T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

Koyunlarda Phlorizinin Serum Lipid Profili ve Oksidatif Stres Parametreleri Üzerine Etkisi

Proje No: **TSD-12-4119**

Proje Türü

Doktora Tezi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Yrd.Doç.Dr.Ali Cesur ONMAZ
Veteriner İç Hastalıkları ABD

Araştırmacının Adı Soyadı
İlknur KARACA BEDİK
Veteriner İç Hastalıkları ABD

26.09.2013

KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

KOYUNLARDA PHLORİZİNİN SERUM LİPİD PROFİLİ VE OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Hazırlayan

İlknur KARACA BEDİK

Danışman

Yrd.Doç.Dr.Ali Cesur ONMAZ

Doktora Tezi

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSD-12-4119 nolu proje ile desteklenmiştir

Haziran 2013
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: İlknur KARACA BEDİK
İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"Koyunlarda Phlorizinin Serum Lipid Profili ve Oksidatif Stres Parametreleri Üzerine Etkisi" adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan	**Danışman**
İlknur KARACA BEDİK	**Yrd.Doç.Dr.Ali Cesur ONMAZ**

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Vehbi GÜNEŞ

Yrd. Doç. Dr. Ali Cesur ONMAZ danışmanlığında **İlknur KARACA BEKDİK** tarafından hazırlanan **"Koyunlarda Phlorizinin Serum Lipid Profili ve Oksidatif Stress Parametreleri Üzerine Etkisi"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü **Veteriner İç Hastalıkları** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

07 / 05 / 2013

(Tez savunma sınav tarihi yazılacaktır.)

JÜRİ:

Danışman	:Yrd. Doç. Dr. Ali Cesur ONMAZ
Üye	:Prof. Dr. Mehmet ÇİTİL
Üye	:Prof. Dr. Osman KÜÇÜK
Üye	:Prof. Dr. Vehbi GÜNEŞ
Üye	:Prof.Dr. İhsan KELEŞ

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 30 MAYIS 2013 tarih ve 584 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

30 MAYIS 2013

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Ali Cesur ONMAZ'a, Anabilim dalı Başkanı Prof. Dr. Vehbi GÜNEŞ'e ve Prof. Dr. İhsan KELEŞ'e, deneme aşamasında değerli fikirlerini aldığım Doç. Dr. Öznur ASLAN'a, çalışmam sırasında analizlerinin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan İç Hastalıkları Anabilim Dalı Araştırma görevlisi Mehmet ULUSAN'a, biyopsi işleminin gerçekleştirilmesi aşamasında yardımlarından dolayı Cerrahi Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Gültekin ATALAN'a, öğretim görevlisi Dr. Muharrem EROL ve Hanifi EROL'a ve araştırma görevlisi Zafer DOĞAN'a, Çalışmanın histapatolojik değerlendirilmesinde yardım ve bilgilerini esirgemeyen Prof. Dr. Ayhan ATASEVER ve araştırma görevlisi Duygu YAMAN'a istatistiksel analizlerde yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Ferhan ELMALI'ya, çalışma süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ'a, sevgili eşim Murat BEKDİK'e ve sevgili kardeşlerim Sıla ve Karacan KARACA'ya tez projesini TSD-12-4119 proje koduyla maddi olarak destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi yetkililerine, çalışmalarım sırasında ve ayrıca tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen çok kıymetli aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İlknur KARACA BEKDİK
Kayseri, Haziran 2013

KOYUNLARDA PHLORİZİNİN SERUM LİPİD PROFİLİ VE OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

İlknur KARACA BEKDİK

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner İç Hastalıkları Anabilim Dalı Doktora Tezi, Mayıs 2013

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ali Cesur ONMAZ

ÖZET

Bu çalışmanın amacı koyunlarda phlorizin uygulamasının serum lipit profili ve oksidatif stres indikatörleri üzerine etkinliğini araştırmaktı. Çalışmada 10 adet laktasyonda ve gebe olmayan koyun kullanıldı. Phlorizin 100 mg/kg dozunda her hayvana derialtı yolla enjekte edildi. Çalışma öncesi ve sonrasında hayvanların canlı ağırlıkları (CA) ve sırt yağı kalınlığı (SYK) ölçüldü. Çalışmadan önceki (0. saat) ve sonraki 12, 24, 48, 72 ve 120. saatlerde alınan kan örneklerinde hematolojik ve lipit profilini içeren biyokimyasal parametreler ile oksidatif stres indikatörleri analiz edildi. Aynı saatlerde idrar örnekleri de analiz edildi. Histopatolojik muayene için, çalışma öncesi ve sonrasında iki adet koyundan karaciğer biopsi örneği alındı. Çalışma sonucunda, phlorizinin ortalama canlı ağırlık, sırt yağı kalınlığı, total lökosit (WBC), insülin, glikoz, kan üre nitrojen (BUN), kreatinin, trigliserit (TG), alkalen fosfataz (ALP), laktat dehidrogenaz (LDH), total oksidatif seviye (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) değerlerini önemli ölçüde azalttığı ($p<0.05$) ve ortalama trombosit (PLT), hemoglobin (Hgb), esterleşmemiş yağ asitleri (NEFA) değerlerini ise önemli oranda artırdığı belirlendi ($p<0.05$). İdrar örneklerinde proteinüri ve glikozüri tespit edildi. Histopatolojik muayenede, phlorizin uygulamasından sonra alınan biyopsi örneklerinde hepatositlerin stoplazmalarındaki yağ vakuollerinin sayısında azalma görüldü. Sonuçta, bu çalışma koyunlarda phlorizinin antihiperglisemik, antioksidant ve antihiperlipidemik olarak önerilebileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Koyun, phlorizin, lipid profili, oksidatif stres

THE EFFECTS OF PHLORIZIN ON SERUM LIPID PROFILE AND OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN SHEEP

Ilknur KARACA BEKDIK

Erciyes University, Institue of Health Sciences

Department of Veterinary Internal Medicine

Phd Thesis, May 2013

Supervisor: Assistand Prof. Ali Cesur ONMAZ

ABSTRACT

The aim of this study was analyzed the effect of phlorizin application on the serum lipid profile and the oxidative stress indicators in sheep. Ten non-lactating and non-pregnant sheep were used in this study. Phlorizin was subcutaneously injected at a dosage of 100 mg/kg to each animal. Body weight (BW) and subcutaneous fat thickness (SFT) were measured at the beginning and at the end of the study. Hematological, biochemical parameters including lipid profile and oxidative stress indicators were analyzed in blood samples obtained before (0. hour) and 12, 24, 48, 72 and 120. hours after the study. Urine samples were analyzed at the same time intervals. Liver biopsy materials were obtained before-and after study for histopathological examinations. Results indicates that phlorizin significantly decreased mean BW, SFT, total leukocyte (WBC), insulin, glucose, blood urea nitrogen (BUN), creatinin, triglyceride (TG), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH), total oxidative status (TOS) and oxidative stress index (OSI) values ($p<0.05$), whereas phlorizin significantly increased mean platelets (PLT), hemoglobin (Hgb) and non-esterified fatty acids (NEFA) values ($p<0.05$). Proteinuria and glycosuria were determined in urine samples. Histopathological examinations revealed a progressive decrease in cytoplasmic lipid vacuoles of hepatocytes after phlorizin administration. This study suggests that phlorizin could be purposed as an antihyperglycemic, antioxidant and antihyperlipidemic agents in sheep.

Key words: Sheep, phlorizin, lipid profile, oxidative stress

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

İÇ KAPAK i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI iii
KABUL VE ONAY SAYFASI iv
TEŞEKKÜR v
ÖZET vi
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER viii
TABLO LİSTESİ xi
ŞEKİL VE GRAFİK LİSTESİ xii
KISALTMALAR xiii

1.GİRİŞ VE AMAÇ 1
2.GENEL BİLGİLER 3
2.1. PHLORİZİN 3
2.2. PHLORİZİNİN KİMYASAL YAPISI 4
2.3. ETKİ MEKANİZMASI 4
2.4. PHLORİZİNİN GELECEKTE KULLANIMI 8
2.5. LİPİD METABOLİZMASI 9
2.6. LİPİD METABOLİZMASININ HORMONAL REGÜLASYONU 11
2.7. KARACİĞER YAĞLANMASI 12
2.8. OKSİDATİF STRES 18
3. GEREÇ VE YÖNTEM. 36
3.1. GEREÇ 36
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Hayvanlar 36
3.1.2. Araştırmada Kullanılan Araç Gereç, Kimyasal Maddeler ve Malzemeler 36
3.2. YÖNTEM 42
3.2.1. Klinik Muayene 42
3.2.2. Kan Örneklerinin Toplanması 42
3.2.3. İdrar Örneklerinin Toplanması 43
3.2.4. Koyunlara Phlorizin Uygulanması 43
3.2.5. Kan Örneklerinin İşlenmesi 44
3.2.6. Hematolojik Analizler 44
3.2.7. İdrar Örneklerinin İncelenmesi 45

3.2.8. Biyokimyasal Analizler 45
3.2.9. Oksidatif Stres Parametrelerinin Belirlenmesi 49
3.2.10. Ultrasonografik Muayene 51
3.2.11. Biyopsi Örneğinin Alınması 52
3.2.12. Histopatolojik Analizler 54
3.2.13. İstatistik Analizler 54
4. BULGULAR 55
4.1. PHLORİZİN UYGULAMA SONRASINDA KLİNİK MUAYENE BULGULARI 55
4.2. PHLORİZİNİN CANLI AĞIRLIK ÜZERİNE ETKİSİ 55
4.3. HEMATALOJİK ANALİZ SONUÇLARI 56
4.4. İDRAR ANALİZİ SONUÇLARI 59
4.5. BİYOKİMYASAL ANALİZ SONUÇLARI 60
4.6. OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ ANALİZ SONUÇLARI. 65
4.7. ULTRASONOGRAFİK MUAYENE BULGULARI 67
4.8. HİSTOPATOLOJİK ANALİZ SONUÇLARI 68
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 70
6.KAYNAKLAR 80
EKLER
ÖZGEÇMİŞ

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1. Serbest radikallerin hücre dışı kaynakları.....27
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan koyunlara verilen yemin bileşimi.....42
Tablo 4.1. Koyunlarda ortalama canlı ağırlık değişimleri 56
Tablo 4.2. Çalışmada kullanılan koyunlara ait hematoloji değerleri 58
Tablo 4.3. İdrar analiz sonuçları 59
Tablo 4.4. İdrar glikoz değerleri.....60
Tablo 4.5. Çalışmada kullanılan koyunlara ait biyokimyasal değerler 61
Tablo 4.6. Çalışmada kullanılan koyunlara ait ortalama BHB, NEFA ve AcAc seviyeleri 63
Tablo 4.7. Çalışmada kullanılan koyunlara ait ortalama oksidatif stres değerleri 65
Tablo 4.8. Çalışmada kullanılan koyunlara ait ortalama sırt yağ kalınlıkları 67

Şekil 2.1. Phlorizinin kimyasal yapısı.....4
Şekil 2.2. Glikozun bağırsak ve böbrek proksimal tubullerinden emilimi 7
Şekil 2.3. Phlorizinin glikoz emilimini SGLT1 ve SGLT'yi bloke ederek engellemesi 8
Şekil 2.4. Memeli hücrelerinde reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin meydana gelişi 26
Şekil 2.5. Serbest oksijen radikallerinin etkilediği hücresel yapılar.....29
Şekil 3.1 Koyunların kan alınması.....43
Şekil 3.2. İdrar alma yöntemi.....43
Şekil 3.3. Koyunlardan idrar alınması 43
Şekil 3.4. Phlorizin dihydrate.....43
Şekil 3.5. Koyunlara deri altı phlorizin enjeksiyonu.....43
Şekil 3.6. Santrifüj edilmiş kan örnekleri 44
Şekil 3.7. EDTA'lı kan örneklerinin kan sayım cihazında kan sayımlarının yapılması 44
Şekil 3.8. İdrar örneklerinin test stripleri ile değerlendirilmesi 45
Şekil 3.9 Standart soluyon derişimlerin hazırlanması.....46
Şekil 3.10. NEFA analizinde ELISA pleytindeki görüntü 47
Şekil 3.11. TOS analizinde ELISA pleytindeki görünüm.....50
Şekil 3.12. TAS analizinde ELISA pleytindeki görüntü.....51
Şekil 3.13. Koyunların sırt bölgesindeki yağlanmanın ultrasonografi ile ölçülmesi ..52
Şekil 3.14. Koyunların sırt bölgesindeki yağlanmanın ultrasonografik görüntüsü 52

Sayfa No

Şekil 3.15. Biyopsi iğnesi 53

Şekil 3.16. Koyunlarda biyopsi alma işlemi öncesi karaciğerin ultrasonografik muayenesi 53

Şekil 3.17. Koyunlarda karaciğerden biyopsi alma işleminden önce bölgeye lokal anestezi uygulanması.....53

Şekil 3.18. Koyunlarda karaciğerden biyopsi alınması.....53

Şekil 3.19. Koyunlarda karaciğerden biyopsi alınması sırasında ultrasonografik görüntü 53

Şekil 4.1. Phorizin uygulama öncesi (0. saat) ve sonrasında (120. saat) canlı ağırlık değişimleri 56

Şekil 4.2. Phorizin uygulama öncesi ve sonrasında serum AcAc düzeylerindeki değişimler 63

Şekil 4.3. Phorizin uygulama öncesi ve sonrasında serum BHB düzeylerindeki değişimler 64

Şekil 4.4. Phorizin uygulama öncesi ve sonrasında serum NEFA düzeylerindeki değişimler 64

Şekil 4.5. Phorizin uygulama öncesi ve sonrasında serum TAS düzeylerindeki değişimler 66

Şekil 4.6. Phorizin uygulama öncesi ve sonrasında serum TOS düzeylerindeki değişimler 66

Şekil 4.7. Phorizin uygulama öncesi ve sonrasında serum OSI düzeylerindeki değişimler 67

Şekil 4.8. Phlorizin uygulamasından önceki (0. saat) ve sonraki (120. saat) ortalama sırt yağı kalınlıkları 68

Şekil 4.9. Phlorizin uygulamasından önce 1 numaralı hayvanın karaciğerinin histopatolojik görünümü 69

Şekil 4.10. Phlorizin uygulamasından sonra 1 numaralı hayvanın karaciğerinin histopatolojik görünümü 69

Şekil.4.11. Phlorizin uygulamasından önce 2 numaralı hayvanın karaciğerinin histopatolojik görünümü 69

Şekil.4.12. Phlorizin uygulamasından sonra 2 numaralı hayvanın karaciğerinin histopatolojik görünümü 69



KISALTMALAR

AcAc	Aseto Asetik Asit
ALP	Alkalen Fosfataz
ALT	Alanin Aminotransferaz
AST	Aspartat Aminotransferaz
BHB	Beta Hidroksi Bütirik Asit
BUN	Kan Üre Nitrojen (Blood Ure Nitrogene)
CA	Canlı Ağırlık
CAT	Katalaz
CPK	Kreatin Fosfokinaz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ETZ	Elektron Transport Zinciri
GGT	Gama Glutamil Transferaz
GLDH	Glutamat Dehydrogenase
GLUTs	Kolaylaştırıcı Glikoz Taşıyıcıları
GR	Glutatyon Reduktaz
GSH-Px	Glutatyon Peroksidaz
GST	Glutatyon S-Transferaz
HCT	Hemotokrit
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HE	Hematoksilen-Eozin
HGB	Hemoglobin
$HO_2^{\cdot}$	Perhidroksil Radikali
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
$HO^{\cdot}$	Hidroksil Radikali
HOCI	Hipokloröz Asit
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
MCH	Ortalama Eritrosit Hemoglobini (Mean Corpuscular Hemoglobin
MCHC	Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu (Mean

	Corpuscular Hemoglobin Concentrate)
MCV	Ortalama Eritrosit Hacmi (Mean Corpuscular Volume)
MDA	Malondialdehit
MPO	Myeloperoksidaz
MPV	Ortalama Trombosit Hacmi (Mean Platelet Volume)
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NEFA	Esterleşmemiş Yağ Asiti
NO	Nitrik Oksit
OD	Optik Dansite
OSİ	Oksidatif Stres İndeksi
PCT	Platekrit (Platelet Crit)
PDW	Trombosit Dağılım Genişliği (Platelet Distribution Width)
PLT	Trombosit (Platelet)
RBC	Eritrosit Sayısı
RDW	Eritrosit Dağılım Genişliği (Red Cell Distribution Width)
RNA	Ribonükleik Asit
SDH	Sorbitol Dehidrogenaz
SGLTs	Sodyum Bağımlı Glikoz Taşıyıcıları
SOD	Superoksit Dismutaz
SSSS	Stok Stabil Standart Solüsyon
SYK	Sırt Yağı Kalınlığı
TAS	Total Antioksidan Seviye
TG	Trigliserit
TOS	Total Oksidan Seviye
WBC	Total Lökosit Sayısı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Phlorizin elma ağacının kök kabuklarında, sürgünlerinde ve yapraklarında bulunan acı tada sahip fenolik bir glikozit (1) olup ateş düşürücü özelliğinden dolayı sıtma gibi birçok ateşli ve enfeksiyöz hastalığın tedavisinde denenmiş ve hastalıkların tedavisinde yararlı olduğu kabul edilmiştir (2). Phlorizin daha önceden insanlarda böbrek fonksiyon çalışmalarında sıklıkla kullanılmış ve glikozüriye sebep olduğu bildirilmiştir (3,4).

