluşturulan ratlarda pepino ekstaktının etkisi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

Tarih
... / ... / 2019

Üye:Prof. Dr. İ. Özkan ALATAŞ

Üye:Prof. Dr. Sema USLU

Üye:Doç. Dr. Halide Edip TEMEL

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ... / ... / ... tarih ve ... / ... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İ. Özkan ALATAŞ
Enstitü Müdürü

Özet

Yüksek flavonoid ve fenolik asit içeriği olan pepino (*solanum muricatum*) serbest radikalleri ortadan kaldırma özelliği sayesinde kuvvetli bir antioksidan ve anti-inflamatuardır. Pepino, ayrıca çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklerinden dolayı son yıllarda araştırmacıların ilgisini çeken doğal bir tarım ürünüdür. Anti-tümör, anti-hepatotoksik, immünomodülatör etkinlik gibi özelliklere de sahiptir.

Vücutta meydana gelen doku hasarı veya patojen mikroorganizma enfeksiyonundan sonra sistemik veya bölgesel cevaplar oluşur. Hasara karşı oluşan bu cevaba inflamatuvar cevap veya inflamasyon denir. İnflamasyon sırasında oluşan serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu ürünleri, genlerde mutasyonlara ve kanser de dahil olmak üzere birçok hastalıkla ilgili anahtar proteinlerin translasyon sonrası değişiklik geçirmesine sebep olmaktadır. İnflamasyon; sepsis, aterosklerotik hastalıklar, romatoid artrit ve myokard infarktüsü gibi birçok hastalığın patofizyolojisinde önemli rol oynar.

Lipopolisakkarit (LPS), gram negatif bakterilerin dış zarının bir parçası olup, inflamatuvar sitokinlerin, serbest oksijen radikallerinin, nitrik oksit ve araziidonik asit metabolitlerinin aşırı miktarda açığa çıkmasına yol açarak çeşitli inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde yüksek ölçüde yere sahiptir.

Bu çalışmada lipopolisakkaritle oluşturulan deneysel inflamasyon ile pepino (*solanum muricatum*) ekstresinin inflamasyon ve antioksidan sistem üzerine olan koruyucu etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızda 31 adet 3 aylık Sprague Dawley cinsi dişi sıçan ile 4 çalışma grubu hazırlandı. 1. Grup: DMSO+LPS ile indüklenmiş hasta kontrol, 2. Grup: 250 mg/kg pepino+LPS, 3. Grup: 500 mg/kg pepino+LPS, 4. Grup: 5 mg/kg indometazin+LPS olarak belirlendi. Dört gruba da 6 gün boyunca ilgili maddeler tek doz gavaj yolu ile verildi. 7. Gün 4 gruba da intraperitoneal olarak 5 mg/kg LPS (*E. coli*, serotip 055B5) verildi. 24 saat sonra diseksiyon işlemleri yapıldı. İntrakardiyak kan örnekleri ve karaciğer doku örnekleri alındı. Laboratuvar çalışmasında, bu örneklerden Aspartat Aminotransferaz (AST), Alanin Aminotransferaz (ALT), Alkalen Fosfataz (ALP), Gama Glutamil Transferaz (GGT), Yüksek duyarlılıklı C-Reaktif Protein (hsCRP), Malondialdehit (MDA), Myeloperoksidaz (MPO), Nitrik Oksit (NO), Tümör Nekroz Faktör (TNF- α) düzeyleri belirlendi. Karaciğer dokuları ışık mikroskopta 100-500 μ m kesitte Hematoksilen-Eozin yöntemiyle incelendi. İstatistiksel bulgular SPSS 20.0 Windows paket programda değerlendirildi.

Biyokimyasal ve histolojik bulgularımıza dayanarak LPS ile indüklenen inflamasyon modelimizdesiçan doku örneklerinde serbest radikallerin artışı ile karaciğer hasarının oluştuğı tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz verilere göre koruyucu etkinliğin belirleneceğı tedavi gruplarımızdan başta 500 mg/kg pepino olmak üzere 250 mg/kg pepino ve 5 mg/kg indometazin alımının karaciğer yapı ve fonksiyonlarının korunmasına katkı sağladığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: İnflamasyon, Serbest Radikal, Antioksidan, LPS, Pepino

Summary

Pepino (*Solanum muricatum*), a high flavonoid and phenolic acid content, is a powerful antioxidant and anti-inflammatory because of its ability to eliminate free radicals. Pepino (*Solanum muricatum*) is a natural agricultural product, and because of several biological and pharmacological properties it has attracted researchers' interest in recent years. It has many effects including antitumor, antihepatotoxic, immunomodulatory activity.

After tissue injury or infection by pathogen microorganisms in the body, responses of systemic and local events are triggered. This generalized response to injury is referred to inflammatory response or inflammation. The free radicals and lipid peroxidation products that occur during inflammation cause mutations in genes and changes in key proteins related to many diseases, including cancer, after translation. Inflammation plays key role in the pathophysiology of many diseases such as sepsis, atherosclerotic disease, rheumatoid arthritis and myocardial infarction.

Lipopolysaccharide (LPS) is part of the external membrane of gram negative bacteria, causing the release of excessive amounts of inflammatory cytokines, free oxygen radicals, nitric oxide and arachidonic acid metabolites to a high degree in pathogenesis of various inflammatory diseases.

The aim of this study is to investigate the protective effects of pepino (*Solanum muricatum*) extract on inflammation and antioxidant system in an experimental inflammation model induced by lipopolysaccharide (LPS) in rats.

In our study, 3 months old 31 female Sprague Dawley rats were divided into 4 groups. Group 1: %0.5 DMSO+ LPS-induced patient control, Group 2: 250 mg/kg pepino+LPS, Group 3: 500 mg/kg pepino+LPS, Group 4: 5 mg/kg indometazin+LPS was identified. The required ingredients were given to all four groups through a single dose of gavage for 6 days. On the 7. Day in four groups, 5 mg/kg of LPS (*E. coli*, serotype055-B5) was administered to the rats intraperitoneally. 24 hours later, the dissection was performed. Intracardiac blood samples and liver tissue samples were taken. The levels of Aspartate Aminotransferase (AST), Alanine Aminotransferase (ALT), Alkaline Phosphatase (ALP), Gamma Glutamyl Transferase (GGT), High sensitive C-Reactive Protein (HsCRP), Malondialdehyde (MDA), Myeloperoxidase (MPO), Nitric Oxide (NO) and Tumor Necrosis Factor (TNF- α) levels were determined in the laboratory. The liver tissues were examined under light microscopy. Mean values were evaluated by statistical analysis.

Based on our biochemical and histological data, LPS induced inflammation damage in rat tissue by oxidative damage and inflammation as a result of severe in terms of samples was detected. Our treatment group 5 mg/kg indometazin and 250 mg/kg pepino especially 500 mg/kg of pepino were observed to show a protective effect against liver structure and function.

Keywords: Inflammation, Free Radicals, Antioxidant, LPS, Pepino

İçindekiler

Özet.....	iii
Summary.....	v
İçindekiler.....	vii
Tablo Dizini	x
Şekil Dizini.....	xi
1 GİRİŞ VE AMAÇ	0
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 İNFLAMASYON	3
2.1.1 Akut İnflamasyon	4
2.1.1.1 Akut İnflamasyonun Patofizyolojisi	4
2.1.1.2 Akut İnflamasyonun Sistemik Etkileri	5
2.1.1.3 Akut İnflamasyonun Seyri	5
2.1.2 Kronik İnflamasyon.....	7
2.1.3 İnflamatuar Mediyatörler	8
2.1.3.1 Vazoaktif aminler	8
2.1.3.2 Plazma proteazları	9
2.1.3.3 Araşidonik asit metabolitleri	9
2.1.3.4 Lökosit ürünleri	9
2.1.3.5 Trombosit aktiveleştirici faktör (TAF)	9
2.1.3.6 Sitokinler	10
2.1.3.6.1 Pro-inflamatuar sitokinler	11
2.1.3.6.2 Anti-inflamatuar sitokinler	12
2.1.3.7 Büyüme faktörleri	13
2.1.3.8 Nitrik oksit (NO), P maddesi ve kalpainler	14
2.2 LİPOPOLİSAKKARİT (LPS).....	15
2.3 PEPİNO (SOLANUM MURİCATUM)	16
2.4 SERBEST RADİKALLER, OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDANLAR	21
2.4.1 Serbest Radikaller	21
2.4.2 Serbest Oksijen Radikalleri	21

2.4.3	Serbest Radikal Kaynakları	23
2.4.4	Serbest Oksijen Radikallerinin Biyokimyasal Etkileri	23
2.4.4.1	Lipidlere etkileri ve lipid peroksidasyonu	24
2.4.4.2	Proteinlere etkileri.....	25
2.4.4.3	Karbohidratlara etkileri	26
2.4.4.4	DNA' ya etkileri.....	26
2.4.5	Oksidatif Stres	27
2.4.5.1	Oksidatif Stresin Etkileri	28
2.4.6	Antioksidan Sistem	28
2.5	KARACİĞER FONKSİYON TESTLERİ	29
2.5.1	Alanin Aminotransferaz (ALT).....	29
2.5.2	Aspartat Aminotransferaz (AST)	29
2.5.3	Alkalin Fosfataz (ALP)	30
2.5.4	Gamma Glutamil Transferaz (GGT)	30
2.6	İNFLAMASYON VE ENDOTEL FONKSİYON PARAMETRELERİ.....	30
2.6.1	C-Reaktif Protein (CRP)	30
2.6.2	Miyeloperoksidaz (MPO)	30
2.7	OKSİDATİF STRES PARAMETRESİ	31
2.7.1	Malondialdehit (MDA).....	31
3	GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	32
3.1	Deneylerde Kullanılan Kimyasallar	32
3.2	Deneylerde Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler:	32
3.3	Deney Hayvanları	33
3.4	Bitki Ekstresinin Hazırlanması	33
3.5	Deney Grupları.....	33
3.6	Yöntemler.....	34
3.6.1	Kan ve Doku Örneklerinin Alınması	34
3.6.2	Oksidatif stres ile ilişkili ölçümler	34
3.6.2.1	Malondialdehit (MDA) düzeylerinin ölçümü	34
3.6.3	İnflamasyon ve Endotel Fonksiyon Belirteçleri	37

3.6.3.1	HsCRP ölçümü	37
3.6.3.2	Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin ölçümü	37
3.6.3.3	Nitrik Oksit (NO) düzeylerinin ölçümü	38
3.6.3.3.1	Nitrik Oksit (NO) çalışma prensibi	39
3.6.4	Karaciğer Hasarı Belirteçleri	40
3.6.4.1	ALT Ölçüm Test Prensibi	40
3.6.4.2	AST Ölçüm Test Prensibi	40
3.6.4.3	ALP Ölçüm Test Prensibi	41
3.6.4.4	GGT Ölçüm Test Prensibi	41
3.6.5	İnflamatuvar Belirtecin Ölçümü	41
3.6.5.1	Tümör Nekroz faktörü – α (TNF- α) Düzeyleri	41
3.6.6	Karaciğer Doku Örneklerinin Histolojik Analizleri	45
3.6.6.1	Skorlama	45
3.6.7	İstatistiksel Analiz.....	46
4	BULGULAR	47
4.1	Oksidatif Stres Belirteci	47
4.2	İnflamasyon ve Endotel Fonksiyon Belirteçleri	48
4.3	Karaciğer Hasarı Belirteçleri	61
4.4	Karaciğerde Histolojik Bulgular	69
5	TARTIŞMA	73
6	SONUÇ VE ÖNERİLER	79
	KAYNAKLAR DİZİNİ	80

Tablo Dizini

Tablo 2.1. 100 g pepino meyvesinin bileşiminde bulunan maddeler.....	21
Tablo 4.1. Çalışma Gruplarının Doku MDA Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	47
Tablo 4.2. Çalışma Gruplarının Serum HsCRP Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	50
Tablo 4.3. Çalışma Gruplarının Doku MPO Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	52
Tablo 4.4. Çalışma Gruplarının Serum MPO Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	54
Tablo 4.5. Çalışma Gruplarının Doku NO Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	55
Tablo 4.6. Çalışma Gruplarının Serum NO Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	57
Tablo 4.7. Çalışma Gruplarının Serum TNF- α Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	59
Tablo 4.8. Çalışma Gruplarının Serum ALT Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	61
Tablo 4.9. Çalışma Gruplarının Serum AST Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	69
Tablo 4.10. Çalışma Gruplarının Serum ALP Düzeylerinin Karşılaştırılması..	71
Tablo 4.11. Çalışma Gruplarının Serum GGT Düzeylerinin Karşılaştırılması.	73

Şekil Dizini

Şekil 2.1. İnflamasyon süreçleri.....	5
Şekil 2.2. İnflamasyon sürecindeki lökosit olayları.....	7
Şekil 2.3. Lipopolisakkarit (LPS)'in yapısı.....	16
Şekil 2.4. Pepino çiçekleri ve pepino meyvesi.....	18
Şekil 2.5. Pepino meyvesinin çeşitleri.....	20
Şekil 4.1. Doku MDA düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması.....	41
Şekil 4.2. Serum HsCRP düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması....	51
Şekil 4.3. Doku MPO düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması.....	53
Şekil 4.4. Serum MPO düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması.....	54
Şekil 4.5. Doku NO düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması.....	56
Şekil 4.6. Serum NO düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması.....	58
Şekil 4.7. Serum TNF- α düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması.....	60
Şekil 4.8. Serum ALT düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması.....	62
Şekil 4.9. Serum AST düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması.....	63
Şekil 4.10. Serum ALP düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması.....	65
Şekil 4.11. Serum GGT düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması.....	67
Şekil 4.12. Deney gruplarına ait ratların karaciğer kesitleri.....	69
Şekil 4.13. Deney gruplarına ait ratların karaciğer kesitleri.....	70

Simge ve Kısaltmalar Dizini

ALT	:	Alanin Aminotransferaz
ALP	:	Alkale Fosfataz
AST	:	Aspartat Aminotransferaz
BSA	:	Siğır Serum Albumini
COX2	:	Siklooksijenaz-2
CSIF	:	Sitokin Sentezi Engelleyici Faktör
DMSO	:	Dimetilsülfoksit
EDTA	:	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EGF	:	Epidermal Büyüme Faktörü
ELISA	:	Enzim-Bağlı İmmun-Sorbent Testi
FGF	:	Fibroblast Büyüme Faktörü
GGT	:	Gama Glutamil Transpeptidaz
GSH	:	Redükte Glutasyon
H	:	Hidrojen
HE	:	Hematoksilen-Eosin
HETAB	:	Hekzadesil Trimetil Amonyum Bromid
HETE	:	Hidroksieikozatetraenoik Asit
HNE	:	4-Hidroksioneal
HOCl	:	Hipokloröz Asit
HPETE	:	Hidroperoksieikozatetraenoik Asit
HsCRP	:	Yüksek Duyarlıklı C Reaktif Protein
IL-1	:	İnterlökin-1
IL-1α	:	İnterlökin-1 α
IL-1β	:	İnterlökin-1 β
IL-2	:	İnterlökin-2
IL-6	:	İnterlökin-6
IL-8	:	İnterlökin-8
IL-10	:	İnterlökin-10
IL-11	:	İnterlökin-11
IL-13	:	İnterlökin-13
IL-18	:	İnterlökin-18
iNOS	:	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
IFN	:	İnterferon
LBP	:	Lipoprotein Bağlayıcı Protein
LOO•	:	Lipid Peroksil Radikali
LOOH	:	Lipid Hidroperoksidi
LPS	:	Lipopolisakkarit
MDA	:	Malondialdehit
MHC	:	Major Doku Uygunluğu Bileşeni

MPO	:	Miyeloperoksidaz
NADH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADPH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NF-κB	:	Nükleer Faktör Kappa B
NO	:	Nitrik Oksit
NOS	:	Nitrik Oksit Sentaz
O₂	:	Oksijen
O₂•	:	Süperoksit Radikali
OH•	:	Hidroksil Radikali
ONOO	:	Peroksinitrit
PGP	:	P-Glikoprotein
ROO•	:	Peroksil Radikali
SAPK	:	Stresle Aktive Protein Kinaz
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
SOR	:	Serbest Oksijen Radikalleri
TAF	:	Trombosit Aktifleştirici Faktör
TBA	:	Tiyobarbütirik Asit
Th2	:	Tip 2 Yardımcı T Lenfosit
TKBF	:	Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
TMB	:	Tetrametil Benzidin
TNF	:	Tümör Nekroz Faktör

1 GİRİŞ VE AMAÇ

İnflamasyon; immünolojik veya immünolojik olmayan her türlü zararlı, yabancı ve yıkıcı etkene veya meydana gelebilecek içsel/dışsal hasara karşı organizmanın verdiği doğal bir savunma cevabıdır. İnflamasyonun tetiklenmesi infeksiyöz (gram-pozitif ve gram negatif bakteriler, virüs, mantar vb.) ya da infeksiyöz olmayan (travma, yanık, yabancı cisim, iskemik vb.) birçok nedenle meydana gelebilir. Birçok mediyatör ve hücrenin etki ettiği bu doğal savunma cevabının amacı inflamasyonu tetikleyen nedeni ortadan kaldırmak veya etkisizleştirmek ve/veya doku onarımına yardımcı olmaktır. İnflamasyon; ateroskleroz, miyokard infarktüsü, kanser, romatoid artrit, yenidoğan akciğer hastalığı, sepsis, tüberküloz, sarkoidoz, crohn hastalığı, menenjit gibi ciddi hastalıkların patogeneğinde önemli bir yere sahiptir (Özbaşıoğlu ,2009; Entok vd., 2014; Gannong, 1999; Akpınar, 2003).

İnflamasyondaki belirtileri oluşturan ve doku hasarının giderilmesinde görev alan kompleman sistemi elemanları, arasıdonik asit metabolik ürünleri, nitrik oksit, uyarılmış lenfosit, monosit ile makrofajlardan salınan sitokinler ve lizozomal enzimler gibi mediyatörler inflamatuvar süreçte birbirleriyle etkileşim göstererek kompleks inflamatuvar yanıtı meydana getirirler (Barnes, Chung & Page, 1998; Kuralay & Çavdar, 2006).

Çeşitli inflamasyon modellerinde, endotoksin ile oluşumları tetiklenen serbest oksijen radikalleri gibi moleküllere inflamasyonun çeşitli aşamalarında görev düştüğü bilinmektedir (Özbaşıoğlu, 2009).

Gram (-) bakterilerin hücre duvarında bulunan lipopolisakkaritler (LPS) vücut tarafından hemen tanınmaktadır. Deneysel olarak LPS uygulamasının, kanda inflamasyon mediyatörleri ve serbest oksijen radikalleri (SOR) gibi moleküllerin artışına neden olduğu belirlenmiştir (Er vd., 2010; Huang vd., 2012; Özbaşıoğlu, 2009; Yazar vd., 2010). LPS kendini bağlayan protein ile birleştikten sonra monosit ve makrofajların hücre yüzeyinde bulunan reseptörü ile etkileşerek nükleer faktör kapp B (NF-κB)'nin aktivasyonu ve protein kinazların uyarılmasını sağlar. Böylece lökositler, vasküler hücreler ve plazmadan inflamatuvar mediyatörlerin ve serbest oksijen radikallerin salınması ile inflamasyon etkenlerine karşı bir yanıt oluşturulur (Caroff & Karibian, 2003; Iontcheva, Amar, Zawawi, Kantarci, & Van Dyke, 2004; İskit, 2005).

Serbest oksijen radikallerinin miktarları organizmada oldukça hassas bir dengededir (Fausto, 2000; Kulistic vd., 2004). Serbest oksijen radikalleri ile antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması "oksidatif stres" olarak adlandırılır (Aruoma, 1998). Serbest oksijen radikallerin birikimine paralel olarak doku-organ hasarının önlenmesi vücudun kendi oluşturduğu "antioksidan sistemi" adı verilen bir savunma mekanizmasıyla düzenlenebilmektedir (Fausto, 2000; Nakano vd., 1998). Serbest oksijen radikallerinin zararlı etkileri, antioksidanlar tarafından azaltılır veya tamamen yok edilir. Hücre içinde oksijenin metabolize edildiği her yerde antioksidanlar, oksijen ara metabolitlerini azaltmak için hızlı ve spesifik olarak görev yaparlar (Xu vd., 2011).

Bitki dokuları ekzojen ve endojen kaynaklı serbest radikallerin neden olduğu oksidatif strese maruz kaldıklarından birçok antioksidan savunma sistemine sahiptirler. Bitkilerdeki önemli redoks potansiyeline sahip antioksidan bileşenler flavonoidler, kateşin, fenolik asitler, karotenoidler ve fenolik diterpenlerdir. Fenolik asitler genellikle serbest radikalleri yakalama özelliğine sahipken, flavonoidler radikalleri temizleyerek ve metallerle bağ yaparak radikal oluşumunu engellerler (Brewer, 2011).

Pepinonun serbest radikallerin oluşturduğu hasarlara karşı koruyucu etkisinin, içeriğinde bulunan flavonoidlerin anti-inflamatuar, antioksidan ve serbest radikalleri süpürücü etkisinden ileri geldiği bildirilmiştir. Flavonoidler sadece tepkimelerin artmasını önlemekle kalmayıp aynı zamanda serbest radikallerin oluşumunun da önüne geçer. Yapılan araştırmalarda pepino ekstraktlarının SOR'lara karşı antioksidan aktiviteleri araştırılmış, antioksidan özellikte olduğu ve ksantin oksidaz aktivitesini belirgin bir şekilde inhibe ederek serbest radikal oluşumunu önlediği gözlemlenmiştir. Pepinonun en önemli antioksidan mekanizması; serbest radikallerin oluşturduğu DNA hasarlarını tamir edici özellikte olmasından ve lipit peroksidasyonuna neden olan polimerize zincir reaksiyonlarını kırıcı özelliği ile SOR'ları dokulardan uzaklaştırıcı etki göstermesidir (Guilia, Mascolo & Angelo, 1999; Sudha, Sangeetha Priya, Indhu Shree & Vadivukkarasi, 2011).

İnflamasyon kanser gelişimi için önemli bir belirteçtir. İnflamasyon sırasında oluşan serbest radikaller ve aldehitler (malondialdehit gibi), zararlı gen mutasyonlarına ve kanserle ilgili anahtar proteinlerin translasyon sonrası değişiklik geçirmesine neden olur (Hofseth & Wargovich, 2007). İnflamasyonun önlenmesi inflamasyon içerikli hastalıkların (pnömoni, ateroskleroz, miyokard infarktüsü, romatoid artrit, sepsis, tüberküloz, sarkoidosis, crohn hastalığı, menenjit, hepatit vb.) tedavisinde büyük önem taşır. İnflamasyonla oluşan serbest radikaller DNA hasarına neden olabilmekte ve kanser başlangıcına sebebiyet verebilmektedir. Yapılan literatür taramaları sonucunda, tıbbi özelliği oldukça iyi bilinen pepinonun

inflamasyon ve serbest radikal oluşumu üzerine oldukça olumlu etkilerinin olduğu gözlenmiştir (Hofseth vd., 2007).

Literatür bilgilerinin işığında alışmamızda LPS ile oluşturulan deneysel inflamasyon modelinde pepino ekstresinin inflamasyon ve antioksidan sistem üzerine olan koruyucu etkinliğinin araştırılması hedeflendi. Araştırmamızdan elde edeceğimiz sonuçların kanser biyogenezi, diğer birçok hastalığın patogenezinde önemli rol oynayan inflamatuvar sürecin düzenlenmesi, yeni doğal etken maddelerin tedavide kullanılabilmesi ve yeni araştırma alanlarının belirlenmesi açısından katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

2 GENEL BİLGİLER

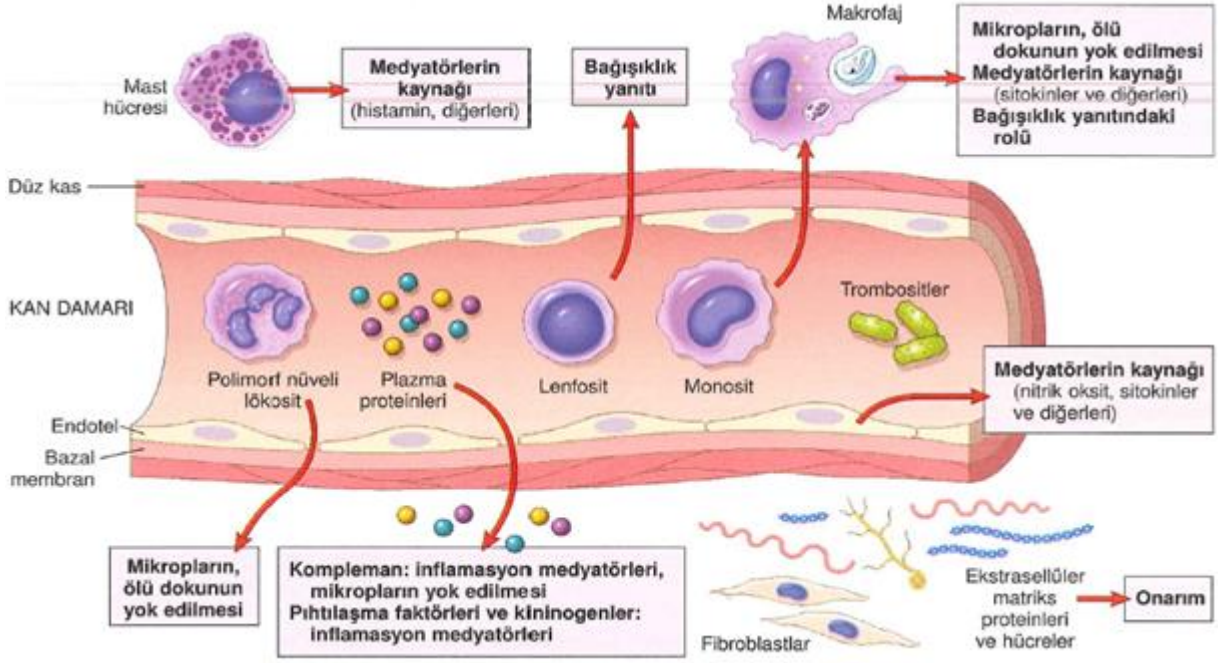
2.1 İNFLAMASYON

Canlı organizmaların yaşamlarını sürdürebilmek için enfeksiyon etkenleri gibi organizma dışı istilacıları ve hasarlı dokuları uzaklaştırması gerekir. Bu fonksiyonlar, *inflamasyon* adı verilen, karmaşık bir organizma cevabı ile meydana getirilir. İnflamasyon genel olarak; konak hücrenin, kan damarlarının, proteinlerin ve diğer medyatörlerin; travma, enfeksiyöz ajanlar ve onların toksik ürünleri, kimyasal maddeler, aşırı sıcak-soğuk gibi fiziksel etkenler, cerrahi girişimler, immun cevap ve iskemi gibi hücre hasarını başlatan nedeni ve bu neden yüzünden nekroza uğrayan hücre ve dokuların ortadan kaldırmaya çalıştığı ve onarım sürecini başlattığı, koruyucu bir cevap olarak belirtilmektedir (Tuzlalı, 2014; Akpınar, 2003). Bu lokal zedelenme, vasküler ve hücresel yanıtlara yol açarak plazmadan ve lokal hücrelerden çok sayıda inflamatuvar mediyatörün salgılanmasını sağlar (Kumar, Cotran & Robbins, 1992). Aynı zamanda dokularda iyileşme sürecinin tetikleyicisidir (Carrero & Stenvinkel, 2009).

İnflamasyon çok eski çağlarda tanımlanmıştır. M.S. 1.yy' da Galen ve Celsus, inflamasyonun dış belirtilerini rubor (periferik vazodilatasyon), calor (ateş), dolor (ağrı) ve tumor (artmış kılcak geçirgenlik) olarak belirlemiştir (Vincent, Opal, Marshall, & Tracey, 2013). Daha sonra 1850' lerde Rudolf Virchow tarafından Functio laesa (organ disfonksiyonu) eklenerek inflamasyonun beşinci karakteristik özelliği tanımlanmıştır (Libby, 2007). Temel düzeyde, enfeksiyon veya doku yaralanmasıyla tetiklenen akut inflamatuvar cevap, kan bileşenlerinin (plazma ve lökositler) koordineli olarak enfeksiyon veya yaralanma bölgesine migrasyonunu içerir (Ryan & Majno, 1977). İnflamasyon; osteoartrit, ateroskleroz, miyokard infarktüsü, kanser, romatoid artrit, sepsis, tüberküloz, sarkoidoz, crohn hastalığı, menenjit gibi birçok hastalığın patogeneğinde yer alır (Özbaşoğlu, 2009).

İnflamatuvar yanıt kısaca;

- 1) Zararlı etkenin tespit edilmesi,
- 2) Lökositlerin inflamatuvar yanıtın oluşacağı yere toplanması,
- 3) Tespit edilen zararlı etkenin ortadan kaldırılması,
- 4) Oluşan yanıtın düzenlenmesi ve denetlenmesi,
- 5) Hasarlı bölgenin onarımı ve son olarak
- 6) Fonksiyon kaybının giderilmesi aşamalarını içermektedir (Tuzlalı, 2014).



Şekil 2.1. İnflamasyon süreçleri (Tuzlalı, 2014)

İnflamasyonlarla ilgili birçok sınıflandırma olsa da yapılan en iyi ve geçerli sınıflama, sürenin göz önüne alınarak yapıldığı sınıflamadır. Buna göre inflamasyon akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılır (Tuzlalı, 2014).

2.1.1 Akut İnflamasyon

Akut inflamasyon, hücre ve dokulardaki hasara karşı kısa sürede ve çok hızlı olarak şekillenir. Vazodilatasyon, vasküler sızıntı, ödem gelişimi ve çoğunlukla polimorfnüklear lökositlerin göçü ile tanımlanır (Ersoy, 2010).

2.1.1.1 Akut İnflamasyonun Patofizyolojisi

Hücresel hasar oluşumundan sonra, genellikle ilk olarak kısa süreli bir vazokonstriksiyon ve bunu takip eden bir vazodilatasyon oluşumu gözlenir. Kimyasal mediyatörlerin salınımı ve hücresel efektörlerin aktivasyonu sonucunda ortaya çıkan lokal vazodilatasyon, kızarıklık ve ısı artışına, mikrovasküler yatakların açılmasına ve interstisyuma bir miktar proteince fakir transudat sızmasına sebep olur. Bunu izleyerek şekillenen vasküler permeabilededeki artış ise proteince zengin bir sıvının damar dışına çıkmasına, vasküler ozmotik basınçta azalmaya ve interstisyel sıvının ozmotik basıncında artışa, dolayısıyla da ödem şekillenmesine neden olur (Baron & Lee, 2006; Cheville, 1999; Kumar, Cotron, Robbins, 2000).

Vasküler değişikliklerin gelişmesi ile birlikte lökositlerdeki hücresele olaylar belirlenir. Tüm bu vasküler ve hücresele olayların şekillenmesinde birçok kimyasal mediyatör rol alır. Vazodilatasyon; prostaglandinler ve nitrik oksit aracılığıyla oluşur. Lökositlerin aktif hale gelmesini; bakteriyel ürünler ve kemokinler (örn: IL-8) sağlar. Ateş gelişmesinde; IL-1, IL-6, TNF- α , prostaglandinler, ağrı şekillenmesinde; prostaglandinler, bradikininler, doku hasarının oluşmasında ise nötrofil ve makrofaj lizozomal enzimleri, oksijen metabolitleri ve nitrik oksit gibi birçok kimyasal mediyatörün rolü vardır (Baron & Lee, 2006; Cheville, 1999; Ersoy, 2000; Kumar, Cotron, Robbins, 2000).

2.1.1.2 Akut İnflamasyonun Sistemik Etkileri

Akut inflamasyonda başlangıçta ortaya çıkan lokal bulgulara ilave olarak sistemik bulgular da görülebilir. Akut inflamasyonun başlıca sistemik bulguları ateş, periferale lökositik değişiklikler ve plazma proteinlerindeki farklılaşmalardır (Ersoy, 2010; Tanas, 2007).