Phlorizin birçok araştırmacı tarafından sığırlarda (5), koyunlarda (6) ve ratlarda (7,8) renal ve intestinal glikoz reabsorbsiyonunu engellemek amacıyla kullanılmıştır. Koyun ve keçilerle yapılan çalışmalarda; phlorizin enjeksiyonundan sonra hiypoglisemi, glikozüri, ketonemi meydana geldiği ve serbest yağ asiti miktarında artışların olduğu rapor edilmiştir (6). Bu özelliklerinden dolayı ülkemizde de koyunlara phlorizin verilerek deneysel çalışmalar yapılmış ve phlorizin uygulamasının yanında aç bırakılan koyunlarda ketozis oluşturulabileceği bildirilmiştir (9,10). Ayrıca birçok araştırmacı tarafından phlorizinin oksidatif denge üzerinde olumlu etkilere yol açtığı, antioksidan ve süperoksit anyonlarını (11), singlet oksijeni (12), lipit peroksit radikallerini (13), temizleyici ve metal iyonlarını bağlayıcı (14) özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Buna ilaveten phlorizinin, 17-β estradiol'den daha güçlü bir lipit peroksidasyon inhibitörü olduğu da bildirilmiştir (15). Tip 1 ve tip 2 diyabetli rodentlerde yapılan çalışmalarda, deri altı uygulanan phlorizinin idrarla glikoz atılımını artırarak ve glikozun böbreklerden geri emilimini engelleyerek hiperglisemiyi düzelttiği belirtilmiştir (16,17). Ayrıca tip 1 diyabetli hastalarda, phlorizinin parçalanması sonucunda oluşan ploritinin, bağırsaklardan, glikoz, yağ asitleri ve gliserol'ün emilimini azaltması sonucunda; glisemik düzeyi dengelediği, trigliserit (TG) ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) seviyelerini normal düzeyde tuttuğu ya da biraz düşürdüğü, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) seviyelerini ise hafif artırdığı gözlemlenmiştir (18).

Ratlarda ve insanlarda phlorizin kullanılarak yapılan deneysel çalışmalarda, antihiperglisemik ve antioksidant etkileri bilinmesine rağmen, koyun gibi geviş getiren hayvan türlerinde söz konusu bu etkileri bilinmemekte olup, aynı zamanda karaciğer yağlanmasıyla sonuçlanabilecek önemli hastalıklardaki lipit profili üzerindeki antihiperlipidemik rolü de henüz ortaya konmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada phlorizinin koyunlarda;

1. Hematolojik parametreler [total lökosit (WBC), eritrosit (RBC), hemoglobin (Hgb), hematoktit (Hct), ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama eritrosit hemoglobin (MCH), ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC), eritrosit dağılım genişliği (RDW), trombosit (PLT), ortalama trombosit hacmi (MPV), trombosit dağılım genişliği (PDW), platekrit (PCT)],

2. Serum lipit profili [trigliserit, toplam kolesterol, esterleşmiş yağ asitleri (NEFA), yüksek dansiteli lipoprotein (HDL), düşük dansiteli lipoprotein (LDL)], keton cisimleri [beta hidroksibutirik asit (BHB), asetoasetik asit (AcAc)] ile birlikte diğer kimyasal parametreler [glikoz, albumin, kan üre nitrojen (BUN), kreatinin, aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP), gama glutamil transferaz (GGT), laktat dehidrogenaz (LDH), trigliserit (TG), total protein (TP), amilaz, lipaz],
3. Oksidatif Stres Parametreleri [total antioksidan seviye (TAS), total oksidan seviye (TOS) ve oksidatif stres indeksi] üzerinde etkinliğinin araştırılması,
4. Yağlanma (karaciğer, deri altı yağ dokusu) ya da obezite üzerine etkisi,
5. İnsülin hormonu üzerindeki etkilerinin tespit edilmesi amaçlandı.

Ayrıca bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında lipit ve glikoz metabolizmasını ilgilendiren ileri çalışmalara literatür bilgisi sağlanması da amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

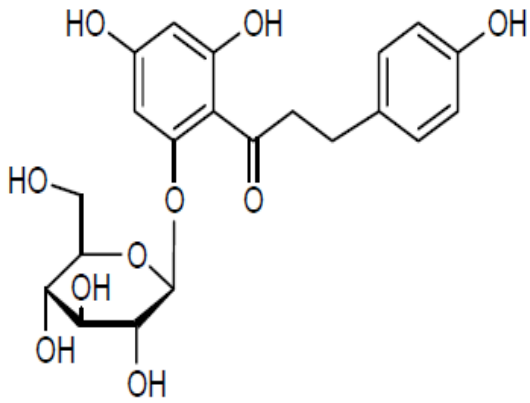
2.1. PHLORİZİN

Philorizin elma ağacının kök kabuklarında, sürgünlerinde ve yapraklarında bulunan başlıca fenolik glikozittir (1). Fransız kimyagerler phlorizini 1835'de elma ağacının kabuğundan izole etmişlerdir (19). Aynı zamanda, floretin glikozitler Avustralya yerli saparna (Smilax glyciphylla) yaprakları (20), tatlı çay (Lithocarpus polystachyus) (21) ve çok düşük seviyede çilek meyvesinde (22) de bulunmaktadır.

Deneysel kanıtlar phlorizinin elma ağacının fizyolojisinde bir dizi rolü olduğunu göstermektedir. Bunlar elma ağacının büyüme ve gelişmesinin düzenlenmesinde rol oynamak (23-25) ve antibakteriyel (26) ve antifungal (phytoalexin) özellik göstermek (27,28) gibi önemli etkilerdir. Elma suyu ve şarabının renginin büyük bir oranını doğal olarak açığa çıkan phlorizinin dimerize oksidan ürünü oluşturmaktadır (15). Yüksek performanslı likit kromatografi kullanılarak elma suyu (29) ve elma meyvesinin (30) içerdiği phlorizin miktarı belirlenmiştir. Elma kabuğu 12-418 mg/kg phlorizin içerirken elma posası 4-20mg/kg phlorizin içerir. Phlorizin, enaz Golden Delicious cinsi elmalarda bulunurken en fazla Reineta Green cinsi elmalarda bulunur. Bu çalışmalar phlorizinin insan diyetinin doğal bir bileşeni olduğunu göstermektedir (31). Söğüt ve kına kına ağaçlarının ekstraktlarının antipiretik özellikte olması ve florizinin de acı tadı nedeniyle bunlara benzemesi florizinin de bunlar gibi sıtmanın tedavisinde kullanılmasına neden olmuştur (2). Phlorizinin 1.0 g'dan daha yüksek dozlarda glikozüriye neden olduğu ifadesi Merck'in 1886 yılı baskısında von Mering tarafından yapılan bir gözlem olarak yer almıştır (32).

2.2. PHLORİZİNİN KİMYASAL YAPISI

Dihidrokalkon kimyasal sınıfına ait olan phlorizin (1-[2-(β-D-Glucopyranosyloxy)-4,6-dihydroxyphenyl]-3-(4-hydroxyphenyl)-1-propanone), fenilpraponoid ile yapısal olarak benzer olduğu için flavonoid öncüsüdür ve elma ağacında bulunan en büyük fenolik glikozittir (1,15,30,31,33). $C_{21}H_{24}O_{10}$ kimyasal formülüne sahip olan phlorizinin molekül ağırlığı 436.41 g mol^{-1}'dir (Şekil 2.1). Beyazdan sarıya değişen kristalize yapıya sahip olan Pholorizin erime noktası 106-109 ^{o}C'dir ve 200 °C'nin üzerinde dekompoze olur. Eter ve soğuk suda zayıf çözünürken etanol ve sıcak suda iyi çözünür.



Şekil 2.1. Phlorizinin kimyasal yapısı (31)

2.3. ETKİ MEKANİZMASI

Phlorizinin başlıca farmakolojik etkisi renal glikozüri oluşturmak ve sodyuma bağlı glikoz transportunu inhibe ederek bağırsaklardan glikoz emilimini bloke etmektir (34,35). Phlorizinin hipoglisemi ve hipolipemiye yol açmasının (36,37) yanısıra, lipit peroksidasyonunun önlenmesi (15), kemik erimesinin önlenmesi (38), hafıza gelişimi sağlanması (39,40), insan kolon kanser hücrelerinin büyümesinin önlenmesi (41,42) gibi bir seri yeni biyoaktif fonksiyonu belirlenmiştir (31,42). Phlorizin ve türevleri, biyolojik açıdan aktif olup, özellikle de lipit peroksidasyona karşı antioksidan özellikler göstermektedirler (15).

Böbrek yapısını bozan, poliüriye sebep olan ve inatçı bir şekilde idrarda şeker atılımına neden olan diabetes mellitus ile eş zamanlı olarak phlorizin alımı glikozüriye sebep olmaktadır (43,44). Phlorizin bu etkiyi böbrek tubullerindeki glikoz geri emilimini engelleyerek göstermektedir (45). Homer Smith, 1930'larda, normal bireylerde glikozüri meydana getirmek için phlorizini intravenöz uygulayarak, glomerular filtrasyon hızını ve böbrek kan akımını ölçmek için noninvasiv klirens yöntemlerini geliştirmiştir (44). Phlorizin ve diabetes mellitusun idrardaki etkilerinin benzerliğinin üzerine araştırmalar genişletilmiş ve phlorizinin köpekler üzerindeki kronik uygulamalarında sadece glikozüriye neden olmadığı, aynı zamanda poliüri, ağırlık kaybı gibi insanlardaki diabetes mellitus semptomlarına eşdeğer olduğu gözlemlenmiştir (3).

Smith'in (46) phlorizin aracılığı ile böbreklerden glikoz atılımıyla ilgili olan araştırması, renal hemodinamikte ve tubüller tarafından yapılan metabolik transportta temel kavramların gelişimine katkıda bulunmuştur. Araştırmacı, phlorizinin insanlara güvenli bir şekilde intravenöz verilebileceğini saptamıştır. LaVeen (47) insanlarda deneysel olarak malign hastalıkların tedavisinde, tümör hücreleri tarafından glikoz alımını engellemek için phlorizini intravenöz olarak kullanmıştır.

Phlorizin sığırlarda (5) ve koyunlarda (6) renal glikoz reabsorbsiyonunu, ratlarda da intestinal glikoz absorbsiyonunu engellemek için kullanılmaktadır (7,8). Lyle ve ark. (48) tarafından düvelerde 1.3 butanediol ve phlorizin uygulanarak oluşturulan ketoziste, bu kimyasal maddelerin; idrarla glikoz atılımını hızlandırdıkları, plazma glikoz konsantrasyonunu düşürdükleri, ketonemi ve ketonüriye neden oldukları, serbest yağ asiti konsantrasyonunu arttırdıkları, klinik belirtilere neden oldukları saptanmıştır. Aynı araştırmacılar, phlorizin enjeksiyonunun, glikozun kinetik metabolizmasını etkileyerek glikozüri ve ketonemiye neden olduğu, glikozun renal tubular reabsorbsiyonunun hem kompetatif hem de nonkompetatif inhibisyonu sonucu glikozürinin şekillendiğini bildirmişlerdir.

Phlorizin gibi kalkonları içeren flavanoidler, bütün bitki aileleri tarafından üretilen metabolitlerdir. Bu polifenolik bileşikler antioksidan ve süperoksit anyonlarını (11), singlet oksijeni (12), lipit peroksit radikallerini (13), temizleyici ve metal iyonlarını bağlayıcı (14) özelliklere sahiptirler. Epidemiyolojik gözlemler flavonoid tüketim sıklığı ile koroner arter hastalığı prevalansı arasında ters bir ilişki olduğunu (49) ve çok sayıda çalışma da kısmen bundan phlorizinin sorumlu olduğunun düşünüldüğünü göstermektedir. Phlorizinin, lipit peroksidasyonunun 17-β estradiol'den daha güçlü bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir (15).

Koyun ve keçilere phlorizin enjeksiyonunun hiypoglisemi, glikozüri, ketonemi ve serbest yağ asiti miktarında artışlara neden olduğu belirtilmekte (6,50,51) ve aç bırakılan koyunlarda bu etkinin daha fazla ve kısa sürede oluştuğu bildirilmektedir (51). Serbest yağ asiti konsantrasyonundaki artışın nedenini, idrar yoluyla atılan glikozun, total kan şekeri düzeyinde yetersizliğe neden olması sonucu oluşan negatif enerji balansına bağlı olarak adipoz dokudaki yağların mobilizasyonuna bağlanmaktadır (6). Ketozis ve gebelik toksemilerinde insülin hormonu seviyesinin düşmesi sonucunda serbest yağ asiti mobilizasyonunun hızlanabileceği de araştırmacılarca (48) vurgulanmaktadır. Bu araştırıcılar plazma insülin seviyesinin kontrol hayvanlarında 0.34 ng/ml iken phlorizin enjeksiyonu sonucu şekillendirdikleri ketoziste 0.24 ng/ml'ye düştüğünü saptamışlardır. Ülkemizde de koyunlara phlorizin verilerek deneysel ketozis oluşturulabileceğini belirten çeşitli çalışmalar yapılmıştır (9,10). Ketotik sığırlarda hipoinsülineminin hipoglisemi ile ilişkili olduğu (52), eksojen keton cisimlerinin köpeklerde insülin seviyesini arttırdığı (53), benzer bir ilişkinin ruminantlarda da olduğu (48) bildirilmektedir. Glikoz konsantrasyonu ile insülin konsantrasyonunun hem koyunlarda (54) hem de diğer ruminantlarda (55) ilişkili olduğu, kan glikoz seviyesi arttığında insülin hormonu seviyesinin de arttığı, kan glikoz seviyesi azaldığında ise insülin hormonu seviyesinin de azaldığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Boer ve ark. (55), ketotik sığırlara glikoz enjekte ettikten sonra glikoz miktarı ile birlikte insülin hormonu miktarının da arttığını saptamışlardır.

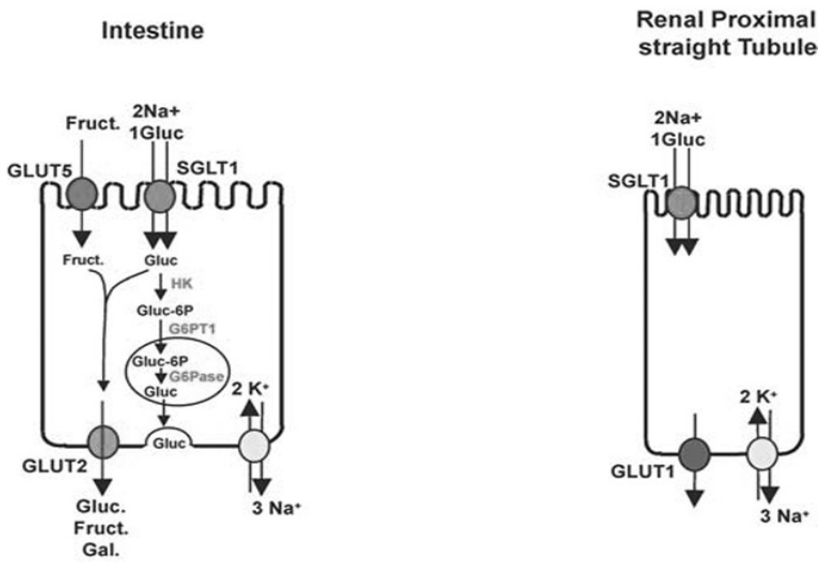
Phlorizinin yüksek konsantrasyonlarının (10^{-4}-10^{-3} M) aerobik metabolizmayı inhibe ettiği ve mitokondrial şişmeye neden olduğu (56), glikozun eritrositlerin içine taşınmasını (56) ve her iki böbrek ve ince barsaklarda glikoz emilimini inhibe ettiği belirtilmiştir (57).