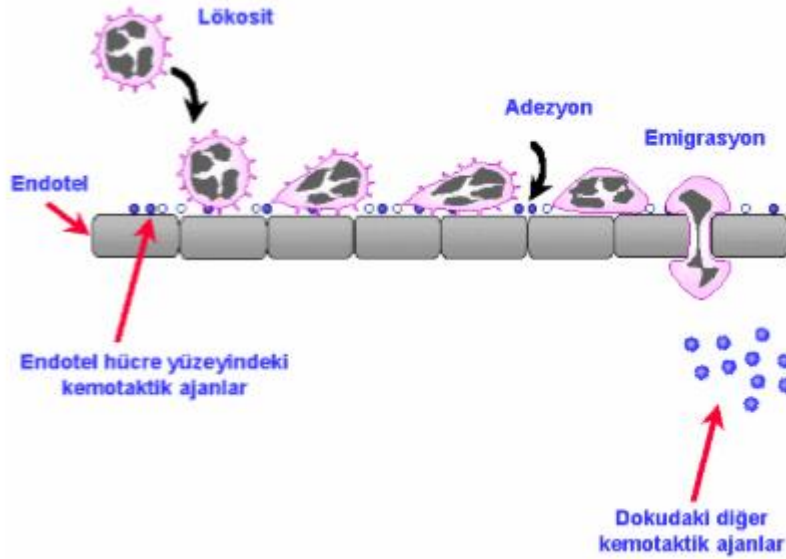
2.1.1.3 Akut İnflamasyonun Seyri

Akut inflamasyonun 2 önemli alt başlığı vardır:

- 1. Vasküler Olaylar:** Damarlarda meydana gelen vazodilatasyon, inflamasyon bölgesine kan akımının artmasını sağlarken, damar duvarındaki geçirgenlik artışı plazma proteinlerinin kan dolaşımından uzaklaşmalarına neden olur. Endotel hücrelerinin aktiflenmesi ile birlikte, lökositler damar duvarlarından geçerek inflamasyon bölgesine yönelirler ve adezyon özelliklerinde artış gözlenir. Vazodilatasyon ve kan akımı artışının meydana gelmesi, intravasküler hidrostatik basıncın artmasına neden olur. Bu durum kapillerden sıvı filtrasyonunun artması ile sonlanır. Toplanan sıvı başlangıçta transuda özellikli olsa da, damar duvarı geçirgenliği arttığından ve bölgeye hücreler toplanmaya başladığından protein içerikli eksuda sıvıya dönüşüm gözlenir. Sonuçta intravasküler ozmotik basınç azalır ve interstisyel ozmotik basınç artarak ödeme sebep olur (Kuralay & Çavdar, 2006; Ryan & Majno, 1977; Tuzlalı, 2014).
- 2. Hücresele olaylar:** Vasküler değişikliklerin meydana gelmesi sonrası lökositler, damar dışına çıkarak enfeksiyonlu ya da hasarlı dokuların yer aldığı inflamasyonlu bölgede bir araya gelirler. Akut inflamasyonun oluşmasında görev alan başlıca lökositler, nötrofillerdir (Tuzlalı, 2014).

Bu hücrelerin inflamasyon bölgesinde toplanmaları çok aşamalı süreçleri barındırmaktadır. Süreç sırasıyla şu aşamalardan oluşur:

- Endotel adezyon molekülleri olan selektinler aracılığı ile nötrofiller öncelikle endotel yüzeyine gevşek bir şekilde yaklaşarak yuvarlanırlar (migrasyon ve yuvarlanma).
- İkinci aşamada yine endotel adezyon molekülleri olan integrinler sayesinde endotele sıkıca tutunma (adezyon) olayı gözlenir.
- Üçüncü aşamada nötrofiller endotel hücreleri arasındaki boşluklardan damar dışına yönelir ve geçerler (transmigrasyon). Burada CD31 (trombosit endotel hücreleri adezyon molekülü-1/PECAM-1) adezyon molekülü görevlidir.
- Endotel dışına göç eden nötrofiller, zararlı etkenleri fagositoz yolu ile ortadan kaldırmaya uğraşırlar. Fagositoz işlemi 3 aşamada meydana gelir; aktif nötrofil öncelikle zararlı etkeni tanır ve üzerine bağlar, zararlı etken nötrofil içerisine alınarak fagosit vakuolü içerisine hapsedilir ve myeloperoksidaz gibi enzimler ile parçalanarak ortamdan uzaklaştırılır (Ryan & Majno, 1977; Tuzlalı, 2014).



Şekil 2.2. İnflamasyon sürecindeki lökosit olayları (Kuralay & Çavdar, 2006)

Nötrofillerin temel fonksiyonu, fagositoz ile mikroorganizmaları ortadan kaldırmaktır ve burada myeloperoksidaz (MPO) enzimi önemli role sahiptir. MPO, Cl^- iyonlarını kullanarak H_2O_2 'yi Hipokloroz aside (HOCl) çevirir. Oldukça reaktif olan HOCl birçok biyolojik molekülü oksitler ve ortamdan temizler (Klebanoff, 1999).

Akut inflamatuvar cevabın amacı, hasara neden olan ajanın inaktivasyonunu ve nötralizasyonunu sağlamaktır. Akut inflamasyon aşağıdaki durumlardan biri ile biter (Baron & Lee, 2006).

Çözülme: Komplike olmayan akut inflamasyonlarda, doku bir rezolüsyon süreci ile normale döner. Bu süreçte, eksudat ve hücre yıkıntıları eritilerek makrofajlar ile lenfatik akım yoluyla ortadan kaldırılır (Ersoy, 2010).

Onarım: İnflamasyona neden olan etken nötralize edilmeden önce dokuda nekroz şekillenmişse, onarım hareketleri aktive olur. Böylece nekroze dokular ya rejenerasyonla ya da skatriks oluşumu ile düzelir (Ersoy, 2010).

İrin oluşumu: Bakteriyel enfeksiyonlarda nötrofillerin aşırı şekilde göçleri ile birlikte erime nekrozu gözlenir (irinli inflamasyon). Nekrotik doku ve nötrofillerin likefaksiyona uğrayan kütlesi irin olarak adlandırılır. İrinli bölgenin bir duvarla çevrilmesi sonucu ise apse oluşumu gözlenir (Ersoy, 2010).

Kronik inflamasyon: Sebep olan etkenlerin akut inflamatuvar cevap ile nötralize edilemediği durumlarda, vücutta bir immun yanıt meydana gelir. Bu da kronik inflamasyona sebep olur (Ersoy, 2010).

2.1.2 Kronik İnflamasyon

İnflamasyon, herhangi bir nedenle iyileştiremez duruma gelirse, akut inflamasyon kronik bir aşama başlatır. Sürekli enfeksiyon durumu oluşması veya kronik hücresel yaralanma gibi, tetikleyici uyarının yok edilmesinin mümkün olmadığı durumlarda, haftalarca ve aylarca devam eden kronik inflamasyon gelişir. Kronik inflamatuvar durumlarda, konakçıya verilen hasar, patojenler gibi yabancı istilacıların değil, konakçının kendisinin oluşturduğu inflamatuvar yanıt tarafından ortaya çıkar (Ahmed, 2011).

Kronik inflamasyon, hücre ve dokulardaki hasarın devamlılığı nedeni ile provoke edilen, uzun süreli (haftalar, aylar ya da belirsiz süreli) bir vakadır. Mononükleer hücre infiltrasyonu, inflamatuvar hücreler tarafından doku yıkımı, fibrozis ve anjiyogenezis ile dokunun onarılması ile ilgilidir (Ersoy, 2010).

Akut inflamasyondan farklı olarak kronik inflamasyonda aşağıdaki mekanizmalar gözlenir:

1. Akut inflamasyonda başlangıçta nötrofilik lökosit infiltrasyonu vardır. Bunu 24 ve 48 saat sonra monositik hücrelerin hâkimiyeti izler. Buna karşılık kronik inflamasyonda makrofajlar, lenfositler ve plazma hücreleri gibi tek çekirdekli hücrelerin varlığı izlenir.
2. İnflamasyonun meydana geldiği dokuda bulunan inflamatuvar hücrelerin salgıladıkları ürünler doku yıkımının gerçekleşmesine neden olur.

3. Yeni damar yapılanması (anjyogenez) ve fibrozisin meydana geldiği doku onarımı gözlenir (Tuzlalı, 2014).

Modern tıp çağındaki kronik inflamasyonun önemi, ateroskleroz, obezite, Tip II Diabetes Mellitus, astım, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar, romatoid artrit ve kanser gibi birçok hastalıkla ilişkili olması nedeniyle göz ardı edilemez hale gelmiştir (Ahmed, 2011).

Kronik inflamasyon yüksek kanser riski ile ilişkili bir rahatsızlıktır. Moleküler düzeyde, kronik inflamasyon sırasında oluşan serbest radikaller ve aldehytler, zararlı gen mutasyonlarına ve kanserle ilgili anahtar proteinlerin post-translasyonel değişikliğine sebep olabilir. Sitokinler, büyüme faktörleri ve NF- κ B gibi transkripsiyon faktörleri de dahil olmak üzere inflamasyonun diğer ürünleri, kanser genlerini (örneğin, tümör baskılayıcı genler ve onkogenler) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi önemli inflamatuvar enzimlerin ekspresyonuna müdahale edebilir. Bu enzimler doğrudan SOR'ları da etkiler. Kronik inflamasyonun prokanseroz sonuçları; DNA hasarı, artan DNA sentezi, hücre çoğalması, DNA onarımı yollarının ve hücresel ortamın bozulması, apoptozis inhibisyonu, anjyogenez ve invazyonun ilerlemesidir. Kronik inflamasyon aynı zamanda immünsupresyon ile alakalıdır ve kanser için risk barındırmaktadır (Hofseth & Wargovich, 2007).

2.1.3 İnflamatuvar Mediyatörler

Histamin, inflamasyona uğramış dokudan, hücrelerden veya plazmadan köken alan inflamatuvar mediyatörlerden ilk keşfedilenidir. Bu mediyatörlerin hücrelerde spesifik reseptörleri bulunur ve salındıklarında birçoğunda kimyasal değişiklikler olmaktadır. Ayrıca uyarılan bir mediyatör diğer bir mediyatörü uyarmakta rol alabilir (Bienvenu, 1995).

Kimyasal mediyatörler 8 maddede sınıflandırılabilir:

2.1.3.1 Vazoaktif aminler

Vazoaktif mediyatörlerden histamin ve serotonin, akut inflamasyonda artmış damar geçirgenliğinden sorumludurlar (Bienvenu, 1995). Kökeni kemik iliği olan mast hücreleri, kanda bulunan bazofiller ve trombositler, histaminin kaynağıdır. Histaminin salınması travmatik olgular, sıcaklık artışı veya azalışı gibi fiziksel etkiler, mast hücrelerinde bulunan kompleman sistem reseptörlerinin uyarılması, alerjik durumlar ve nötrofillerden lizozom proteinlerinin salınımı gibi olaylar sonucunda görülmektedir. Yine mast hücrelerinden kaynaklanan serotonin aynı zamanda aktive olmuş trombositler tarafından da salınmaktadır (Kuralay & Çavdar, 2006).

2.1.3.2 *Plazma proteazları*

İnflamatuvar cevapta plazma kaynaklı maddeler olan kininler, kompleman sistem ve koagülasyon sistemi olarak iki kısımda incelenmektedir. En önemli kininler olan kallikreinler, arter genişlemesine ve damar geçirgenliğinde artışa neden olan bradikinin ve kemotaktik olarak nötrofillerin bir araya toplanmasını sağlar. Kompleman sistemin en önemli bileşenlerinden C3a, vasküler geçirgenliğin artmasında ve histamin salgılanmasında görevlidir. C5a nötrofil kemotaksisinden sorumludur. C3b ise mikroorganizmaların fagositozundan sorumludur (Takabayashi vd., 1996). Fibrinojenin fibrine dönüşmesi esnasında oluşan fibrinopeptidlerle fibrin yıkım ürünleri de koagülasyon kaskadını meydana getirirler (Kuralay & Çavdar, 2006).

2.1.3.3 *Araşidonik asit metabolitleri*

İnflamasyon nedeniyle ya da çeşitli kompleman sistem ürünleriyle (C5a gibi) uyarılan fosfolipaz aktivasyonu hücre zarı fosfolipidlerinin parçalanmasına neden olarak araşidonik asit oluşumuna sebep olmaktadır (Cheeseman & Slater, 1993). Fosfolipaz aktivasyonu sonucu oluşan araşidonik asit daha sonra siklooksigenaz yolu ve lipoksigenaz yoluyla reaksiyona dahil olur ve bu yolla ilerler. Siklooksigenaz yolu prostaglandin ve tromboksan senteziyle biter. Birçok prostaglandin ve tromboksan tanımlanmış olup damar genişlemesi, daralması ve trombosit agregasyonu gibi işlevlerde görülmektedirler (Kuralay & Çavdar, 2006). Lökotrienlerden, hidroperoksieikozatetraenoik asit (HPETE) ve hidroksieikozatetraenoik asit (HETE) hipooksigenaz yolu ürünleridir. Özellikle nötrofillerde bol olarak bulunan 5-lipoksigenaz enziminin etkisiyle araşidonik asitten oluşan bu metabolitler kuvvetli kemotaktik karakterdedirler. Lökositlerin endotelle bağlantı kurmasına da destek olurlar (Haeggstrom, Nordlund, & Thunnissen, 2002).

2.1.3.4 *Lökosit ürünleri*

İnflamatuvar yanıtta çeşitli şekillerde aktifleşen nötrofil ve makrofajlardan salınan lizozomal enzimler ve reaksiyon sonucu meydana gelen serbest oksijen radikalleri lökosit ürünlerini meydana getirir (Cheeseman & Slater, 1993).

2.1.3.5 *Trombosit aktifleştirici faktör (TAF)*

Trombosit aktifleştirici faktör (TAF); nötrofil, bazofil, monosit ve damar endotel hücrelerinin uyarılması sonucu trombositlerin bir araya gelmesini sağlayan ve trombosit stümilasyonunu uyanan mediyatördür. TAF, ayrıca damar geçirgenliğinin artmasında, lökosit yapışmasında ve kemotaksisinde de rolü vardır (Aghabeigi, 1992).

2.1.3.6 *Sitokinler*

İnflamatuvar mekanizmanın oluşumunda, çok çeşitli kimyasal medyatörler bulunmaktadır. Bunların içinde önemli sitokinler, hücreler tarafından salgılanan küçük proteinler bir kısmı oluşurmaktadır (8-26 kDa) ve hücreler arasındaki etkileşimler ve iletişimler üzerinde spesifik etkileri mevcuttur (Zhang & An, 2007).

Sitokin genel bir isimdir; diğer isimler arasında lenfokin (lenfositler tarafından üretilen sitokinler), monokin (monosit tarafından üretilen sitokinler), kemokin (kemotaktik faaliyet gösteren sitokinler) ve interlökin (bir lökosit tarafından üretilen ve diğer lökositler üzerine etki yapan sitokinler-IL) bulunur. Sitokinler, kendilerini salgılayan hücelere (otokrin eylem), yakındaki hücelere (parakrin etki) veya bazı durumlarda uzak hücelere (endokrin eylem) etkide bulunabilirler. Sitokinler birçok hücre nüfusu tarafından oluşturulur, ancak yardımcı T hüceleri (T- Helper, TH) ve makrofajlar baskın üreticilerdir (Zhang & An, 2007).

Polipeptid yapıda olan sitokinler; bakteri ürünleri, toksinler, fiziksel olaylar ve immun sistem tarafından uyarılıp aktive olmuş makrofajlar ve yardımcı T hüceleri (CD4+) gibi hücre gruplarından sekrete olan moleküler yapılarıdır (Park & Barbul, 2004). İnterlökinler (özellikle IL-1, IL-6 ve IL-8) ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), inflamatuvar süreçte etkili olan en önemli sitokinlerdir. TNF- α , proinflamatuvar etkilerinin yanında hücre büyüme ve çoğalmasını düzenlemesi açısından önemli bir yer tutar. Bu sebeple de akut inflamasyonda ve tümör immünitesinde birçok rolü olduğunun çalışmalarla üstünde durulmuştur. Bunlardan başka interlökinlerle birlikte lökosit adhezyonunun ve kemotaksisinin kontrolüyle de ilişkilidir. Yapılan çalışmalar IL-1'in inflamatuvar sindirim sistemi hastalıklarında ve tüberkülozda sitokin üretimini arttırdığı sonucunu göstermiştir. Ayrıca anti-inflamatuvar olarak, aşırı radyasyon dozlarına karşı ve tümör hücelerinin çoğalmasının durdurulması için immün baskılayıcı olarak görev aldığı sonucuna ulaşılmıştır. Bunlardan başka IL-18 ile birlikte vasküler hücre adezyon molekülleri, vasküler endotelyal büyüme faktörü ve hücre içi adhezyon moleküllerinin ekspresyonunda da etkili olduğu konusunda da bilgi sahibi olunmuştur. Dahası IL-1'in siklooksigenaz-2'yi (COX2) ve indüklenabilir nitrik oksit sentazı (iNOS) aktive ettiği dolayısıyla prostaglandin ile nitrik oksit (NO) sentezinde

rol oynadığı belirtilmiştir (Armstrong, Jordan, & Millar, 1996; Dinarello, 2002).

Sitokinler zararlı etkenlere karşı ortaya çıkan en erken bağışıklık ve inflamasyon mekanizmalarında ve mikroplara karşı daha geç gelişen spesifik bağışıklık reaksiyonlarında görev alırlar. Sitokinler, görev aldıkları reaksiyonlara göre, pro-inflamatuar sitokinler ve anti-inflamatuar sitokinler olmak üzere ikiye ayrılırlar (Tuzlalı, 2014; Zhang & An, 2007).

2.1.3.6.1 Pro-inflamatuar sitokinler

Pro-inflamatuar sitokinlerin yapımından ağırlıklı olarak aktive makrofajlar sorumludur ve inflammatuar reaksiyonların başlatılmasında, şiddetinin ve süresinin düzenlenmesinde önemli yer tutarlar. IL-1 β , IL-6 ve tümör nekroz faktörü (TNF)- α gibi bazı proinflammatuar sitokinlerin patolojik ağrı sürecinde yer aldığı birçok kez ispatlanmıştır (Zhang & An, 2007). IL-1, IL-6 ve TNF- α akut inflamasyonda rol alan başlıca etkin pro-inflamatuar sitokinlerdir.

IL-1, öncelikle monositler ve makrofajlar olmak üzere, hücre yaralanması, enfeksiyon, zararlı etken istilası ve inflamasyon sırasında fibroblastlar ve endotel hücreleri gibi bağışıklık sisteminde yer almayan hücreler tarafından da serbest bırakılır (Zhang & An, 2007). IL-1 α ve β , için cDNA'ların 1984'de klonlaması gerçekleştirilmiştir. İkisi de insan kromozomunun 2. Lokasyonunda bulunan iki farklı gen tarafından kodlanmıştır. Hücre ile ilişkili moleküller için 22-31 kDa ve salgılanmış molekül için 17,5 kDa boyutlarındadır. IL-1 β 'nin, özellikle lipopolisakkarit kaynaklı inflamasyon ve ağrıda, TNF- α ile birlikte başlıca sorumlu sitokin olduğu çalışmalarla ispatlanmıştır (Watkins, vd., 1994). Hem IL-1 α hem de IL-1 β , hipotalamusun vasküler endotel hücrelerini uyararak, prostaglandin E2 sentezini arttırıcı ve ateşi uyarıcı etki yapar. Ayrıca T hücre proliferasyonunu da tetikleyebilir (Feghali & Wright, 1997; Warren, 1990).

Mononükleer fagositik hücreler, IL-6'nın en önemli üretim yerleridir. IL-6 aynı zamanda fibroblastlar, endotel hücreleri, B ve T lenfositler, hepatositler, keratinositler, glial hücreler ve kemik iliği stroma hücreleri tarafından da oluşturulur. Akut inflamasyonun başında, IL-6 akut faz yanıtlarına aracılık eder. Pro-inflamatuar bir sitokin olarak aktivitesi sürdüğünde akut inflamasyon, immün yanıtları içeren kronik inflamasyona doğru ilerler. Karaciğer tarafından akut faz protein sentezinin uyarılmasını sağlayan IL-6 ayrıca olgun B hücreleri için bir büyüme faktörüdür ve bu bağışıklık sistemi hücrelerinin antikor üreten plazma hücrelerine dönüşümlerini başlatır. Sistemik juvenil idiyomatik artrit, Tip I Diabetes Mellitus, ankilozan spondilit, Sedef ve Crohn hastalığı, romatizmal artrit de

dâhil olmak üzere bazı inflamatuvar hastalıklarda dolaşımdaki IL-6 seviyeleri artmıştır (Feghali & Wright, 1997; Gabay, 2006; Zhang & An, 2007).

İnflamasyon oluşumunda önemli rol oynayan ve aynı zamanda kaşektin olarak da bilinen bir diğer pro-inflamatuvar sitokin Tümör nekroz faktör alfadır (TNF- α). Öncelikli olarak T lenfositler ve makrofajlar tarafından oluşturulmaktadır. Salgılanan formu 17 kDa, membran formu ise 26 kDa büyüklüğünde olan bir sitokindir (Kriegler, Perez, DeFay, Albert, & Lu, 1988). TNF, 2 hücre yüzeyi reseptörleri olan TNFR1 ve TNFR2 vasıtasıyla, apoptotik yolları düzenleyen, nükleer faktör kappa B (NF-kB) ve stresle aktive protein kinazların (SAPK'ları) aktivasyonu ile inflamasyonu düzenleyen çeşitli sinyal yolları üzerinde yoğunlaşır (Zhang & An, 2007). TNF- α ve IL-1'in birçok inflamatuvar özellikleri benzerdir. TNF- α , IL-1 gibi, doğrudan hipotalamusun vasküler endotel hücreleri tarafından prostaglandin E2 sentezinin uyarılması yoluyla ya da dolaylı olarak IL-1'in serbest bırakılmasıyla ateşin yükselmesine sebebiyet verebilir. TNF- α , IL-6 ve IL-1 gibi, karaciğer tarafından akut faz cevap proteinlerinin üretimini tetiklemektedir (Feghali & Wright, 1997; Watkins et al., 1994; Zhang & An, 2007).

Sepsis sırasında, gram negatif bakterilerden salınan lipopolisakkaritler, makrofajlar tarafından TNF- α 'nın (ve ardından IL-1 ve IL-6'nın) yaygın üretimini indükler. TNF- α 'nın sistemik salınımının, septik şokun karakterize ettiği ateş ve hipotansiyondan sorumlu olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak, TNF- α 'nın bazı kanser ve enfeksiyonlarda ortaya çıkan kaşeksiden sorumlu olduğu akla gelmektedir (Beutler & Cerami, 1988; Feghali & Wright, 1997).

2.1.3.6.2 Anti-inflamatuvar sitokinler

Anti-inflamatuvar sitokinler, pro-inflamatuvar sitokinlerin aktivite ve etkilerini kontrol eden bir dizi immün düzenleyici moleküler yapılardır. Başlıca anti-inflamatuvar sitokinler, IL-1 reseptör antagonisti, IL-4, IL-10, IL-11 ve IL-13 olarak belirtilir. IL-1, TNF- α ve IL-18 için spesifik sitokin reseptörleri de pro-inflamatuvar sitokinler için inhibitörler olarak görev yaparlar (Zhang & An, 2007).

Tüm anti-inflamatuvar sitokinler arasında, IL-10, aktive makrofajlar tarafından salgılanan TNF- α , IL-6 ve IL-1 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu baskılayan, güçlü inflamasyon önleyici özelliklere sahip bir sitokin olarak bilinir. Aktive edilmiş T hücreleri tarafından IFN- γ üretimini inhibe ettiği için, IL-10'a B hücresi türevi T hücresi büyüme faktörü ve sitokin sentezi engelleyici faktör (CSIF) olarak adlandırılmıştır. İnsan IL-10'u için 1990'da klonlanan cDNA'nın, 18 kDa'lık boyuta sahip bir protein olduğu bulundu. IL-10, CD4+ T hücreleri, aktive CD8+ T hücreleri ve aktive B

hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından yapılır (Chen & Zlotnik, 1991; Feghali & Wright, 1997; Zhang & An, 2007).

IL-10, endojen anti-sitokinlerin üretimlerini tetikleyebilir ve pro-inflamatuar sitokin reseptörlerinin üretimlerini suprese edebilir. Dolayısıyla, pro-inflamatuar sitokinlerin üretiminin ve işlevinin, yüksek düzeylerde zit şekilde regülasyonunu sağlamaktadır (Zhang & An, 2007). Etkileri arasında, antijen spesifik T hücre proliferasyonunun azaltılması, nitrik oksit ve prostaglandin sentezinin baskılanması, IL-2 ile indüklenen IFN- γ üretiminin ve monositlerde IL-4 ve IFN- γ ile indüklenen Majör doku uygunluğu bileşeni (MHC) sınıf II proteinlerin ekspresyonlarının inhibisyonu bulunmaktadır (Feghali & Wright, 1997).

T hücresi kaynaklı, B hücresi büyüme faktörü olarak adlandırılan önemli anti-inflamatuar sitokinlerden biri de IL-4'dür. Tip 2 yardımcı T lenfosit (Th2) hücreleri esas kaynak hücreleridir. Ayrıca makrofajlar, monositler, mast hücreleri, bazofiller, fibroblast ve endotel hücrelerinden de salgılanmaktadır. IL-4, TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuar sitokinlerin ve monositler tarafından salgılanan (monokin) parçalayıcı enzimlerin üretim miktarını düşürür. IL-1 β sentezini, özellikle IL-1 reseptör antagonistini (IL-1Ra) uyararak baskılayabilir (Abbas, Lichtman, & JS., 2000; Özbal, 2000).

12-17 kDa'lık bir protein olan IL-13, IL-10 gibi, lipopolisakkarit benzeri etkenler sonrası insan periferel kan monositleri tarafından sekrete edilen IL-1 β , TNF- α , IL-8 ve IL-6 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini inhibe ederek anti-inflamatuar etkinliklerde bulunmaktadır. IL-13, hücre kaynaklı Th2 hücreleri olup, birçok özellikleri IL-4 ile aynıdır (Feghali & Wright, 1997; Gour & Wills-Karp, 2015).

2.1.3.7 *Büyüme faktörleri*

Çeşitli hücre tiplerinin çoğalmasında görev alan büyüme faktörlerinin salgınmasından sorumlu olan makrofajlar, inflammatuar süreçte aktive olma görevini de bünyelerinde bulundururlar. Büyüme faktörleri, diğer mediyatörlerden farklı olarak hücre zarında bulunan reseptörlere bağlanarak etkisini başlatır (Park & Barbul, 2004). Epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblastlar ve birçok epitel hücresi üzerinde mitotik aktiviteyi arttırmaktan sorumludur. Fibroblast büyüme faktörü (FGF) ise damar farklılaşmasında görevlidir. Bunlardan başka özellikle aktif trombositlerden olmak üzere endotel, düz kas ve makrofaj hücrelerinden de salgılanabilen trombosit kökenli büyüme faktörü (TKBF) de hücre çoğalması ve lökosit kemotaksisinden sorumludur (Sessle, 2001).

2.1.3.8 Nitrik oksit (NO), P maddesi ve kalpainler

Nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-arjininden sentezlenen NO, üzerinde taşıdığı eşleşmemiş elektron ile uzun ömürlü olmayan bir serbest radikal olarak bilinir. Endotel hücrelerinde bulunan nitrik oksit sentaz enzimi eNOS, indüklenebilir formda bulunan iNOS ve nöronlardaki ise cNOS olarak isimlendirilir (Rizk, Witte, & Barbul, 2004). Yapılan çalışmalar sonucu NO' in damarlarda vazodilatasyona neden olduğu ile ilgili verilere ulaşılmıştır. Bu etkinin yanında özellikle iNOS' un lipopolisakkaritler, INF- γ ve TNF- α gibi moleküller tarafından uyarılmasıyla makrofajlarda çok miktarda NO üretimi gerçekleştiği ve patojenlere karşı bir savunma sistemi oluşturulduğu sonucu elde edilmiştir. (Cendan vd., 1996). NO' in aşırı üretiminin mast hücrelerinin aktivasyonunu engellediği ve lökositlerin adhezyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir. Bunlardan başka özellikle güçlü bir oksidan olan peroksinitritin (ONOO-) oluşumuna neden olmaktadır (Hibbs, 2002).

Bunların dışında ağrı iletiminde rol oynayan periferik sinirlerin terminal uçlarında yerleşmiş nöropeptid grubu bir mediyatör olan P maddesi, damar genişlemesi ve salgı üretiminde artışa neden olan analjezik etkili bir kimyasal olarak bilinmektedir (O'Connor vd., 2004).

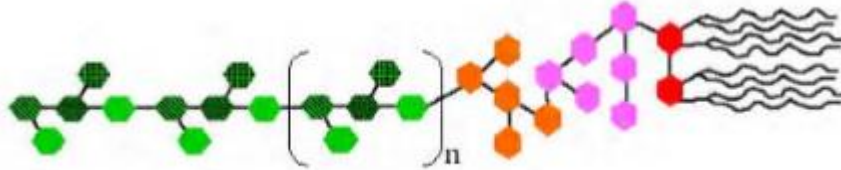
Son olarak kalpainler, birçok nörodejeneratif hastalığın patofizyolojik gelişiminde rol oynayan, inflamasyon, apoptoz ve hücre siklusunda rol alan proteazlar olarak görev yapmaktadır. İnflamasyon oluşumunda önemli bir transkripsiyon faktörü olan NF-kB' nin aktive edilmesini sağlayarak etkinliğini gösterdiğine yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Lancaster, Christman, Blackwell, Koay, & Blackwell, 2001).

İnflamasyonun önlenmesinin pek çok kanser tipinde hastalıktan korunma sağladığı yönünde yapılan çalışmalar da vardır. Özellikle akut inflamasyona nazaran hücre ve doku hasarının uzun süreli seyrettiği kronik inflamasyonun, epiteliyal kanser oluşumunda bir risk faktörü olarak görülmektedir. Ayrıca viseral kanserlerin 5'te 1'inde etken olarak enfeksiyonlar rol oynamıştır (Arık, Güdeloğlu, & Uygur, 2011). İnflamasyon sonucu enfeksiyöz olsun ya da olmasın dokuda gelişen fagositoz aktivitesinin artması ve süperoksit anyonlarının çıkışına bağlı olarak oluşan oksidatif ürünler sebebiyle DNA' da mutasyonların gerçekleştiği gösterilmiştir. Kansere neden olan enfeksiyöz ajan varlığında (*Helicobacter pylori* gibi) serbest oksijen radikallerinin miktarının arttığı ve vücuttaki antioksidan enzimlerin büyük çoğunluğunda bir azalma meydana geldiği belirtilmiştir (Kawanishi & Hiraku, 2006; Zhou, Xiao, Zheng, Dong, & Zhang, 2006).