2.3.1. Phlorizin ve Hücresel Glikoz Transportu

Glikoz polar bir bileşik olduğundan lipitten zengin hücre membranlarından geçerken taşıyıcı proteinlerin aktif transportuna ihtiyaç duyar. İki çeşit glikoz taşıyıcısı vardır: Bunlar sodyum bağımlı glikoz taşıyıcıları [(SGLT1 ve SGLT2) aktif transport] ve kolaylaştırıcı glikoz taşıyıcılarıdır [(GLUT1-GLUT12) kolaylaştırılmış difüzyon] (58,59).

SGLT'nin klonlanmış rat böbreğinden iki izoformu (SGLT1 ve SGLT 2) elde edilmiştir (60-62). SGLT1 düşük kapasiteli ve yüksek affiniteli bir sodyum bağımlı glikoz taşıyıcısıdır. Başlıca gastrointestinal sistemde ince barsak hücrelerinde lokalize olmaktadır. Ayrıca proksimal tubulün S3 segmentinde de bulunabilmektedir (63). SGLT1'in gastrointestinal glikoz emilimi için anahtar taşıyıcı olmasına rağmen, nefronlardaki glikoz reabsorbsiyonunun sadece %10'u kadarından sorumlu olması nedeniyle, böbrekler üzerindeki etkisi daha az önemlidir (64).

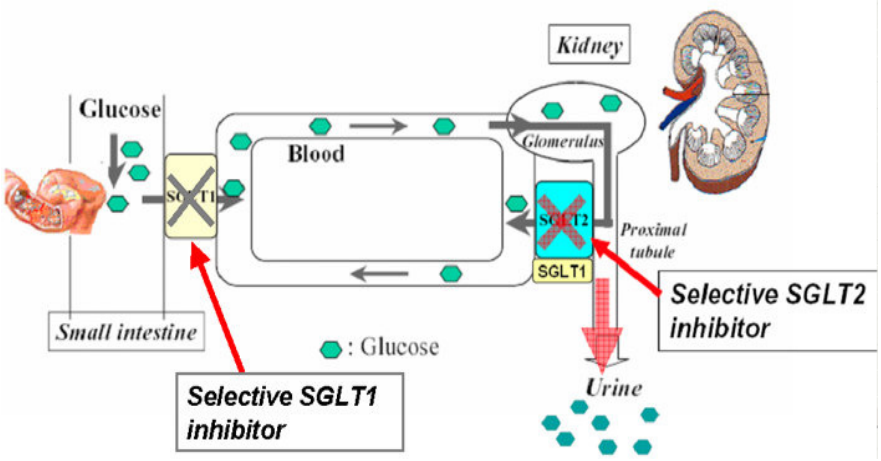
SGLT2 yalnızca proksimal renal tübülün apikal bölgesinde bulunan düşük affiniteli bir sodyum-glikoz kotransportörüdür (64). SGLT2 SGLT1'in aksine başlıca böbrekte bulunan, yüksek kapasiteli, düşük affiniteli bir taşıyıcıdır. Böbrekte en yaygın ve fonksiyonel olarak öneme sahip olan sodyum-glikoz kotransportörü SGLT2'dir. Bu taşıyıcı böbrekte glikoz reabsorbsiyonunun yaklaşık %90'ından sorumlu olduğu için diabet alanında büyük ilgi odağı haline gelmiştir (65). Bu taşıyıcı, kıvrık proksimal tübül S1 segmentinin (ilk segment) fırça kenarlı membranı üzerinde nispeten yüksek bir yoğunlukta bulunmaktadır (66,67). SGLT2 tubuler filtrattaki sodyum ve glikoz ile bağlanmaktadır. Bu bileşikler daha sonra apikal hücre membranı boyunca yer değiştirirler (65). SGLT1 taşıyıcısı her bir sodyum iyonu ile iki glikoz molekülü taşırken, SGLT2 taşıyıcısı her bir sodyum iyonu ile bir glikoz molekülü taşımaktadır (64). Glikozun SGLT1 ve SGLT2 taşıyıcıları ile emilimi şekil 2.2.'de belirtilmiştir.



Şekil 2.2. Glikozun Bağırsak ve Böbrek Proksimal Tubullerinden Emilimi (68-70).

Phlorizin hem SGLT1'i hem de SGLT2'yi (Şekil 2.3.) özel ve rekabetçi bir şekilde inhibe eder (71). Bu taşıyıcıların inhibisyonu kilo kaybına yol açmak ya da tokluk kan şekerini düşürmek için bir yöntem olarak sunulabilir (65).

Phlorizinin kolaylaştırılmış glikoz taşıyıcıları (GLUT1 - GLUT12) üzerine etkisi bulunmamaktadır (72).



Şekil 2.3. Phlorizinin glikoz emilimini SGLT1 ve SGLT'yi bloke ederek engellemesi (73, 74)

Japon araştırmacıların 1997'de yaptığı bir çalışmada, glikoz çözeltisinin alımını takiben farelere oral phlorizin uygulamasının kan şekerinin yükselmesini engellediği belirtilmektedir (75). Phlorizin beynin glikoz alımını engellemektedir. Fakat bunun mekanizması tam olarak bilinmemektedir (76). Glikoz uygulamasının rodentler ve insanlarda hafızayı geliştirdiği bilinmektedir. Ancak, Virjinya Üniversitesindeki araştırmacılar rat ve farelerin pasif kaçınma görevini öğrenmelerinde phlorizinin

etkilerini araştırmak için yaptıkları çalışmada, phlorizinin belleği geliştirdiği bulunmuş, bu etkinin kan glikoz düzeyi ve beyin glikoz alımından bağımsız olduğunu bildirilmiştir (77).

2.4.PHLORİZİNİN GELECEKTE KULLANIMI

Phlorizin 1835 yılında keşfedildiğinden beri tıp ve biyoloji alanında deneysel olarak çeşitli amaçlar için kullanılmıştır. Phlorizinin insülinden bağımsız olarak plazma glikoz konsantrasyonunu düşürmesi, bu alanda çalışmaların yoğunlaşmasına sebep olmuştur (36,78). Phlorizinin kilo almaya neden olmadan kan glikoz seviyesini düşürerek glukotoksisiteyi düzeltmesi tip 2 diyabet tedavisinde önemli bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir. İntestinal glikoz emilimini ve renal glikoz emilimi engelleme kabiliyeti, kalori kaybına neden olur. Bu da muhtemelen kilo kaybına sebep olur. Bu nedenle phlorizin, obezite için potansiyel bir tedavi ajanı olabilir (31).

2.5. LİPİD METABOLİZMASI

Lipitler organizmada hem yapı hem de fonksiyonları bakımından oldukça önemli bir yer tutarlar. Lipitler, yağ dokularında %90 gibi bir oranda bulunurken, diğer dokularda %1-10 arasında bulunmaktadır (79,80). Lipitler suda çözünemeyen maddelerdir. Bu sebeple kanda taşınabilmeleri için bazı proteinlere bağlanarak kanda taşınabilir hale gelmeleri gerekmektedir. Plazmanın proteinleri ile birleşmiş olan lipitlere "lipoprotein" adı verilir. Lipoproteinlerin esas görevi lipitlerin bir organ veya dokudan bir başkasına taşınmasını sağlamaktır (81).

Sindirim sonucunda, monogliseritler, yağ asitleri, kolesterol, gliserol ve az miktarlardaki digliseritler ve trigliseritler safra asit ve tuzlarıyla beraber emülsiyon halinde bulunurlar. Bu emülsiyon içerisindeki maddeler ince barsak villileri vasıtasıyla mukoza hücrelerine alınırlar. Barsak hücreleri içerisine giren gliserol ve yağ asitlerinden tekrar trigliserit ve fosfolipitler sentezlenmektedir (79).

2.5.1. Trigliserit (TG)

Yağları oluşturan en küçük yapı taşlarına yağ asiti adı verilir ve bu asitler vücutta depolanabilmek için gliserol adı verilen bir madde ile birleşerek trigliserit adını alırlar. Trigliseritler vücutta başlıca enerji kaynaklarıdırlar. Bu sebeple kanda belirli oranlarda bulunmaları gerekir (81). Trigliserit yağın doğada bulunduğu şeklidir. Kolesterol gibi hem vücutta yapılır hem de besinlerle alınır. Trigliserit yağ dokusunda hücrelerin sitozolünde hemen hemen susuz bir şekilde depolanır. Bu yağ, vücut yakıt gereksinimi duyduğunda kullanılmaya hazır bir şekilde depo yağı olarak işlev görür. Karaciğerde ise küçük bir miktar depolanır. Çoğu kolesterol ve kolesterol esterleri, fosfolipit ve protein ile birlikte paketlenerek çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL) olarak adlandırılan lipoprotein partiküllerini oluşturmak üzere kullanılır. Bu partiküller kana salgılanır ve periferik dokulara yeni sentezlenmiş lipit olarak verilirler (82).

2.5.2. Kolesterol

Kolesterol bütün hayvansal hücrelerde bol miktarda bulunan bir zoosteroldür. Kolesterol hidrofobik özelliğinden dolayı ya da lipoprotein partikülünün bir bileşeni olarak proteinle birlikte ya da safradaki fosfolipit ve safra tuzları tarafından çözünmüş halde taşınabilir. Kolesterol dışarıdan alınabildiği gibi organizmada da sentezlenebilir. Kolesterolün sentezini ve katabolizmasını yöneten organ karaciğerdir (82). Kolesterol diğer türlerde olduğu gibi ruminantların dokularında, vücut hücrelerinde ve en çok da karaciğerde (83-86) sentezlenerek hücre membranının yapısında görev alan ve hücre membranlarının sağlamlılığını arttıran bir komponentdir. Ruminantlarda kolesterol kanda %60-80 oranında ester formda, geri kalanı ise serbest formda bulunur (87).

Kolesterol deride kolekalsiferole dönüşerek provitamin D3'ü oluşturur ve progesteron, östrojen sentezinde kullanılır. Kolesterolun VLDL/LDL deki oranları endojen hidroperoksitler ve oksidan/antioksidan çalışmalar için önemlidir (86,88).

Ruminantlarda kan kolesterol seviyesi; özellikle rasyon, cinsiyet, yaş, gebelik, mevsim, genetik, laktasyon, karaciğer ve safra kesesinin hastalıklarında değişmektedir (87,89). Trigliseritler, fosfolipitler, yağ asitleri ve kolesterol suda çözünemediklerinden dolayı kan dolaşımına bu halleri ile verilemezler. Bunların kan dolaşımında kolayca taşınabilmeleri için lipoproteinlere ihtiyaç vardır. Lipoproteinler, dansitelerine göre; yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL), düşük dansili lipoproteinler (LDL) ve şilomikronlar olmak üzere dört sınıfa ayrılırlar (90).

2.5.3. Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein Kolesterol (HDL-C)

HDL, karaciğerde üretilir. Bu lipoprotein türünün görevi, dokulardaki fazla kolesterolü alarak karaciğere taşımaktır. HDL arterlerde oluşan ateromalardaki kolesterolu alıp vücuttan atılmak üzere karaciğere taşıdığı için bu lipoproteinde bulunan kolesterol "iyi kolesterol" olarak anılır. HDL partikulleri karaciğerde sentezlenir ve ekzositoz ile kana bırakılırlar (82).

2.5.4. Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Kolesterol (LDL-C)

Karaciğerde üretilen LDL seviyesi ile kalp hastalıkları arasındaki bağlantıdan dolayı sıkça "kötü kolesterol" olarak anılır. LDL'in başlıca işlevi, kolesterol ve trigliserit üreten hücre ve dokulardan bu molekülleri alıp, bunları gereksinimi olan hücre ve dokulara taşımaktır. Vücuttaki toplam kolesterolün %70'i LDL'de bulunmaktadır (91).

2.5.5. Şilomikronlar

Barsaklardan hücrelere eksojen lipitlerin transportunda, endojen lipitlerin karaciğerden hücrelere transportunda ve kolesterolün hücrelere transportunda görevlidir (92-94).

Barsak hücrelerinde şekillenen lipoproteinler şilomikronlardır. Bu şilomikronlarlar içerisinde trigliseritler, fosfolipitler, az miktarlarda yağ asitleri ve kolesterol bulunur. Kana geçen şilomikronlar taşıdıkları lipitlerin büyük kısmını yağ dokularına verirler. Geriye kalan kısım karaciğer ve diğer doku ve organlara verilir. Karaciğerde lipoprotein lipazı olmadığından dolayı, şilomikronlardaki lipitlerin büyük kısmı yağ dokularınca alınmaktadır. Bu dokularda bulunan şilomikron lipazı, şilomikronlardaki trigliseritlerin %90'ını hidrolize eder. Şilomikronlardaki trigliseritlerin büyük kısmının alınmasından sonra, karaciğer tarafından kolayca işlenebilecek bir yapı kalır ve buna remnant adı verilir (97).

2.6.LİPİD METABOLİZMASININ HORMONAL REGÜLASYONU

İnsülin, yağ metabolizmasında substrat akışının en önemli hormonal mediatörüdür. Yağ hücrelerinin sitoplasmalarında asetil koenzim A üretimini arttırarak lipogenezisi hızlandırır. Mitokondrilerde pürivat dehidrogenazın defosforilasyonunu kamçılayarak asetil koenzim A'nın yapılmasını arttırır (98).

Serbest yağ asiti metabolizması insülin-glukagon bihormonal sistemi ile kontrol edilir. Trigliseritlerin sentezi insülin ile sitümüle edilir. Fakat karaciğerde glikoz üretimi ve adipoz dokulardan yağ asitlerinin salınımı, bu hormon tarafından inhibe edilir. Bununla birlikte sığırlarda insüline karşı direnç meydana gelebilir. Bu durumda insülin konsantrasyonu artsa dahi adipoz dokulardan serbest yağ asitlerinin salınımı devam eder. Eğer bunlara ilave olarak kateşolamin aktivitesi de artarsa serbest yağ asiti ve glikoz konsantrasyonları yükselir ve tigliserit sentezi stimüle edilir (98).

Adipoz dokuların trigliserit depolarından lipitlerin mobilizasyonu, karbonhidratların vücudun bazal enerji ihtiyacını karşılamada yetersiz kaldığı ya da vücudun enerji ihtiyacının arttığı durumlarda meydana gelir. Acil durumlarda sempatoadrenal sistem aktive olarak lipolizise sebep olur. Kateşolaminler (epinefrin ve norepinefrin) cAMP'nin şekillenmesini arttırır ve lipolizisi aktive eder. Glukagon, adrenokortikotropin (ACTH), somatotropik hormon (STH) ve büyüme hormonu da benzer etkilere sahiptir. Oysa insülin, aksi etkiye sahiptir, cAMP'nin şekillenmesini önler ve lipolizise engel olur. İnsülin yokluğunda serbest yağ asitlerinin belirgin mobilizasyonu gerçekleşir (98).