2.2 LİPOLİSAKKARİT (LPS)

Gram negatif bakterinin hücre duvarı ve sitoplazmik zarından oluşan yapısı hücre zarfı olarak bilinir. Hücre zarfı dış zar, orta tabaka ve plazma zarından meydana gelmektedir. Hücre zarfının birincil işlevi sitoplazmik zarı dış etkilere karşı savunmaktır. Dış zar gram negatif bakterilere özgüdür. Dış zarda primer olarak LPS ve porinler (por proteinleri) bulunur. Ayrıca antijenik özelliğe sahip olan LPS, bakteri lizisine bağlı olarak hücre duvarı parçalanınca, bakteri bölünürken veya protein vezikülleri ile birlikte ortama salınır (Doğan, 2001; Rietschel vd., 1996)

Gram-negatif (-) bakterilerin önemli bir dış zar bileşeni olan Lipopolisakkarit, yapısında polisakkarit ve fosfolipid bulunan 10^5 - 10^8 Da moleküler ağırlığında ve amfifilik karakterde (bir ucu hidrofilik, bir ucu hidrofobik) bir molekül olarak bilinir. LPS'nin endotoksitesi onun kimyasal yapısından kaynaklanır. LPS'ler genel olarak üç büyük yapısal alan içeren ortak bir yapı gösterirler; polisakkarit alan en dış yüzde, çoğu organizmada oldukça değişken olan O-spesifik halkadan meydana gelir ve endotoksinin spesifikliğı ile ilgilidir. Diğer bölge olan orta derecede korunmuş bir çekirdek oligosakkarit yan zincir bölgesi (R-kor oligosakkarit) ise birbirine benzer olan bakterilerde yapı olarak ortaktır. Fosfolipit alan olan iyi korunmuş bir lipit A alanı, toksisitenin oluşmasını sağlayan ve inflamatuvar cevaba neden olan bölgedir (Caroff & Karibian, 2003; Dmitriev, Ehlers, & Rietschel, 1999).



Şekil 2.3. Lipopolisakkarit (LPS)'in yapısı

Escherichia coli (E. coli) gibi Gram-negatif bakterilerin hücre duvarının bir bileşeni olan ve "endotoksin" olarak da adlandırılan lipopolisakkaritler (LPS), sıçan ve farelere uygulandığında inflamasyon gözlenmiştir (Özbaşıoğlu, 2009). Ayrıca bu endotoksinler, pikomolar düzeylerde de olsa, insanlarda doğal bağışıklık sistemini tetikleyecek inflamasyona neden olabilirler (Faraj, McLaughlin, & Erridge, 2017). LPS' nin inflamatuvar süreci başlatmasındaki ilk basamak karaciğer tarafından hepatositlerde sentezlenen moleküler ağırlığı 58 kDa olan akut faz reaktanı lipoprotein bağlayıcı protein (LBP) ile etkileşmesidir. LBP ile bağlanan LPS, monosit, lenfosit ve özellikle makrofajların zarında bulunan molekül ağırlığı 53 kilodalton olan CD14 reseptörlerinin uyarılmasını sağlayarak immün yanıtın başlamasına öncülük eder. Konakçı hücrelerdeki CD14 molekülü glikozilofosfoinozitol yapısında bir

reseptördür. LPS; monosit, lenfosit ve özellikle makrofajların zarında bulunan TLR4 sinyal reseptörü ve yardımcı proteini MD-2 uyarılmasını sağlayarak immün yanıtı sürdürür (Dai, Zhang, & Pruett, 2005; Iontcheva, Amar, Zawawi, Kantarci, & Van Dyke, 2004; Bilgin, 2007). Bu reseptörlerin uyarılması, hücre içerisinde bir dizi sinyal yolunun aktivasyonunu sağlayarak bir nükleer transkripsiyon faktörü olan NF- κ B' yi ve MAPK yolunun aktivasyonunu sağlar. Bunun sonucunda TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-8 ve IL-6 gibi birçok proinflamatuvar sitokin ve iNOS' un ekspresyonunda bir artış gözlenir (Heller vd., 1997). Etkenin ortadan kaldırılmasına yardım eden bu inflamatuvar yanıtın sonunda ise iNOS aracılığıyla oluşan NO, siklooksigenaz-2 (COX-2) etkisiyle oluşan prostaglandinler ve serbest oksijen radikalleri gibi organizmada toksik etkiler oluşturabilecek ürünler görülür. Ayrıca T ve B lenfositlerin uyarılmasına katkıda bulunan LPS, antikör üretilmesini sağlar. Bunlardan başka serum proteazlarının, kompleman sistem elemanlarının ve fagositlerin aktifleşmesinde görev almaktadır (Alexander & Rietschel, 2001; Gnauck, Lentle, & Kruger, 2016; Raetz & Whitfield, 2002).

Birçok Gram-negatif bakteri hücre duvarında LPS bulunmasına rağmen inflamasyon ve sepsis çalışmalarında genellikle *Escherichia coli* (*E. coli*)' nin değişik serotiplerinden elde edilen liyofilize toz halindeki formlarından yararlanılmaktadır (İskit, 2005).

2.3 PEPİNO (SOLANUM MURİCATUM)

Pepino (*Solanum muricatum*), Solanaceae (patlıcangiller) familyasından çok yıllık ya da tek yıllık olarak da yetiştirilebilen bitkilerin meyvelerine verilen addır (Correll, 1962; Anderson & Bernardello, 1991; Anderson vd., 1996).

Genellikle çok yıllık bir bitki olarak Güney Amerika'nın Kuzey Andes Bölgesinde yetiştirilen pepino, daha çok deniz seviyesinin üzerindeki bölgeleri (800-2700 m) sevmektedir. Yeni Zelanda da ise vejetatif olarak çoğaltılır ve yıllık olarak yetiştirilir (Regwell & Turner, 1986; Gonzalez vd., 2000). "Pepino dulce" (İspanyolca'da 'tatlı salatalık') ya da "melon pear" olarak da adlandırılan Pepino meyvesi (*Solanum muricatum* Ait.), dona karşı oldukça hassas ve her zaman yeşil kalabilen bir bitki türüdür (Ahumada & Cantwell, 1996).

Anavatanı Güney Amerika ülkeleri olan pepino meyvesi ülkemizde, gece gündüz sıcaklık farkının fazla olmadığı ılıman iklim koşullarına sahip bölgelerde (Karadeniz, Ege, Marmara ve Akdeniz bölgeleri) üretimi yapılabilmektedir. Türkiye'de üretimine yeni başlanan Pepino çeşidi olan Miski, Peru orijinli olup Güney Amerika'nın diğer bölgelerinde de doğal olarak üretilmektedir (Akay, 1984).



Şekil 2.4. Pepino çiçekleri ve pepino meyvesi (Şimşek,2010)

Canlılıkları çevre koşulları, özellikle sıcaklık ve nem ile değişebilen (Mesquida ve Renard, 1982); çeşitli vitaminler, aminoasitler, organik asitler, mineraller, ozlar ve elementler bakımından zengin (Akay, 1984) olan polen; bitki türlerine göre farklılıklar göstermekle birlikte bünyesinde; vitaminlerden, B1, B2, B3, B5, B6, B9, vitamin H (B7), C, A ve E (Sorkun 1986; Taşkın, 2006); aminoasitlerden, Sistin, Lisin, Histidin, Triptofan, Metiyonin, Fenilalanin, Arjinin, İzolösin, Valin ve Glutamin; organik asitlerden, Parahidroksi Benzoik asit, Askorbik asit, Kafeik asit, Sinnamik asit, Kumarik asit, Ellagik asit, Ferulik asit, Rosmarinik asit, Vanillik asit, Gallik ve Fenolik asitler; elementlerden, Fosfor, Kalsiyum, Magnezyum, Alüminyum, Silikon; ozlardan, Glukoz, Fruktoz ve Sukroz barındırmaktadır (Çakır, 1990).

17. yy' da tarihçi Cobo tarafından suyunun böbrek ateşine yararlı olduğu tespit edilen pepino, yaprak ve meyveleri ile dekoratif bir bitki olup süs bitkileri kataloglarında da yer almakta, kapalı mekanlara asıldığında etrafa çok hoş bir koku bırakmaktadır (Prohens vd., 1996a). Çok yönlü bir bitki olan pepino (Nuez ve Ruiz 1996) olgunlaştığında kavun benzeri bir tada sahip olup (Sweet, 1986; Ruiz vd., 1996a) herhangi bir yemeğin parçası olarak da kullanılabilir.

Pepinodan elde edilen ekstrelerin, tümör gelişimini in vivo ve in vitro olarak çift taraflı inhibe ettiğinin tespit edildiği çalışma; insan ve fare hücre hatları; prostat, mide, karaciğer, göğüs, yumurtalık, kalın bağırsak ve akciğer kanser hücreleri; umbilikal ven endotel hücre ve akciğer diploid fibroblast normal hücreleri üzerinde yürütülmüş, hücre canlılıkları tespit edilmiştir. Farelerin inokülasyonunda mide kanseri hücreleri ile yapılan in vivo çalışma, CSG' nin (100 µg) doğrudan tümör kütesine enjektisinin tümör hacmini düşürdüğünün altını çizmiştir (Ren & Tang, 1999).

Kim' in patentli buluşu; pepino yaprakları, sapı ve meyvesini barındıran meyve ekstraktlarının çeşitli yöntemlerle hazırlanmasıyla elde edilen bir bileşimin, kandaki alkol yoğunluğunu düşürmesi için kullanılmasıyla ilişkilidir. Bu buluşun içeriğini, pepino meyve ekstraktları itibariyle ağırlık olarak % 30-40 pepino meyvesi; % 60-70 pepino yaprakları, pepino sapsarı ve meyan kökü oluşturmakla birlikte bu bileşim; alkol sersemliğinin tedavisinde içecek olarak, alkolizmin tedavisinde ilaç olarak veya diyetsetel lif şeklinde diyet yiyeceği olarak değeriendirilmektedir.

Pepino meyvesinin çeşitleri

Pepino bitkisinin adaptasyonunu sağlamak ve yüksek verim elde edebilmek amacıyla çeşitli islah yöntemleriyle, farklı koşullarda farklı türler de yetiştirilmiştir. Son zamanlarda, Yeni Zelanda'da ve Avustralya'da, Şili'de yetiştirilen "El Camino" ve "Schmidt" gibi türlerin yanı sıra, "Suma", "Miski", "Lincoln Long", "Golden Litestripe" gibi çeşitli ticari ürünler de yetiştirilmiştir (Prohens vd., 1996).

Çok çeşitli şekil ve renkte, sulu, hoş aromalı ve tatlı bir meyve olan 'pepino' günümüzde, Peru, Şili ve Yeni Zelanda'da daha çok ihracı yapılan bir ürün olmakla birlikte Kaliforniya'da ve son yıllarda ülkemizde de ticari bir ürün olarak yetiştirilmektedir. Pepino meyvesinin, "Toma", "Miski Prolific", "Colossal", ve "El Camino" adlarıyla anılan birçok ticari çeşidi de vardır (Ahumada & Cantwell, 1996). Yetiştiriciliği yapılan Pepino çeşitlerinden; El Camino, Toma, Miski, Kawi, Sweet Long, Sweet Round, Puzol, Schimit, Suma, Gold, Golden Litestripe, Asca, Lincoln Long ve Corneraya sayılabilir (Redgwell & Turner, 1986). Ülkemizde şu anda Miski çeşidi üretilmektedir.

Pepino meyvesinin %92' si su ve içerdiği kalori değeri min 25 cal/100 g olup meyvede; sakkaroz, fruktoz ve glikozdan oluşan toplam şekerin %50' sini sakkaroz; uçucu olmayan organik asitlerin %90' dan fazlasını sitrik asit oluştururken; malik asit ve iz miktarlarda quinik asit de bulunmakta olup aspartik asit, toplam serbest amino asitlerin %70' ini; selüloz (%71), pektin (%17) ve hemiselüloz (%11) hücre duvarı polisakkaritlerini oluşturmakta ve birçok meyveden daha yüksek askorbik asit düzeyine (48,0-68,6 mg/100 g) sahiptir. Olgunlaşma sırasında sakkaroz, sitrik asit ve dikarboksilik amino asit seviyelerinde sürekli bir artış olduğu gözlemlenmiştir (Redgwell & Turner, 1986; Yörük, 1997).



Şekil 2.5. Pepino meyvesinin çeşitleri(Rodriguez-Burruezo, 2003)

Gelişmekte olan pepino meyvelerinde, çözünebilir şekerlerin, nişastanın, invertaz ve sakkarozun sintaz aktiviteleri incelendiğinde; sakkarozun, büyümenin erken aşamasında düşük miktarlarda bulunduğu ve meyveler tam büyüklüğüne ulaştığında akümüle olmaya başladığı; olgunlaşmamış meyvede bulunan nişastanın, olgun meyvede çok az olduğu; gelişmekte olan genç meyvelerde çözünebilir asitin invertaz aktivitesi yüksek bulunurken, sakkaroz akümülesyonunun başlamasıyla birlikte düşük seviyelere indiği, genç meyvelerde düşük olan sakkaroz sintaz aktivitesinin ise, olgun meyvelerde arttığı belirlenmiştir (Schaffer vd., 1989).

Pepinonun yüksek oranda askorbik asit içeriğine ve diüretik özelliğe sahip olduğu bilinmektedir (Ren & Tang, 1999). Pepinoda, düşük kalori miktarı ile yüksek askorbik asit içeriğinin bir arada bulunuşu kayda değer olup tansiyon düşürücü ve idrar söktürücü özellikler taşımakta (Sanchez-Vega, 1992) ve sulu ekstraktları kanser hücrelerine karşı tümör karşıtı davranış sergilemektedir (Ren & Tang, 1999).

Yeme olgunluğuna gelen pepino meyveleri krem-sarı renkte, bol sulu ve kavun aromasına sahiptir. Bu sebeple bazı ülkelerde "Armut Kavunu" olarak da adlandırılmaktadır. Kivi, kavun, muz, ananas ve şeftali tatlarının hepsini birden içermesi yanında, pepino C vitamini içeriği yönünden de oldukça zengin bir meyve olarak bilinmektedir. Ayrıca, potasyum, kalsiyum ve demir gibi mineraller bakımından da zengindir (Redgwell & Turner, 1986).

Pepinonun, tedavi edici özellikleri olduğu belirtilmektedir. Kullanımına ilişkin çeşitli olasılıklar olmakla beraber diğer birçok meyveden daha fazla C vitamini yapısında bulundurmaktadır ki bu anlamda antiskorbütik ve tıbbi amaçlı kullanıma da uygun görülmektedir. Çeşidine ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak C vitamini içeriği 45-70 mg/100g arasında değişiklik gösterir (Redgwell ve Turner, 1986). Bu değer çoğu C vitamini kaynağı meyveden bile fazladır. 17.yy'da araştırmacı Cobo, pepinonun niteliklerine dikkat çekerek, meyve suyunun çeşitli merhemlere katılarak böbrek sorunları gibi rahatsızlıklarda rahatlıkla kullanılabileceğini belirtmiştir (Prohens vd., 1996).

Yüksek miktarda kalsiyum ve vitamin içeriği ve antitümör etkisi gibi bazı tıbbi etkileri olan; %9,5 kuru madde içeriği, %4,6 karbonhidrat, %0,06 asit, %34,25 mg C vitamini ve yüksek miktarda A vitamini içeren olgun pepino meyvelerinde; esterler, aldehitler, ketonlar, terpenler, alkoller, mesifuran ve beta-damascenone gibi aromatik ve uçucu bileşiklerin varlığı belirlenmiştir (Guiqin, 1998; Nemati vd., 2009).

Tablo 2.1. 100 g pepino meyvesinin bileşiminde bulunan maddeler (Wills vd., 1986).

	(g)	<u>Vitaminler</u>	(mg)
<u>Protein</u>	0.60	C	31.00
Yağ	0.10	B1	0.03
Su	93.40	B2	0.03
<u>Şeker</u>	(g)	B12	0.40
Glikoz	2.00		
Fruktoz	1.50	<u>Karotenoidler</u>	(mg)
Sakkaroz	1.30	α-Karoten	0.00
Nişasta	0.00	β-Karoten	0.17
Selüloz	1.10		
<u>Organik Asitler</u>	(g)	<u>Mineraller</u>	(mg)
Malik	0.03	K	120.00
Sitrik	0.07	Na	1.00
Diğer	0.00	Ca	5.00
Kül	0.50	Mg	8.00
<u>Enerji (kJ)</u>	93.00	Fe	0.10

2.4 SERBEST RADİKALLER, OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDANLAR

2.4.1 Serbest Radikaller

Organizmadaki metabolik olaylar sonucu doğal olarak oluşan serbest radikaller, vücut tarafından oksidan-antioksidan dengesi adı verilen bir düzen içerisinde. Bu dengenin bozulması birçok hastalığın da patolojisinde rol oynayan oksidatif strese sebep olur (Mercan, 2004). Serbest radikallerin en önemli özelliği son yörüngelerinde, diğer birçok radikal ile paylaşabileceği ve son derece reaktif olan eşlenmemiş bir elektron olmasıdır. Atom çekirdeğinin etrafında bulunan elektronlar 'orbital' denilen yörüngelerde hareketli bir şekilde bulunmaktadır. Kararlı durumlarda ilk orbitalde iki, diğerlerinde sekiz elektron vardır. Serbest radikaller kimyasal olarak kararsız yapıda bulunmaktadır (Kurt, Başaran & Aral, 2005; Rikans, Hombrook & Cai, 1994). Dış orbitaldeki eşleşmemiş elektronun eşleşmesini ve daha kararlı hale gelmesini sağlamak için, herhangi bir molekül veya atom ile etkileşime girerek, o yapıdan bir elektron alma veya bir elektron verme isteğindedirler. Bu nedenden dolayı, diğer moleküllerle reaksiyona girebilecek şekilde aktif bir yapı olma eğilimindedirler. Bunun sonucunda da reaksiyona girdiği molekülü bir radikal haline getirebilir. Böylece diğer moleküllerle reaksiyona girmeye meyilli olup organizmada da temel organik moleküllerin yapılarını bozarak zararlı hale dönüşebilirler. Serbest radikal oluşumunda moleküle bir elektron eklenmesi biyolojik ortamlarda en sık görülen serbest radikal oluşum biçimidir (Mccord, 1993; O'Neill, Stebbins, Bonigut, Halliwell, & Longhurst, 1996; Halliwell & Gutteridge, 1984).

Organizmada serbest radikaller metabolik olaylar sonucu sürekli oluşmakta olup biyolojik sistemlerde meydana gelme yollarında ilk sırayı elektronların radikal oluşturmak için diğer bir moleküle transfer olmaları almaktadır (Seifried, Anderson, Fisher, & Milner, 2007).

2.4.2 Serbest Oksijen Radikalleri

Oksijen (O_2), enerji düzeylerindeki elektronların yapısı nedeniyle oldukça kararsız olan, suda çözünmeyen, kokusuz ve renksiz bir molekül olarak bilinir. Oksijenin kararlılığı açısından oldukça önemli olan bir nokta da ayrı orbitallerde (2P) bulunan elektronların aynı yönde dönmesidir. Çünkü bu elektronlardan bir tanesinin diğer orbitale sıçraması ya da farklı yönde dönmeye başlamasıyla singlet oksijen oluşumu meydana gelmektedir. Oksijenin bu reaktif yapısı ve özellikle oksijen kullanan canlılarda metabolik faaliyetlerdeki kullanımının yüksek derecede olması oksijenin biyolojik sistemlerdeki en önemli reaktif kaynak olmasının sebebidir. Serbest oksijen radikalleri, kendileri radikal olmayan fakat oksijen radikallerinin meydana

gelmesi sırasında açığa çıkan türevleri de bünyesinde bulundurmaktadır (Albayrak, 2015).

Oksijenin radikal türleri, biyolojik ortamlardaki en önemli serbest radikallerdir. Serbest oksijen radikalleri sadece serbest oksijen radikallerini içermezken, oksijen radikali oluşumunda yer alan, radikal olmayan oksijen türlerini de bünyesinde barındırır (Halliwell & Gutteridye, 1984).

Biyolojik sistemlerde, oksidatif fosforilasyonla ATP üretilirken oksijenin indirgenmesi sırasında süperoksit (O_2^-) radikali oluşmaktadır. Zayıf bir oksidan olan O_2^- radikalinin kendi başına önemli hücre hasarlarına neden olması zor olsa da oksidatif strese yol açabilen reaksiyonları başlatabilmesi açısından elzemdir. En önemli reaksiyon olan ve demir gibi geçiş metallerinin (Cu, Mn, Zn, Cr, Co, Ni, Mo) katalize ettiği Haber-Weiss reaksiyonunda dikkat çeken O_2^- , H_2O_2 ve demir varlığında oldukça reaktif olan hidroksil ($OH\bullet$) radikallerini meydana getirir. Hidrojen peroksit ise hücre zarı içerisine girerek daha reaktif olabilecek radikallerin oluşmasına sebep olur. Bu sebeple tüm bu zararların önlenmesi için vücutta bir takım antioksidan sistemler meydana gelmiştir (Nordberg & Arner, 2001; Albayrak, 2015).

Hidroksil radikali DNA'daki deoksiriboz molekülüne etki ederek DNA ve RNA'da bulunan aromatik pürin ve pirimidin bazlarıyla girdiği reaksiyonlar sonucu mutajenik etki gösterebilmektedir. Ayrıca DNA'da zincir kırılmaları meydana getirmektedir (Dizdaroglu, 1991). Peroksil radikali (ROO^-) hücre zarında yer alan yağ asitleriyle birleşip lipid hidroperoksitlere dönüşür ki bu olay reseptörlerin aktivitesini engellediğinden hücre zarı yapısına ciddi hasarlara sebep olmaktadır (Sleep, Wilson, Simmons, & Gratzer, 1999). Bunların dışında nötrofil, makrofajlar gibi hücrelerin fagositik faaliyetleri sonucu oluşan hipokloröz asit yine zararlı bir oksidan olarak bilinmektedir (Marcinkiewicz vd., 2000).

İnflamatuar cevapta rolü olan ve damar endotelinin fizyolojik faaliyetlerini düzenleyen NO ise hücre içinde oluşmuş olan diğer serbest radikallerle reaksiyona girerek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşturmakta ve daha ileri reaksiyonlar sonucu hidroksil radikalinin meydana gelmesine sebep olmaktadır (Marcinkiewicz vd., 2000; Albayrak, 2015).

Hidroksil ($HO\bullet$), süperoksit (O_2^-) gibi reaktif oksijen türleri ve hidrojen peroksit (H_2O_2) baz değişikliği (modifikasyonları), zincir kırığı ve DNA-protein çapraz bağ kırıkları gibi her türlü DNA hasarını meydana getirmektedir. Reaktif oksijen ve azot türleri direk ya da dolaylı olarak hücrel makromoleküllerde geçici ya da kalıcı hasara sebebiyet vermektedir. Böylece, oksidatif stres hasarları meydana gelir. Nükleik asit, protein ve lipid gibi

hücrel makromoleküller üzerinde oksidatif hasarlar kanser dahil birçok hastalığın oluşumuna sebep olmaktadır (Aruoma, 1998).

2.4.3 Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikallerin kaynakları endojen (hücre içi) kaynaklar ve ekzojen kaynaklar olmak üzere ikiye ayrılır:

-Ekzojen radikal kaynakları: Ekzojen olarak organizmada serbest radikal üretimine neden olan etmenler olarak; havadaki azot dioksit ve kükürt dioksit gazları, çözücüler, pestisitler, asbest gibi kimyasallar, radyasyon, ultraviyole ışınları, stres, aşırı alkol tüketimi, çoklu doymamış yağ asitleri, yüksek kalorili beslenme, DNA hasarına yol açabilecek aşırı demir ve bakır tüketilmesi verilebilir (Albayrak, 2015).

-Endojen radikal kaynakları: Mitokondrial elektron transport sistemi, iskemi, travma, inflamasyon, intoksikasyona bağlı oksidatif stres durumları, peroksizom enzimleri, tioller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidroproteinler, endoplazmik retikulum ve nukleus zarındaki elektron transport sistemleri, NADPH oksidaz, lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz gibi hücre içi enzimler de endojen radikal kaynakları olarak sayılabilir (Akpınar, 2003; Çam, 2007).

2.4.4 Serbest Oksijen Radikallerinin Biyokimyasal Etkileri

Biyolojik sistemlerdeki metabolik aktivitelerin sonucu oluşan serbest radikaller birçok hastalığın patogeneğinde rol oynar. Fakat doğal mekanizmalar tarafından meydana gelen serbest radikaller hücre içerisinde değişik roller de üstlenmiştir. Son yıllarda süperoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) ikinci haberci olarak görev yaptığı düşüncesi hızla kabul görmektedir. Son yirmi beş yılda yapılan araştırmalar serbest radikallerin hücre fonksiyonlarını düzenlediğini kanıtlar nitelikte sonuçlar vermiştir. Özellikle hidrojen peroksit ile yapılan çalışmalar, onun hücre içerisinde insülin büyüme faktörü gibi görev yaptığını gösterir niteliktedir. Redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin keşfi sonrası NO'nin guanilat siklaz aracılığıyla vazodilatasyonda ve sinir iletiminde rol oynadığı ispatlanmıştır. Bu gelişme serbest radikallerin ikinci haberci olarak işlev yaptığının diğer bir kanıtı olarak gösterilebilmektedir. Pek çok araştırmadan elde edilen bu gibi veriler serbest radikallerin hedefleri ve sinyal yolları hakkındaki görüşleri aydınlatmaktadır (Bobrowski, 2005).

Vücudumuzdaki tüm moleküller serbest radikaller tarafından hasara uğratılma riskiyle karşı karşıya kalmaktadır. Böyle hasarlı moleküller hücre

fonksiyonlarını bozarlar ve hatta birçok patolojik durumda hücre ölümlerine sebep olacak kadar büyük sonuçlar doğurabilirler (Devasagayam vd., 2004).

Serbest oksijen radikalleri normal metabolizmanın ürünü olarak oluşabildikleri gibi; organizmanın; iyonize radyasyona, oksitleyici ajanlara ve yabancı maddelere maruz kaldığı durumlarda da oluşabilir. Lipidler, proteinler ve nükleik asitler serbest oksijen radikallerinin en önemli hedefleridir. Hücre veya zarların lipid bileşenleri serbest radikallerin genellikle karşılaştıkları ilk yapıdır. Ayrıca in vivo ve in vitro yapılan çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin karbonhidratlara, lipidlere, proteinlere ve DNA ya zarar verdiği açığa çıkarılmıştır (Çolak,2011).

2.4.4.1 Lipidlere etkileri ve lipid peroksidasyonu

Hücre zarları çoklu doymamış yağ asitleri açısından zengindir. Çoklu doymamış yağ asitleri, oksitleyici radikaller için kolay hedeflerdir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve zincirleme olarak kendiliğinden süren bir reaksiyondur (Halliwell & Gutteride, 1984; Kulisic, Radonic, Katalinic & Milosa, 2004).

Lipid peroksidasyonu sırasında açığa çıkan ve etkisini oluştukları alan dışında da gösterebilen çok sayıda toksik madde ikinci haberciler olarak görev yapabilirler. Lipid peroksidasyonundan kaynaklanan hasarlar hücre fonksiyonlarının devamlılığı açısından da oldukça etkilidir. Lizozomal zarların tahribi hidrolitik enzimlerin salınması ve intrasellüler sindirimin gerçekleşmesine katkı sağlar. Biriken hidroperoksitler direkt olarak toksik etkiye sebep olabilirler. Bunların yanı sıra duyarlı aminoasit kalıntılarını (methionin, histin, stein, lizin) okside eder veya zincir polimerizasyon reaksiyonlarıyla enzimleri inaktive hale getirebilirler (Devasagayam vd., 2004; Albayrak, 2015).

Bir proton ve bir elektrona sahip olan hidrojen atomu radikal özelliğe sahiptir. Biyolojik bir molekülden bir hidrojen atomu ayrıldığında geride kalan molekülde eşleşmemiş bir elektron kalır. Hidroksi radikali gibi etkili olan radikaller, bir hidrojen kopararak biyolojik molekül ile etkileşmeye başlarlar. Bu reaksiyon lipid peroksidasyonunu başlatır. Bu reaksiyonlar dört basamakta gerçekleşir (Aruoma,1998; Gutteridge, 1995).

- 1. Başlama basamağı:** HO• radikali, bir yağ asidinin (LH) metilen kısmından bir hidrojen atomu (H) kopararak lipid radikalini ortaya çıkarır.

- 2. İlerleme basamağı:** Zincir reaksiyonu, oluşan lipid radikaline O₂ takviyesi ile devam eder ve lipid peroksi radikali (LOO•) ile lipid hidroperoksidi (LOOH) meydana gelir.
- 3. Yıkım basamağı:** Tek elektron üzerinden yeniden yapılanma lipid parçalanması ile sonlanır. Bu oluşan ürünlerden birisi, malondialdehittir (MDA). Kan ve idrarda miktarı belirlenebilir.
- 4. Sonlanma basamağı:** Zincir reaksiyonu, antioksidanlar tarafından ayrıca radikallerin birbiri ile tepkime vermesiyle bitebilir.

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitlerinin (LOOH) yıkımı için geçiş metallerinin katalizi şarttır. Lipid peroksitleri (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan, hücre düzeyinde metabolize edilen ve başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayan aldehitler açığa çıkar. Malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (HNE) ve çeşitli 2-alkenaller bunlar içerisinde en önemlileridir. Malondialdehit (MDA) kanda ve idrarda gözlenir ve lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi bir korelasyonu vardır. Lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonu ürünlerinden birisi olan MDA konsantrasyonu tiyobarbitürik asit (TBA) metodu kullanarak plazma ve çeşitli doku homojenatlarında düzeylerine bakılabilmektedir. Sonuçta düzeyler TBA ile MDA ve diğer perokside lipid yıkım ürünleri reaksiyonu ile oluşan kırmızı kromoforun 532 nm' de absorpsiyonunun ölçülmesi ile belirlenmektedir (Bobrowski, 2005; Yangı, 2012).

Lipid peroksidasyonu, zar lipid yapısındaki değişiklikleri nedeni ile zar işlevinin bozulması, oluşan serbest radikallerin enzimler ve diğer hücre bileşenleri üzerine etkisi, son ürünler olan aldehitlerin sitotoksik etkileri sebebiyle farklı yollarla hücre hasarına sebep olduğunu düşündürmektedir (Çolak, 2011).

2.4.4.2 *Proteinlere etkileri*

Serbest radikallerin proteinlere etkisi proteinin aminoasit içeriğine göre farklılık göstermektedir. Bunun dışında oransal olarak daha fazla disülfid bağı içeren hücre dışı proteinler (IgG, albümin gibi) hidroksil ve peroksi radikali saldırısına daha duyarlıdır. Serbest radikallerin meydana getirdiği hasar nedeniyle proteinlerde fragmentasyon, çapraz bağlanma, proteinin agregasyonu ve dolayısıyla bazı enzimlerin inaktive olması sonucu meydana gelebilir. Özellikle kükürt içeren (sistein, sistin gibi) aminoasitlerin ve doymamış bağ içeriklerinden dolayı aromatik aminoasitlerin (tirozin, triptofan, fenilalanin) radikallerden etkilenmeleri çok daha olasıdır. Yapısında demir bulunan hemoglobin gibi proteinler önemli derecede zarara uğrarlar. Oksihemoglobinin süperoksit radikali veya hidrojen peroksitle reaksiyona

girmesi ferrihemoglobin ya da methemoglobin adı verilen hipoksiye neden olan bileşikleri meydana getirir (Devasagayam vd., 2004; Erenel vd., 1992; Reznick vd., 1992).

Serbest radikallerin protein yapısında meydana getirdikleri bu deformasyon, proteinlerin antijenitesinde, nörotransmitter fonksiyonlarında ayrıca zar proteinlerinin işlevlerinde bozulmalara sebep olmaktadır. Proteinlerin artan oksidasyonu yaşlanmayla beraber birçok hastalığın oluşumunda rolü vardır. Beyin hücrelerinin ve yaşlanan hücrelerin lizozomlarında toplanan perokside olmuş lipid ve proteinlerin bir agregatı olan lipofuscinin, nörodejeneratif hastalıklarla ilişki içerisinde olduğunu göstermektedir (Devasagayam vd., 2004; Erenel vd., 1992; Reznick vd., 1992).

2.4.4.3 *Karbohidratlara etkileri*

Normal fizyolojik koşullarda uygun pH ve sıcaklıkta glukoz gibi monosakkaritlerin otooksidasyonu ile hidrojen peroksit ve okzaldehitler açığa çıkabilir. Hidroksil gibi serbest radikaller rastgele olarak karbohidratın karbon atomlarından birinden hidrojen atomu kopararak karbon merkezli radikaller meydana getirebilir. Oluşan serbest radikallerin hyaluronik asidi parçalayarak gözde katarakta sebep olması ve romatoid artritte olduğu gibi nötrofillerin aktivasyonu sonucu oluşan zararlı oksiradikaller serbest radikallerin karbohidratlara etkilerine örnek olarak verilebilir (Devasagayam vd., 2004; Erenel vd., 1992).

2.4.4.4 *DNA'ya etkileri*

Sağlığa zararlı oksijen metabolitlerinden doğrudan nükleik asitler de etkilenecek baz hidroksilasyonu, DNA iplikçiklerinin çapraz bağlanması veya kırılması gibi sonuçlar doğurabilir. Hücrede oluşan serbest radikaller, nükleik asitler de mutasyonlara ve hücre ölümlerine yol açabilir. Sitotoksisite, büyük oranda nükleik asit baz değişimlerinden ileri gelen kromozom değişikliklerine veya DNA'nın yapısındaki diğer bozukluklara bağlıdır. Özellikle hidroksil radikalının bazlarla ve deoksiriboz şekeriyle çok kolay bir şekilde reaksiyona girmesi ve ayrıca hidrojen peroksitin de zarlardan kolayca geçerek çekirdeğe, oradan da DNA'ya ulaşarak hücre ölümüne yol açması radikallerin nükleik asitlere oldukça zarar verebileceğinin bir işareti olarak öngörülebilmektedir. Hidroksil radikali saldırısına en hassas bölge olarak pirimidin bazların C4-C5 çift bağı öne çıkar. Timin glikol, urasil glikol, 5-hidroksideoksiuridin gibi pirimidin hasar ürünleri bu hidroksil saldırısı sonucu meydana gelir. Hücrede oluşabilecek toksisite özellikle nükleik asit baz değişimlerinden ve kromozomlarda meydana gelebilecek hasarlardan kaynaklanmaktadır. Aynı zamanda malondialdehitin de çekirdekte DNA ile reaksiyona girebilmesi

potansiyel zararını göstermektedir (Halliwell & Gutteridge, 1984; Auraoma, 1998; Albayrak, 2015).

Nükleazların aktivasyonu sonucu DNA kırılması gerçekleşir. Serbest radikaller ve özellikle malondialdehit, hücre çekirdeğinde başlıca DNA ile tepkimeye girmektedir. Nükleik asit yapısındaki baz değişimleri veya DNA zincir kopması sonucu kromozomal yapıda değişiklikler oluşturarak neden olmaktadır (Fausto, 2000; Halliwell & Gutteridge, 1984).

Hasar, doğrudan veya dolaylı özellik gösterebilir. Doğrudan hasar, H₂O₂' den oluşan hidroksil radikalının DNA' ya çok yakın bir yerde oluşması ve onu kırması şeklinde gerçekleşir. Dolaylı olarak ise hücre içi sıvıda serbest Ca²⁺'nin artışı proteazları aktive hale geçirebilir. Bunun sonucunda hücre iskeletinde değişiklikler meydana gelir. Oksijenli sistemlerde karbon merkezli şeker radikaline moleküler oksijenin eklenmesi sonucu peroksil radikallerini meydana getirmektedir. Şeker peroksil radikallerinin en karakteristik özelliği karbon-karbon bağı kırarak alkali bölge kurmalarıdır. C-5 merkezli peroksil radikali, oksil radikaline dönüştürülerek DNA zincirinin kırılmasına, sağlam bazın ve şekerin serbest kalmasına neden olmaktadır. DNA'daki değişikliğe uğramış şeker grupları DNA zincirinden salınabilir ya da fosfat bağlarıyla DNA'ya bağlı durumda bulunabilir. Baz ve şeker radikallerinin reaksiyonları; değişik modifiye baz ve şekerler oluşumuna, kontrolsüz baz dizilimine, zincir kırılmalarına ve DNA-protein çapraz bağların oluşarak sitotoksisteyesebep olabilirler. Bugüne kadar oksidatif olarak değişikliğe uğramış yaklaşık 20 tip DNA saptanmıştır. Sonuçta mutajenik ve kanserojenik etkiler gözlenmektedir (Fausto, 2000; Devasagayam vd., 2004; Halliwell & Gutteridge, 1984; Albayrak, 2015).

Reaktif nitrojen ürünleri (nitrojen dioksit, peroksinitrit, dinitrojen trioksit ve nitrik asit gibi) de DNA'da nitrozasyon ve deaminasyon tepkimeleri ile mutajenik bir aktiviteye neden olurlar. DNA' da meydana gelen bu değişikliklerin yaşlanma ve kanserle doğrudan ilişkili olması yüksek düzeyde önem taşır (Devasagayam vd., 2004; Halliwell & Gutteridge, 1984; Albayrak, 2015).

2.4.5 Oksidatif Stres

Serbest radikal moleküllerinin varlığı, antioksidan savunma gücü ile dinamik bir denge içinde bulunduğu sürece organizmanın faydasıdır. Örneğin; fagositik hücreler tarafından mikroorganizmaların öldürülmesinin ana mekanizması serbest radikal üretimi olarak görülmektedir. Serbest radikaller apoptozun tetikleyicisi, habercisi ve efektörü olarak işlev görürler. Bu şekilde; aşırı hücre çoğalmasını önleyerek homeostazide rol oynarlar. Serbest radikaller ikinci haberci olup, transkripsiyon faktörlerini

aktifleştirirler. Hücresler arası haberleşmede görevleri vardır. Hücresinin büyümesini sağlayan olayları düzenlerler. Sitolozde ve mitokondride üretilen serbest oksijen radikali, protein sistein kalıntılarının redoksunu düzenleyerek proteinlerin yapı ve işlevinin düzenlenmesinde görev alırlar (Aruoma, 1998).

Organizmada serbest radikallerin zararlı etkileri ortaya çıkmadan etkisizleştirilmesini sağlayan güçlü savunma sistemleri vardır. Serbest radikallerin oluşum hızı ile etkisizleştirilme hızı dengede olduğu sürece organizma bu bileşiklerin etkisinde kalmamaktadır. Buna karşılık savunma azalır ya da bu zararlı bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa, bu denge bozulup serbest radikallere bağlı zararlı etkileri ortaya koymaya başlar. Serbest radikallerin doku ve hücrelerde oksidatif stres olarak etkileri bulunur (Çolak, 2011).

2.4.5.1 Oksidatif Stresin Etkileri

- 1) Hücre organelleri ve zarındaki lipid ve protein yapısını bozarlar.
- 2) Hücre içi yararlı enzimleri etkisiz hale getirirler.
- 3) DNA yapısını bozarlar.
- 4) Mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarlar.
- 5) Elastaz, proteaz, fosfolipaz, ksantin oksidaz gibi litik enzimleri aktive eder.
- 6) Hücresinin potasyum kaybını artırırılar.
- 7) Trombosit kümelenmesini artırırılar.
- 8) Dokulara fagosit toplanmasını artırırılar.
- 9) Hücre dışındaki kollajen doku parçalarını, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar.
- 10) Mikro ve makromolekülleri etkileyerek kapiller geçirgenliği bozarlar. (Yangı, 2012)

2.4.6 Antioksidan Sistem

Organizmada sürekli biçimde serbest radikal niteliğinde bileşikler ortaya çıkmaktadır. Ancak bu radikallerin organizmaya zarar vermesi güçlü bir savunma sisteminin varlığı nedeniyle önlenmektedir. Prooksidan-antioksidan dengenin bozulmaması dolayısıyla oksidatif stresin oluşmaması ve oluşacak zararlı etkilerin en aza indirilmesi, organizma açısından kritik düzeyde önemlidir. Serbest radikaller ve onların eylemlerini nötralize edebilen antioksidanlar, farklı aşamalarda etkilerini ortaya koyarlar. Bu etkiler;

- ✚ **Toplayıcı etki:** Serbest oksijen radikallerini tutma veya daha zayıf bir moleküle çevirme işlemi,
- ✚ **Baskılayıcı etki:** Serbest oksijen radikallerine bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif hale dönüştürme işlemi,
- ✚ **Kırıcı etki:** Serbest oksijen radikallerinin zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleme işlemi,
- ✚ **Onarıcı etki:** Zincir ve serbest oksijen radikallerinin yapmış olduğu hasarı tamir etme işlemidir (Devasagayam vd., 2004; Zerin, Karakilçik, Nazligül, Bitiren, & Özardali, 2004).

Antioksidan etkinlik, aktivasyon enerjisi, reaksiyondaki hız sabiti ve yükseltgenme-indirgenme potansiyeli arasında bir ilişki bulunmaktadır. En etkili antioksidanlar serbest radikal zincir reaksiyonunu durdurmak üzere etki gösterenlerdir. Genellikle aromatik veya fenolik halkalar içeren bu antioksidanlar oksidasyon sırasında oluşan serbest radikallere H• vererek kendilerini radikal haline dönüştürürler (Brewer, 2011).

İmmün sistemdeki hücrelerin savunma görevlerini gerçekleştirebilmek için serbest radikallere ihtiyaçları olsa da serbest radikallerin aşırı üretimi veya antioksidan sistem tarafından etkisiz hale getirilememeleri hücre ölümü ve doku hasarı ile sonuçlanmaktadır (Blokhina, Virolainen, & Fagerstedt, 2003).

2.5 KARACİĞER FONKSİYON TESTLERİ

2.5.1 Alanin Aminotransferaz (ALT)

ALT, karaciğer hasarının göstergesi olarak en fazla yararlanılan testtir. Karaciğer hücrelerinin sitoplazmasında bulunur. Genellikle protein sentezinde kullanılarak karaciğer hasarının tespitinde görev alır. Karaciğer hasarının olması durumunda ALT değeri yükselir. AST değerine göre daha karmaşık bir yapıya sahiptir (Hsu, Lin & Chen 2018).

2.5.2 Aspartat Aminotransferaz (AST)

AST, karaciğer hasarının belirlenmesinde ALT ile birlikte kullanılır. Karaciğer hücrelerinde, beyinde, pankreasta, akciğerlerde, böbreklerde, kırmızı kan hücrelerinde ve kalp iskelet kasının yapısında bulunur. Karaciğer hücrelerinin sitoplazma ve mitokondrilerinde oluşabilir. Karaciğerlerin protein sentezinde görev alır (Hsu, Lin & Chen 2018).

2.5.3 Alkalen Fosfataz (ALP)

ALP, karaciğer ve kemik hasarlarının gözlemlenmesinde genellikle GGT ile birlikte kullanılır. Safra kanallarına yakın olan karaciğer hücrelerinin ve kemiklerin yapısında bulunur. ALP değerinin yükselmesiyle safra kanallarının tıkanıklığından söz edilebilir. ALP ve GGT değerleri birlikte yükselebilir. GGT değeri normal değerlerde olmasına rağmen ALP değerinde yükselme görülüyorsa buna bağlı olarak; kemiklerde hasar oluşması, kemik rahatsızlıkları ve kemik iliği hastalıklarının gözlemlenmesi söz konusu olabilir (Zhang vd., 2016).

2.5.4 Gamma Glutamil Transferaz (GGT)

GGT, karaciğer hücrelerinde görülebilen, safra kanallarına yakın olan enzimdir. Safra kanallarının tıkanıklığında kullanılır. Genellikle ALP değeri ile birlikte yükselir. Ayrıca aşırı alkol alımına bağlı olarak yükselebilir (Noyan, 2009).

2.6 İNFLAMASYON VE ENDOTEL FONKSİYON PARAMETRELERİ

2.6.1 C-Reaktif Protein (CRP)

CRP en duyarlı akut faz reaktanlarından biri olarak uzun zamandır bilinmektedir. Plazma düzeyi genellikle myokard infarktüsü, stres, travma, enfeksiyon, inflamasyon, cerrahi ve neoplastik proliferasyon sonrası dramatik olarak artar. CRP'nin belirlenmesi organik hastalıkların taranmasında, inflamatuvar hastalığın aktivitesinin değerlendirilmesinde, sistemik lupus eritamatozus, lösemi veya cerrahi sonrası araya giren enfeksiyonların saptanmasında (plazma düzeyinde sekonder artış) ve bakteriyolojik inceleme için örnek alınımının güç olduğu neonatal septisemi ve menenjit takibinde klinik olarak yararlıdır (Ertorun, 2015).

2.6.2 Miyeloperoksidaz (MPO)

MPO'nun halojenürler ve tiyosiyanata ek olarak nitrit (NO₂), tirozin, askorbat, ürat, ketakolaminler, östrojenler ve serotonin gibi başka doğal substratları bulunmaktadır (Van der Vliet vd., 1997). Myeloperoksidazın serumda artışının birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir.

MPO'nun, inflamasyon ve kardiyovasküler hastalıklar arasında önemli bir rolü olduğu son zamanlarda yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Saldırgan patojenleri öldürmenin yanı sıra, MPO'nun enzimatik reaksiyonunda ortaya çıkan oksidanlar endotel disfonksiyona, ateroskleroz, akut koroner sendromun gelişimi ve myokard infarktüsün gelişimine neden olmaktadır (Aratani vd., 2004).

2.7 OKSİDATİF STRES PARAMETRESİ

2.7.1 Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olup, oksidatif hasar düzeyini belirtmek için kullanılır. MDA, lipid peroksidasyon ürünleri arasında hücrede en fazla bulunan ürünlerden biridir. Ayrıca MDA, prostoglandin biyosentezinde de üretilmektedir. MDA'nın, memeli hücrelerinde ve insanlarda mutajenik karakterde, fare ve ratlarda ise karsinojenik karakterde olduğu gösterilmiştir (Spalding, 1988).

3 GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)(Merck, Almanya)
- Asetik Asit (Sigma, Almanya)
- Tiyobarbütirik Asit (TBA) (Sigma, Almanya)
- Sodyum Hidroksit (Merck, Almanya)
- Bakır (II) Sülfat (Merck, Almanya)
- Çinko (II) Sülfat (Merck, Almanya)
- Sülfürik Asit (Sigma, Almanya)
- Sülfanilamid (Sigma, Çin)
- Glisin (Sigma, Almanya)
- N-Naftiletilediamin (Sigma, Almanya)
- Dipotasyum Hidrojen Fosfat (Sigma, Almanya)
- Potasyum Dihidrojen Fosfat (Merck, Almanya)
- Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) (Sigma, Almanya)
- Hekzadesil Trimetil Amonyum Bromid (HETAB) (Sigma, Almanya)
- Tetrametilbenzidin (TMB) (Sigma, Almanya)
- N-N-Dimetil Formamid (Sigma, Almanya)
- Lipopolisakkarit (LPS) (Sigma, İsrail)
- Tetraetosipropan (Sigma, Çin)
- Hidrojen Peroksit (Carlo Erba Reagent, Almanya)
- Dimetilsüfoksit (DMSO) (Sigma, ABD)
- İndometazin (Sigma, Almanya)
- TNF- α ELISA Kit (İnvitrogen, ABD)
- Serum Fizyolojik (Eczacıbaşı, Türkiye)

3.2 Deneylerde Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler:

- Hassas terazi (Sartorius BP121S)
- pH Metre (HANNA pH 211)
- Vorteks (WiseMix VM-10, WISD)
- Derin Dondurucu, -80°C (Thermo, ULT 1386-5-V40)
- Su banyosu (Nüve BM402)
- Santrifüj (Nüve NF800)
- Santrifüj, soğutmalı (Jouan MR22)
- Spektrofotometre (Shimadzu, UV-1601)
- Çalkalayıcı (WiseMax)
- Mikropleyt okuyucu (PerkinElmer2030 Multilabel reader, Victor X3)
- Mikropleyt yıkayıcı (BioTek ELx50)
- Otomatik Pipet (Eppendorf)
- Eppendorf Tüp (2 ml) (Eppendorf)

- Jelli Tüp (BD Vacutainer)
- Cobas otoanalizatör (Roche Diagnostics)

3.3 Deney Hayvanları

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma ve Klinik Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi. Çalışma için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından 2015 tarihli 449-1 karar numarası ile Etik Kurul onayı verildi. Sıçanlar ESOĞÜ Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi (TICAM)'nden temin edildi ve deney sonlanımına kadar bu merkezde barındırıldı.

Deneylerde 180-250 g ağırlığında 31 adet erişkin dişi Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ışıklandırması olan, ısı (22 ± 2 °C) ve nemi (%45- 50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda polikarbonat şeffaf kafeslerde barındırıldı. Tüm sıçanlara standart sıçan yemi ve çeşme suyu temin edildi. Deney süresince hayvanlar günlük olarak kontrol edilerek genel morfolojik görünüşleri (tüy dökülmesi, dışkılama bozuklukları) makroskobik olarak değerlendirildi. Herhangi bir yem ve su kısıtlaması yapılmadı.

Tüm cerrahi işlemler ve ötenazi, anestezi altında gerçekleştirildi. Cerrahi işlemler öncesinde tüm sıçanlara anestezi sağlamak için intramusküler 80 mg/kg Ketamin ve analjenik/kas gevşetici olarak ise intramusküler 10 mg/kg Ksilazin uygulandı.

3.4 Bitki Ekstresinin Hazırlanması

Solanaceae familyasına ait *Solanum muricatum* (pepino) meyveleri toplandıktan sonra kabukları soyuldu; sulu kısımları ezilerek suları alındı; kalan kısım derin dondurucuda dondurulduktan sonra liyofilize edildi. Kurutulmuş ekstraktlarda % verim hesaplandı.

3.5 Deney Grupları

Deney grupları, kontrol grubunda 7 adet ve diğer gruplarda 8 adet sıçan olacak şekilde oluşturuldu.

Grup 1 (LPS Kontrol) : Bu grup deney hayvanlarına %0.05'lik DMSO 7 gün boyunca gavaj yoluyla verildi. 7. gün % 0.9'luk NaCl içinde çözülerek hazırlanan 5 mg/kg LPS'nin intraperitoneal enjeksiyonundan 24 saat sonra diseksiyon işlemleri gerçekleştirildi.

Grup 2 (Pepino 250+LPS) : Bu grup deney hayvanlarına %0.05'lik DMSO içinde çözülen 250mg/kg pepino ekstraktı 7 gün boyunca gavaj yoluyla verildi. 7. gün % 0.9'luk NaCl içinde çözümlenerek hazırlanan 5 mg/kg LPS'nin intraperitoneal enjeksiyonundan 24 saat sonra diseksiyon işlemleri gerçekleştirildi.

Grup 3 (Pepino 500+LPS) : Bu grup deney hayvanlarına %0.05'lik DMSO içinde çözülen 500 mg/kg pepino ekstraktı 7 gün boyunca gavaj yoluyla verildi. 7. gün % 0.9'luk NaCl içinde çözümlenerek hazırlanan 5 mg/kg LPS'nin intraperitoneal enjeksiyonundan 24 saat sonra diseksiyon işlemleri gerçekleştirildi.

Grup 4 (İndometazin+LPS) : Bu grup deney hayvanlarına %0.05'lik DMSO içinde çözülmüş 5 mg/kg indometazin 7 gün boyunca gavaj yoluyla verildi. 7. gün % 0.9'luk NaCl içinde çözümlenerek hazırlanan 5 mg/kg LPS'nin intraperitoneal enjeksiyonundan 24 saat sonra diseksiyon işlemleri gerçekleştirildi.

3.6 Yöntemler

3.6.1 Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

7 gün boyunca gavaj yoluyla verilen DMSO çözeltisi, pepino ekstresi ve indometazinden sonra 7. gün intraperitoneal olarak yapılan LPS enjeksiyonu ile oluşturulan inflamasyonda, ekstre ve referans ilacın koruyucu etkinliği değerlendirmek üzere, sıçanların diseksiyon işlemleri 8. gün gerçekleştirildi. Sıçanlardan kardiyak kan ve karaciğer doku örnekleri alındı. Kan örnekleri jelli tüplere alındıktan sonra 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen serum örnekleri alikotlanarak biyokimyasal analizlerin yapılacağı güne kadar -80 °C'de buzdolabında muhafaza edildi. Alınan karaciğer dokusunun bir kısmı biyokimyasal analizlerinyapılacağı zamana kadar -80 °C'de saklanırken, kalan kısmı histopatolojik analizler için %10'luk tamponlu nötral formaldehid solüsyonu içerisinde, karanlık ve serin bir ortamda muhafaza edildi.

3.6.2 Oksidatif stres ile ilişkili ölçümler

3.6.2.1 Malondialdehit (MDA) düzeylerinin ölçümü

Bu çalışmada tüm gruplara ait doku örneklerinde gerçekleştirilen MDA ölçüm yöntemi, MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile verdiği renk reaksiyonu esasına dayanmaktadır(Ohkawa, Ohishi & Yagi, 1979). Doku MDA ölçümü için homojenat örnekleri, karaciğer dokuları 1 g doku başına 9 ml 0.15 N KCl

olacak şekilde homojenize edilerek hazırlandı. MDA düzeylerinin ölçümü için gerekli çözeltiler aşağıdaki gibi hazırlandı:

1) Sodyum dodesil sülfat (SDS): 8.1 g SDS tartılarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2) % 20'lik asetat tamponu (pH:3.5): 20 ml glasiyel asetik asit distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Tampon hazırlanırken pH ayarı NaOH ile yapıldı.

3) Tiyoarbütirik asit (TBA) (pH:5.5-7): 0.8 g TBA tartılarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti hazırlanırken pH ayarı NaOH ile yapıldı.

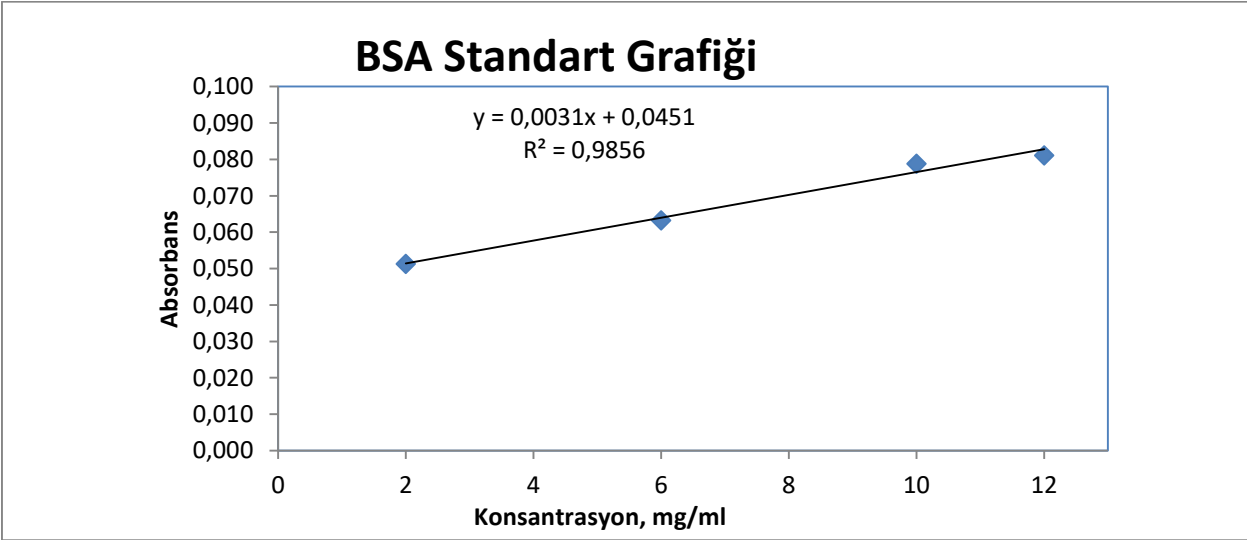
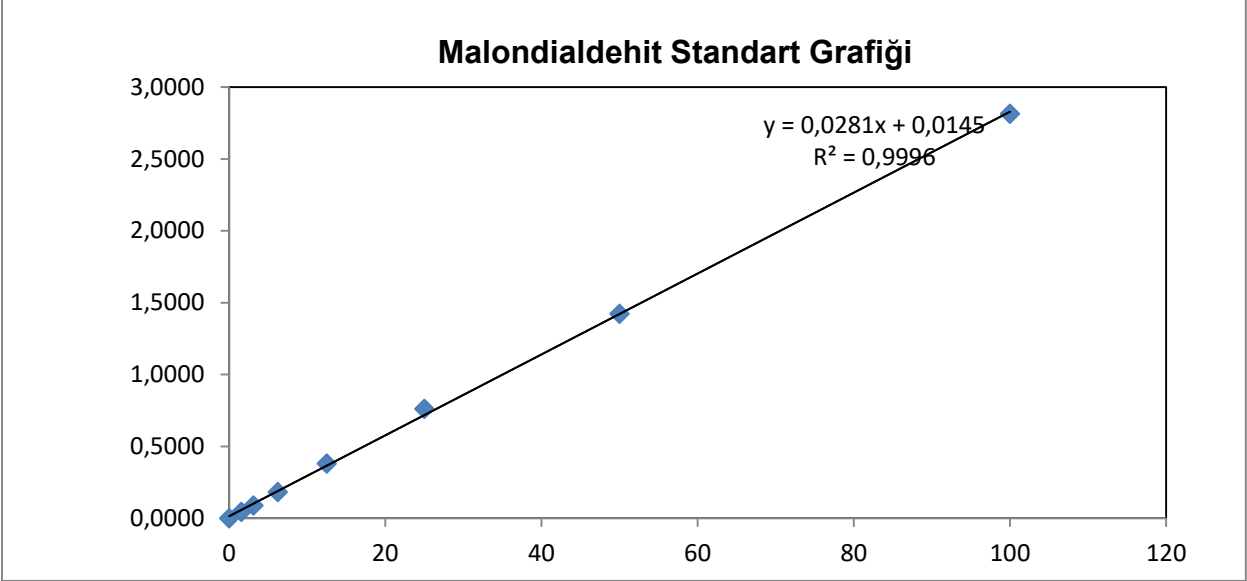
Kör ve numune tüpleri Tablo 3.1'de verildiği gibi hazırlandı.

Tablo 3.1. MDA ölçümü prosedürü

	KÖR TÜPÜ	NUMUNE TÜPÜ
HOMOJENAT	-	400 µl/500 µl
SDS	200 µl	200 µl
ASETİK ASİT	1500 µl	1500 µl
TBA	1500 µl	1500 µl
DİSTİLE SU	800 µl	400 µl

Hazırlanan tüplerin her biri 95 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda tüpler musluk suyu ile soğutuldu ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlardan 532 nm'de spektrofotometrede absorbans okumaları yapıldı. 10, 20, 40, 60, 80, 100 nmol/mL konsantrasyonlarda hazırlanan 1,1,3,3-tetraetoksipropan çözeltileri aynı işlemlerden geçirilerek standart grafiği hazırlandı. Standart grafiği yardımıyla, ölçülen absorbans değerlerinden numune MDA konsantrasyonları hesaplandı. Homojenatların total protein düzeyleri Gornall ve ark. (1949)'nın yöntemiyle ölçülerek numune MDA konsantrasyonları ile oranlandı. Doku MDA sonuçları nmol/mg protein olarak verildi.

Doku homojenatlarında yapılan protein ölçümleri için önce aşağıdaki standart grafiği çizildi.



3.6.3 İnflamasyon ve Endotel Fonksiyon Belirteçleri

3.6.3.1 HsCRP ölçümü

HsCRP ölçümü İmmünotürbidimetrik ölçüm prensibine dayanan bir testtir. Lateks mikropartiküllerine bağlanmış anti-CRP antikorları ile numune içindeki antijenin bir antijen/antikor kompleksi oluşması esasına dayanır. Aglutinasyonun ardından serum hsCRP düzeyleri türbidimetrik olarak ölçüldü.

3.6.3.2 Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin ölçümü

Nötrofil infiltrasyonu ve inflamasyon göstergelerinden biri olan miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi serum ve doku örneklerinde Suzuki ve ark. tarafından bildirilen yöntemle ölçüldü. Yöntem, MPO'nun katalizlediği reaksiyon ile 3,3'-5,5'-tetrametil benzidin (TMB) molekülünün oksidasyonunun ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Doku MPO aktivitesi ölçümü için homojenat örnekleri, karaciğer dokuları 1 g doku başına 9 ml 50 mM potasyum fosfat tamponu olacak şekilde homojenize edilerek hazırlandı.

Serum ve doku MPO aktivitelerinin ölçümü için gerekli çözeltiler aşağıdaki gibi hazırlandı:

- 1) 50 mM Potasyum Fosfat tamponu (pH 7.4):** 6.80 g KH_2PO_4 tartılarak distile suda çözüldü. 8.70 g K_2HPO_4 tartılarak distile suda çözüldü. Karıştırılan çözeltiler 1 lt'ye tamamlandı.
- 2) 50 mM Potasyum Fosfat tamponu (pH 6.0):** 7.4'e ayarlanmış olan Potasyum Fosfat tamponunun içine %0.5'lik HETAB konur ve 10 mM EDTA ile pH:6.0'ya ayarlandı.
- 3) 160 mM Potasyum Fosfat tamponu (pH 5.4):** 21.77 g.tampon 160 mM KH_2PO_4 ve 160 mM K_2HPO_4 çözeltileri ile hazırlandı ve pH 5.4 'e ayarlandı.
- 4) 3,3'-5,5'- Tetrametilbenzidin (TMB):** 0,384 g TMB 100 ml N-N dimetil formamid de çözüldü.
- 5) %0.06'lık Hidrojen Peroksit (H_2O_2) çözeltisi:** 0.1 ml stok H_2O_2 alınarak distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

MPO aktivitesi ölçümü için kör ve numune tüpleri Tablo 3.2'de verildiği gibi hazırlandı.

Tablo 3.2. MPO aktivitesi ölçüm prosedürü

	KÖR TÜPÜ	NUMUNE TÜPÜ
POTASYUM FOSFAT TAMPONU	500 µl	500 µl
TMB	100 µl	100 µl
HOMOJENAT VEYA SERUM	-----	20 µl
DİSTİLE SU	350 µl	330 µl
H₂O₂	50 µl	50 µl

Her bir tüpe H₂O₂ hariç tüm reaktifler sırasıyla konuldu. Okumadan 1-2 dk önce H₂O₂ eklendi. Numunelerin köre karşı 37°C'de 655nm'de 5 dakika boyunca absorbans artışı izlendi. Sonuçlar serum için U/mL, doku için ise U/mg protein olarak hesaplandı.

3.6.3.3 Nitrik Oksit (NO) düzeylerinin ölçümü

Birçok çalışmada vücutta endojen olarak üretilen NO konsantrasyonu total nitrit ve nitrat cinsinden hesaplanır. Çünkü üretilen NO çok hızlı bir şekilde önce nitrite (NO₂⁻) sonra da nitrata (NO₃⁻) dönüşür. Deproteinizasyon işlemi ile ortamdan proteinler uzaklaştırıldıktan sonra nitrit ve nitrat ölçümlerine geçilir (Cortas & Wakid, 1990).

Bu çalışmada tüm gruplara ait serum ve doku örneklerinde gerçekleştirilen NO ölçümü Cortas ve ark.'larının yöntemine dayanmaktadır (Cortas & Wakid, 1990).

NO düzeylerinin ölçümü için gerekli çözeltiler aşağıdaki gibi hazırlandı:

- 1) 0.05 M Sodyum Fosfat tamponu (pH 7.0):** 6.8 g. NaH₂PO₄ tartılıp distile su ile çözeltisi hazırlandı. 7.098 g. Na₂HPO₄ tartılıp distile su ile çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan iki çözelti karıştırılarak hacimleri distile su ile 1 lt'ye tamamlandı.
- 2) 5 mM CuSO₄ çözeltisi:** 0.2496g. CuSO₄ tartılıp üzerine 200 ml distile su eklendi.
- 3) 75 mM ZnSO₄ çözeltisi:** 4.313g. ZnSO₄ tartılıp üzerine 200 ml distile su eklendi.
- 4) 55 mM NaOH çözeltisi:** 0.44g. NaOH tartılıp üzerine 200 ml distile su eklendi.
- 5) 0.1 M H₂SO₄ çözeltisi:** 1.647 ml. tartılıp üzerine 300 ml distile su eklendi.
- 6) Glisin çözeltisi:** 15 g. glisin distile suda eritildi.