2.7. KARACİĞER YAĞLANMASI

Vücut depo yağlarının aşırı mobilize olarak karaciğer paranşim hücrelerinde gereğinden fazla miktarda birikimi karaciğer yağlanması olarak tanımlanır (98,95,96). Pek çok ülkede mevcut olan bu hastalığın yapılan çalışmalarla (99-101) ülkemizde de görüldüğü bildirilmiştir. Hepatik hücrelerde geniş miktarlarda trigliserit biriktiği zaman karaciğerin metabolik gücünde ve lipoproteinlerin salınımında azalma meydana gelir. Karaciğerde biriken lipitlerin büyük kısmını

trigliseritler oluşturur ve bunlar, yaygın olarak hepatositlerde birikirler. Hepatositlerin büyük kısmı etkilendiği zaman detoksifikasyon, protein sentezi, hepatik retikulo-endotelial sistem ve glikoneogenezis fonksiyonları bozulur (98,102). Karaciğer yağlanması koyunlarda ani ölümlere neden olmaktadır (103).

2.7.1. Karaciğer Yağlanmasının Nedenleri

Vücudun ihtiyacını karşılayacak derecede yeterli karbonhidrat verilirse, enerji için trigliseritlerin (TG) kullanılması baskılanır. Karbonhidratlar, yağlara göre tercihen kullanılırlar. Adipoz dokularda TG'ler ve serbest yağ asitleri dengededirler. Karbonhidratların yetersiz kaldığı durumlarda TG ve serbest yağ asiti dengesi serbest yağ asiti formasyonu yönünde değişir. Bu adipoz dokulardan TG'lerin mobilizasyonuna yol açar ve enerji elde edilmesi için karbonhidratların yerine serbest yağ asitlerinin kullanılmasını arttırır.

Ruminantlarda, karaciğerde yağ asitlerinin sentezi olmaz. Bu sebeple, sığırların karaciğerlerindeki yağ birikiminin orijini adipoz dokudur. Karaciğerde sentezlenerek kan dolaşımına verilen lipoproteinlerdeki trigliseritler yağ depolarına taşınır ve orada depolanır. Hayvanlarda serum yağ asiti konsantrasyonu yükseldiği zaman, karaciğerde lipoprotein sentezi artmadığı ya da azaldığı zaman karaciğer yağlanması meydana gelir. (97).

Süt ineklerinde karaciğer yağlanması hepatopati olarak tanımlanmakta olup, birçok nedenden ileri gelebileceği bildirilmiştir (104,105). Süt ineklerinde en önde gelen nedenin yağ mobilizasyon sendromu olduğu, bu sendromun doğum öncesi (pre partum) iki hafta ile doğum sonrası (post partum) 6 hafta içinde şekillendiği vurgulanmaktadır (104). Kuruda kalma devresinde, enerji değeri çok yüksek yemlerle beslenerek yağlanan ve semiren ineklerde, karaciğerde geniş yağ metamorfozisinden dolayı posparturient hastalıklar daha çok görülür (106-108). Kuruda kalma devresinde yeterli kaba yem verilmeyip hububat ve yağlı tohum küspeleri bakımından zengin rasyon ile besleme, karaciğeri yağ dejenerasyonu bakımından predispoze hale getirir. Doğumu takip eden günlerde hayvanın enerji ihtiyacının yükselmesi; adipoz dokulardan serbest yağ asitlerinin mobilizasyonunun artmasına, yağ asitlerinin hepatik oksidasyonunun azalmasına ve trigliserit sekresyon mekanizmasının bozulmasına sebep olarak karaciğer yağlanmasının artmasına neden olur (107,109).

Yüksek verimli sütçü sığırların uzun süre dengesiz beslenmesi ve aç bırakılması sonucunda karaciğer yağlanmasının geliştiği bildirmektedir (110). Yemleri kısıtlanan 6 sütçü sığırın serum serbest yağ asiti konsantrasyonunun önemli derecede arttığı, HCO_3 ve pH'da önemsiz azalmaların meydana geldiği bildirilmektedir (111).

Kolin, karaciğerde uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunun artmasını ve yağ asitlerinin karaciğerden yağ depolarına taşınmasını kolaylaştırır. Kolin ya da kapsadığı orotik asitin yemlerde

yetersiz bulunması karaciğer yağlanmasına sebep olur. Kolin, metil transfer reaksiyonlarında ve fosfolipit sentezinde gereklidir. Ayrıca asetil kolin sentezinde prekürsör olarak görev yapar. Yağlı periparturient sığırlarda karaciğer yağlanmasının şekillenmesinde, kolin yetersizliğinin oynadığı rolün daha fazla araştırılması gerektiği belirtilmektedir (98,107,112).

Selenyum, kobalt eksikliği A, E vitamini eksikliği, gebelik toksemisi, zehirlenmeler ve negatif enerji balansı hepatik lipidozisin koyun ve keçilerdeki karaciğer yağlanması nedenleri arasında belirlenmiştir (102,104,113). Dünyanın farklı yerlerinde keçi ve koyunlarda kobalt eksikliği ile ilişkili karaciğer yağlanmasının klinik, biyokimyasal ve patolojik bulguları bildirilmiştir (105,109,111,). Hıdıroğlu ve Hartin (114), A ve E vitamin seviyeleri ile yağlı karaciğer sendromu arasındaki ilişki üzerine yaptıkları bir çalışmada, hasta ineklerde A ve E vitamin seviyelerinin normal sınırların altında olduğunu, şekillenen retensiyo olgularının buna bağlı olabileceğini ileri sürmektedirler. Nizamlıoğlu ve ark (101), yağlı karaciğer sendromlu ineklerde A ve E vitamin düzeylerinin düşük olduğunu, bunun da retinol bağlayan protein sentezindeki yetersizlikten kaynaklanmış olabileceğini bildirmektedirler.

2.7.2. Karaciğer Yağlanmasında Klinik Bulgular

Bu sendromun en göze çarpan semptomu, buzağılamadan önce çok yağlı ve şişman olan sığırların buzağılamadan sonra aşırı kondüsyon kaybetmesidir. Bu sığırlarda periparturient ve postparturient hastalıkların insidansı artar ve enfeksiyöz hastalıklara karşı dayanıklılık azalır. Bu hastalıkta klinik bulgu olarak depresyon, anoreksi, ketonüri, süt üretiminin belirgin miktarda azalması, ilerleyen düşkünlük, zayıflık ve enfeksiyöz hastalıklarla beraber seyrediyorsa rektal ısının yüksek olması belirlenebilir. Bu hayvanlarda nadir olarak da anlamsız bakışlar, baş ve boynun ekstensiyonu ve tremoru gibi sinirsel semptomlar görülür (109,112,115).

Karaciğer yağlanması çoğunlukla bir ya da daha fazla hastalıkla beraber seyreder. Genellikle beraber seyrettiği hastalıklar doğum felci, ketozis, abomasum deplasmanları, retensiyo sekundinarum, mastitis ve metritistir (100,112). Aslan ve ark. (99), metritis ve mastitisli hayvanlarda hafif, retensiyo sekundinarumlu hayvanlarda orta ve ketozis, hipokalsemi ve preventriküler indigesyonlu hayvanlarda ise şiddetli derecede karaciğer yağlanması tespit ettiklerini bildirmektedirler. McCormack (116), karaciğer yağlanması bulunan sığırlarda immun cevabın yetersiz kaldığını, ineklerin enfeksiyonlara karşı aşılarla yeterli derecede korunamadığını ve başta enfeksiyonlar olmak üzere postpartum dönemde ortaya çıkan birçok probleme karşı hayvanları dirençsiz kaldığını bildirmektedir. Roberts ve Reid (117), yağlı karaciğer sendromunun metabolik, enfeksiyöz ve reprodüktif bozukluklar; özellikle ketozis, hipokalsemi, metritis, mastitis ve retensiyo sekundinarum gibi hastalıkla beraber seyrettiğini ve bu hastalıklara karşı hayvanlarda predispozisyon oluşturduğunu bildirmektedirler. Gerloff ve ark. (110), şiddetli karaciğer yağlanması

görülen sığırlardaki reprodüktif performans ile sağlıklılılar arasında önemli bir farkın olmadığını belirtmelerine karşın, Reid ve ark. (118) hafif ve orta derecede karaciğer yağlanması bulunan sığırlarda, reprodüktif performansda önemli fark bulunduğunu bildirmektedirler. Andrews ve ark. (119) karaciğer yağlanması bulunan sığırların %23'ünde hipokalsemi şekillendiğini bildirmektedirler.

2.7. 3. Karaciğer Yağlanmasında Klinik Patoloji

Karaciğer yağlanması bulunan hayvanlarda, total lökosit sayısı 3000/mm^3'ün altında olup, bant nötrofillerin sayısında artış vardır. Hemoglobin konsantrasyonu, çoğunlukla sindirim sistemindeki su absorbsiyonunun bozulması ya da sıvı alımının azalmasından dolayı 13.0 g/dL'nin üzerine çıkar (107). Nizamlıoğlu ve ark. (120), orta ve şiddetli karaciğer yağlanması bulunan hayvanlar üzerinde yaptıkları çalışmada, lenfosit oranlarının normalin altında olduğunu, monosit, nötrofil ve eosinofil oranlarının ise önemli bir değişme göstermediğini bildirmektedir. Reid ve ark. (121), karaciğer yağlanması bulunan sığırlarda, total lökosit sayılarının düşük ve hematokrit değerinin ise yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Karaciğer yağlanmasında kan glikoz düzeyi 40 mg/dl'nin altına düşer. Hastaların çoğunda ketonemi ve ketonüri mevcuttur. Fakat hayvanda doğum felci şekillenmişse glikoz 100 mg/dL'nin üzerindedir (107). Aştı ve ark. (100) yaptıkları bir çalışmada, karaciğerde yağlanmaya bağlı olarak plazma serbest yağ asiti seviyesi ve plazma AST aktivitesinin arttığını, plazma glikoz konsantrasyonunun ise azaldığını bildirmektedir. Aynı araştırıcılar (100), karaciğerlerinde ortalama %27.72 yağlanma bulunan sığırlarda, ortalama kan glikoz konsantrasyonunu 54.42 mg/dl, serbest yağ asiti konsantrasyonunu 1.98 mM/l ve AST aktivitesini 101.75 U/L olarak tespit etmişlerdir.

Aslan ve ark. (99), postpartum dönem hastalıklarının karaciğer yağlanması ile ilgisi üzerine yapmış olduğu çalışmada, yağlı karaciğer sendromlu ineklerde plazma glikoz düzeyinin önemli oranda azaldığını, plazma AST, total lipit ve serbest yağ asiti konsantrasyonunun ise önemli oranda yükseldiğini bildirmektedirler. Araştırmacılar (99), ortalama %22.3 yağlanma bulunan hipokalsemili hayvanlarda plazma glikoz miktarını 58.3 mg/dl, plazma AST aktivitesini 152.1 U/L, plazma Total Lipit miktarını 206.1 mg/dl ve plazma serbest yağ asiti miktarını 0.94 mM/L olarak tespit etmişlerdir.

Yağlı karaciğer sendromunda enerji eksikliği nedeniyle serum glikoz konsantrasyonu düşerken, keton cisimleri ve serum BHB düzeyi ile lipomobilizasyona bağlı olarak serum serbest yağ asitleri düzeyinin arttığı saptanmıştır (98,104,105,122). Karaciğer yağlanmasında plazma trigliseritleri ve lipoproteinlerinde azalma meydana gelir (98,112). Karaciğer yağlanmasında serum trigliseritler 5mg/dl'nin altına düşebilirken, serbest yağ asiti 7 mg/dl'nin üzerinde bulunabilir. Şiddetli karaciğer yağlanmasının sonucu olarak lipoprotein formasyonu ve yağ mobilizasyonu bozulur, trigliseritler

daha da düşer (107). Serum kolesterol konsantrasyonu ile karaciğer yağ konsantrasyonu ters orantılıdır. Şiddetli karaciğer yağlanmasında serum kolesterol düzeyi aşırı şekilde düşer. Serumdaki kolesterol lipoproteinlerin bir kompanentidir. Şiddetli yağlanmalardaki serum kolesterol düzeylerinin düşmesi hepatik lipoprotein sekresyonunun azaldığını gösterir (113).

Karaciğer yağlanması bulunan hayvanlarda kan elektrolit değerleri genellikle normaldir ya da hafif değişiklik gösterir (102,107). Reid ve Roberts (121), yağlı karaciğer sendromunda saptadıkları düşük Mg^{++} seviyesinin kemiklerden Ca^{++} mobilizasyonunu azalttığını, bunun doğum ve sonrası günlerde hipokalsemi olaylarının şekillenmesinde rol oynayabileceğini ileri sürmektedirler.

2.7.4. Karaciğer Yağlanmasında Nekropsi Bulguları

Yağlı karaciğer sendromunda, karaciğer normalin üç dört katı büyümüş, gevrek kıvamda keskin kenarı kütleşmiş ve ikterik görünüştedir. Böbreklerde büyüme ve dejenerasyon olabilir. Histopatolojik muayenelerde, karaciğer parankim hücrelerinde ve böbrek epitelyum hücrelerinde, kalp, kas, adrenal bez hücrelerinde diffuz yağ infiltrasyonları görülür (96,109,119). West (115), karaciğer yağlanması bulunan ve tedavide başarısız olunan altı sığırın nekropsisinde, karaciğerin büyüdüğünü, sarımsı renkte olduğunu, böbrekler etrafında yağ birikintisi bulunduğunu ve histolojik olarak da geniş yağ infiltrasyonları tespit ettiğini bildirmektedir.

2.7.5. Karaciğer Yağlanmasının Teşhisi

Karaciğer yağlanmasının teşhisi genellikle zor olup, maalesef çoğunun teşhisi ölümden sonra yapılmaktadır. Karaciğer yağlanmasının teşhisinde başlıca iki metot kullanılmaktadır. Bunlardan ilki sığırlarda çabuk, güvenli ve hayvanları çok az etkileyen lokal anestezi altında perkutan biopsi iğneleri ile alınan karaciğer örneklerindeki yağlanmanın kimyasal ya da histolojik metodlardan birisi ile tayini, ikincisi ise kanın kimyasal analizidir (99,100,121).

Teşhiste faydalı laboratuar bulguları olarak ketonüri, sülfobromftalein retensiyon zamanının uzaması, sorbitol dehidrogenaz (SDH) ve aspartat aminotransferaz (AST) enzim aktivitelerinin artmasının yanında serum albumin, kolesterol, magnezyum, insülin düzeylerinin ve lökosit sayılarının düşmesi sayılabilir (102,121). Herdt (112), hepatosellüler enzimlerin serum aktivitelerinin karaciğer yağlanması için duyarlı indikatörler olmadığını, fakat serumda yaygın bir şekilde ölçülen AST aktivitesindeki yükselmenin, karaciğer yağlanması ile ilişkili olduğunu bildirmektedir. Kreatin fosfokinazın (CPK) belirlenmesi (103), AST'nin kaynağının belirlenmesinde faydalı olur. Bununla beraber, Roberts ve Reid (117), bu labratuar sonuçlarının hepatik lipidozis için zayıf bir gösterge olduğunu bildirmektedirler. Gaal ve ark. (123), karaciğerdeki lipit artışının trigliserit artışı şeklinde olduğunu, bu sebeple karaciğerdeki total lipitlerin ölçülmesiyle karaciğer yağlanmasının teşhisinin hatalı olacağını, çünkü total lipitlerin içine trigliseritlerin dışındaki lipitlerin de girdiğini belirtmektedir. Serum AST, glutamat dehidrogenaz

(GLDH), gamma-glutamil transpeptidase (GGT), total bilirubin düzeylerinin saptanması; bunlardan AST' nin düşük oranda hepatospesifik, GLDH' in hepatospesifik, GGT' nin ise safra kanalları, böbrekler ve barsak epiteli için spesifik olduğu, bu yönleriyle ayırıcı tanıda anlamlı oldukları, serum total bilirubin düzeyini saptamanın yağlı karaciğer sendromu tanısında bir endikatör olarak kabul edildiği bildirilmektedir (105,106,122).