- 7) Sülfanilamid:** 5 g. Sülfanilamid 500 ml ısıtılmış 3M HCl içerisinde çözüldü.
- 8) N.Naftiletiledimin:** 50 mg. N.Naftiletiledimin 250 ml distile suda çözüldü.

3.6.3.3.1 Nitrik Oksit (NO) çalışma prensibi

Doku homojenatının hazırlanması:

Karaciğer dokuları homojenizatör kullanılarak 1/10 oranında soğuk 0.1 M Fosfat tamponu (pH:7.4) ile homojenize edildi. Doku homojenatları 4000 x g'de ve +4°C'de 20 dakika süre ile santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi.

1) Deproteinizasyon işlemi:

125 µl homojenat, 500 µl 75 mM çinko sülfat çözeltisi üzerine 625 µl 55 mM NaOH çözeltisi ilave edildi. 10 dakika beklendi. Daha sonra 10 dakika 1163 g. de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar ölçüm için kullanıldı.

2) Kadmiyum aktivasyonu:

Yaklaşık 750 mg kadmiyum 0,1 M sülfirik asit içinde bekledikten sonra alındı. 3 kez distile suda yıkandı. 2 dak. 5 mM CuSO₄ içerisinde beklenip drenaj yapılarak glisin (%1,5) ile 3 kez yıkandı ve 10 dk. içerisinde kullanıldı.

3) Reaksiyon:

250 µl glisin, 250 µl süpernatant ve 500 µl distile üzerine aktive edilmiş kadmiyum eklendi. 90 dak. oda sıcaklığında beklendi. Buradan 500 µl alınarak üzerine 25 µl distile su, 250 µl sülfanilamid (%1) ve 250 µl Naftiletiledimin (%0,02) çözeltisi eklendi ve 45 dak. oda ısısında beklendi. Oluşan renk 545 nm'de Elisa okuyucuda 96 kuyucuklu plakalara aktarılarak spektrofotometrik ölçüm prensibine göre değerlendirildi (Cortas & Wakid, 1990).

Standart Sodyum Nitrit (NaNO₂) Çözeltisi: Stok çözelti seyreltilerek 5, 10, 20, 50, 100 µmol/L konsantrasyonlarda NaNO₂ çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiler kadmiyumsuz ortamda direkt renklendirilerek standart eğri elde edildi. 100 µM NaNO₂ çözeltisi hazırlamak için 6.9 mg NaNO₂ tartıldı, bir miktar distile su içinde çözümlenerek son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

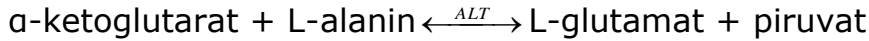
Nitrik Oksit Düzeylerinin Hesaplanması:

- Standart tüplerine 2 mL NaOH, 2.5 mL ZnSO₄, 1 mL glisin tamponu eklendi. Kadmiyumsuz ortamda 1 mL sülfanilamid ve 1 mL N.naftiletilediamin ve farklı konsantrasyonlardaki standartlardan numaralandırılmış tüplere eklendi.
- Kör ve örnek tüplerinde olduğu gibi işlemlerden geçirildi ve 545 nm'de absorbansları okundu. Standartların absorbansları kullanılarak standart eğri oluşturuldu.
- Doku homojenatlarının nitrit konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.
- Doku nitrik oksit düzeylerinin hesabı için, aynı doku homojenatların total proteinleri ölçüldü ve örneklerin konsantrasyonları total proteinlerine oranlandı. Doku nitrit düzeyleri, µmol/mg protein olarak verildi.

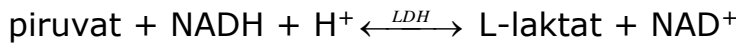
3.6.4 Karaciğer Hasarı Belirteçleri

3.6.4.1 ALT Ölçüm Test Prensibi

Alanin aminotransferaz enzim aktiviteleri standardize edilmiş UV-fotometrik ölçüm prensibine dayanan Roche Cobas c501 otoanalizör cihazında ALT test kitiyle belirlenmiştir.



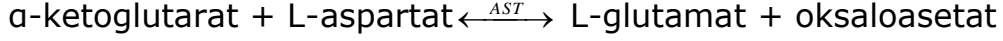
ALT enzimi bu denge reaksiyonunu katalize eder. Piruvattaki artış, laktat dehidrojenazın katalize ettiği bir indikatör reaksiyonunda tayin edilir.



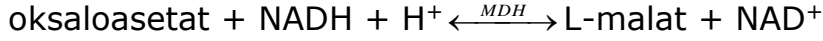
NADH, NAD'ya yükseltgenir. Fotometrik olarak tayin edilen NADH'nin azalma hızı; piruvatın oluşma hızı ve böylelikle ALT aktivitesiyle doğru orantılıdır.

3.6.4.2 AST Ölçüm Test Prensibi

Aspartat aminotransferaz enzim aktiviteleri standardize edilmiş UV-fotometrik ölçüm prensibine dayanan Roche Cobas c501 otoanalizör cihazında AST test kitiyle belirlenmiştir.



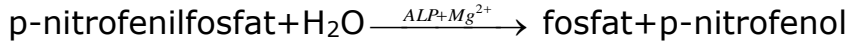
AST enzimi bu denge reaksiyonunu katalize eder. Oksaloasetattaki artış, malat dehidrojenazın katalize ettiği bir indikatör reaksiyonunda tayin edilir.



NADH, NAD⁺'ya yükseltgenir. Fotometrik olarak tayin edilen NADH'nin azalma hızı, oksaloasetatın oluşma hızı ve böylelikle AST aktivitesiyle doğru orantılıdır.

3.6.4.3 ALP Ölçüm Test Prensipleri

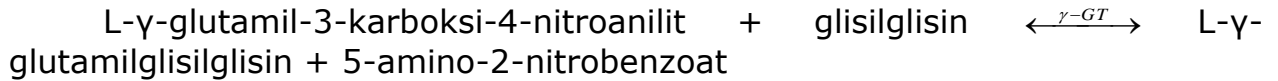
Alkalin fosfataz enzim aktiviteleri standardize edilmiş kolorimetrik ölçüm prensibine dayanan Roche Cobas c501 otoanalizör cihazında ALP test kitiyle belirlenmiştir.



p-nitrofenil fosfat, ortamda magnezyum ve çinko iyonları bulunduğunda, fosfat ve p-nitrofenolün oluşması için fosfatazlar ile hidrolize edilir. Açığa çıkan p-nitrofenol ALP aktivitesiyle doğru orantılıdır ve fotometrik olarak ölçülebilir.

3.6.4.4 GGT Ölçüm Test Prensipleri

Gamma-glutamilttransferaz, L-γ-glutamil-3-karboksi-4-nitroanilidin γ-glutamil grubunu glisilglisine transfer eder. Serbest kalan 5-amino-2-nitrobenzoat miktarı GGT aktivitesi ile orantılıdır ve fotometrik olarak tayin edilebilir.



3.6.5 İnflamatuvar Belirtecini Ölçümü

3.6.5.1 Tümör Nekroz faktörü - α (TNF- α) Düzeyleri

Serum TNF-α düzeyleri rat TNF-α (KRC3011, Invitrogen Corporation, USA) kantitatif ELISA test kiti kullanılarak ölçüldü.

TNF - α Düzeyleri Ölçüm Metodu Prensibi:

İnvitrogen TNF- α kiti solid faz sandviç Enzim Bağlı İmmün Ölçüm (ELISA) prensibine dayanır. Rat TNF- α molekülüne spesifik monoklonal antikolar strip halindeki kuyucuklara kaplanmıştır.

İlk inkübasyon sırasında, bilinen konsantrasyondaki TNF- α standartları, kontroller ve bilinmeyen örnekler kuyucuklara pipetlenir. Yıkamadan sonra biyotin ile konjuge edilmiş ikincil antikolar eklenir. Tekrar yıkama işleminden sonra streptavidin ile konjuge peroksidaz enzimi eklenir. Üçüncü inkübasyondan sonra bağlanmayan enzimler yıkama işlemiyle uzaklaştırılır. Substrat solüsyonu ilave edilerek bağlı enzimlerin reaksiyonuyla renk değişimi gözlenir. Renk şiddeti TNF- α konsantrasyonu ile orantılı olarak değişim gösterir.

TNF - α Düzeyleri Ölçüm Materyalleri

- 1) Rat TNF- α Standartları**
 - ✚ Kit içeriğinde 2 adet liyofilize şişe halinde bulunmaktadır.
- 2) Standart Dilüsyon Tamponu**
 - ✚ % 0,1 Sodyum azid içerisinde 25 ml'lik 1 adet şişe halinde kit içeriğinde mevcuttur.
- 3) İnkübasyon Tamponu**
 - ✚ 1 adet şişe içerisinde 12 ml'lik tampon kit içeriğinde mevcuttur.
- 4) Rat TNF- α Kontrolleri (Yüksek ve Düşük Konsantrasyon)**
 - ✚ % 0,1 sodyum azid içerisinde liyofilize halde 2 şişe halinde kit içeriğinde mevcuttur.
- 5) Rat TNF- α Biotin Konjugatı**
 - ✚ % 0,1 Sodyum azid içerisinde 11 ml'lik 1 adet şişe halinde kit içeriğinde mevcuttur.
- 6) Streptavidin – HRP (100X)**
 - ✚ 3,3 mM Timol içerisinde 0,125 ml'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.
- 7) Streptavidin – HRP Dilüent**
 - ✚ 3,3 mM timol içerisinde 25 ml'lik şişede 1 adet kit içeriğinde mevcuttur.
- 8) Konsantre Yıkama Tamponu (25X)**
 - ✚ 100 ml'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.
- 9) Stabilize Kromojen, Tetrametil benzidin (TMB)**
 - ✚ l'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.
- 10) Stop Solüsyonu**
 - ✚ 25 ml'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.

TNF - α Düzeyleri Ölçüm Metodu

a. Örneklerin Hazırlanması

- ✚ Tüm kit bileşenleri ve serumlar oda ısısına getirildi. Serumlar mikrofüj tüpünde İnkübasyon Tamponu içinde 1:2 oranında seyreltildi ve well'lere koyulmadan önce iyice karıştırıldı.

b. Kontrollerin Hazırlanması

- ✚ Vial üzerindeki bilgiye göre hazırlanıp seyreltilmeden kullanıldı.

c. Standartların Dilüsyonu

- ✚ Rekonstitüe (2,000 pg/mL) standart hazırlanışı: Vial üzerindeki bilgiye göre Standart Seyreltme Tamponu ile hazırlandı. Dikkatli karıştırılıp en az 10 dakika oda ısısında bekletildi. 1 saat içinde kullanıldı.

- ✚ Diğer standartların hazırlanışı:

Standartlar (pg/ml)	Standart seyreltme tamponu	Eklenecek solüsyon
750	375 μ l	225 μ L 2000 pg/mL'den
375	300 μ l	300 μ L 750pg/mL'den
187.5	300 μ l	300 μ L 375 pg/mL'den
93.8	300 μ l	300 μ L 187.5pg/mL'den
46.9	300 μ l	300 μ L 93.8pg/mL'den
23.4	300 μ l	300 μ L 46.9pg/mL'den
11.7	300 μ l	300 μ L 23.4pg/mL'den
0	300 μ l	---

d. Streptavidin – HRP Hazırlanması:

- ✚ Oda sıcaklığındaki Streptavidin HRP Konsantresinden (100X) 8 kuyucuk için 10 µL alınıp 1 mL StreptavidinHRP Diluent ile seyreltildi (11x8 kuyucuk için 110 µL konsantreye 11mLdilüent).Hazırlanan bu solüsyon Streptavidin-HRP Çalışma Solüsyonu'dur. Nazikçe karıştırılıp 15 dakika içinde de kullanıldı.

e. Yıkama Tamponu dilüsyonu:

- ✚ Oda sıcaklığındaki Yıkama Tamponu Konsantresi (25X) kullanılmadan önce karıştırıldı. 1:25 oranında distile su ile seyreltildi (20 mL 500mL'ye seyreltilir). Hazırlanan bu solüsyon Çalışma Yıkama Tamponu' dur. Kuyucuk başına harcanan miktar hesaplanarak gerekli miktarda tampon hazırlandı.

Ölçüm Prosedürü:

1. Deney için gerekli 8 kuyucuklu strip miktarı belirlendi ve kullanılmayacak fazla stripler tekrar orijinal kabına yerleştirildi.
2. Sıfır standart kuyucuklarına 100 µL Standart Seyreltme Tamponu eklendi. Kromojen körü için ayrılmış well(ler) boş bırakıldı.
3. Uygun kuyucuklara 100 µL standartlardan eklendi.
4. Uygun kuyucuklara örnekler ve/veya kontrollerden 100 µL eklendi.
5. Plate kapatıldı ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Bu aşamada örnek, standart ve kontroller içindeki mevcut TNF-α molekülleri kuyucukların iç duvarına kaplanmış TNF-α antikorları tarafından tutulur.
6. Kuyucuklar 400 µL yıkama tamponu ile 4 kez otomatik plate yıkama cihazında yıkandı ve sonrasında plate, emici kağıt üzerine ters çevrilerek vuruldu.
7. Kromojen körü hariç her kuyucuğa biyotinlenmiş Rat TNF-α Biotin Konjugatı'ndan 100 µL pipetlendi.
8. Plate kapatılarak ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
9. Kuyucuklar yine aynı 6.basamaktaki gibi 4 kez yıkandı. Plate, emici kağıt üzerine ters çevrilerek vuruldu. (Bu sırada Streptavidin-HRP Çalışma Solüsyonu hazırlandı).

10. Kromojen körü hariç her kuyucuğa 100 µL Streptavidin-HRP Çalışma Solüsyonu eklendi.
11. Plate kapatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
12. Altıncı basamaktaki yıkama işlemi tekrarlandı.
13. Tüm kuyucuklara 100 µL Substrat (tetrametilbenzidin - TMB) eklendi ve karanlık bir ortamda 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Renk maviye dönmeye başladı.
14. İnkübasyon işlemi bitiminde tüm kuyucuklara 100 µL stop solüsyonu eklendi ve stop öncesi mavi rengin sarı renge değiştiği gözlemlendi. Renk değişimi örnekteki TNF-α konsantrasyonuyla orantılı olarak 450 nm'de absorbands düzeyleriyle belirlendi.
15. Tüm sonuçlar standartlar ile dilüsyonlarına karşılık çizilen absorbands eğrisi üzerinden hesaplandı. Örnek sonuçları dilüsyon faktörüyle çarpılarak verildi.

3.6.6 Karaciğer Doku Örneklerinin Histolojik Analizleri

Ötanazi uygulanan hayvanlardan elde edilen karaciğer dokuları %10'luk tamponlu nötral formaldehit ile tespit edildi. Çeşme suyu ile yıkanan dokular sırasıyla %70, 80, 90 ve 96'lık etil alkol serisinden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilol içinde şeffaflaştırılan dokular sıvı parafinlerden geçirilip bloklar haline getirildi. Elde edilen parafin bloklardan 5 mm kalınlığında seri kesitler alınarak hematoksilin-eozin tekniği ile boyandı ve ışık mikroskobunda değerlendirildi. Mikroskoba monte dijital kamera ile görüntüler alındı.

3.6.6.1 Skorlama

Histopatolojik değişiklikler yarı kantitatif yöntemle puanlandı. Bunun için Sherif ve Al-Shaalan tarafından uygulanan skorlama yönteminde kullanılan kriterlere tarafımızdan iltihabi hücre infiltrasyonu da eklenerek skorlama yapıldı (Sherif & Al-Shaalan, 2018). Karaciğer kesitlerinin her birinde rastgele seçilen 10 mikroskobik alanda iltihabi hücre infiltrasyonu, kanama, sinüzoidal konjesyon, hepatosit dejenerasyonu ve parankimal nekroz 0-5 arasında puanlandı. Puanlama aşağıdaki şekilde yapıldı:

- 0: normal histoloji
- 1: Lezyon alanların <%10'unda gözlemlendi.
- 2: Lezyonların %11-25'inde gözlemlendi.
- 3: Lezyonların %26-50'sinde gözlemlendi.
- 4: Lezyonların %51-75'inde gözlemlendi.
- 5: Lezyon alanların >%75'inde gözlemlendi.

Sonunda toplam skor hesaplandı.

3.6.7 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda yapıldı. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences) Statistics Version 20 paket programı kullanıldı. Öncelikle gruplar arasındaki değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadığı analiz edildi. Parametrik verilerin normal dağılıp dağılmadığı değerlendirildi. Normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılmaları Tek Yönlü Varyans Analiz (Oneway ANOVA) testi kullanılmıştır. Veriler, ortalama±standart sapma (SD, standard deviation) olarak verildi. Normal dağılım göstermeyen verilerin karşılaştırılmalarında ise Kruskal-Wallis kullanılmıştır. Veriler ortanca değer, 25'inci ve 75'inci yüzdelerik değerler olarak ifade edilmiştir. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4 BULGULAR

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular uygun istatistik yöntemler ile değerlendirilmiş ve gruplara ait veriler hem tablo hem de grafik halinde belirtildi.

4.1 Oksidatif Stres Belirteci

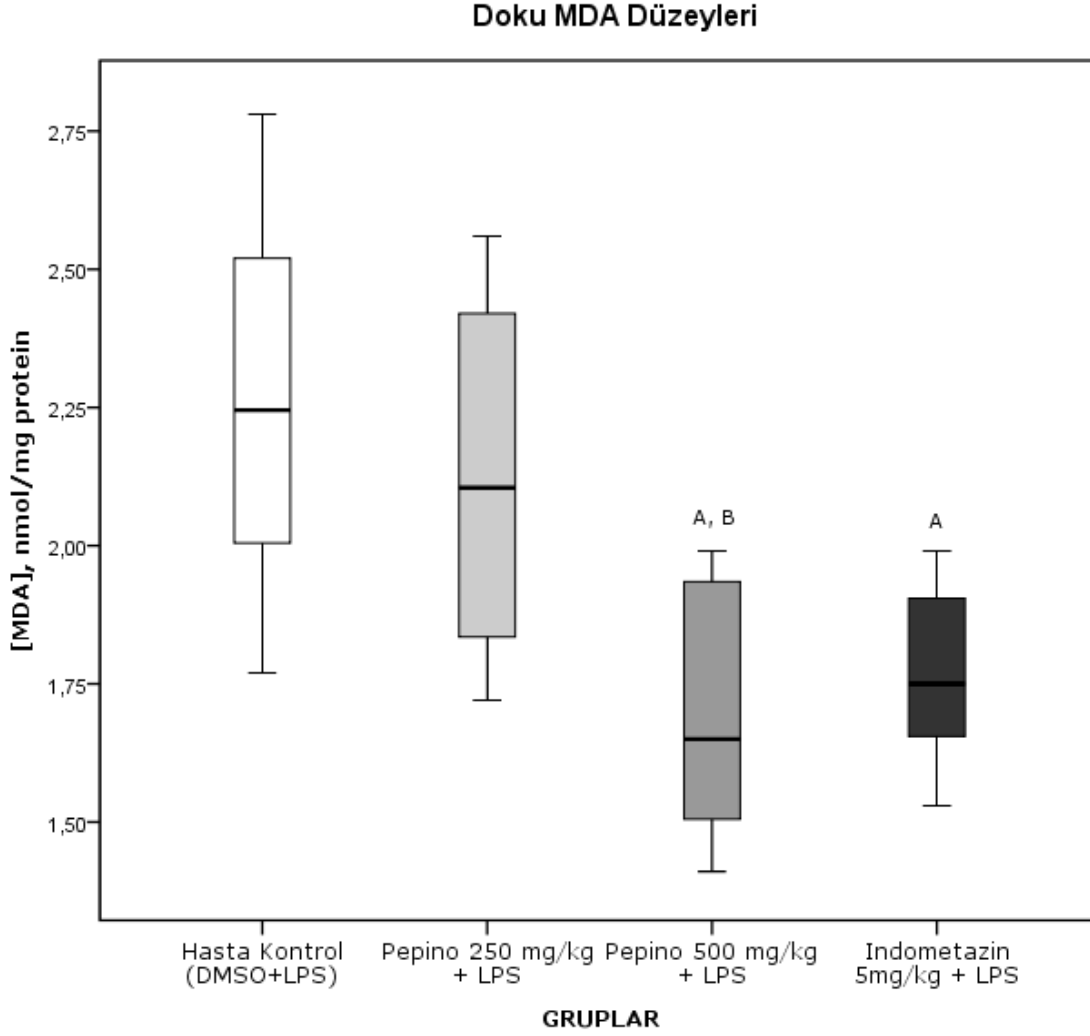
4.1.1. Doku MDA düzeyleri

Çalışma gruplarımızın doku MDA düzeyleri Tablo 4.1' de verilmiştir.

Tablo 4.1.Çalışma Gruplarının Doku MDA Düzeyleri (nmol/mg protein)

GRUPLAR	MDA (doku) Ortalama±SD
HASTA KONTROL (Grup 1)	2,26±0,34
LPS + 250 mg/kg pepino (Grup 2)	2,13±0,33
LPS + 500 mg/kg pepino (Grup 3)	1,70±0,23 ^{A,B}
LPS + 5 mg/kg İndometazin (Grup 4)	1,77±0,16 ^A

Çalışma gruplarımızın doku MDA değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.1'de verildi. Çalışma gruplarımızın doku MDA değerleri sırasıyla; 2,26±0,34; 2,13±0,33; 1,70±0,23; 1,77±0,16 nmol/mg protein olarak bulunmuştur. Grup 1'e göre istatistiksel olarak değerlendirme yapıldığında Grup 3 ve Grup 4'te ileri derecede azalma gözlemlendi ($p<0,001$). Grup 2'ye göre istatistiksel olarak değerlendirme yapıldığında ise Grup 3'te ileri derecede azalma bulundu ($p<0,001$). Diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ($p>0,05$)



A; Grup 1'e göre fark: $p < 0,001$
 B; Grup 2'e göre fark: $p < 0,001$

Şekil 4.1. Doku MDA düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması

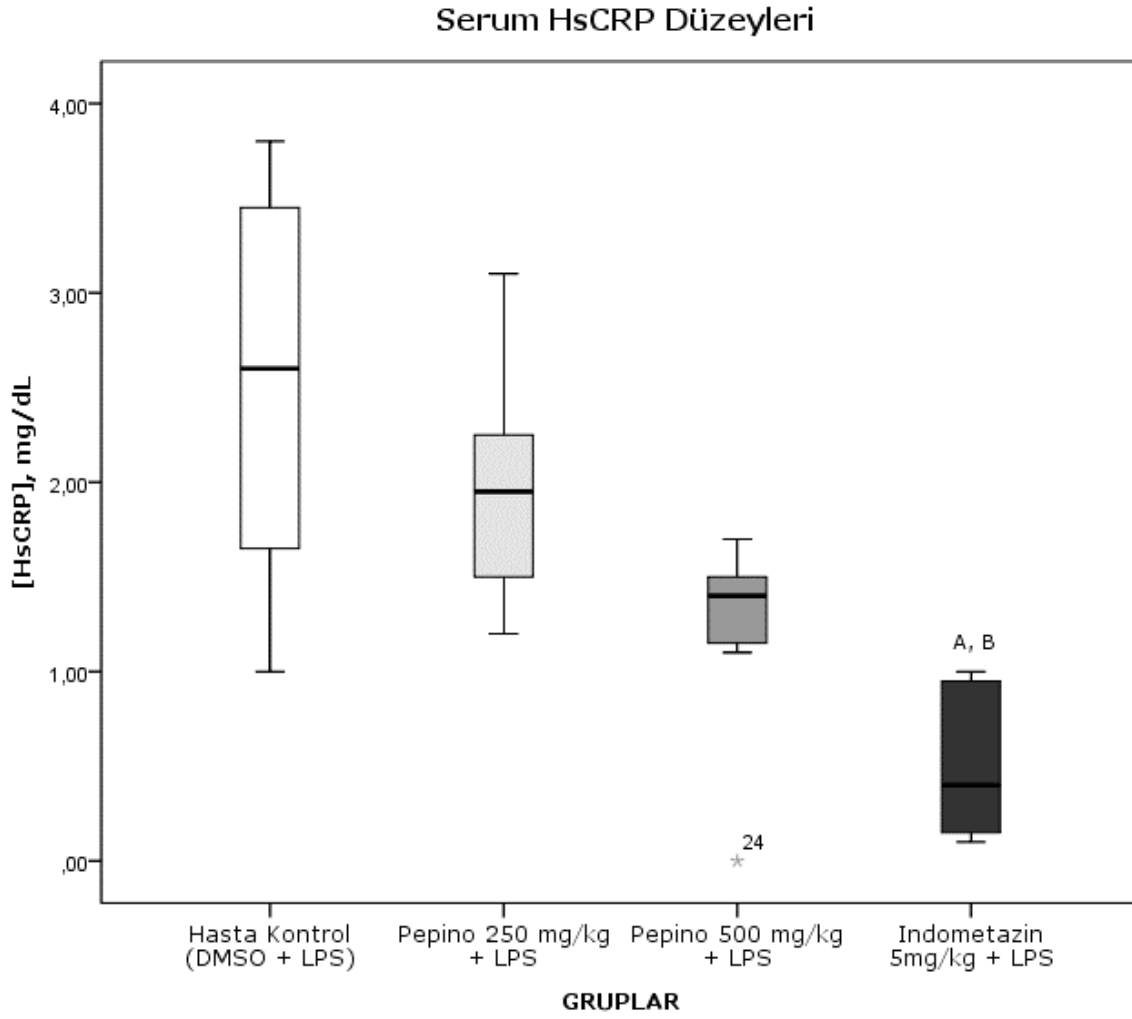
4.2 İnflamasyon ve Endotel Fonksiyon Belirteçleri

Çalışma gruplarımızın serum hsCRP ile serum ile doku MPO, NO ve serum TNF- α düzeylerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmiş hali Tablo 4.2, Tablo 4.3, Tablo 4.4, Tablo 4.5, Tablo 4.6 ve Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Çalışma Gruplarının Serum HsCRP Düzeylerinin Karşılaştırılması (mg/dl)

GRUPLAR	HsCRP Medyan (%25-%75)
HASTA KONTROL (Grup 1)	2,60 (1,43-3,48)
LPS + 250 mg/kg pepino (Grup 2)	1,95 (1,50-2,28)
LPS + 500 mg/kg pepino (Grup 3)	1,40 (1,13-1,55)
LPS + 5 mg/kg İndometazin (Grup 4)	0,40 ^{A,B} (0,13-0,98)

Çalışma gruplarımızın serum HsCRP değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.2’de verilmiştir. Çalışma gruplarımızın serum HsCRP değerleri sırasıyla; 2,60 (1,43-3,48); 1,95 (1,50-2,28); 1,40 (1,13-1,55); 0,40 (0,13-0,98) mg/dl olarak bulundu. Grup 1’e göre istatistiksel olarak değerlendirme yapıldığında Grup 4’te ileri derecede azalma gözlemlendi ($p < 0,001$). Grup 2’ye göre istatistiksel olarak değerlendirme yapıldığında ise yine Grup 4’te ileri derecede azalma bulundu ($p < 0,001$). Diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ($p > 0,05$).



Şekil 4.2. Serum HsCRP düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması

Her bir grubun değeri ortanca (%25-%75 persantil) olarak verildi.

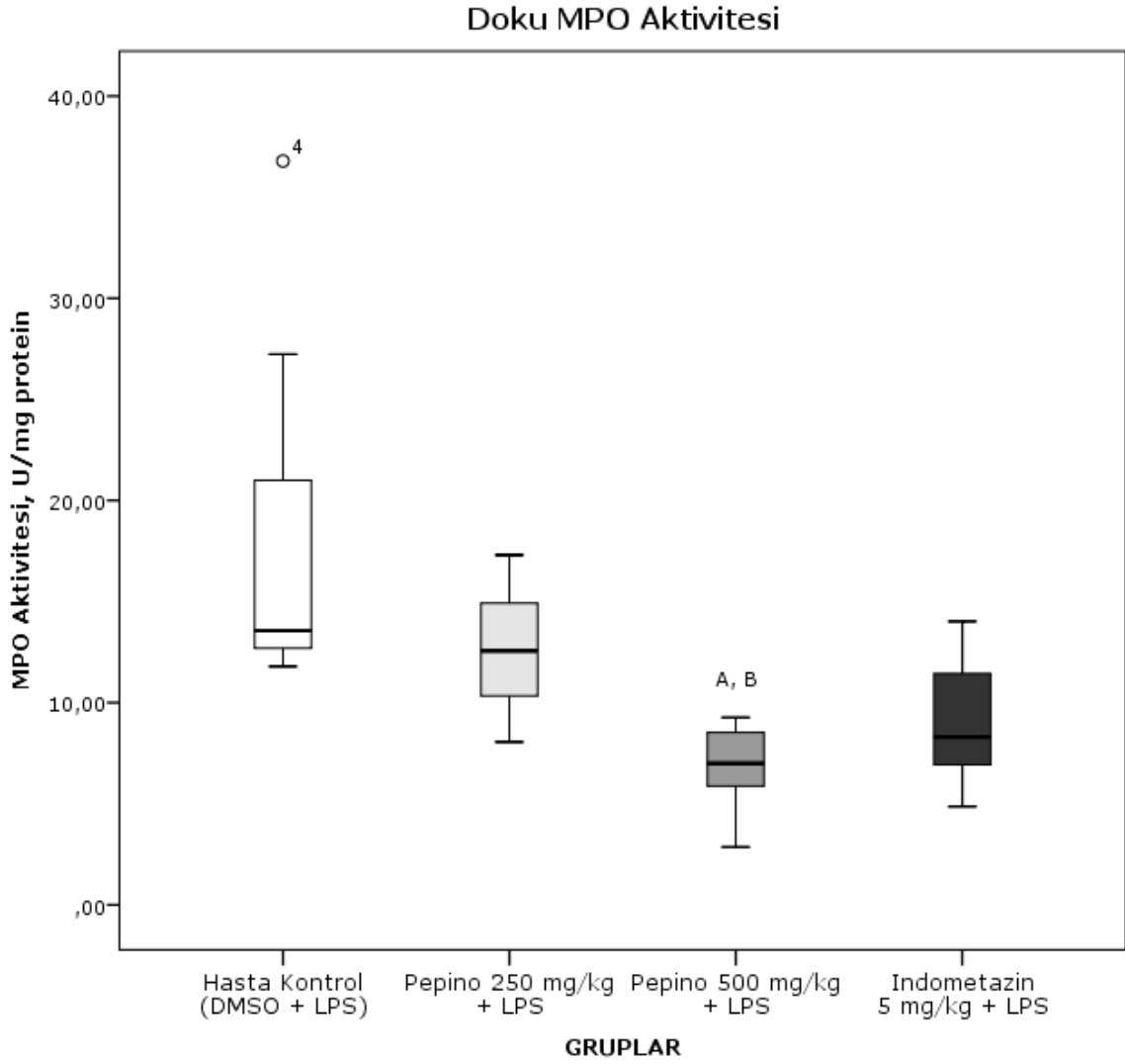
^A; Grup 1'e göre fark: $p < 0,001$

^B; Grup 2'e göre fark: $p < 0,001$

Tablo 4.3. Çalışma Gruplarının Doku MPO Düzeyleri (U/mg protein)

GRUPLAR	MPO (doku) Medyan (%25-%75)
HASTA KONTROL (Grup 1)	13,57 (12,62-24,12)
LPS + 250 mg/kg pepino (Grup 2)	12,56 (9,69-15,15)
LPS + 500 mg/kg pepino (Grup 3)	7,00 ^{A,B} (5,76-8,57)
LPS + 5 mg/kg İndometazin (Grup 4)	8,31 (6,88-12,62)

Çalışma gruplarımızın doku MPO değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.3’de verilmiştir. Çalışma gruplarımızın doku MDA değerleri sırasıyla; 13,57 (12,62-24,12); 12,56 (9,69-15,15); 7,00 (5,76-8,57); 8,31 (6,88-12,62) U/mg protein olarak bulundu. Grup 1’e göre istatistiksel olarak değerlendirme yapıldığında Grup 3’te ileri derecede azalma gözlemlendi ($p < 0,001$). Grup 2’ye göre istatistiksel olarak değerlendirme yapıldığında ise yine Grup 3’te ileri derecede azalma bulundu ($p < 0,001$). Diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ($p > 0,05$).



Her bir grubun değeri ortanca (%25-%75 persantil) olarak verildi.

^A; Grup 1'e göre fark: $p < 0,001$

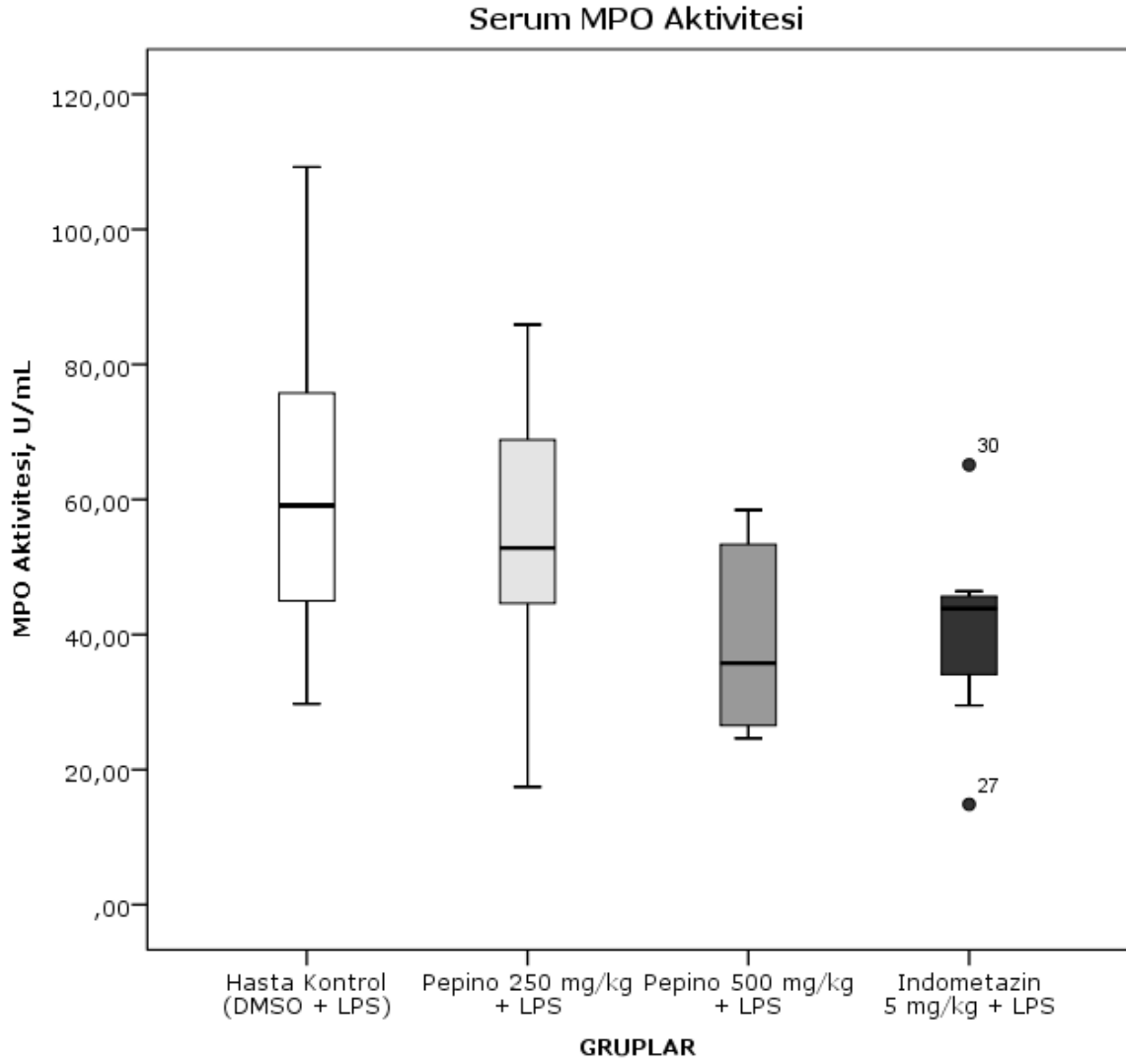
^B; Grup 2'e göre fark: $p < 0,001$

Şekil 4.3. Doku MPO düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması

Tablo 4.4. Çalışma Gruplarının Serum MPO Düzeylerinin Karşılaştırılması (U/ml)

GRUPLAR	MPO (serum) Ortalama±SD
HASTA KONTROL (Grup 1)	62,34±24,99
LPS + 250 mg/kg pepino (Grup 2)	54,49±20,70
LPS + 500 mg/kg pepino (Grup 3)	39,30±14,08
LPS + 5 mg/kg İndometazin (Grup 4)	40,90±14,46

Çalışma gruplarımızın serum MPO değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.4'de verilmiştir. Çalışma gruplarımızın serum MPO değerleri sırasıyla; 62,34±24,99; 54,49±20,70; 39,30±14,08; 40,90±14,46 U/ml olarak bulundu. Çalışmamızda yer alan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde önemli bir fark bulunamadı ($p>0,05$).



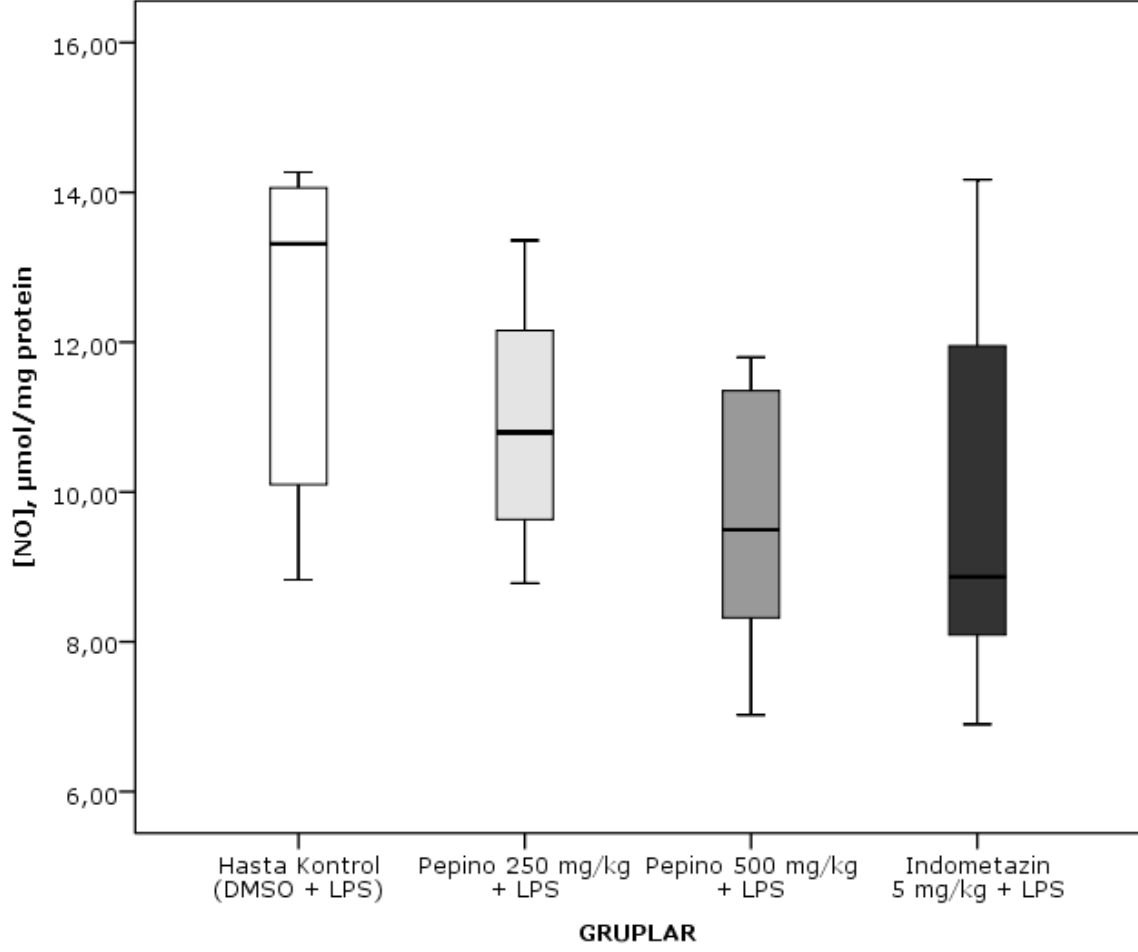
Şekil 4.4. Serum MPO düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması

Tablo 4.5. Çalışma Gruplarının Doku NO Düzeyleri ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)

GRUPLAR	NO (doku) Medyan (%25-%75)
HASTA KONTROL (Grup 1)	13,31 (9,62-14,13)
LPS + 250 mg/kg pepino (Grup 2)	10,80 (9,24-12,48)
LPS + 500 mg/kg pepino (Grup 3)	9,50 (8,21-1,45)
LPS + 5 mg/kg İndometazin (Grup 4)	8,87 (8,09-12,35)

Çalışma gruplarımızın doku NO değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.5'de verilmiştir. Çalışma gruplarımızın doku NO değerleri sırasıyla; 13,31 (9,62-14,13); 10,80 (9,24-12,48); 9,50 (8,21-1,45); 8,87 (8,09-12,35) $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein olarak bulunmuştur. Çalışmamızda yer alan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde önemli bir fark bulunamadı ($p>0,05$).

Doku NO Düzeyleri



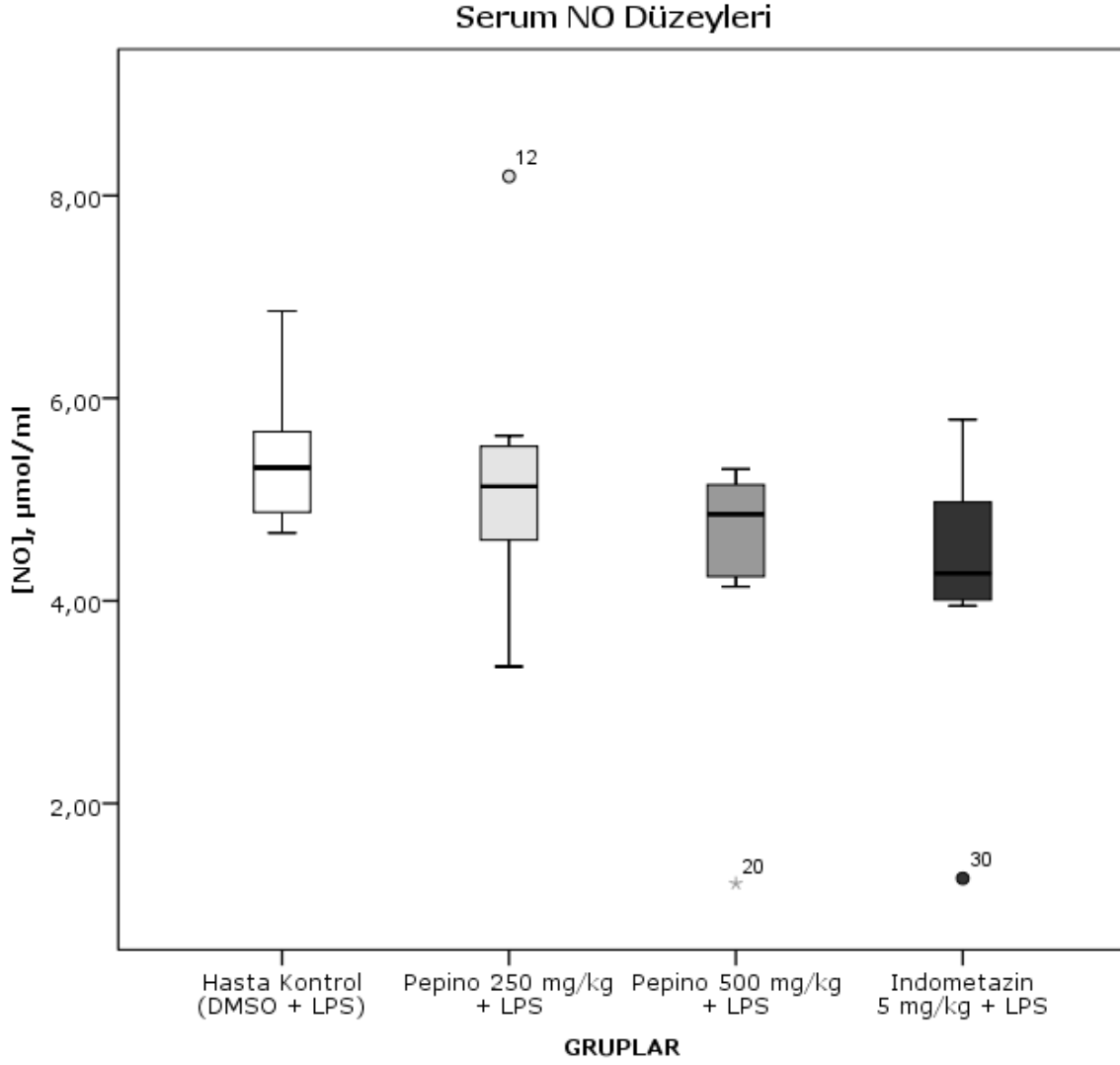
Her bir grubun değeri ortanca (%25-%75 persantil) olarak verildi.

Şekil 4.5. Doku NO düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması

Tablo 4.6. Çalışma Gruplarının Serum NO Düzeylerinin Karşılaştırılması ($\mu\text{mol/ml}$)

GRUPLAR	NO (serum) Medyan (%25-%75)
HASTA KONTROL (Grup 1)	5,32 (4,87-5,69)
LPS + 250 mg/kg pepino (Grup 2)	5,13 (4,56-5,58)
LPS + 500 mg/kg pepino (Grup 3)	4,86 (4,19-5,15)
LPS + 5 mg/kg İndometazin (Grup 4)	4,27 (3,98-5,23)

Çalışma gruplarımızın serum NO değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.6'da verilmiştir. Çalışma gruplarımızın serum NO değerleri sırasıyla; 5,32 (4,87-5,69); 5,13 (4,56-5,58); 4,86 (4,19-5,15); 4,27 (3,98-5,23) $\mu\text{mol/ml}$ olarak bulundu. Çalışmamızda yer alan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde önemli bir fark bulunamadı ($p>0,05$).



Her bir grubun değeri ortanca (%25-%75 persantil) olarak verildi.

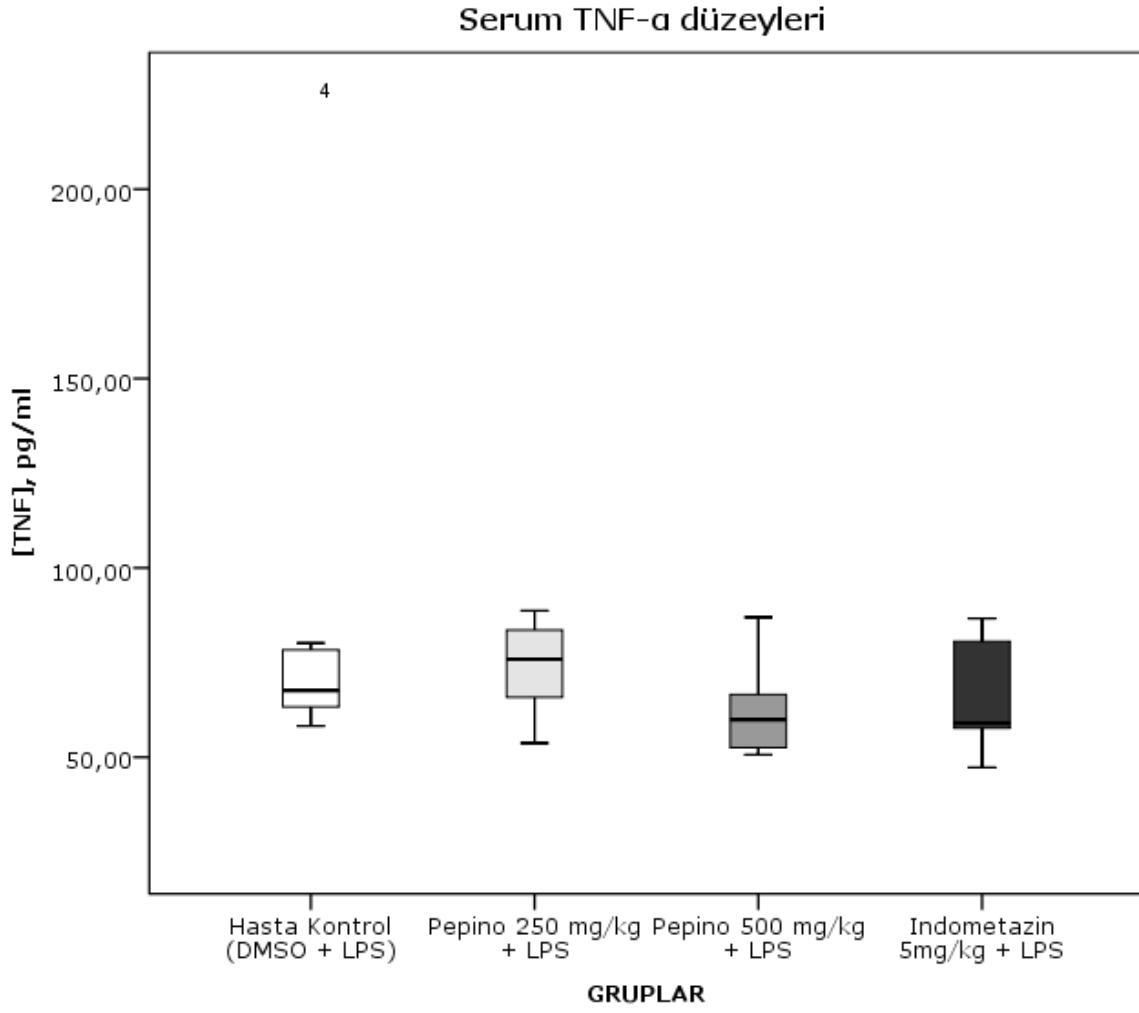
Şekil 4.6. Serum NO düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması

Çalışma gruplarımızın serum TNF- α düzeylerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmiş hali Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.7. Çalışma Gruplarının Serum TNF- α Düzeyleri (pg/ml)

GRUPLAR	TNF- α Medyan (%25-%75)
HASTA KONTROL (Grup 1)	67,61 (62,33-79,26)
LPS + 250 mg/kg pepino (Grup 2)	75,89 (65,29-83,84)
LPS + 500 mg/kg pepino (Grup 3)	59,95 (52,11-67,89)
LPS + 5 mg/kg İndometazin (Grup 4)	59,03 (57,47-83,52)

Çalışma gruplarımızın serum TNF- α değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.7’de verilmiştir. Çalışma gruplarımızın serum TNF- α değerleri sırasıyla; 67,61 (62,33-79,26); 75,89 (65,29-83,84); 59,95 (52,11-67,89); 59,03 (57,47-83,52) pg/ml olarak bulundu. Çalışmamızda yer alan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde önemli bir fark bulunamadı ($p>0,05$).



Şekil 4.7. Serum TNF- α düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması

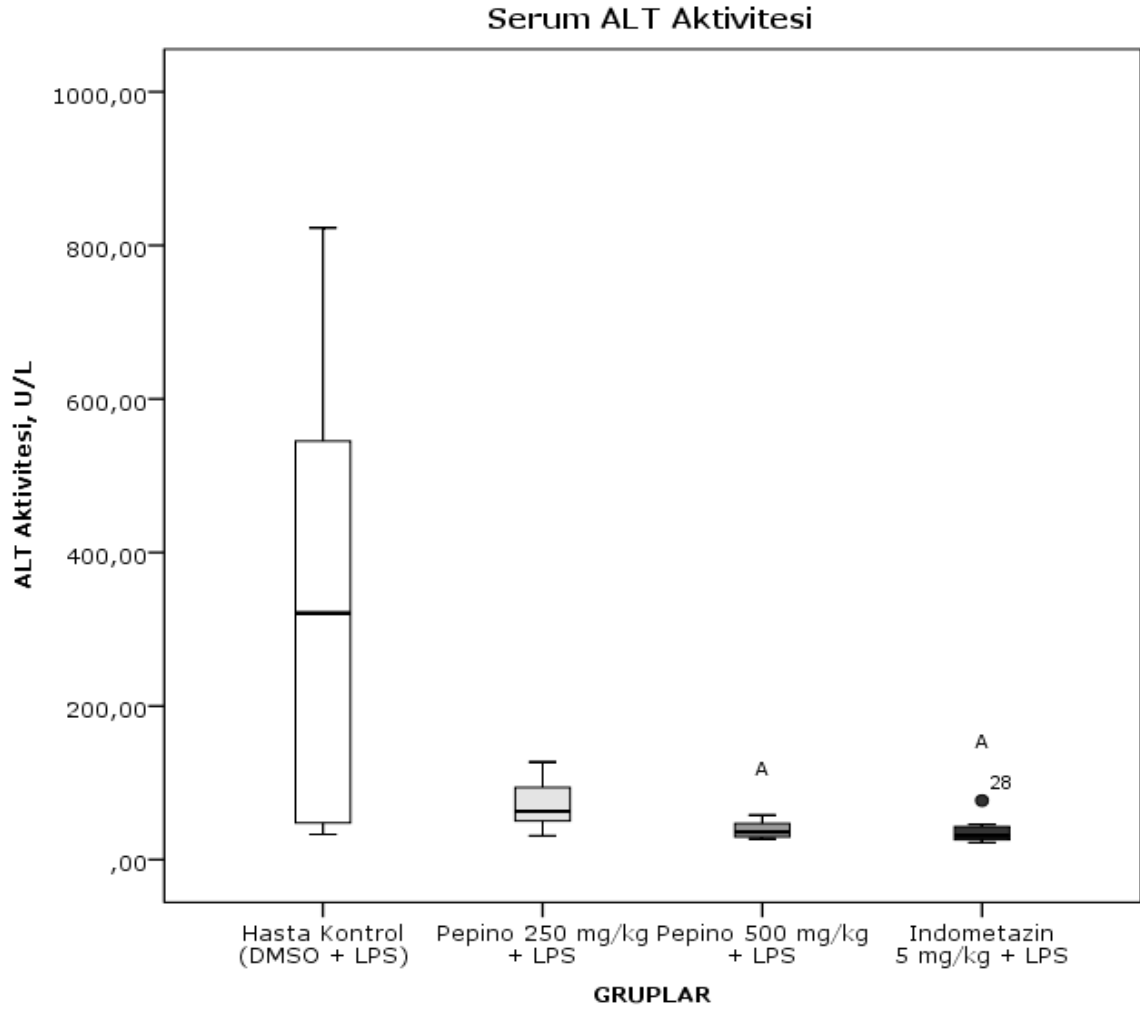
4.3 Karaciğer Hasarı Belirteçleri

Çalışma gruplarımızın serum ALT, AST, ALP ve GGT düzeylerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmiş halleri Tablo 4.8, Tablo 4.9, Tablo 4.10 ve Tablo 4.11’ de verilmiştir.

Tablo 4.8. Çalışma Gruplarının Serum ALT Düzeyleri (U/L)

GRUPLAR	ALT Medyan (%25-%75)
HASTA KONTROL (Grup 1)	321,00 (47,00-589,00)
LPS + 250 mg/kg pepino (Grup 2)	63,00 (48,75-95,50)
LPS + 500 mg/kg pepino (Grup 3)	36,00 ^A (29,25-47,00)
LPS + 5 mg/kg İndometazin (Grup 4)	31,00 ^A (25,50-44,50)

Çalışma gruplarımızın serum ALT değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.8’de verilmiştir. Çalışma gruplarımızın serum ALT değerleri sırasıyla; 321,00(47,00-589,00);63,00(48,75-95,50);36,00(29,25-47,00); 31,00(25,50-44,50)U/L olarak bulundu.Grup 1’e göre istatistiksel olarak değerlendirme yapıldığında Grup 3 ve Grup 4’te ileri derecede azalma gözlemlendi($p<0,001$). Diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ($p>0,05$).



Her bir grubun değeri ortanca (%25-%75 persantil) olarak verildi.

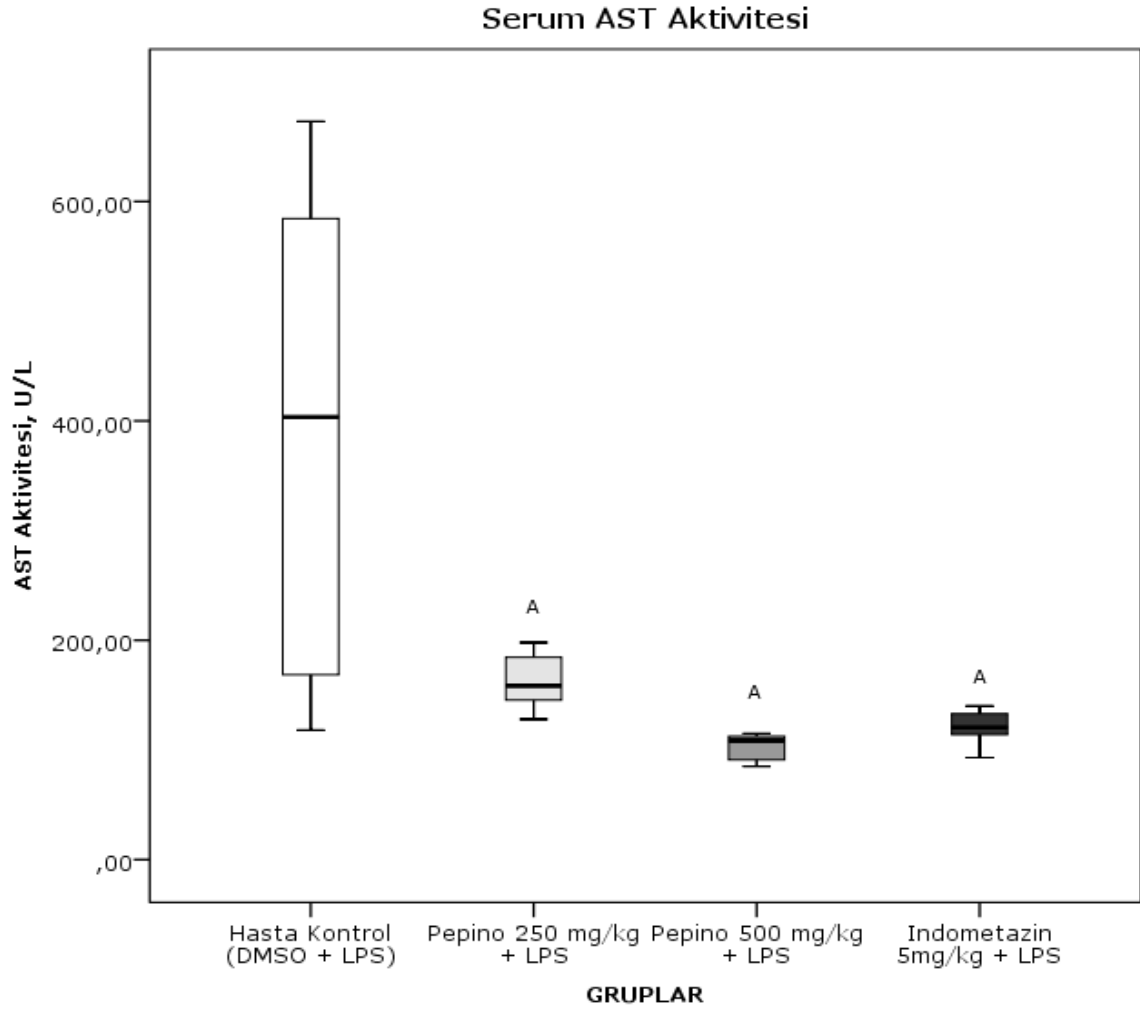
^A; Grup 1'e göre fark: $p < 0,001$

Şekil 4.8. Serum ALT düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması

Tablo 4.9.Çalışma Gruplarının Serum AST Düzeyleri (U/L)

GRUPLAR	AST Ortalama±SD
HASTA KONTROL (Grup 1)	388,00±220,06
LPS + 250 mg/kg pepino (Grup 2)	162,88±25,67 ^A
LPS + 500 mg/kg pepino (Grup 3)	103,00±12,15 ^A
LPS + 5 mg/kg İndometazin (Grup 4)	121,00±14,94 ^A

Çalışma gruplarımızın serum AST değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.9'da verilmiştir. Çalışma gruplarımızın serum ALT değerleri sırasıyla; 388,00±220,06;162,88±25,67;103,00±12,15; 121,00±14,94U/Lolarak bulundu.Grup 1'e göre istatistiksel olarak değerlendirme yapıldığında Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'te ileri derecede azalma gözlemlendi(p<0,001). Diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı (p>0,05).



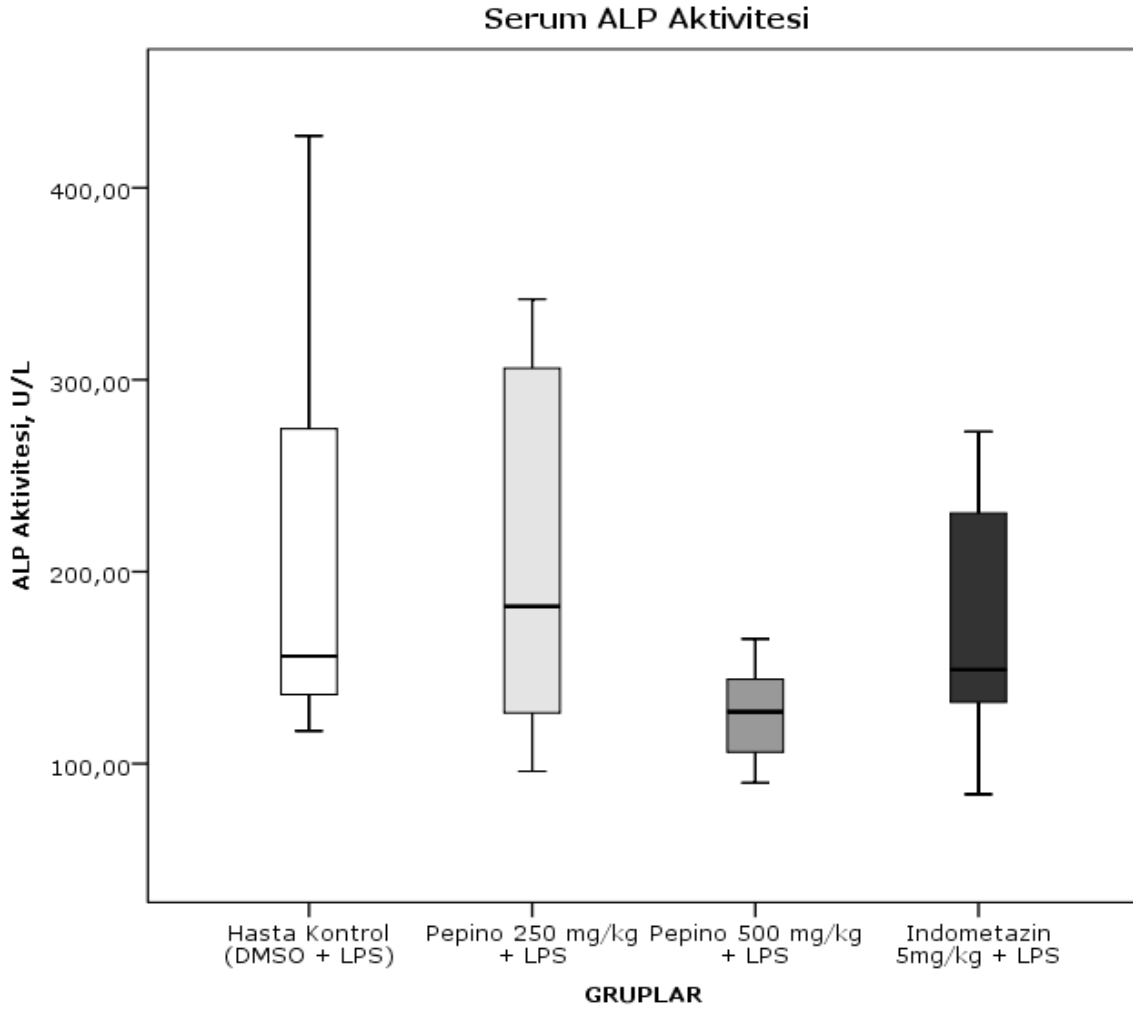
Her bir grubun değeri ortalama±SD olarak verildi.
^A; Grup 1'e göre fark: $p < 0,001$

Şekil 4.9. Serum AST düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması

Tablo 4.10.Çalışma Gruplarının Serum ALP Düzeyleri (U/L)

GRUPLAR	ALP Medyan (%25-%75)
HASTA KONTROL (Grup 1)	156,00 (134,00-330,25)
LPS + 250 mg/kg pepino (Grup 2)	182,00 (118,25-306,50)
LPS + 500 mg/kg pepino (Grup 3)	127,00 (101,50-150,50)
LPS + 5 mg/kg İndometazin (Grup 4)	149,00 (127,50-240,25)

Çalışma gruplarımızın serum ALP değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.10'da verilmiştir. Çalışma gruplarımızın serum ALP değerleri sırasıyla; 156,00(134,00-330,25); 182,00(118,25-306,50);127,00(101,50-150,50);149,00(127,50-240,25)U/L olarak bulundu.Çalışmamızda yer alan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde önemli bir fark bulunamadı ($p>0,05$).