Karaciğer yağlanması bulunan süt ineklerinde yağlanmanın derecesi ve yerleşimi konusunda karaciğer biyopsisinin kesin tanı yöntemi olduğu, bu işlemin hayvanın sağlığına ve süt verimine hiçbir olumsuz etkisinin olmadığı bildirilmektedir (105,112,122,124). Karaciğerde %20'nin üzerindeki yağlanmalar şiddetli, %10-20 arası orta şiddetli ve %10'un altındaki yağlanmalar ise hafif şiddetli karaciğer yağlanması olarak değerlendirilir (100,120). West (125), gebe ve laktasyonda olmayan sığırlar ile periparturient sütçü sığırların karaciğer fonksiyonlarındaki olası bir değişikliği tespit etmek amacıyla aldığı biyopsi örneklerinde gebe ve laktasyonda olmayan sığırlarda herhangi bir yağ infiltrasyonu gözlenmediğini, periparturient sütçü sığırlarda ise sentrilobuler ve midzonal şekilde yağlanma tespit edildiğini belirtmiştir. Smart ve ark (126), karaciğer biopsisini takiben oluşabilecek komplikasyonların insidansının çok düşük olacağını, hayvanların biyopsiden sonra hafif abdominal ağrı gösterebileceğini ve bunun da 1-2 gün içinde kendiliğinden iyileşeceğini bildirmektedir. Bu araştırmacılar (126), serum AST konsantrasyonunun hepatositlerdeki yıkımdan dolayı hafif yükseldiğini ve bu yüzden kan örneklerinin biyopsi işleminden önce alınmasını tavsiye etmektedir.

Karaciğer yağlanmasının tanısında kullanılan bir diğer yöntem de ultrasonografik muayenedir. Aşırı oranda karaciğer yağlanmasında sonografik olarak ekojenite artışı, orta ve az oranda yağlanma hallerinde ise belli loplarda yağlanma sonucu ekojenite farklılıklarının ortaya konabileceği, bu loplardan alınan iğne biyopsilerinden yapılacak histopatolojik bakıların kesin tanıda yararlı olduğu bildirilmiştir (105,122). Orta ve ileri derecede karaciğer yağlanması görülen olgularda organ boyutlarının büyüdüğü, karaciğer kalınlığının arttığı ve bu durumların da sonografik olarak ortaya konabildiği bildirilmiştir (113,122).

2.7.6. Karaciğer Yağlanmasında Tedavi

Karaciğer yağlanması için etkili bir tedavi yöntemi günümüze dek geliştirilmemiştir. Tedavi programları adipoz dokularda yağ mobilizasyonunu azaltmaya yöneliktir. Bunun için intravenöz glikoz enjeksiyonları, glikoz prekürsörlerinin oral uygulaması, insülin preparatları ile uygun dozlarda niasin uygulandığında adipoz dokudan serbest yağ asiti salınımının azaltılabileceği bildirilmiştir (112). Lipotropik ajanların uygulanması ile hepatik lipoprotein sentezinin sitimüle edilebileceği, fakat sütçü sığırlarda karaciğer yağlanmasının tedavisinde kullanılabilecek etkili bir lipotropik ilacın hala mevcut olmadığı, tedavide sıklıkla kullanılan kolin ya da lesitinin hastalığın

bazı formlarında lipotropik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (109,112). Bazı araştırmacılarca (112), kolin bakımından yetersiz yemlerle beslenen hayvanlarda, karaciğer yağlanmasının meydana geldiği bildirilmektedir. Bazı araştırmacılara (102) göre ise kolinin kullanılması hala tartışma konusudur, bazı faydalı etkilerinin bildirilmesine rağmen insan hekimliğinde bu ilacın kullanılmasında tartışmalar ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte eğer kullanılacaksa da paranteral olarak verilmesi tavsiye edilmektedir. Çünkü oral yolla verilen kolinin rumen florası tarafından yıkımlanacağı belirtilmektedir (102).

Glukokortikoidler, ketozis tedavisini desteklemektedirler. Fakat hepatik lipisosis tedavisinde dikkatli düşünülerek verilmelidir. Çünkü glukokortikoidler insülin salınımını azaltır ve periferal dokular glikozdan gereği gibi faydalanamazlar. Ayrıca immun supresif etkilerinden dolayı kullanımlarında dikkatli olunmalıdır (102,109).

2.8. OKSİDATİF STRES

Serbest radikaller organizmalarda sürekli olarak oluşturulan ve antioksidan savunma sistemi tarafından düzenli olarak ortadan kaldırılan moleküllerdir. Bu mekanizmada serbest radikallerin oluşumu ile bunların antioksidan sistem tarafından ortadan kaldırılması arasında bir denge söz konusudur ki bu dengeye oksidatif denge adı verilir. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma serbest radikallerin olumsuz etkilerinden zarar görmez. Antioksidan savunma mekanizmasının yetersiz kalması veya serbest radikal oluşumunun artması nedeniyle oksidatif dengenin serbest radikaller yönüne kayması durumunda oksidatif stres meydana gelir (127,128).

Az miktarda serbest radikal oluşumu bazı durumlarda, örneğin bakterilerin nötrofiller tarafından oksijen radikalleri ile öldürülmesi gibi, organizmaya yararlı olabilir. Bunun yanında fazla miktarda serbest radikal oluşumu sonucu oluşan oksidatif stres ile hücrede DNA, proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve enzimlerin zarar görmesine yol açabilir (129,130).

2.8.1. Serbest Radikaller

Atomların çekirdeklerini çevreleyen ve içinde elektronların bulunduğu boşluklara orbital adı verilmektedir. Her bir orbitalde spinleri birbirine ters yönde olan iki elektron bulunur. Bu elektronlara eşlenmemiş veya ortaklanmamış elektronlar denir (131) Yapılarında (dış orbitallerinde) bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren atom veya bileşikler serbest radikaller olarak tanımlanmaktadır (132,133). Bu elektronlar üst kısımlarına konulan nokta ile ifade edilirler (134). Atomlardaki elektronlar yörünge olarak bilinen boşluklarda hareket ederler. Her yörüngede birbirine zıt yönde hareket eden en fazla iki elektron bulunur. Radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla ya da atom veya moleküle bir elektron ilavesiyle oluşurlar. Oluşan radikaller

çok reaktif olup, stabil değildirler. Diğer moleküllere elektron verebildiklerinden ya da onlardan elektron alabildiklerinden dolayı vücutta indirgeyici veya yükseltgeyici olarak davranırlar (135,136). Serbest radikallerin reaktivitesi karşı spin yönünün bir elektron kazanma isteğinden dolayı oluşur. Serbest radikallerin en önemli tepkimeleri, moleküler oksijen ve onun reaktif türlerinin olduğu tepkimelerdir (137).

Demir, bakır, mangan, molibden gibi geçiş metalleri de dış yörüngelerinde birer elektron taşımalarına rağmen radikal karakter göstermezler. Serbest radikal kabul edilen atom ve moleküller elektron dağılımlarının yanı sıra termodinamik yapıları ve lokal kinetik reaktiviteleri ile değerlendirilir (138). Ökaryotik hücrelerde, enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla serbest radikallerin oluşumu fizyolojik bir olaydır (139). Organizmada oluşan serbest radikaller endojen ve ekzojen kaynaklıdır (140). Memelilerde, mitokondriyal elektron transport zinciri (ETZ), fagositik ve endotelyal hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, redoks döngüleri, araşidonik asit metabolizması, otooksidasyon reaksiyonları esnasında ksantin oksidaz ile nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz gibi enzimlerinin etkisiyle meydana gelirler. Ekzojen kaynaklar ise endüstriyel kirleticiler, ilaçlar, diyet, iyonize radyasyon, ultraviyole (UV) ışık, sigara dumanı ve ksenobiyotiklerdir (140). Serbest radikaller, sadece zararlı maddeler olmayıp organizmada pek çok biyolojik işlevlere de sahiptir. Bu moleküller, sinyal iletiminde hücresel mesajcı olarak görev aldıkları gibi apoptozis ve fizyolojik proteolizde aracı olarak görev yaparlar. Ayrıca, kemotaksis, sitokin üretimi ve mikrovasküler tonusun regülasyonunda görevlidirler. Fagositlerin mikroorganizmaları öldürmelerinde rolleri bulunmaktadır. Böylece enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan yangısal durumlara karşı organizmanın savunmasına aracılık etmektedir (139). Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da, serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Serbest radikallerin aerobik hücrelerde en önemli tepkimeleri moleküler oksijen ve onun reaktif türleri (süperoksit anyonu ve hidroksil radikali), peroksitler ve geçiş metallerinin olduğu tepkimelerdir (137).

2.8.2. Memelilerdeki Başlıca Serbest Radikaller

2.8.2.1. Reaktif Oksijen Türleri

Solunum için esansiyel olan oksijenin organizmaya alınması, taşınması ve oksidatif metabolizma için kullanılması sırasında oksijenin indirgenmesi ve aerobik hücrelerde enzimatik oksidasyonu ile az miktarda ancak sürekli olarak radikaller üretilmektedir. Oksidatif metabolizma hızındaki artışla birlikte oksijen radikalleri de artmaktadır (139).

Biyolojik sistemlerde oksijenin metabolizması sonucu oluşan ürünlere reaktif oksijen türevleri (ROT) denilmektedir. Reaktif oksijen türevleri, serbest radikallerin dış orbital yörüngesinde

paylaşılmamış bir elektron ile bir oksijen atomu bulunması ile karakterizedir. Oksijenin indirgenmesi ya da oksijene iyonize radyasyonun etkimesi ile meydana gelirler (135,136). Moleküler oksijen elektron transferiyle suya kadar indirgenir. Bu yol 4 elektron gerektirir ve bu yolda reaktif ara moleküller oluşur ki bunlar süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksi radikalleridir. Bunlar önemli oksidatif stres ajanları olup reaktif oksijen türevleri (ROT) olarak adlandırılır (141).

Baslıca ROT'lar şunlardır (142).

Süperoksit radikali ($O_2^{-\cdot}$)

Hidroksil radikali ($HO^{\cdot}$),

Hipokloröz asit (HOCI)

Singlet oksijen (singlet O_2;O_2 ↑↓)

Hidrojen peroksit (H_2O_2),

Alkil radikali ($RO^{\cdot}$)

Peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$)

Alkoksil radikali ($RO^{\cdot}$)

Organik peroksit radikali ($RCOO^{\cdot}$)

Perhidroksil radikali ($HO_2^{\cdot}$)

Süperoksit Radikali ($O_2^{-\cdot}$)

Moleküler oksijenin (O_2) bir elektron transferi sonucu indirgenmesi ile kararsız bir yapı olan $O_2^{\cdot}$ radikali oluşur (143).

$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{-\cdot}$

Süperoksit radikalleri başlıca şu yollarla oluşabilir: (144)

1- İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip yükseltgenirken süperoksit oluşumuna neden olurlar.
2- Başta çeşitli dehidrojenazlar ve oksidazlar olmak üzere enzimlerin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali bir ürün olarak oluşabilir.
3- Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında kullanılan oksijene NADH dehidrojenaz ve koenzim A gibi elektron taşıyıcılarından elektron transferinden dolayı tüketilen oksijenin %1–5 kadarı süperoksit oluşumuna neden olur.
4- Aktive edilen fagositik lökositler süperoksit üreterek fagozomlar içine ve bulundukları ortama verilirler. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal üretimi daha reaktif türlerin oluşumunu da katalizler.

Süperoksit radikali serbest radikal olmasına karşın reaktifliği yüksek değildir. Kendiliğinden, özellikle elektronca zengin bir ortam olan iç mitokondri zarında solunum zinciriyle birlikte oluşur. Süperoksit ayrıca iskemi-reperfüzyonda aktive olan ksantin oksidaz gibi flavoenzimlerce endojen olarak da oluşturulur. Lipooksijenaz ve siklooksijenaz ise diğer süperoksit oluşturan enzimlerdir (145,146). Süperoksit ayrıca yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar gibi fiziksel ve kimyasal ajanlar ile bazı bileşiklerin otooksidasyonunda ve fagositozda oluşur (147).

Milisaniyelik yarı ömrüyle zayıf bir oksidan fakat güçlü bir redüktan olan süperoksit radikali oksijen toksisitesinde önemli bir faktördür ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimi buna karşı organizmayı korur. Süperoksit radikali zayıf bir oksidan olduğundan hasar oluşturacak bir tür olmaktan çok H_2O_2 kaynağı ve geçiş metallerinin redükleyicisi olması nedeniyle önem taşımaktadır (148). Süperoksit radikaline bir elektron eklenmesi veya O_2'nin doğrudan indirgenmesiyle H_2O_2 oluşur. Süperoksit radikali tiyol grupları ile reaksiyon verebilir. Böylece glutatyon (GSH)'un tükenmesine yol açarak hücreyi ileri bir oksidatif strese sokabilir veya enzim ve diğer hücresel proteinler üzerindeki tiyol gruplarıyla reaksiyon vererek onların inaktivasyonuna yol açabilir. Ayrıca, süperoksit radikali bir dizi reaksiyonu başlatarak başka radikallerin oluşumuna yol açabilir. Süperoksit radikali, demir varlığında hidrojen peroksit (H_2O_2) ile etkileşerek (Haber-Weiss reaksiyonu) hidroksil radikalinin oluşumunda rol oynamanın yanında üç değerlikli demir ile reaksiyona girerek perferril radikalinin de oluşumunda rol oynayabilir. Ancak, süperoksit radikali çok kısa ömürlü olduğundan söz konusu reaksiyonlara uğrayamadan dismutasyon yoluyla H_2O_2 ve oksijene dönüşür (142). Dismutasyon ya kendiliğinden oluşur veya SOD aracılığıyla katalize olabilir (148).

$$2O_2^{-\cdot} + 2H+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Süperoksit radikaline bir elektron transferi (süperoksit dismutasyonu) ya da O_2'ne iki elektronun eklenmesi (indirgenme) ile veya glikolat oksidaz ve D-amino asit oksidaz ile direkt olarak meydana gelir (135).

Hidrojen peroksit birçok bileşiği oksitleyici bir ajandır. Proteinleri, tiyol grubu içeren enzimleri, fosfolipitleri, karbohidratları ve DNA'yı hedef alıp fenton reaksiyonu aracılığıyla hasara neden olabilir (149).

Hidrojen peroksit, güçlü bir oksidan olmasına rağmen yavaş reaksiyon verir (150). Hidrojen peroksit, ya kendisi oksidatif hasar yapabilir ya da O_2^- gibi daha reaktif bir radikal oluşturarak hasara yol açabilir. Hidrojen peroksit, kendisi hasar oluşturduğunda proteinlerdeki tiyollerin oksitlenmesine ve deoksiribonükleik asitde (DNA) zincir kırılmasına neden olur. Bu yolla glikoliz enzimlerinden gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz enzimini inaktive eder. Yüksek düzeyde H_2O_2, glikolizin inhibisyonu sonucu ATP boşalmasına yol açar. Hidrojen peroksit, bu etkisini,

gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz enziminin kofaktörü olan nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) düzeyini azaltarak ya da hücrede pH değişikliği yaparak gösterir. Ayrıca, piruvat gibi bazı ketoasitlerin de nonenzimatik oksitlenmesine yol açar. Mitokondriyal elektron transport zinciri de H_2O_2'den etkilenir. Hidrojen peroksit hücre membranını geçebildiği için DNA hasarı riski artmaktadır (150).

Hidrojen peroksit serbest radikal olmamasına karşın biyolojik zarlara nüfuz edebilmesi ve daha reaktif oksijen türlerinin yapım aşamasında aldığı rolden dolayı önemlidir. Diğer bir önemli işlevi ise hücre içi sinyal molekülü olarak görev yapmasıdır (151).

Hidrojen peroksitin redoks özelliği ve geçiş metalleri varlığında yüksek reaktif serbest radikalleri oluşturmasına karşı vücut, savunma sistemi geliştirmiştir. İstenmeyen hidrojen peroksit katalaz, glutatyon peroksidaz ve diğer oksidazlar ile hücreden uzaklaştırılır (152).

Hidroksil Radikali ($HO^{\cdot}$)

Hidroksil radikali, biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü radikaldir (150).

Hidroksil radikali birkaç yolla oluşabilir (153)

- **Fenton reaksiyonu :** Hidrojen peroksit, Fe^{+2} ve diğer geçiş elementleri (Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenerek hidroksil radikalini oluşturur.
- **Haber-Weiss reaksiyonu:** Hidrojen peroksit O_2 ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur. Reaksiyon Fe ve Cu tarafından katalizlenir.