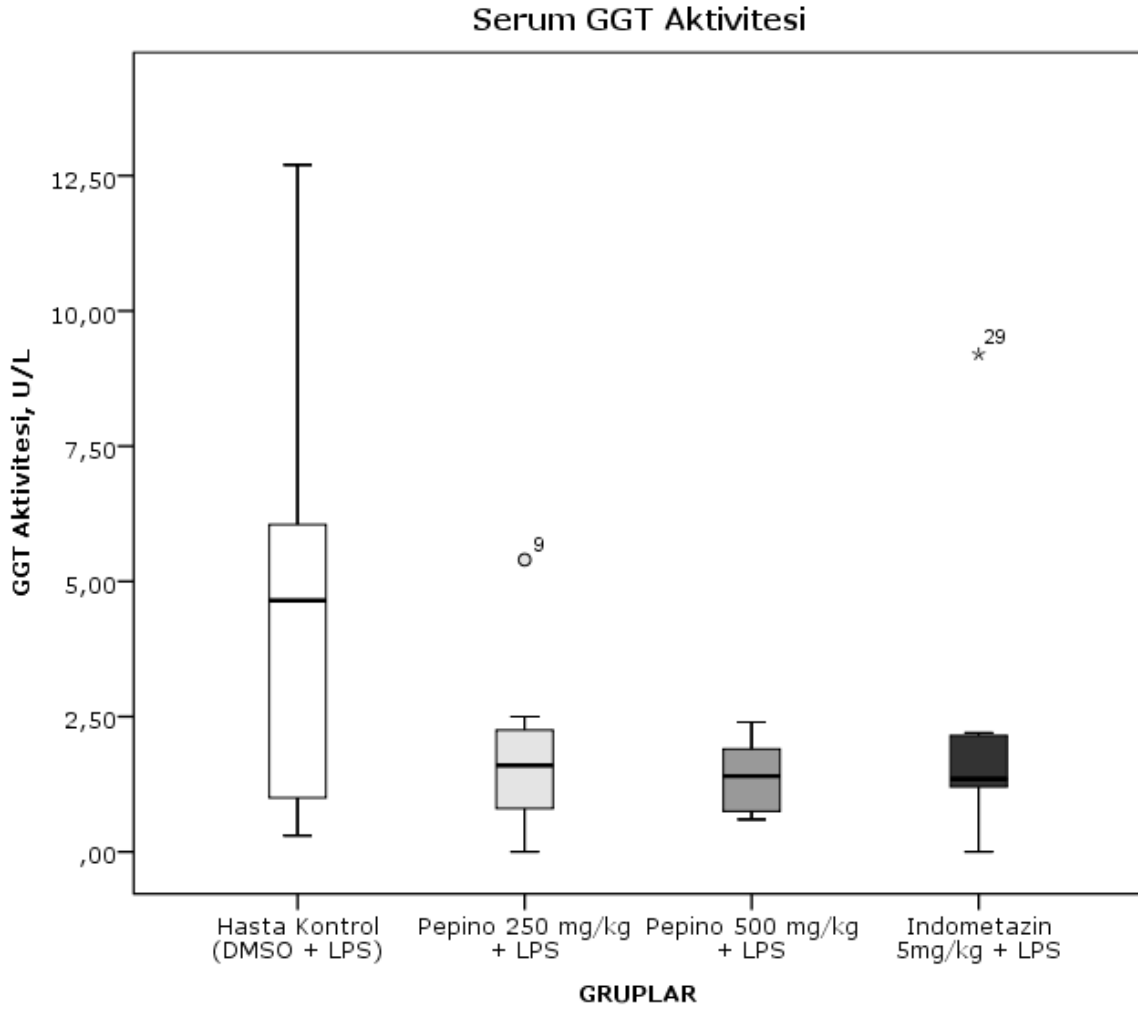
Her bir grubun değeri ortanca (%25-%75 persantil) olarak verildi.

Şekil 4.10. Serum ALP düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması

Tablo 4.11.Çalışma Gruplarının Serum GGT Düzeylerinin Karşılaştırılması (U/L)

GRUPLAR	GGT Medyan (%25-%75)
HASTA KONTROL (Grup 1)	4,65 (0,70-6,08)
LPS + 250 mg/kg pepino (Grup 2)	1,60 (0,80-2,38)
LPS + 500 mg/kg pepino (Grup 3)	1,40 (0,73-1,95)
LPS + 5 mg/kg İndometazin (Grup 4)	1,35 (1,20-2,18)

Çalışma gruplarımızın serum GGT değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.11’de verilmiştir. Çalışma gruplarımızın serum GGT değerleri sırasıyla; 4,65(0,70-6,08);1,60(0,80-2,38);1,40(0,73-1,95); 1,35(1,20-2,18) U/L olarak bulundu. Çalışmamızda yer alan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde önemli bir fark bulunamadı ($p>0,05$).



Her bir grubun değeri ortanca (%25-%75 persantil) olarak verildi.

Şekil 4.11. Serum GGT düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması

4.4 Karaciğerde Histolojik Bulgular

Çalışmamızdaki karaciğer doku örnekleri Hematoksilen-Eozin boyama yöntemiyle incelendi. Tüm gruplardaki bulguların değerlendirilmesinde;

- İltihap
- Kanama
- Konjesyon
- Hepatosit Dejenerasyonu
- Nekroz

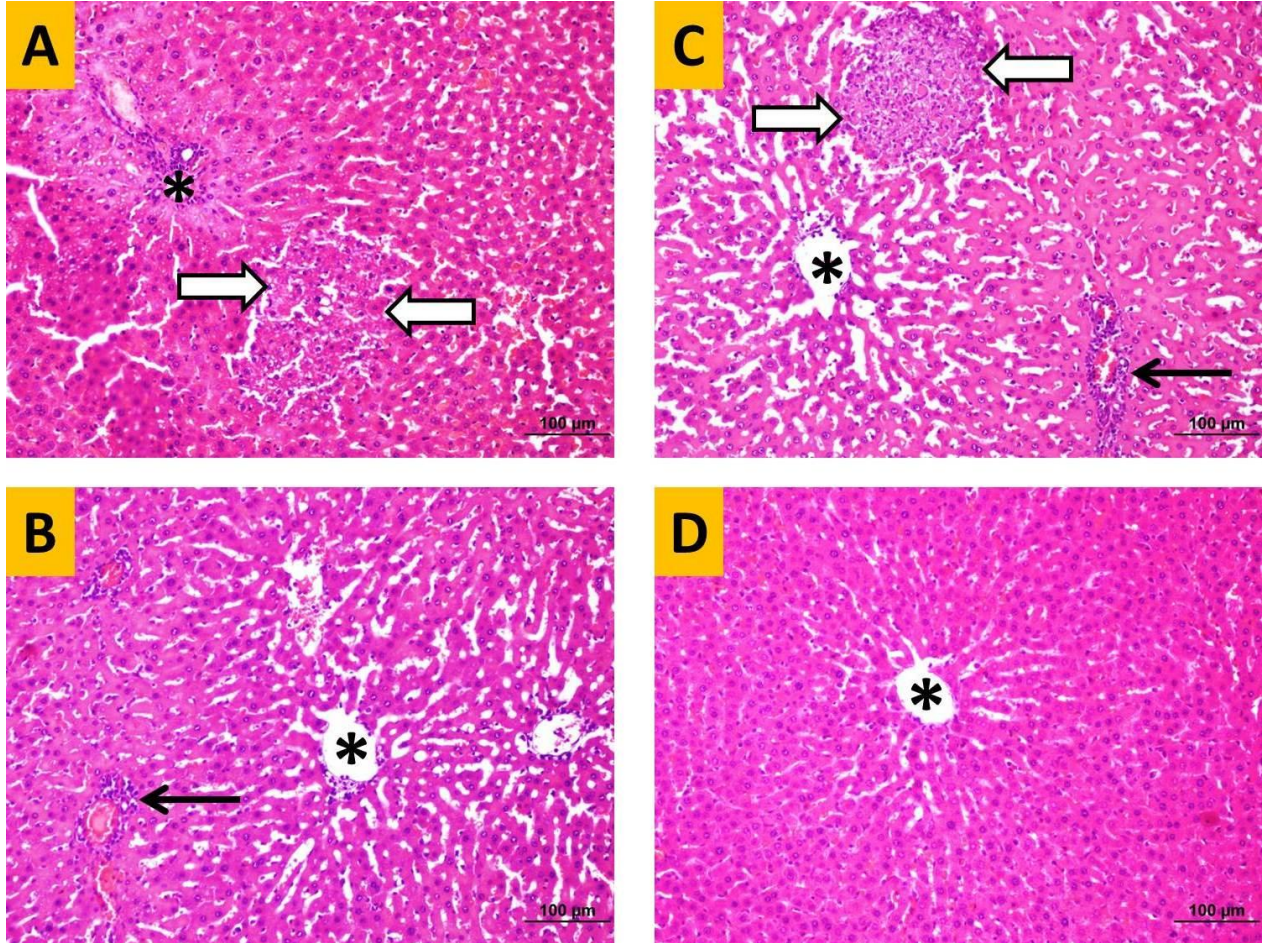
dikkate alınarak incelendi.

Tablo 4.12.Deney gruplarına ait skorların istatistiksel olarak değerlendirilmesi

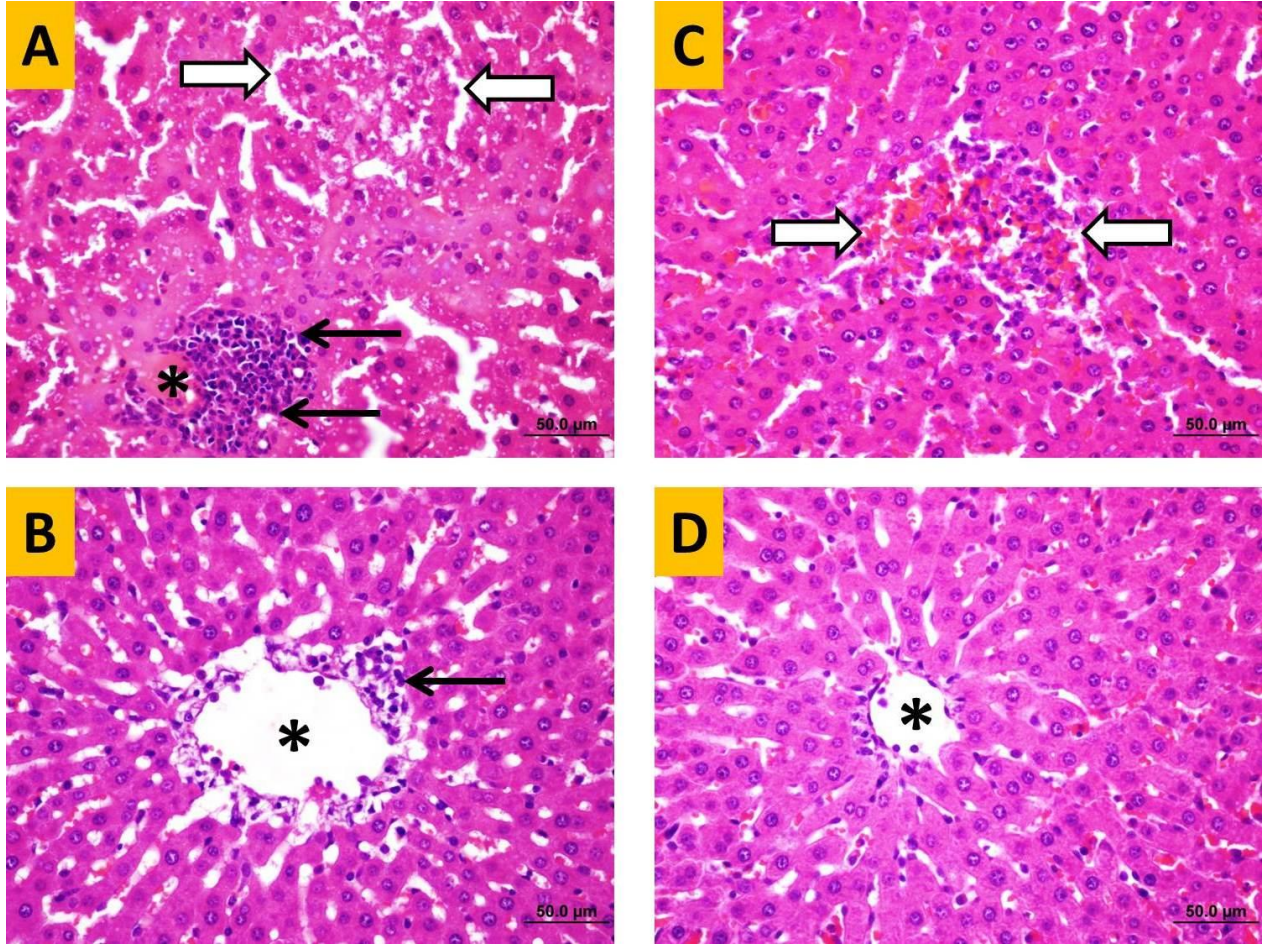
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
İltihap	3,00 (2,00-3,00)	2,00 (1,00-2,00)	1,00 * (1,00-2,00)	1,00 * (0,25-1,00)
Kanama	1,00 (0,00-1,00)	0,00 # (0,00-0,00)	0,00 # (0,00-0,00)	0,00 # (0,00-0,00)
Konjesyon	3,00 (2,00-4,00)	2,00 (0,25-2,00)	1,50 (1,00-2,75)	0,50 # (0,00-1,00)
Hepatosit Dejenerasyonu	3,00 (3,00-4,00)	0,00 * (0,00-0,00)	0,00 * (0,00-0,00)	0,50 * (0,00-1,00)
Nekroz	2,00 (2,00-3,00)	1,00 (1,00-2,50)	0,00 # (0,00-1,00)	0,00 # (0,00-1,00)
Toplam Skor	12,00 (12,00-14,00)	4,50 (2,25-6,75)	4,00 * (2,25-4,75)	2,00 * (1,00-3,00)

Grup 1 e göre fark: *; $p < 0.001$

#; $p < 0.05$



Şekil 4.12.Deney gruplarına ait sıçanların karaciğer kesitleri. Sadece inflamasyon oluşturulan kontrol grubu **(A)**, inflamasyon ile birlikte indometazin verilen grup **(B)**, inflamasyon ile birlikte düşük doz pepinoekstresi verilen grup **(C)** ve inflamasyon ile birlikte yüksek doz pepino ekstresi verilen grup **(D)**.Santral venler(*), santral venler etrafında biriken iltihabi hücreler(*ince oklar*)ile iltihaplı nekrotik odaklara (*kalin oklar*) dikkat ediniz. Yüksek doz pepinoekstresi verilen grupta karaciğer histolojisinin diğer gruplara göre daha tipik görünümüne sahip olduğu görülmektedir. Kesitler hematoksilin-eozintekniği ile boyanmıştır.Barların hepsi 100 µm'dir.



Şekil 4.13. Deney gruplarına ait sıçanların karaciğer kesitleri. Sadece inflamasyon oluşturulan kontrol grubu **(A)**, inflamasyon ile birlikte indometazin verilen grup **(B)**, inflamasyon ile birlikte düşük doz pepinoekstresi verilen grup **(C)** ve inflamasyon ile birlikte yüksek doz pepino ekstresi verilen grup **(D)**. Santral venler(*), santral venler etrafında biriken iltihabi hücreler (*ince oklar*) ile iltihaplı nekrotik odaklar (*kalin oklar*)görülmektedir. Yüksek doz pepinoekstresi verilen grupta karaciğer histolojisinin diğer gruplara göre daha tipik görünümüne sahip olduğuna, B ve D görüntülerinde santral venlerin içinde iltihabi hücrelerin marjinasyonuna dikkat ediniz. Kesitler hematoksilin-eozin tekniği ile boyanmıştır. Barların hepsi 50 µm'dir.

Sadece inflamasyon oluşturulan kontrol grubunda karaciğerde özellikle santral venler etrafında yoğun mono nükleer iltihabi hücre infiltrasyonları izlendi. Santral venler ve karaciğer sinüzoidlerinde konjesyon gözlemlendi. Karaciğer parankiminde nekrotik hepatositleri de içeren çok sayıda küçük iltihap odakları dikkati çekti (**Şekil 4.13A ve 4.14A**). Toplam hasar skoru en yüksek olan bu gruptu. İnflamasyon ile birlikte indometazin uygulanan grupta toplam hasar skoru kontrole göre azalmasına karşın iltihabi hücre infiltrasyonu ve nekroz odaklarına rastlandı (**Şekil 4.13B ve 4.14B**). İnflamasyon ile birlikte düşük doz pepino ekstresi uygulanan grupta toplam hasar skoru puanı indometazin grubuna benzerdi. Mikroskopik incelemede iltihabi hücre infiltrasyonu ve nekroz odakları kontrole göre önemli derecede azalmış olsa da yer yer gözlemlendi (**Şekil 4.13C ve 4.14C**). İnflamasyon ile birlikte yüksek doz pepino ekstresi uygulanan grupta ise toplam hasar skoru en düşük olarak belirlendi. Bu grupta iltihabi hücre infiltrasyonu en hafif düzeye gerilemişti. Nekrotik odaklar ise sadece birkaç hayvanda gözlemlendi (**Şekil 1D ve 2D**). Kanama bakımından gruplar karşılaştırıldığında kontrol grubunun her 3 tedavi grubuna kıyasla önemli derecede kanama odaklarına sahip olduğu ($p=0.002$), ancak tedavi grupları arasında belirgin bir fark olmadığı saptandı. Konjesyon bakımından yapılan karşılaştırmada sadece kontrol grubu ile yüksek doz pepino ekstresi verilen grup arasında önemli fark görüldü ($p=0.002$) ve bu fark konjesyonun pepino grubunda azalması şeklinde gerçekleşti. Hepatosit dejenerasyonu bakımından yapılan karşılaştırmaya göre kontrol grubunun her üç tedavi grubundan önemli derecede yüksek hasar puanına sahip olduğu ($p<0.001$) ve tedavi grupları arasında ise önemli bir fark olmadığı belirlendi.

Bütün bu histolojik bulguların ışığında indometazinin inflamasyonun histolojik etkilerini kısmen geriletebildiği, fakat tek başına koruyucu etki sağlayamadığı görüldü. Pepino ekstresi uygulanan gruplara bakıldığında, düşük doz pepino ekstresi uygulamasının indometazine benzer şekilde kısmi bir histolojik düzelmeye sağladığı ve yüksek doz pepino ekstresi verilmesinin ise histolojik hasarı dikkate değer bir biçimde geriletmediği sonucuna varıldı.

5 TARTIŞMA

Escherichia coli (E. coli) gibi gram-negatif bakterilerde hücre duvarının bir bileşeni olan ve "endotoksin" olarak adlandırılan lipopolisakkarit (LPS), deney hayvanlarına uygulandığında inflamasyonu tetiklemektedir. Çeşitli akut ve kronik deneysel inflamasyon modellerinde, endotoksin ile oluşumları tetiklenen TNF- α , IL-8 ve IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinlerin venitrik oksit, prostanooidler ve serbest oksijen radikalleri gibi moleküllerin inflamasyonun çeşitli aşamalarında rol aldıkları bilinmektedir (Yangı, 2012).

Radikallerin aşırı reaktif yapılarına bağlı olarak, hücrede karbonhidrat, protein ve lipidlerin okside olması ile sonuçlanacak hasarların önlenmesi antioksidan düzeyleriyle ilişkilidir. Enzimatik antioksidanlar serbest radikal zincir tepkimesinin başlaması için gerekli olan serbest radikal miktarının azaltılmasını sağladıkları için primer antioksidanlar olarak da adlandırılırlar. Genel olarak enzimatik savunma sistemleri, zararlı oksijen türevlerini yok ederler (Yangı, 2012).

İnflamasyon ve oksidatif stres gibi birçok mekanizma, akut karaciğer hasarına neden olmaktadır. LPS'nin organizmadaki detoksifikasyonu, karaciğerde retikuloendotelial sistemin başlıca bileşenleri olan Kupffer hücreleri tarafından meydana gelmektedir. Kupffer hücreleri, endotoksemi sırasında, proinflamatuvar sitokinlerin ve SOR'ların başlıca kaynağı olması nedeniyle, bu hücrelerin aktivasyonu, LPS kaynaklı meydana gelen akut hepatik hasarın nedeni olabileceği düşünülmektedir (Kalaz, vd., 2016; Yan, vd., 2016).

Bu tez çalışmasında; literatürde anti-inflamatuvar etki gösterdiği bildirilen pepinonun, lipopolisakkarit ile oluşturulan 24 saatlik deneysel inflamasyon üzerinde koruyucu etkilerinin bazı biyokimyasal ve histolojik analizler yardımıyla araştırılması amaçlandı. Çalışmada ratlara, gavaj yoluyla 250 mg/kg ve 500 mg/kg %0.5'lik DMSO çözücüsü içerisinde pepino ekstresi ve intraperitonel yolla 5 mg/kg LPS enjeksiyonları yapıldı. Çözücü olarak seçilen DMSO, referans ilaç olarak belirlenen indometazin ve deneysel inflamasyon modeli için seçilen LPS dozları, ratlarda toksik dozun altında olacak şekilde ve literatürle uyumlu olarak uygulandı (Cho, Choi, Kim & Lee, 2009; Quaile, vd., 2010). LPS uygulamasından 24 saat sonra intrakardiyak kan örnekleri ve karaciğer doku örnekleri alındı.

Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehit düzeyinin ölçülmesi mevcut klinik ve deneysel çalışmalarda en sık kullanılan oksidatif hasar belirteçlerinden biridir. Lipit peroksidasyonu endotoksin bağımlı hepatik hasarın sorumlularından biri olan MDA'nın, en fazla karaciğer, akciğer ve serumda biriken biyokimyasal bir belirteç olduğu bildirilmiştir (Haugaard, 1968).

Hsu ve arkadaşlarının alkol tüketiminden sonra yükselmiş olan lipit peroksidasyonu üzerine pepinonun sıvı ekstresinin etkisini araştırdıkları bir çalışmada, alkol grubundaki MDA içeriği kontrol grubuna göre 1.6 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte pepinonun %1'lik ve %2'lik sıvı ekstresi kullanılan gruplarda MDA seviyesinin alkol grubuna göre önemli ölçüde düşük ve kontrol grubu ile neredeyse paralel olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuçlar alkol kullanımı ile indüklenen lipid peroksidasyonunun, sıvı pepino ekstresi kullanımı ile kontrol altına alınabildiğini göstermiştir (Hsu vd., 2011).

Standart toz yem ile %2'lik ve %4'lük oranlarda karıştırılarak hazırlanan (w/w) kurutulmuş sulu pepino ekstresinin diyabetik sıçanlara uygulandığı bir çalışmada, pepino tedavi gruplarında MDA düzeylerinin hasta kontrol grubuna göre önemli oranda düştüğü belirtilmiştir (Hsu, Lin & Chen, 2018). Bu şekilde pepino ekstresinin MDA oluşumunu azaltarak renal oksidatif stresi azaltabileceği düşünülmüştür. Pepino ile tedavi edilen diyabetli sıçanlarda gözlenen bu antioksidan etkinin, pepino ekstresi içinde bulunan askorbik asit, fenolik asitler ve flavanoidlerden kaynaklandığı ileri sürülmüştür.

Bu çalışmada ise karaciğerde meydana gelen oksidatif hasarın boyutu, MDA düzeyleri üzerinden incelenerek değerlendirilmeye çalışıldı. Hasta kontrol grubu olan LPS grubundatespit edilen MDA düzeylerindeki artış, LPS'nin karaciğerde belirgin olarak oksidatif hasar meydana getirdiğini sonucunu ortaya koydu. Hasta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, pepino 500 mg/kg grubunda MDA düzeyleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak azaldı. LPS grubuna oranla, tedavi grupları karşılaştırıldığında ise, referans ilaç olarak indometazin kullanılan ratlarda da anlamlı düzeyde azalma tespit edildi. Pepino 250 mg/kg ile Pepino 500 mg/kg arası anlamlı fark bulunması 250 mg/kg'lık dozun doku hasarı üzerinde beklenen etkiyi sağlamadığını düşündürdü.

C-reaktif protein inflamasyon için spesifik olmayan bir biyokimyasal belirteçtir. Düzeyi akut inflamatuvar durumlarda veya doku hasarında geçici olarak 1000 katına kadar çıkmakta, kronik inflamatuvar olaylarda ise sürekli yüksek değerlerde seyretmektedir (Ertorun, 2015).

Shathish ve Guruvayoorappan'ın yaptığı çalışmada ratlarda pepino ekstresinin formaldehit kaynaklı kronik inflamasyonu önemli ölçüde inhibe edebileceği vurgulanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları pepino ekstresinin akut ve kronik inflamasyon için güçlü bir inhibitör olarak görev yaptığını göstermektedir. Mekanizma, inflamatuvar mediatörlerin oluşumunun inhibisyonuna bağlı olabileceği, ancak Pepino ekstresinin anti-inflamatuvar etki mekanizmasını açığa çıkarmak için ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmektedir (Shathish & Guruvayoorappan, 2014).

Bu çalışmamızda akut inflamasyonun tespiti için serum hsCRP düzeyleri incelendi. Hasta kontrol grubunda düzeyleri yüksek seyreden hsCRP, indometazin grubunda hasta kontrol ratlarına göre istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler gösterdi. Düşük doz pepino uygulanan sıçanlarda ise hsCRP düzeyleri hasta kontrol grubu ratları ile paralellik gösterdi ve indometazin grubu ile istatistiksel yönden anlamlı farklılıklar tespit edildi. Buna karşın, yüksek doz pepino grubu serum hsCRP düzeylerinde azalma gözlemlendi, ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Çalışmamızda LPS uygulaması sonrasında, sıçanların karaciğer hücrelerinde meydana gelen nötrofil infiltrasyonu ve inflamasyonun tespiti için myeloperoksidaz enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Sadece LPS uygulanan 1. gruptaki sıçanların karaciğer MPO düzeylerinde yüksek düzeyde artış görüldü. Bunun yanısıra aynı grupta karaciğer dokuları histolojik olarak değerlendirildiğinde iltihabi hücre odakları, yer yer kanamalar ve dejenerasyona uğramış hepatositler gibi inflamasyonu işaret eden bulgular olduğu belirlendi. LPS grubu olan 1. Grup ile LPS öncesi pepino uygulanan 2. Grup kıyaslandığında, MPO düzeylerinde anlamlı farklılık gözlenmedi. Aynı zamanda 2. Grubun karaciğer dokuları incelendiğinde, iltihabi ve kanama odaklarında gerilemeler gözlemlendi ancak bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildi. 3. Grup olan LPS öncesi daha yüksek doz pepino alan ratların karaciğer dokularında iltihabi hücre odakları en hafif düzeye gerilemişti. Genel olarak neredeyse referans ilaç olan indometazin grubuna yakın histolojik inceleme sonuçları olması, pepinin karaciğerde LPS'nin meydana getirdiği inflamasyonu kontrol altında tuttuğunu düşündürdü. Hasta kontrol grubuna kıyasla, 3. Grup olan LPS öncesi pepino 500 mg/kg grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olması, bu dozun inflamasyonu kontrol altına almada etkili olabileceğini ortaya koymaktadır.

Otokrin ve parakrin bir hücresel ajan olan nitrik oksit, fizyolojik ve bazı patofizyolojik koşullar altında homeostazın sürdürülmesinde önemli bir yere sahiptir. Septik şok, reperfüzyon hasarı gibi durumlarda NO aktivitesi artmaktadır. NO etkisini, akut inflamatuvar olaylarda hem koruyucu hem de hasar verici bir molekül olarak ortaya koyabilir. NO, oluşan SOR'lar ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan ONOOH oluşturmakta ve sonuçta da

HO• radikali oluşumuna yol açmaktadır. NO bazı durumlarda da bir antioksidan gibi davranarak hücreleri lipid peroksidasyonundan korumaktadır (Memişoğulları, 2005). Bu paradoks ve puliripotent aktivite, NO etkisinin yorumlanmasında güçlüğe neden olmaktadır (Kuyumcu, Polat Düzgün, Özmen & Besler, 2004).

Shathish ve Guruvayoorappan'ın yaptığı bir çalışmaya göre, sıçanlarda tümör gelişimi sırasında pepino ekstresinin NO salınımı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde ettikleri bulgulara göre, kanserli sıçanlarda 15. günde gözlenen serum nitrik oksit düzeyindeki artış pepino ekstresi kullanımı ile anlamlı düzeyde gerileme göstermiştir. Bu durumun NO' nun vazodilatasyon etkisi nedeniyle tümördeki kan akışını artırmasından kaynakladığı düşünülmüştür ve bu yönüyle anti tümör ajanı olarak da kabul edilebileceği ileri sürülmüştür (Shathish & Guruvayoorappan, 2014).

Herraiz ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, pepino ekstresinin 1:1 ve 1:10 seyreltilmiş örneklerinin LPS ile muamele edilmiş makrofaj hücreleri üzerine etki ederek NO salınımında inhibisyona sebep olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada,1:10'luk seyreltilmiş Pepino ekstresinin NO salınımının inhibisyonu üzerinde 1:1'lik seyreltilmiş ekstreden çok daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Pepino ekstresinin bu etkisi nedeniyle *in vivo* anti-inflamatuar özelliğe sahip olabileceği ileri sürülmüştür. Ayrıca Pepinonun bu inhibisyon etkisinin nedeni olarak, içerisinde bulunan klorojenik asitin nitrik oksit sentazı inhibe edici etkisi olduğu belirtilmiştir (Herraiz vd., 2016).

Deneyssel olarak inflamasyon oluşturulan bu çalışmamızda, nitrik oksit düzeyleri incelendiğinde literatür ile uyumlu sonuçlar elde edildi. Hasta kontrol grubunda nitrik oksit düzeylerinin arttığı, düşük/yüksek doz pepino ve ayrıca indometazin verilen gruplarda nitrik oksit düzeylerinde düşüş tespit edildi, ancak bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Çalışmamızda inflamatuvar belirteçlerden, proinflamatuvar sitokin olan serum TNF- α düzeyleri ölçülmüş, ancak TNF- α düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmiştir.

LPS uygulaması sonrasında, ratların karaciğer hücrelerinde hasar oluşup oluşmadığını tespit etmek amacıyla, serum örneklerinde AST, ALT, ALP ve GGT enzim aktivitelerinin tayini yapıldı.

Hsu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 5 hafta boyunca alkol diyeti uygulanan sıçanlarda kontrol grubuna oranla ALT ve AST düzeyleri yükselmiştir. Tedavi amaçlı planlanan %1'lik ve %2'lik dozlar halinde uygulanan sıvı pepino ekstresinin, ALT ve AST düzeylerinde azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir (Hsu, Lin & Chen 2018).

Çalışmamızda, deneysel inflamasyon oluşturulmuş hasta kontrol grubunda yer alan sıçanlarda serum ALT ve AST düzeylerinin önemli derecede artmış olduğu gözlemlendi. Fakat pepinonun koruyucu etkinliğinin araştırıldığı, 7 gün boyunca farklı dozlarda pepino ekstresi ve indometazin verilen gruplarda serum ALT ve AST düzeyleri anlamlı düzeyde düşüş göstermiştir. 500 mg/kg pepino ekstresi verilen ve referans ilaç olan indometazin verilen sıçanlarda paralel sonuçlar tespit edildi. 500 mg/kg pepino grubunda meydana gelen AST ve ALT aktivitelerindeki azalma, pepinonun LPS'nin karaciğer fonksiyonlarını etkileyecek düzeyde hasar vermesini engellediğini ve koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Karaciğerin safra kanallarına bakan yüzeylerinden sentezlenen ALP ve GGT beraber değerlendirilmeleri gereken enzimlerdir. Bu nedenle çalışmamızda, karaciğerde LPS indüklü inflamasyon sonrası, safra kanallarına bağlı olası defektlerin üzerinde pepino ekstresinin etkileri değerlendirildi.

Zhang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, alkol ile birlikte pepino ekstresi verilen sıçanlarda ALP seviyelerinin meyve ve alkolden etkilenmediği tespit edilmiştir (Zhang vd., 2016). Bu çalışma ile uyumlu olarak, bizim çalışmamızda da serum ALP düzeyleri, LPS verilen grup ile pepino tedavi grupları arasında anlamlı değişiklik göstermedi.

GGT, aminoasit veya küçük peptidlerin gama glutamil artıklarının transferini katalizleyen bir enzimdir. Serumdaki GGT'nin en önemli kaynağı karaciğerdir ve safra epitelinde de yüksek miktarda sentezlenmektedir (Noyan, 2009).

Lenfoma hücreleri verilerek oluşturulan sıçan kanser modelinde pepino ekstresinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada (Shathish & Guruvayoorappan, 2014), pepino ekstresi uygulamasının kontrol grubu sıçanlara kıyasla GSH seviyelerini azalttığını ortaya koymuştur. Hücrel proliferasyon için bir belirteç olan ve gama-glutamil moleküllerinin GSH'dan diğer amino asit ve dipeptidlere transferini katalizleyen bir enzim olan GGT aktivitesi, normal hayvanlarla karşılaştırıldığında hasta kontrol grubu hayvanların serumunda artış göstermiştir. Pepino ekstresi tedavisinin, serum GGT aktivitesini önemli ölçüde azaltarak metastaz üzerinde inhibitör etki gösterdiği ileri sürülmüştür (Shathish & Guruvayoorappan, 2014). Kemoterapinin etkinliğinin GSH düzeyini azaltması ile ilişkilendirildiğinde, pepino ekstresi uygulamasının anti-proliferatif bir etkiye sahip olduğu düşünülebilir.

Bulgularımıza göre, LPS indüklü inflamasyonda serum GGT aktivitesi hasta kontrol grubunda artış gösterdi, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. LPS öncesi uyguladığımız pepino gruplarında ve indometazin grubunda ise GGT aktivitelerinde düşüş tespit edildi, ancak hasta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu düşüş anlamlı düzeyde değildi.

6 SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, deneysel model olarak LPS ile ratlarda inflamasyon oluşturuldu ve tedavi için, çok eski çağlardan bu yana insanlar tarafından ya çeşitli hastalıkların tedavisinde ya da etkilerinin azaltılmasında kullanılmış, günümüzde anti-tümör, anti-hepatotoksik, immünomodülatör gibi biyolojik aktivitelere sahip, doğal meyveekstraktının inflamasyon ve antioksidan sistem üzerine olan etkileri araştırıldı.

Sonuç olarak bu çalışmanın verileri, LPS'nin inflamasyon ve oksidatif strese neden olduğu, doğal bir tarım ürünü olan pepinonun karaciğer dokularında gösterdiği koruyucu etkinin muhtemel mekanizmasının, reaktif oksijen radikallerinin temizlenmesi sonucu lipid peroksidasyonunun ve/veya antioksidan tüketiminin engellenmesi ile olabileceğini düşündürmektedir. Antioksidan etkinliği üzerinde pepinonun, LPS'nin neden olduğu inflamasyon ve oksidatif hasara karşı koruyucu olarak kullanılması çalışmanın verilerinden hareketle önerilebilir. Endojen antioksidan enzim seviyelerinin yükseltilmesinde pepinonun faydalı etkilere sahip olduğu düşünülmektedir. Pepinonun etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, doz ve tolerabilite konularının tamamen açıklığa kavuşturulması için prelinik ve klinik çalışmalara gereksinim vardır. Çalışmanın gelecekte yapılacak iyi tasarlanmış araştırmalara önder olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abbas AK, Lichtman AH, & JS., P. (2000). *Cytokine In "Cellular and Molecular Immunology"*: WB Saunders Company Philadelphia.
- Ahmed, A. U. (2011). An overview of inflammation: mechanism and consequences. *Frontiers in Biology*, 6(4), 274. doi:10.1007/s11515-011-1123-9.
- Ahumada, A., Cantwell, M. (1996). Postharvest studies on pepino dulce (*Solanum muricatum* Ait.): maturity at harvest and storage behavior, *Postharvest Biology and Technology* 7, 129-136, 1996.
- Aghabeigi, B. (1992). The pathophysiology of pain. *Br Dent J*, 173(3), 9197. doi: 10.1038/sj.bdj.4807944.
- Akay, M.T., (1984). Doğanın Harika Maddesi Bal. *Bilim ve Teknik*, 17, 29-31.
- Akpınar, E., (2003), Ratlarda oluşturulan deneysel inflamasyon modellerinde L-tipi kalsiyum kanal blokörlerinin etkileri, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 84 s. (yayınlanmamış)
- Albayrak, L. (2015). Nontravmatik akut karın ağrılı olgularda serum oksidatif stres ve prolidaz enzim düzeylerinin araştırılması, Uzmanlık Tezi, Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.
- Alexander, C., & Rietschel, E. T. (2001). Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res*, 7(3), 167-202.
- Anderson, G., J., Bernardello, L., M., (1991). The relationships of *Solanum cochoae* (Solanaceae), a new species from Peru, *Novon.*, 1:127-133.
- Anderson, G.J., Jansen R.K., Kim, Y., (1996) The origin and relationships of the pepino, *Solanum muricatum* (Solanaceae): DNA restriction fragment evidence, *Ec. Bot.*, 50:369-380.
- Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., . . . Koyama, H. (2004). In vivo role of myeloperoxidase for the host defense. *Jpn J Infect Dis*, 57(5), S15.
- Arık, A. İ., Güdeloğlu, A., & Uygur, C. (2011). İnflamasyonun önlenmesi, prostat kanserinden korunmada yarar sağlar mı? *Üroonkoloji Derneği Yönetim Kurulu*, 22.
- Armstrong, L., Jordan, N., & Millar, A. (1996). Interleukin 10 (IL-10) regulation of tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax*, 51(2), 143-149.
- Aruoma, O.I., (1998), Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75,2 ,199-212 p.
- Barnes, P. J., Chung, K. F., & Page, C. P. (1998). Inflammatory mediators of asthma: An update. *Pharmacological Reviews*, 50(4), 515-596.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Baron, S., Lee, C., (2006), General Pathology, Host Response to Injury, Acute Inflammatory Response, Lange Pathology Flash Cards, McGraw-Hill, New York. 70-75 p.
- Beutler, B., & Cerami, A. (1988). Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu Rev Biochem*, 57, 505-518. doi:10.1146/annurev.bi.57.070188.002445.
- Bienvenu, J. (1995). [Exploration of cytokines in inflammation in biological fluids]. *C R Seances Soc Biol Fil*, 189(4), 545-555.
- Bilgin, Ö., (2007), Lipopolisakkarit ile uyarılmış hepatik iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan deneklerde, melatonin uygulanmasının doku (karaciğer ve böbrek) Nf-Kb ekspresyonu ile kan ve doku lipid peroksidasyonu üzerine etkisi, Uzmanlık Tezi, Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, 102 s. (yayımlanmamış)
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot*, 91 Spec No, 179-194.
- Bobrowski, K. (2005). Free radicals in chemistry, biology and medicine: contribution of radiation chemistry. *Nukleonika*, 50, S67-S76.
- Brewer, M. S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 221-247. doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x
- Caroff, M., & Karibian, D. (2003). Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res*, 338(23), 2431-2447.
- Carrero, J. J., & Stenvinkel, P. (2009). Persistent inflammation as a catalyst for other risk factors in chronic kidney disease: a hypothesis proposal. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 4(Supplement 1), S49-S55.
- Cendan, J. C., Topping, D. L., Pruitt, J., Snowdy, S., Copeland, E. M., 3rd, & Lind, D. S. (1996). Inflammatory mediators stimulate arginine transport and arginine-derived nitric oxide production in a murine breast cancer cell line. *J Surg Res*, 60(2), 284-288.
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, 49(3), 481-493.
- Chen, W. F., & Zlotnik, A. (1991). IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol*, 147(2), 528-534.
- Cheville, N.F., (1999), Acute Inflammation, Introduction to Veterinary Pathology, Blackwell Publishing Ltd. Oxford UK., 105-119 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Cho, Y. K., Choi, Y. H., Kim, S. H., & Lee, M. G. (2009). Effects of Escherichia coli lipopolysaccharide on the metformin pharmacokinetics in rats. *Xenobiotica*, 39(12), 946-954. doi:10.3109/00498250903215994.
- Correll, D.S., (1962). The potato and its wild relatives, Texas Research Foundation, Renner, Texas, USA.
- Cortas, K., Wakid, N.W. (1990). Determination of Inorganic Nitrate in Serum and Urine by a Kinetic Cadmium-Reduction Method. *Clin. Chem.* 36/8: 1440-1443.
- Çam, H., (2007), Sıçanlarda aspirin ile uyarılan gastritin önlenmesinde kafeik asit fenetil esterinin etkinliğinin araştırılması, Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi.
- Çakır, H., (1990). Balıkesir Yöresi Ballarında Dominant ve Sekonder Polenler. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fen Bilimleri Eğitimi Anabilim Dalı (Biyoloji), Yüksek Lisans Tezi, 77s, Bursa.
- Çolak, E. (2011). Karbon tetrakloridin (ccl4) indüklediği karaciğer hasarı ve oksidatif stres üzerine Cynara scolymus L. yaprağı ekstraktının etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir
- Dai, Q., Zhang, J., & Pruett, S. B. (2005). Ethanol alters cellular activation and CD14 partitioning in lipid rafts. *Biochem Biophys Res Commun*, 332(1), 37-42. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.04.088.
- de Waal Malefyt, R., Yssel, H., Roncarolo, M. G., Spits, H., & de Vries, J. E. (1992). Interleukin-10. *Curr Opin Immunol*, 4(3), 314-320.
- Devasagayam, T. P., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., & Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India*, 52, 794-804.
- Dinarello, C. A. (2002). The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol*, 20(5 Suppl 27), S1-13.
- Dizdaroglu, M. (1991). Chemical Determination of Free Radical-Induced Damage to DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, 10(3-4), 225-242. doi: Doi 10.1016/0891-5849(91)90080-M.
- Dmitriev, B. A., Ehlers, S., & Rietschel, E. T. (1999). Layered murein revisited: a fundamentally new concept of bacterial cell wall structure, biogenesis and function. *Med Microbiol Immunol*, 187(3), 173-181.
- Doğan, M.D., (2001), E. coli 0111:B4 ve 055:B5 serotipi lipopolisakaritlerinin sıçanlarda oluşturduğu termoregüle edilebilir ve davranışsal değişikliklerin farmakolojik karakterizasyonu, Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı, 71 s. (yayımlanmamış)

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Entok, E., Ustuner, M. C., Ozbayer, C., Tekin, N., Akyuz, F., Yangi, B., Gunes, H. V. (2014). Anti-inflammatuar and anti-oxidative effects of *Nigella sativa* L.: (18)FDG-PET imaging of inflammation. *Molecular Biology Reports*, 41(5), 2827-2834. doi: 10.1007/s11033-014-31372.
- Er, A., Yazar, E., Uney, K., Elmas, M., Altan, F., Cetin, G., (2010), Effects of tylosin on serum cytokine levels in healthy and lipopolysaccharide-treated mice, *Acta Vet Hung*, 58, 75-81 p.
- Erenel, G., Erbaş, D., & Arıcıoğlu, A. (1992). Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. *Gazi medical journal*, 3(4).
- Ersoy, B., (2010), Sığırlarda akut inflamasyonun belirlenmesinde serum demir düzeyinin diyagnostik öneminin araştırılması, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 90 s. (yayımlanmamış)
- Erturun, İ., (2015), Bazı salvia türlerinin ekstrelerinin, böbrek iskemi/reperfüzyon modeli oluşturulan ratlarda inflamasyon ve oksidatif stres açısından değerlendirilmesi, Doktora tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 115 s.
- Faraj, T. A., McLaughlin, C. L., & Erridge, C. (2017). Host defenses against metabolic endotoxaemia and their impact on lipopolysaccharide detection. *Int Rev Immunol*, 36(3), 125-144.
- Fausto, N., (2000), Liver regeneration, *Journal Of Hepatology*, 32, 19-31 p.
- Feghali, C. A., & Wright, T. M. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci*, 2, d12-26.
- Gabay, C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*, 8 Suppl 2, S3. doi:10.1186/ar1917.
- Gannong, F.W., (1999), Tıbbi Fizyoloji, 19.baskıdan çeviri, Barış Kitapevi, Ankara, 550-552 s.
- Giulia, D.C., Mascolo, N., Angelo A.L., et al., (1999), Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences* 65: 337-53.
- Gnauck, A., Lentle, R. G., & Kruger, M. C. (2016). The Characteristics and Function of Bacterial Lipopolysaccharides and Their Endotoxic Potential in Humans. *Int Rev Immunol*, 35(3), 189-218. doi:10.3109/08830185.2015.1087518.
- Gonzalez, M., Camara, M., Prohens, J., Ruiz, JJ., Torija, E. Nuez F. (2000). Color and composition of improved pepino cultivars at three ripening stages. *Gartenbauwissenschaft*, 65 (2) 83-87.
- Gour, N., & Wills-Karp, M. (2015). IL-4 and IL-13 Signaling in Allergic Airway Disease. *Cytokine*, 75(1), 68-78. doi:10.1016/j.cyto.2015.05.01.
- Guiqin, L., (1998). Chemical Composition Analysis of Fruit of New Crop-Pepino (*Solanum muricatum* Ait.) and Its Nutrition Health Function. *Advances in Horticulture*, 2, 295-298.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Gutteridge, J. M. C. (1995). Lipid-Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue-Damage. *Clinical Chemistry*, 41(12B), 1819-1828.
- Haeggstrom, J. Z., Nordlund, P., & Thunnissen, M. M. (2002). Functional properties and molecular architecture of leukotriene A4 hydrolase, a pivotal catalyst of chemotactic leukotriene formation. *ScientificWorldJournal*, 2, 1734-1749. doi: 10.1100/tsw.2002.810
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219(1), 1-14.
- Haugaard, N. (1968). Cellular mechanisms of oxygen toxicity. *Physiol Rev*, 48(2), 311-373.
- Heller, R. A., Schena, M., Chai, A., Shalon, D., Bedilion, T., Gilmore, J., Davis, R. W. (1997). Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(6), 2150-2155.
- Herraiz, F. J., Villano, D., Plazas, M., Vilanova, S., Ferreres, F., Prohens, J., & Moreno, D. A. (2016). Phenolic Profile and Biological Activities of the Pepino (*Solanum muricatum*) Fruit and Its Wild Relative *S. caripense*. *Int J Mol Sci*, 17(3), 394. doi:10.3390/ijms17030394.
- Hibbs, J. B., Jr. (2002). Infection and nitric oxide. *J Infect Dis*, 185 Suppl 1, S9-17. doi: 10.1086/338005.
- Hofseth, L. J., & Wargovich, M. J. (2007). Inflammation, cancer, and targets of ginseng. *Journal of Nutrition*, 137(1), 183s-185s.
- Hsu, C. C., Guo, Y. R., Wang, Z. H., & Yin, M. C. (2011). Protective effects of an aqueous extract from pepino (*Solanum muricatum* Ait.) in diabetic mice. *J Sci Food Agric*, 91(8), 1517-1522. doi:10.1002/jsfa.4345.
- Hsu, J. Y., Lin, H. H., Hsu, C. C., Chen, B. C., & Chen, J. H. (2018). Aqueous Extract of Pepino (*Solanum muricatum* Ait) Leaves Ameliorate Lipid Accumulation and Oxidative Stress in Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients*, 10(7). doi:10.3390/nu10070931.
- Huang MY, Liao MH, Wang YK, Huang YS, Wen HC., (2012), Effect of lavender essential oil on LPS-stimulated inflammation. *Am J Chin Med*. 40(4):845-59.
- Iontcheva, I., Amar, S., Zawawi, K. H., Kantarci, A., & Van Dyke, T. E. (2004). Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction. *Infect Immun*, 72(4), 2312-2320.
- İskit, A. B. (2005). Sepsiste deneysel modeller. *Yoğun Bakım Dergisi*, 5, 133-136.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Kalaz, E. B., Aydın, A. F., Dogan-Ekici, I., Coban, J., Dogru-Abbasoglu, S., & Uysal, M. (2016). Protective effects of carnosine alone and together with alpha-tocopherol on lipopolysaccharide (LPS) plus ethanol-induced liver injury. *Environ Toxicol Pharmacol*, 42, 23-29. doi:10.1016/j.etap.2015.12.018.
- Kawanishi, S., & Hiraku, Y. (2006). Oxidative and nitrative DNA damage as biomarker for carcinogenesis with special reference to inflammation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(5-6), 1047-1058. doi: DOI 10.1089/ars.2006.8.1047.
- Klebanoff, S. J. (1999). Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians*, 111(5), 383-389.
- Kocycigit, A., Erel, O., Gur, S. (2001). Effects of tobacco smoking on plasma selenium, zinc, copper and iron concentrations and related antioxidative enzyme activities. *Clinical Biochemistry*, 34: 629-633.
- Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., & Lu, S. D. (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*, 53(1), 45-53.
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milosa, M., (2004), Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil, *Food Chemistry*, 85, 4, 633-640 p.
- Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins S.L., (1992), Temel Patoloji, Akut ve kronik inflamasyon, 5. baskıdan çeviri, Nobel Kitabevi & Yüce Yayınları, İstanbul, 25-38 s. (A)
- Kumar, V., Cotran, R.Z., Robbins, S.L., (2000), Akut ve Kronik İnflamasyon, "Basic Pathology" U. Çevikbaş (Editör), Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., Çapa-İstanbul, 25-46 s. (B)
- Kuralay, F., & Çavdar, Z. (2006). İnflamatuar medyatörlere toplu bir bakış. *Genel Tıp Derg*, 16(3), 143-152.
- Kurt, H., Başaran, A., Aral, E., (2005), Sıçanlarda karbon tetraklorit' in oluşturduğu oksidatif stresin likopen ile önlenmesi, *Türkiye Klinikleri Journal of Medical science*, 25, 167-173 s,
- Kuyumcu, A., Polat, A., Özmen, M.M. (2004). Travma ve enfeksiyonda nitrik oksidin rolü. *Ulus Travma Derg*, 10(3):149-159
- Lancaster, L. H., Christman, J. W., Blackwell, T. R., Koay, M. A., & Blackwell, T. S. (2001). Suppression of lung inflammation in rats by prevention of NF-kappaB activation in the liver. *Inflammation*, 25(1), 25-31.
- Libby, P. (2007). Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev*, 65(12 Pt 2), 140-146.
- Memişoğulları, R. (2005). Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3: 30-39.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Marcinkiewicz, J., Chain, B., Nowak, B., Grabowska, A., Bryniarski, K., & Baran, J. (2000). Antimicrobial and cytotoxic activity of hypochlorous acid: interactions with taurine and nitrite. *Inflamm Res*, 49(6), 280-289.
- Mccord, J. M. (1993). Human-Disease, Free-Radicals, and the Oxidant/Antioxidant Balance. *Clinical Biochemistry*, 26(5), 351-357. doi: Doi 10.1016/0009-9120(93)90111-I.
- Mercan, U. (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(1), 91-96.
- Mesquida, J., Renard, M., (1982). Etude de la Dispersion du Pollen par le Vent et de L'importance de la Pollinisation Anémophile chez le Colza (Brassica napus L., var oleifera Metzger). *Apidologie*, 13, 353-366.
- Nakano, H., Yamaguchi, M., Kaneshiro, Y., Yoshida, K., Kigawa, G., Nagasaki, H., Fujiwara, Y., Matsumoto, F., Kitamura, N., Sasaki, J., Kuzume, M., Takeuchi, S., Kumada, K., (1998), SAdenosyl-L-Methionine attenuates ischemia-reperfusion injury of steatotic livers, *Transplantation Proceedings*, 30, 3735-3736 p.
- Nemati, S.H., Karimian, Z., Tehranifar, A., Mashhadian, N.V., Lakzian, A., (2009). Investigation of Some Effective Factors on Yield Traits of Pepino (*Solanum muricatum*) as a New Vegetable in Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(6), 492-497.
- Nordberg, J., & Arner, E. S. J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11), 1287-1312. doi: Doi 10.1016/S08915849(01)00724-9.
- Noyan T. (2009). Serum Gama Glutamil Transferaz: Son Elde Edilen Bulgular ve Çeşitli Hastalıkların Fiziopatolojisindeki Önemi. *Van Tıp Dergisi*: 16 (1):48-55.
- Nuez, F., Ruiz, J.J.(1996). El Pepino Dulce y Su Cultivo. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 148p, Roma, Italy.
- O'Connor, T. M., O'Connell, J., O'Brien, D. I., Goode, T., Bredin, C. P., & Shanahan, F. (2004). The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol*, 201(2), 167-180. doi: 10.1002/jcp.20061.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annals of Biochemistry*. 95:351-358.
- O'Neill, C. A., Stebbins, C. L., Bonigut, S., Halliwell, B., & Longhurst, J. C. (1996). Production of hydroxyl radicals in contracting skeletal muscle of cats. *J Appl Physiol* (1985), 81(3), 1197-1206.
- Özbal, Y. (2000). *Temel İmmünoloji* (2 ed.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Özbaşıoğlu, O., (2009), Endotoksin ile oluşturulan inflamatuvar hiperaljezide talidomidin etkilerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Farmakoloji Anabilim Dalı, 98 s. (yayımlanmamış)
- Öztürk, N., Tunçel, M., Uysal, D., Oncu-Kaya, E.M. (2011). Determination of Rosmarinic Acid by High-Performance Liquid Chromatography and Its Application to Certain Salvia Species and Rosemary. *Food Analytical Methods*. 4(3): 300-306.
- Park, J. E., & Barbul, A. (2004). Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg*, 187(5A), 11S-16S. doi: 10.1016/S0002-9610(03)00296-4.
- Powell, SR.(2000).The antioxidant properties of zinc. *Journal of Nutrition*, 130: 1447-1454.
- Prohens, J., Ruiz, J.J., Nuez, F. (1996). The Pepino (*Solanum muricatum*, Solanaceae), A "New" Crop with a History. *Economic Botany*, 50(4), 355-368.
- Quaile, M. P., Melich, D. H., Jordan, H. L., Nold, J. B., Chism, J. P., Polli, J. W., . . . Rhodes, M. C. (2010). Toxicity and toxicokinetics of metformin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 243(3), 340-347. doi:10.1016/j.taap.2009.11.026.
- Raetz, C. R., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 71, 635-700. doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
- Redgwell, JR., Turner, NA., (1986). Pepino (*Solanum muricatum*): Chemical composition of ripe fruit, *J. Sci. Food Agric.*, 37: 1217-1222.
- Ren, W., Tang, D.G., (1999). Extract of *Solanum muricatum* (Pepino/CSG) Inhibits Tumor Growth by Inducing Apoptosis. *Anticancer Research*, 19, 403-408.
- Reznick, A. Z., Cross, C. E., Hu, M. L., Suzuki, Y. J., Khwaja, S., Safadi, A., . . . Halliwell, B. (1992). Modification of Plasma-Proteins by Cigarette-Smoke as Measured by Protein Carbonyl Formation. *Biochemical Journal*, 286, 607-611.
- Rietschel, E. T., Brade, H., Holst, O., Brade, L., Müller-Loennies, S., Mamat, U., . . . Schumann, R. R. (1996). Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Pathology of Septic Shock*, 216, 39-81.
- Rizk, M., Witte, M. B., & Barbul, A. (2004). Nitric oxide and wound healing. *World J Surg*, 28(3), 301-306. doi: 10.1007/s00268-0037396-7.
- Ruiz, J.J., Prohens, J., Valcarcel, J.V., Nuez, F. (1996). Efecto de la Aplicación de Tratamientos Hormonales en el Comportamiento Productivo del Pepino Dulce en Ciclo de Cultivo de Otoño-invierno. *Información Técnica Económica Agraria*, 17, 294-302.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Ryan, G. B., & Majno, G. (1977). Acute inflammation. A review. *Am J Pathol*, 86(1), 183-276.
- Rikans, L.F., Hornbrook, K.R. and Cai, Y., (1994), Carbon tetrachloride hepatotoxicity as a function of age in female fischer 344 rats, *Mechanisms Of Ageing And Development*, 20,89-99 p.
- Sanchez-Vega, I., (1992). Frutales Andinos, Pepino Dulce (*Solanum muricatum* Ait), 179-183, En, Hernández-Bermejo, J.E y Leon, J. (editors.), *Cultivos Marginados, Otra Perspectiva de 1492*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma.
- Schaffer, A.A., Rylski, I., Fogelman, M., (1989). Carbohydrate Content and Sucrose Metabolism in Developing *Solanum muricatum* Fruits. *Phytochemistry*, 28(3), 737-739.
- Seifried, H. E., Anderson, D. E., Fisher, E. I., & Milner, J. A. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(9), 567-579. doi: 10.1016/j.jnutbio.2006.10.007.
- Sessle, B. J. (2001). New insights into peripheral chemical mediators of temporomandibular pain and inflammation. *Journal of Orofacial Pain*, 15(1), 5-5.
- Shathish, K., & Guruvayoorappan, C. (2014). *Solanum muricatum* Ait. inhibits inflammation and cancer by modulating the immune system. *J Cancer Res Ther*, 10(3), 623-630. doi:10.4103/0973-1482.138198.
- Sleep, J., Wilson, D., Simmons, R., & Gratzer, W. (1999). Elasticity of the red cell membrane and its relation to hemolytic disorders: an optical tweezers study. *Biophys J*, 77(6), 3085-3095. doi: 10.1016/S00063495(99)77139-0.
- Sorkun, K., (1986). "Polen". *Teknik Arıcılık Dergisi*, 4, 23-26.
- Spalding J., (1988). "Toxicology and carcinogenesis studies of malonaldehyde, sodium salt in F344/N rats and B6C3F1 mice, NIH Publication", *Department of Health and Human Services*.
- Sudha, G., Sangeetha Priya, M., Indhu Shree, R., Vadivukkarasi, S. (2011). Antioxidant activity of ripe Pepino Fruits (*Solanum Muricatum* Aiton). *Int J Pharm Pharm Sci, Vol 3, Issue 3*, 257-261.
- Sweet, (1986). Pepino, Can It Grow Here. *California Grower*, 10(7), 19-34
- Takabayashi, T., Vannier, E., Clark, B. D., Margolis, N. H., Dinarello, C. A., Burke, J. F., & Gelfand, J. A. (1996). A new biologic role for C3a and C3a desArg: regulation of TNF-alpha and IL-1 beta synthesis. *J Immunol*, 156(9), 3455-3460.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Tanas, S., (2007), Deneysel olarak enflamasyon oluşturulan ratlarda *Peltigera rufescens* (weis) humb. isimli likenden elde edilen metanol ekstraktlarının antioksidant enzim aktiviteleri üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 97 s. (yayımlanmamış)
- Taşkın, D., (2006). Burdur Yöresi Ballarının Polen Analizi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 52s, Isparta
- Tuzlalı, S., Güllüoğlu, Mine, Çevikbaş, Uğur. (2014). *Robbins Temel Patoloji* (9 ed.). İstanbul: Nobel Kitabevi.
- Vincent, J. L., Opal, S. M., Marshall, J. C., & Tracey, K. J. (2013). Sepsis definitions: time for change. *Lancet*, 381(9868), 774-775. doi:10.1016/s0140-6736(12)61815-7.
- Warren, J. S. (1990). Interleukins and tumor necrosis factor in inflammation. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 28(1), 37-59. doi:10.3109/10408369009105897.
- Watkins, L. R., Wiertelak, E. P., Goehler, L. E., Smith, K. P., Martin, D., & Maier, S. F. (1994). Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. *Brain Res*, 654(1), 15-26.
- Xu, L., Gao, J., Wang, Y., Yu, W., Zhao, X., Yang, X., Zhong, Z., Zhong-Ming, Qian, (2011), Myrica rubra extracts protect the liver from CCl4-induced damage Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1-9 p.
- Yan, D., Liu, H. L., Yu, Z. J., Huang, Y. H., Gao, D., Hao, H., . . . Zhou, X. Y. (2016). BML-111 Protected LPS/D-GalN-Induced Acute Liver Injury in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7). doi:10.3390/ijms17071114.
- Yangı, B. (2012). Propolis ekstresinin deneysel inflamasyon ve antioksidan sistem üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Yazar, E., Er, A., Uney, K., Bulbul, A., Avci, G.E., Elmas, M., Tras, B., (2010), Effects of drugs used in endotoxic shock on oxidative stress and organ damage markers. *Free Radic Res*, 44, 397402 p.
- Yörük, N., (1997). Pepino (*Solanum muricatum* Ait.)' da Bazı Uygulamaların Meyve Tutumu, Verim ve Kalite Üzerine Etkileri. Uludağ Üniversitesi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 66s, Bursa.
- Zerin, M., Karakilçık, A. Z., Nazlıgöl, Y., BİTİren, M., & Özardali, H. İ. (2004). Protective Role of Nigella Sativa Oil on Experimental Liver Injury in Rats. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 24(6), 598.
- Zhang, J.-M., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International anesthesiology clinics*, 45(2), 27-37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Zhang, Y. J., Zhou, T., Wang, F., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, J. J., . . . Li, H. B. (2016). The Effects of *Syzygium samarangense*, *Passiflora edulis* and *Solanum muricatum* on Alcohol-Induced Liver Injury. *Int J Mol Sci*, *17*(10). doi:10.3390/ijms17101616.
- Zhou, J. F., Xiao, W. Q., Zheng, Y. C., Dong, J., & Zhang, S. M. (2006). Increased oxidative stress and oxidative damage associated with chronic bacterial prostatitis. *Asian J Androl*, *8*(3), 317-323. doi: 10.1111/j.1745-7262.2006.00144.x.

Özgeçmiş

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Ezgi ERDOĞAN
Doğum tarihi ve yeri : 20/03/1990 - ESKİŞEHİR
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Evli
İletişim adresleri : ezgialtinok0@gmail.com

Eğitim Durumu

İlköğretim : Ahmet Sezer İlköğretim Okulu(1996-2004)
Lise : Eskişehir Yunus Emre Lisesi / Fen Bilimleri
(2004-2008)
Üniversite : Afyon Kocatepe Üniversitesi / Fen Edebiyat
Fakültesi / Kimya Bölümü (2008-2010)
: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi/ Fen
Edebiyat Fakültesi / Kimya Bölümü (2010-2013)
Diller : İngilizce