Hidroksil radikali, hemen tüm hücresel moleküllerle reaksiyon verebilmekle birlikte en önemli etkileri lipitler, proteinler, sitokromlar ve nükleik asitler üzerine olan etkileridir (150). Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan hidroksil radikali (OH), su dahil ortamda rastladığı her biyomoleküle diffüzyon limiti hızı ile tepkimeye girer. Bu nedenle 10^{-9} saniyeden daha kısa bir ömre sahiptir (154). Bu serbest radikal, yağ asitleri, nükleik asitler, karbonhidratlar ve proteinler gibi çeşitli moleküllerden bir proton çıkarıp karbon merkezli organik radikallerin oluşmasına neden olur (155). Hidroksil radikalinin membran fosfolipitleri komponentlerinden olan çoklu doymamış yağ asitleri üzerindeki etkisi, hücresel oksidatif hasarda başlıca etken olarak değerlendirilmektedir (156). Hidroksil radikali, DNA'da bulunan deoksiriboz gibi şeker moleküllerine saldırarak mutajenik etki gösterebilir. Ayrıca, bu radikal, DNA ve ribonükleik asitde (RNA) bulunan purin ve pirimidin bazlarına katılarak radikal oluşturur. Bu radikalin oluşturduğu hasar fazla olursa mutasyonlar hatta hücre ölümü şekillenebilir (150).

Singlet Oksijen (Singlet O_2,$O_2^{\uparrow\downarrow}$)

Oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi; süperoksit radikalinin nitrik

oksit ile reaksiyonu ve hidrojen peroksitin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir (155). Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmaması nedeniyle serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri arasında yer alan singlet oksijenler, serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olduklarından önemlidirler. Vücutta deri ve retina gibi gün ışığına maruz kalan bölgelerde sıkça oluştuğu belirtilmiştir (155). Flavin içeren proteinler ve hem proteinleri yönünden zengin olan mitokondride hasara yol açarlar (150).

Singlet oksijenin delta ve sigma olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Biyolojik olarak en önemli formu delta singlet oksijendir (144).

Oksijen Türevi Olmayan Serbest Radikaller

Oksijen ve ksenobiyotik radikallerinden başka radikaller de biyolojik sistemlerde oluşabilmektedir (155).

Kükürt Merkezli Radikaller

Tiyol bileşikleri (R-SH) geçiş metalleri varlığında oksitlenerek til radikalini (RS) oluştururlar (150).

$$RSH + Cu^{+2} \rightarrow RS^{\cdot} + Cu^{+} + H^{+}$$

Til radikalleri proteinlerdeki disülfit bağlarının homolitik fizyonuyla da oluşabilmektedir (150).

$$cys - S - S - cys \rightarrow cys - S^{\cdot} + S^{\cdot} - cys$$

Karbon Merkezli Radikaller

Karbon merkezli radikaller birçok biyolojik sistemlerde oluşabilmektedir (150).

$$CCl_4 \rightarrow {}^{\cdot}CCl_3 + Cl^{-}$$

Karbon merkezli radikaller O_2 ile reaksiyona girerek peroksil radikali verirler (150).

$${}^{\cdot}CCl_3 + O_2 \rightarrow {}^{\cdot}O_2{}^{\cdot}CCl_3$$ (triklorometilperoksil radikali)

Fosfor Merkezli Radikaller

Biyolojik sistemlerde fosfor merkezli radikallerin de oluştuğu bildirilmiştir (155).

Azot Merkezli Radikaller

Organizmada, azot merkezli radikaller de oluşmaktadır. Örneğin eritrositlerde fenilhidrazin metabolizması sırasında fenilhidrazin radikali (C6H5N = N.) oluşur. Azot merkezli radikallerin en önemlisi nitrik oksittir (NO) (155).

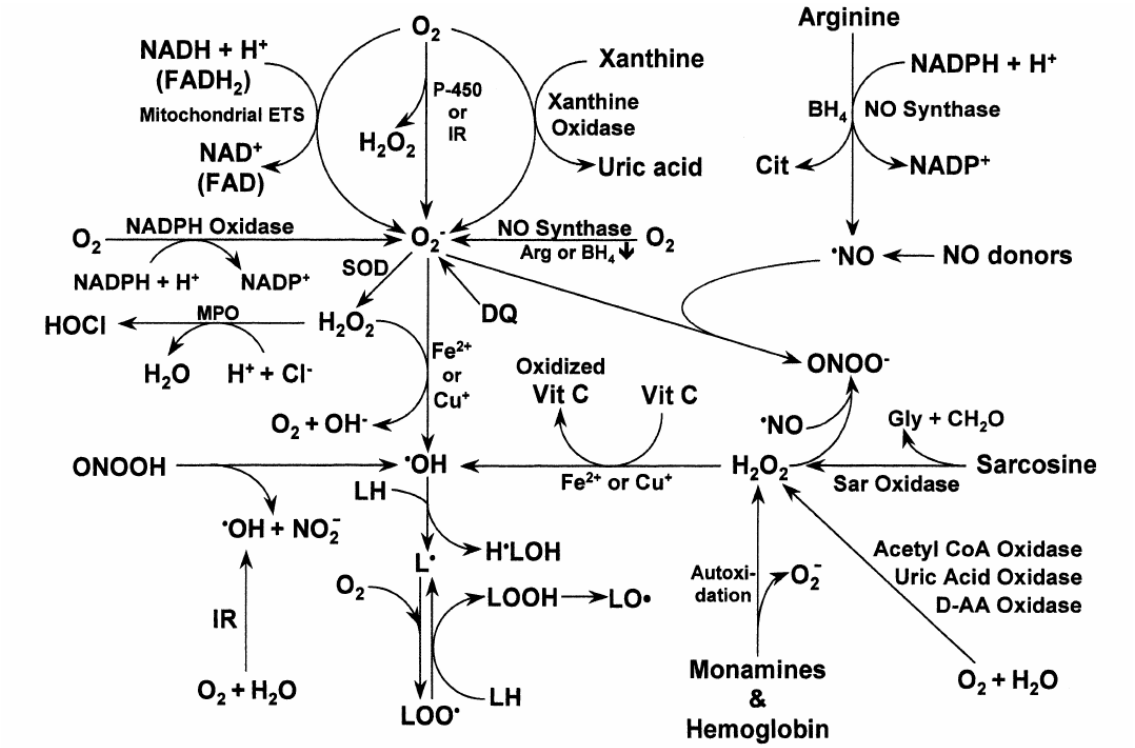
Nitrik Oksit (NO)

$NO^{\cdot}$ enzimatik olarak nitrik oksit sentaz enzimi tarafından L-arjinin'den sentezlenir (151).

$$\text{L-arjinin} + \text{NADPH} + O_2 \rightarrow \text{L-sitrullin} + NO^{\cdot} + NADP^{+}$$

Lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir (158). Düşük konsantrasyonlarda iken, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilir (159). Diğer radikallerden farklı olarak düşük dozlarda toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevleri gerçekleştirir (158). NO bir atom azot ile bir atom oksijenin eşleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır.

Nitrik oksitin organizmada çift yönlü rolü olabileceği yani pek çok fizyolojik olayın gerçekleşmesinde rol oynadığı bildirilmektedir (160). Nitrik oksitin, antioksidan savunmada görev almasının yanı sıra aşırı üretimi durumunda radikal etki gösterdiği ve peroksinitrit gibi daha güçlü radikallerin oluşumuna yol açtığı bildirilmiştir (150).



Şekil 2.4. Memeli hücrelerinde reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin meydana gelişi (İR: İyonize radyasyon, Sit: Sitrullin, D-AA: D-Amino asit, BH4: Tetrahidrobiopterin, Gly: Glisin, L˙: Lipit radikali, SOD: Superoksit dismutaz, MPO: Myeloperoksidaz) (161)

2.8.3. Serbest Radikal Kaynakları

2.8.3.1. Serbest Radikallerin Hücre Dışı Kaynakları

Bazı yabancı toksik maddeler hücrede serbest radikal üretimini artırırlar (Tablo 4.1.). Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler ya da serbest radikallerin ortadan kaldırılmasını sağlayan antioksidan aktiviteyi düşürürler. Bu tip maddeler dört grupta toplanabilirler (162):

Tablo 2.1. Serbest radikallerin hücre dışı kaynakları (162)

Çevresel faktörler	**Toksik kimyasallar**	**Radyasyon**	**İlaçlar**
Hiperoksi	Karbon tetraklorür (CCl_4)	Elektromanyetik radyasyon	Antineoplastik
Hava kirliliği Azot dioksit (NO_2.) Ozon Sülfür dioksit	Halojenlenmişhidrokarbonlar: Kloroform, Bromobenzen, Halotan	Partiküler radyasyon	Antibiyotikler: Kinolon, Tetrasiklin, Aminoglikozid Kinonlar
Tütün	Paraquat		
Sigara içimi	Alloksan		
Böcek ilaçları	Difenoller		
Metaller (Titanyum-Alüminyum-Kurşun-Molibden-Nikel-Krom-Kobalt-Civa-Kadmiyum-Arsenik)			Anestezikler

1. Toksinin kendisi bir serbest radikaldir. Örneğin kirli havanın koyu rengini veren azot dioksit gazı ($NO_2^{\bullet}$) böyle bir maddedir. Azot dioksit ($NO_2^{\bullet}$) etkili bir lipit peroksidasyonu başlatıcısıdır
2. Toksin bir serbest radikale metabolize olur. Örneğin kuru temizlemede kullanılan toksik bir madde olan karbon tetraklorür (CCl_4), karaciğerde sitokrom p450 tarafından triklorometil serbest radikaline ($CCl_3^{\bullet}$) dönüştürülür. Triklorometil serbest radikali de moleküler oksijenle (O_2) etkileşerek peroksil serbest radikali ($CCl_3O_2^{\bullet}$) oluşturur. Triklorometil serbest radikali ($CCl_3^{\bullet}$) ve peroksil serbest radikali ($CCl_3O_2^{\bullet}$) kuvvetli lipit peroksidasyonu başlatıcısıdırlar.

Böylece reaktif serbest radikal üretimi karaciğerde antioksidan savunma kapasitesini aşar. Böylece hücresel membranlarda oksidatif yıkım ve ciddi doku hasarı meydana gelir.

3. Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir. Örneğin özellikle karaciğerde biriken paraquat bir serbest radikale indirgendikten sonra tekrar yükseltgenerek rejenere edilirken, oksijen indirgenir ve böylece bol miktarda süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$) üretilmiş olur. Diyabetik bir ajan olan alloksan da paraquat gibi etki eder.
4. Toksin antioksidan aktiviteyi düşürür. Örneğin parasetamolün karaciğerde Sitokrom P_{450} tarafından metabolizması antioksidan aktivitede önemli yeri olan glutatyonla reaksiyona giren bir ürün oluşturarak glutatyonun miktarını azaltır.

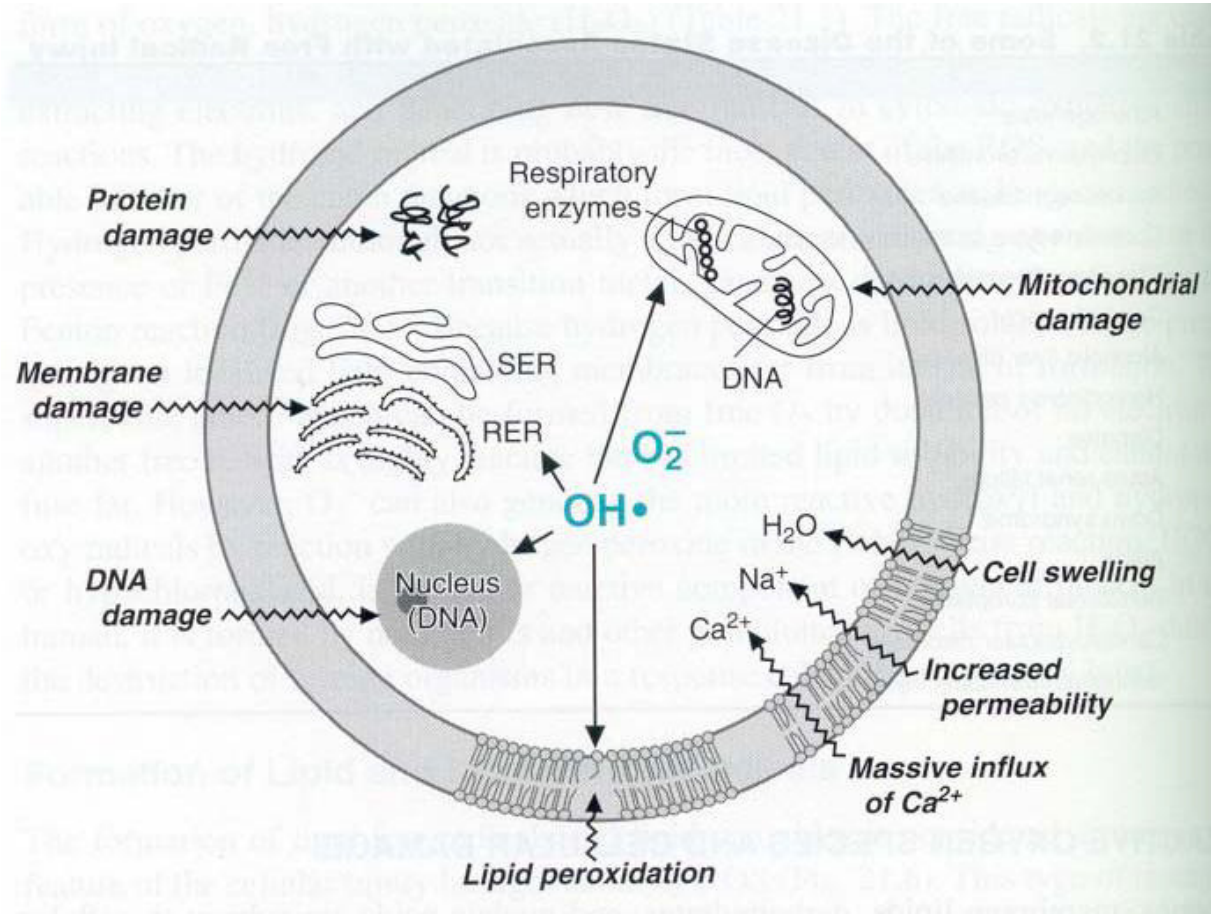
2.8.3.2. Serbest Radikallerin Hücre İçi Kaynakları

Serbest radikaller hücrelerde genel olarak elektron transfer reaksiyonları ile üretilirler. Enzim aracılı veya enzim katalizi olmadan oluşabilirler. Bu reaksiyonlar geçiş metal iyonlarının kimyasal redoksu ile birliktedir (163).

Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin aktif yerinde ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluşabilir. Bazen bu serbest radikal ara ürünler enzimlerin aktif yerinden sızarlar, moleküler oksijenle tesadüfen etkileşirler ve serbest oksijen radikalleri oluşur (162).

2.8.4. Serbest Radikallerin Etkileri

Oldukça reaktif moleküller olan serbest radikaller hücre bileşenleri ve hücre dışı makro moleküllerle etkileşerek organizmada yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olurlar (164). Oksijen radikallerinin etkilediği hücre komponentlerinin başlıcaları; yağ asitleri, proteinler, nörotransmitterler ve nükleik asitlerdir (Şekil 2.6.).



Şekil 2.5. Serbest oksijen radikallerinin etkilediği hücresel yapılar (162)

2.8.4.1. DNA ve Nükleik Asitlere Etkileri

İyonize edici radyasyona maruz kalınması ile oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona neden olurlar. Sitotoksik etki, büyük oranda nükleik asit baz modifikasyonlarından kaynaklanan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer değişikliklere bağlıdır. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer. Hidrojen peroksit zarlardan kolayca geçip hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücrede fonksiyon bozukluğuna ve hatta hücre ölümüne neden olabilir (165).

2.8.4.2. Proteinlere Etkileri

Proteinler, radikallerin etkilerine lipitlere oranla daha az hassastır. Özellikle doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle etkileşimi yüksektir. Bu nedenle triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi aminoasitleri içeren proteinler serbest radikallerden daha kolay etkilenirler. İmmungulobin G ve albumin gibi disülfit bağı fazla olan proteinlerin ise üç boyutlu yapıları bozulur (166).

2.8.4.3. Karbohidratlara Etkileri

Monosokkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehitler meydana gelir. Açığa çıkan okzoaldehitler proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterip, kanser ve yaşlanmaya neden olabilirler (165). Serbest oksijen radikalleri bağ dokunun önemli bir bileşeni olan hiyalüronik'in parçalanmasına da yol açabilirler (167).

2.8.4.4. Lipitlere Etkileri

Serbest radikallerin en önemli etkisi lipitlere yaptığı etkidir ki bu da lipit peroksidasyonu olarak adlandırılır. Hücre membranları poliansatüre yağ asitlerinden ve kolesterolden zengindir, kolaylıkla oksidan radikallerden etkilenirler. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Lipit peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Hücre membranlarında lipit serbest radikalleri ($L^{\bullet}$) ve lipit peroksit radikallerinin ($LOO^{\bullet}$) oluşması, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir (168). Biyolojik sistemlerde birçok radikalin lipit peroksidasyonuna neden olduğu kabul edilmektedir. Bununla birlikte lipit peroksidasyonunu başlatan asıl ajan OH radikalidir (152). Lipit peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipit radikali niteliği kazanmasıyla başlar. Lipit radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipit peroksit radikalleri ve lipit peroksitleri oluşur. Lipit peroksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan malondialdehit (MDA) gibi aldehitler de oluşmaktadır (145).

Lipit peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin zincirleme bir radikal reaksiyonudur. Lipit peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehittir. Malondialdehit, üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşur. Memelilerde MDA oluşumuna en çok araşidonik asit ve deksahekzanoik asit gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu yol açmaktadır. Oleik ve linoleik asitlerin oksidasyonundan da az miktarda MDA oluşmaktadır. Lipit peroksidasyonun göstergesi olarak kullanılan parametrelerden biri MDA'dir (155).

2.8.5. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikal hasarını önlemek amacıyla vücutta antioksidanlar olarak isimlendirilen savunma sistemleri bulunmaktadır. Antioksidanlar; düşük konsantrasyonlarda substratının oksidasyonunu geciktiren veya önleyen tüm maddelerdir (152). Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonlarını engelleyerek lipit peroksidasyonunu inhibe eden ve reaktif oksijen radikallerini tutan maddeler olarak da tarif edilebilir (131). Serbest oksijen radikalleri normal aerobik metabolizma esnasında sürekli olarak üretilir ve çeşitli biyolojik antioksidanlar tarafından ortamdan uzaklaştırılır. Ancak antioksidan koruma hiçbir zaman %100 etkinlikte değildir, bu nedenle hayatta kalmak için tamir mekanizmalarının varlığı önemlidir. Prooksidanlarda artma veya antioksidanların başarısızlığı

oksidatif stres oluşturur. Bu da moleküler hasar ve doku zedelenmesiyle sonuçlanır (152). Hücre membranlarında meydana gelen serbest radikal hasarı antioksidanların etki mekanizmalarını anlamak ta örnek teşkil edebilir. Serbest radikallerin oluşturduğu lipit peroksidasyonunda antioksidanların kullandıkları mekanizmalar şu başlıklar altında toplanabilir (152):

1. Oksijeni uzaklaştırmak veya lokal oksijen konsantrasyonunu düşürmek,
2. Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırmak,
3. $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 gibi anahtar reaktif oksijen türlerini uzaklaştırmak,
4. Hidroksil, alkoksil, ve peroksil türleri gibi serbest radikalleri toplamak,
5. Zincir reaksiyonlarını kırmak,
6. Singlet oksijeni toplamaktır.

Antioksidan savunma sistemleri; enzimatik ve enzimatik olmayan, selüler ve ekstraselüler antioksidanlar olarak farklı şekillerde sınıflandırılabilir (154).

Selüler antioksidanlar; intraselüler antioksidanlar ve membran antioksidanları olarak sınıflandırılabilir. İntraselüler antioksidanlar, enzimatik antioksidanlardır. Bu antioksidanlar radikal oluşumunu önlemek, oluşan radikallerin etkilerini durdurmak, radikallerin oluşturduğu oksidatif hasarı tamir etmek, hasarlanmış moleküllerin eliminasyonu gibi fonksiyonları yerine getirirler (154). Ürik asit, bilirübin ve askorbik asit sitoplazmik yerleşim gösteren antioksidan etkili moleküllerden bazılarıdır (164).

Membran antioksidanları E vitamini ve β-karoten gibi lipofilik moleküller olup serbest radikallerle reaksiyona girerek biyolojik membranları lipit peroksidasyonundan korur (164).

Serüloplazmin, transferrin, haptoglobin ve albumin hücre dışı antioksidanlar olup, serbest radikal hasarına karşı hücrenin korunmasına katkıda bulunurlar. Serüloplazmin bakır iyonlarını bağlayarak metal katalizli reaksiyonları kısıtlar ve demirin transferrine bağlanmasını kolaylaştırır. Transferrin demiri bağlayarak, haptoglobin serbest hemoglobini bağlayarak ve albümin bakırı bağlayarak antioksidan etki gösterir (155,164).

İntraselüler Antioksidanlar

Süperoksid Dismutaz : $O_2^{\bullet-}$'i katalitik olarak uzaklaştırır

Katalaz : Yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2'yi uzaklaştırır

Glutatyon peroksidaz : H_2O_2'yi ve organik hidroperoksitleri uzaklaştırır

Membran Antioksidanları

Vitamin E : Yağda çözünür, zincir kırıcı antioksidandır

β-karoten : Yağda çözünür, radikal tutar ve singlet oksijeni giderir

Koenzim Q antioksidan : Antioksidan olarak etki gösterebilir

Ekstraselüler Antioksidanlar

Transferin : Ferrik iyonları bağlar

Laktoferrin : Düşük pH'da ferrik iyonları bağlar

Haptoglobin : Hemoglobini bağlar

Hemopeksin : Hemi bağlar

Albumin : Bakırı ve hemi bağlar

Serüloplazmin : Bakır iyonlarını bağlar ve $O_2^{\bullet -}$'yi toplar

Ektraselüler SOD : $O_2^{\bullet -}$'i katalitik olarak uzaklaştırır

Ekstraselüler GPx : H_2O_2'yi ve organik hidroperoksitleri uzaklaştırır

Bilirübin : Peroksil radikallerini tutar

Mukus : $^{\bullet}OH$ radikalini tutar

Ürik asit : Radikal tutucudur

Glikoz : $^{\bullet}OH$ radikalini tutar

Enzimatik Antioksidanlar

Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz Sistemi

Superoksit dismutaz (SOD)

Katalaz (KAT)

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)

Glutatyon reduktaz (GR)

Glutatyon S-transferaz (GST)

Glikoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH)

Nonenzimatik Antioksidanlar

a) Yağda çözünen radikal tutucuları: α-tokoferol (E vitamini), β-karoten, Bilirubin, Ubikinol.

b) Suda çözünen radikal tutucuları: Glutatyon, Askorbik asit (C vitamini) urik asit.

c) Metal iyonlarını bağlayan proteinler: Ferritin, transferrin, haptoglobin, seruloplazmin, albumin.

d) NADPH oksidaz inhibitörleri: Adenozin, Ca+2 kanal blokorleri, lokal anestezikler

e) Ksantin oksidaz inhibitörleri: Allopurinol, oksipurinol, folik asit, tungsten

f) Fe redoks dongusunun inhibitörleri: Desferoksamin, seruloplazmin

g) Sitokinler: TNF ve IL-1

h) Notrofil adezyon inhibitörleri

ı) Barbitüratlar

i) Stobadin

Enzimatik Yapıda Olan Antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD, süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştüren reaksiyonu katalizleyen bir metalloenzimdir. SOD enziminin memelilerde üç ayrı tipi bulunur. Bunlar mitokondrial, sitozolik ve ekstraselüler formlardır. Sitozolik ve ekstraselüler form aktif bölgesinde Cu, Zn bulundururken mitokondriyal form Mn bulundurur (140). Sitozolik Cu/Zn SOD memeli hücrelerinde en fazla bulunan izomerdir. Enzimin aktivitesinden bakır, stabilitesinden ise çinko sorumludur. Ekstraselüler SOD Cu ve Zn içermesine rağmen sitozolik SOD'dan farklıdır. Molekül ağırlığı daha büyük olup glikoprotein yapıdadır (169).

Mn-SOD, mitokondrilerde bulunur ve her biri bir manganez atomu içeren dört alt üniteden oluşur (170) . Birçok insan kanserlerinde Mn-SOD'un azaldığı gösterilmiştir ve çoğu vakada aktivitedeki bu azalma defektif gen ekspresyonunun sonucu olarak değerlendirilmiştir. Proteinlerin katalitik aktiviteleri ve stabiliteleri de Mn-SOD tarafından değiştirilebilir (155).

Süperoksid dismutaz $O_2^{\bullet -}$ radikalini ortamdan uzaklaştırarak hücreleri oksidatif hasardan korur.

Glutatyon Peroksidaz (GPx)

Glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve büyük moleküllü lipit hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Bu enzim dört protein alt ünitesinden oluşan tetramerik bir yapıda olup her bir ünitenin aktif bölgesinde bir atom selenyum (Se) elementi bulunur. Sitozol ve mitokondride bulunan bu enzim, karaciğer ve beyinde orta, kasta ise düşük düzeyde aktivite gösterir (150). Glutatyon peroksidaz, aşırı hidrojen peroksit varlığında glutatyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG, glutatyon disülfit) oksidasyonunu katalizler. Böylece, H_2O_2 suya dönüştürülerek detoksifiye edilmiş olur (155,171). Selenyuma bağımlı ve bağımsız iki tipi mevcuttur. Selenyuma bağımlı olan GSH-Px (Se-GSH-Px) sitozol ve mitokondride bulunmaktadır. Hem H_2O_2 hem de lipit hidroperoksitleri metabolize eder. Selenyumdan bağımsız olan GSH-Px (non-Se GSH-Px) ise sadece lipit hidroperoksitleri metabolize eder. Bu fonksiyonu ile lipit peroksidasyonunun başlamasını ve ilerlemesini önlemektedir (172).

Glutatyon redüktaz (GR)

Glutatyon peroksidaz tarafından H_2O_2 ve diğer lipit peroksitlerinin redüksiyonu sırasında glutatyonun okside glutatyona dönüştürülür. Bu okside formun, ileride kullanılmak üzere, tekrar redükte GSH'a dönüştürülmesi gereklidir, çünkü organizmada GSH deposu sınırlıdır. Glutatyon redüktaz enzimi, NADPH varlığında bu indirgenme olayını katalizler (153,158,173).

Katalaz (CAT)

Katalaz, esas olarak peroksizomlarda lokalize olan ve yapısında dört hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Hayvanlarda tüm vücut organlarında bulunan katalaz, karaciğer ve eritrositlerde yoğunlaşmıştır (150).

Katalaz, kataliz görevini iki farklı yolla gerçekleştirir (174).

1. H_2O_2 in parçalanması (katalitik reaksiyon)
2. Alifatik alkollerin peroksidasyonu (peroksidik reaksiyon)

Katalaz, SOD'a benzer bir dismutasyon mekanizması ile hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene parçalayarak biyolojik sistemleri H_2O_2'in zararlarına karşı korur (145,151,174). Ayrıca katalaz enzimi hidrojen peroksit varlığında peroksidaz etkisi ile metanol ve etanol gibi alkolleri, formaldehid ve asetaldehide oksitlerler (150).

Enzimatik Yapıda Olmayan Antioksidanlar

Enzimatik yapıda olmayan antioksidanlar endojen ve ekzojen kaynaklı olabilir.

Endojen Kaynaklı Nonenzimatik Antioksidanlar: Hemoglobin, ferritin, miyoglobin, ürik asit, bilirubin, laktoferrin, transferrin, melatonin, askorbik asit, albumin ve glutatyondur.

Ekzojen Kaynaklı Nonenzimatik Antioksidanlar: β-karoten, vitamin C ve vitamin E'dir (175).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Hayvanlar

Çalışmada, Erciyes Üniversitesi Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezinden (ERÜTAM) temin edilen ortalama 40.15±8.59 kg ağırlıklarında, 1 yaşlı, gebelik ve laktasyon dönemlerinde olmayan, klinik muayeneleri sonucu sağlıklı oldukları belirlenen 10 adet koyun kullanıldı. Çalışmanın bütün deneysel aşamalarında, koyunlardan 0. saatte alınan kan, serum ve biyopsi örnekleri kontrol grubu olarak değerlendirildi.

3.1.2. Araştırmada Kullanılanılan Araç Gereç, Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Phlorizin Dihydrate (1000 mg, Sigma P 3449): Çalışmada phlorizin, koyunlarda serum lipid profili ve oksidatif stres parameterleri üzerine etkisinin incelenmesi amacı ile kullanıldı.

Acephromazin Maleate (50 mg, Sigma A 7111): Koyunlarda biyopsi öncesinde sedasyon sağlanması amacı ile kullanıldı.

Lidocain (20 mg/ml, Adeka): Koyunlarda biyopsi öncesinde lokal anastezi sağlanması amacı ile kullanıldı.

Biyopsi İğnesi (Egemen®, Türkiye): Koyunların karaciğerinden biyopsi almak amacı ile kullanıldı.

Multisample Kan Toplama İğnesi: Çalışmada, koyunlardan kan almak için kullanıldı.

Vakutainer Cam Tüp (Pıhtılaşma Aktivatörlü Antikoagulantsız, 10 ml, 100'lük): Çalışmada kullanılan koyunlardan kan almak için kullanıldı.

Vakutainer Cam Tüp (Heparinli): Çalışmada kullanılan koyunlardan kan almak için kullanıldı.

Vakutainer Cam Tüp (EDTA'lı): Çalışmada kullanılan koyunlardan kan almak için kullanıldı.

Ependorf Tüpü (1,5 ml): Serum ve plazma örneklerinin analiz işlemlerine kadar saklanması amacı ile kullanıldı.

Enjektör 2 cc'lik: Çalışmada, koyunlardan kan almak için kullanıldı.

Enjektör 10 cc'lik: Çalışmada, koyunlardan kan almak için kullanıldı.

Pembe Uçlu İğne: Çalışmada kullanılan koyunlara deri altı pholorizin enjeksiyonu için kullanıldı.

NEFA (Esterleşmemiş Yağ Asitleri) Analizi Test Kiti (Zenbio, Katalog No: SFA-1, USA): Koyunlardan elde edilen serumlarda NEFA analizlerinin yapılması amacıyla kullanıldı.

Kit İçeriği:

Analiz Pleyti (Assay Plate)	96 kuyucuklu
Seyreltme Tamponu (Diluation Buffer)	12 ml
NEFA Standart	1 mM Stock.
NEFA Seyreltici A (NEFA Diluent A)	10.5 ml
NEFA Seyreltici B (NEFA Diluent B)	5.5 ml
NEFA Reaktif A (NEFA Reagent A)	1 Şişe
NEFA Reaktif B (NEFA Reagent B)	1 Şişe
Kaset	2 adet

Beta Hidroksi Bütirik Asit (BHB) Test Kiti (BioVision, Katalog No: K632-100; Milpitas-USA): Çalışmada kullanılan koyunların serum örneklerinde BHB analizlerinin yapılması amacıyla kullanıldı.

Kit İçeriği:

BHB Analiz Tamponu (BHBAssay Buffer)	25 ml
BHB Enzim Karışımı (BHBEnzyme Mix)	Liyofilize
BHB Substrat Karışımı (BHBSubstrate Mix)	Liyofilize
BHB Standart (10 mM)	Liyofilize

Aseto asetik asit (AcAc) analizi Test Kiti (EnzyChromTM Ketone Body Assay Kit) (EKBD-100, Hayward-USA): Çalışmada kullanılan koyunların serum örneklerinde AcAc analizlerinin yapılması amacıyla kullanıldı.

Kit İçeriği:

AcAc Tamponu (AcAc Buffer)	20 ml
AcAc Reaktifi (AcAc Reagent)	1 ml
AcAc Standart	200 µl 80 mM
HBDH Enzim	120 µl

Total Oksidan Seviye (TOS) Test Kiti (Rel Assay Diagnostics, Ürün Kodu: RL0024, Gaziantep/Türkiye): Çalışmada kullanılan koyunların serum örneklerinde TOS düzeylerinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı.

Kit İçeriği:

Reaktif 1 (Analiz Tamponu)	50 mlx1
Reaktif 2 (Prokromojen Solüsyonu)	10 mlx1
Standart 1 (Blank Solüsyonu)	Deiyonize Su
Standart 2 Solüsyonu	10 mlx1

Total Antioxidant Seviye (TAS) Test Kiti (Rel Assay Diagnostics, Ürün Kodu: RL0017, Gaziantep/Türkiye): Çalışmada kullanılan koyunların serum örneklerinde TAS düzeylerinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı.

Kit İçeriği:

Reaktif 1 (Analiz tamponu)	50 mlx1
Reaktif 2 (Renkli ABTS Radikal Solüsyon)	10 mlx1
Standart 1 (Blank Solüsyonu)	Deiyonize Su
Standart 2 Solüsyonu	10 mlx1

Mikrotom Bıçağı (Thermo Scientific MB35): Koyunlardan alınan biyopsi örneklerinden histopatolojik kesit almak için kullanıldı.

Eosin Y Solüsyonu (Sigma HT): Çalışmada kullanılan koyunlardan elde edilen biyopsi örneklerinden alınan kesitlerde histopatolojik boyama yapılması amacı ile kullanıldı.

Glikoz Spektrofotometrik Kit (Abbott Diagnostic, USA): Koyunlardan elde edilen serum örneklerinde, glikoz parametrelerinin Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda tam otomatik biyokimya oto analiz cihazında (Abbott Architect C 16000, USA) spektrofotometrik olarak belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

Albumin Spektrofotometrik Kit (Abbott Diagnostic, USA): Koyunlardan elde edilen serum örneklerinde albumin parametrelerinin Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda tam otomatik biyokimya oto analiz cihazında (Abbott Architect C 16000,USA) spektrofotometrik olarak belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

Total Protein Spektrofotometrik Kit (Abbott Diagnostic, USA): Koyunlardan elde edilen serum örneklerinde total protein parametrelerinin Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda tam otomatik biyokimya oto analiz cihazında (Abbott Architect C 16000, USA) spektrofotometrik olarak belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

Üre Spektrofotometrik Kit (Abbott Diagnostic, USA): Koyunlardan elde edilen serum örneklerinde kan üre parametrelerinin Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda tam otomatik biyokimya oto analiz cihazında (Abbott Architect C 16000, USA) spektrofotometrik olarak belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

Kreatinin Spektrofotometrik Kit (Abbott Diagnostic, USA): Koyunlardan elde edilen serum örneklerinde kreatinin parametrelerinin Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda tam otomatik biyokimya oto analiz cihazında (Abbott Architect C 16000, USA) spektrofotometrik olarak belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

Aspartat Aminotransferaz (AST), Spektrofotometrik Kit (Abbott Diagnostic, USA): Koyunlardan elde edilen serum örneklerinde AST parametrelerinin Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda tam otomatik biyokimya oto analiz cihazında (Abbott Architect C 16000, USA) spektrofotometrik olarak belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

Alanin Aminotransferaz (ALT), Spektrofotometrik Kit (Abbott Diagnostic, USA): Koyunlardan elde edilen serum örneklerinde ALT parametrelerinin Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda tam otomatik biyokimya oto analiz cihazında (Abbott Architect C 16000, USA) spektrofotometrik olarak belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

Alkalen Fosfataz (ALP), Spektrofotometrik Kit (Abbott Diagnostic, USA): Koyunlardan elde edilen serum örneklerinde ALP parametrelerinin Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda tam otomatik biyokimya oto analiz cihazında (Abbott Architect C 16000, USA) spektrofotometrik olarak belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

Gama Glutamil Transferaz (GGT), Spektrofotometrik Kit (Abbott Diagnostic, USA): Koyunlardan elde edilen serum örneklerinde GGT parametrelerinin Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda tam otomatik biyokimya oto analiz cihazında (Abbott Architect C 16000, USA) spektrofotometrik olarak belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

Laktat Dehidrogenaz (LDH), Spektrofotometrik Kit (Abbott Diagnostic, USA): Koyunlardan elde edilen serum örneklerinde LDH parametrelerinin Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda tam otomatik biyokimya oto analiz cihazında (Abbott Architect C 16000, USA) spektrofotometrik olarak belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

Trigliserit (TG), Spektrofotometrik Kit (Abbott Diagnostic, USA): Koyunlardan elde edilen serum örneklerinde TG parametrelerinin Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda tam otomatik biyokimya oto analiz cihazında (Abbott Architect C 16000, USA) spektrofotometrik olarak belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

Amilaz, Spektrofotometrik Kit (Abbott Diagnostic, USA): Koyunlardan elde edilen serum örneklerinde amilaz parametrelerinin Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda tam otomatik biyokimya oto analiz cihazında (Abbott Architect C 16000, USA) spektrofotometrik olarak belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

Lipaz, Spektrofotometrik Kit (Abbott Diagnostic, USA): Koyunlardan elde edilen serum örneklerinde lipaz parametrelerinin Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda tam otomatik biyokimya oto analiz cihazında (Abbott Architect C 16000, USA) spektrofotometrik olarak belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

HDL Spektrofotometrik Kit (Abbott Diagnostic, USA): Koyunlardan elde edilen serum örneklerinde HDL parametrelerinin Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda tam otomatik biyokimya oto analiz cihazında (Abbott Architect C 16000, USA) enzimatik kolorimetrik metot ile belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

LDL Spektrofotometrik Kit (Abbott Diagnostic, USA): Koyunlardan elde edilen serum örneklerinde LDL parametrelerinin Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda tam otomatik biyokimya oto analiz cihazında (Abbott Architect C 16000, USA) enzimatik kolorimetrik metot ile belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

Total Kolesterol spektrofotometrik kit (Abbott Diagnostic, USA): Koyunlardan elde edilen serum örneklerinde total kolesterol parametrelerinin Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda tam otomatik biyokimya oto analiz cihazında (Abbott Architect C 16000, USA) enzimatik kolorimetrik metot ile belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

İnsülin Hormonu Analiz Kiti (Siemens 06609316 Immulite® 2500 Insulin Kit, USA): Koyunlardan elde edilen serum örneklerinde insülin parametrelerinin Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda tam otomatik biyokimya oto analiz cihazında (Immuno Assay System (Simens, Immulite 2000XPi, USA) belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

Kan Sayım Cihazı (Mindray BC-2800 Vet, Çin) ve Cihaza Ait Panasonic KX 1150 Multi-Mode: Kan parametrelerinin ölçümü için kullanıldı.

100 ve 1000 µl'lik Otomatik Pipetler (Finntip, Thermo, Finland): Biyokimyasal analizlerde kullanıldı.

Santrifüj (10 mlx20 Tüplük): Antikoagulantsız kan örneklerinde serum çıkarılması için kullanıldı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Klinik Muayene

Klinik muayene amacıyla hayvanların genel görünümü, hayvanlarda vücudun tutuluşu, kıl örtüsünün, mukozaların (ağız, konjuktiva) ve lenf yumrularının muayenesi yapıldı. Koyunların kulak küpesi numaraları kaydedildi. Yaptığımız klinik muayene ile sağlıklı olduğu belirlenen 10 adet koyun çalışmaya dahil edildi. On beş günlük adaptasyon döneminde ve çalışma süresince koyunlar, 6 kg/baş/gün olacak şekilde arpa, mısır silajı, kuru yonca ve arpa samanı içeren rasyon ile beslendi (Tablo 3.1.). Kullanılan rasyonun konsantre yem : kaba yem oranı 11.7 : 88.3 idi. Koyunlara yalama taşı şeklinde vitamin-mineral premiksleri ve *ad libitum* su verildi.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan koyunlara verilen yemin bileşimi (%)

Verilen Yemin İçeriği	**Doğal Halde kg**	**Kuru Madde Bazında kg**	**Kuru Madde Bazında %**
Mısır Silajı	30	11	28.6
Kuru Yonca	15	14	36.4
Arpa Samanı	10	9	23.3
Arpa	5	4,5	11.7
Toplam	**60**	**38.5**	**100**

3.2.2. Kan Örneklerinin Toplanması

Hayvanların vena jugularisinden hematolojik ve biyokimyasal analizler için vakumlu antikoagulansız, heparinli ve EDTA'lı cam tüplere holder ve uygun iğne yardımı ile phlorizin uygulamasından önce 0. saatte ve phlorizin uygulanmasından sonraki 12, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde, yem verilmeden önce 9 ml kan örnekleri alındı.



Şekil 3.1. Koyunlardan Kan alınması

3.2.3. İdrar Örneklerinin Toplanması

Çalışmada kullanılan koyunlardan 0, 12, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde koyunların ağız ve burunları kapatılıp uyarılmak suretiyle ürinasyon yapmaları sağlanıp, aseptik idrar toplama kaplarına idrar örnekleri alındı.



Şekil 3.2. İdrar alma yöntemi



Şekil 3.3. Koyunlardan idrar alınması

3.2.4. Koyunlara Phlorizin Uygulanması

Çalışmada kullanılan koyunlara 0. saatte kan ve idrar örnekleri alınmasını takiben 10 mg/kg dozunda deri altı yolla tek doz phlorizin (etki süresi 3-10 gün), (100 gr/kg polietilen glikolda çözdürülerek) uygulandı.



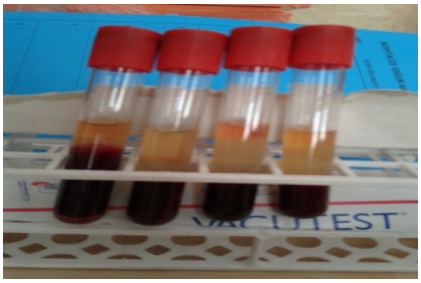
Şekil 3.4. Phlorizin dihydrate



Şekil 3.5. Koyunlara deri altı phlorizin enjeksiyonu

3.2.5. Kan Örneklerinin İşlenmesi

Vakumlu antikoagulansız tüplere alınan kan örnekleri 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra 3000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek serumları çıkarıldı. Daha sonra örnekler biyokimyasal ve hormon analizleri yapılana kadar -20 ^{o}C'de derin dondurucuda saklandı.



Şekil 3.6. Santrifüj edilmiş kan örnekleri

3.2.6. Hematolojik Analizler

Hematolojik analizler için EDTA'lı tüplere 4 ml kan örnekleri alındı. EDTA'lı kan örneklerinde trombosit (10^3/µl) total lökosit (WBC) (10^3/µl), eritrosit (RBC) (10^3/µl) sayıları, hemoglobin (g/dl) ve hematokrit (%) değerleri Mindray BC-2800 Vet kan sayım cihazı kullanılarak ölçüldü.



Şekil 3.7. EDTA'lı kan örneklerinin kan sayım cihazında kan sayımlarının yapılması

3.2.7. İdrar Örneklerinin İncelenmesi

Santrifüje edilmemiş idrar örneklerine bekletilmeden test stripleri (Healgen, URS-10T Reagent Strips, USA) batırıldı ve manuel olarak göz ile bakıda kutunun üzerindeki renk skalasına göre idrardaki lökosit, dansite, pH, glikoz, protein, kan, biluribin, urobilinojen ve keton cisimcikleri yönünden değerlendirildi.



Şekil 3.8. İdrar örneklerinin test stripleri ile değerlendirilmesi

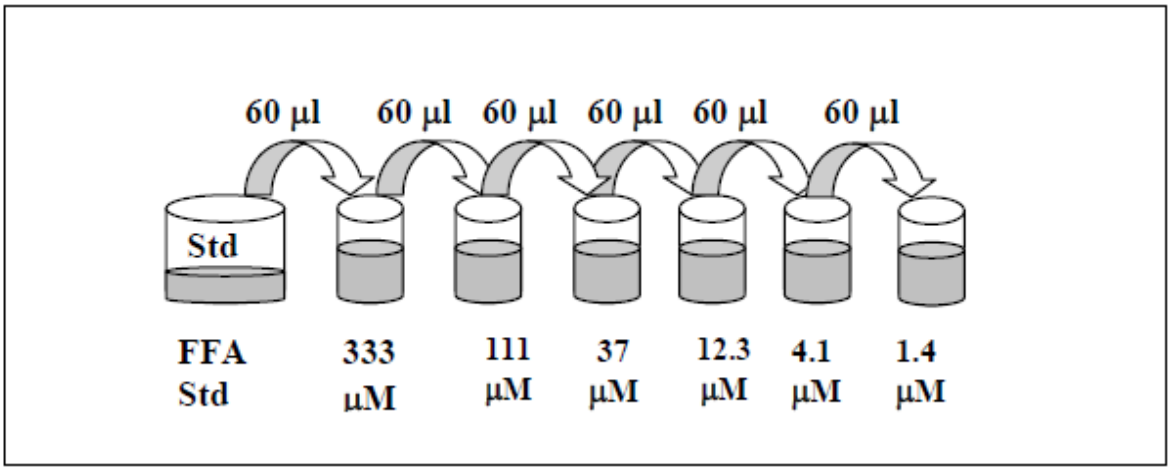
3.2.8. Biyokimyasal Analizler

Çalışmada kullanılan koyun serum örneklerinde NEFA, BHBA, AcAc düzeyleri proje bütçesinden temin edilen ticari kitler ile Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA, Bio-Tek, Türkiye) tekniği kullanılarak belirlendi.

3.2.8.1.NEFA (Esterleşmemiş Yağ Asitleri) Analizi

Standart Solüsyonun Hazırlanması

Standartlar, 0, 1.4, 4.1, 12.3, 37, 111 ve 333 µM derişimde olacak şekilde ayarlandı. Bu amaçla; test kitinin içersinde bulunan sulandırma tamponundan 120'şer µl 6 adet boş tüpe ilave edildi. Daha sonra standart solüsyondan (1.0 mM) 60 µl alınarak yukarıda bahsedilen altı tüpte şekil 3.8'de gösterildiği gibi sırasıyla derişimleri 333, 111, 37, 12.3, 4.1, 1.4 µM olacak şekilde dilüsyon serileri elde edildi. Sulandırma tamponunun kendisi de standart 0 olarak kullanıldı.



Şekil 3.9. Standart soluyon derişimlerinin hazırlanması

NEFA Reaktif A'nın Hazırlanması: 10.5 ml NEFA seyreltici A solüsyonu NEFA reaktif A şişesine ilave edilerek hazırlandı. Hafif bir şekilde dairesel hareketlerle karıştırılarak 2-8 °C'de muhafaza edildi.

NEFA Reaktif B'nin Hazırlanması: 5.5 ml NEFA seyreltici B solüsyonu NEFA Reaktif B şişesine ilave edilerek hazırlandı. Hafif bir şekilde dairesel hareketlerle karıştırılarak 2-8 °C'de muhafaza edildi.

Testin Yapılışı

ELISA pleytindeki 60 kuyucuğa 5'er µl serum numuneleri ilave edildi ve örneklerin son hacimleri 50 µl'ye, 45 µl dilüsyon tamponu kullanılarak, tamamlandı. Diğer her bir

kuyucuğa 50'şer µl standart solüsyonlardan ilave edildi (0, 1.4, 4.1, 12.3, 37, 111 ve 333 µM).

Test kitinin içerisinde mevcut olan kasetlerden birisine 10.5 ml sulandırılmış NEFA Reaktif A ilave edildi. Kaset içersindeki NEFA Reaktif A'dan 100'er µl pleytin her bir kuyucuğuna ilave edildi ve hafifçe karıştırıldıktan sonra 37 °C'de 10 dk inkübe edildi.

Test kitinin içersinde mevcut olan kasetlerden diğerine ise 5.5 ml sulandırılmış NEFA Reaktif B ilave edildi. Kaset içersindeki NEFA Reaktif B'den 50'şer µl pleytin her bir kuyucuğuna ilave edildi ve hafifçe karıştırıldıktan sonra 37 °C'de 10 dk inkübe edildi.

İnkübasyon süresi sonunda pleyt 5 dakika süresince oda ısısında bekletildi. Bu esnada kuyucuklar hava kabarcığı oluşumu yönünden incelendi. Herhangi bir hava kabarcığı gözlenmesi yanlış sonuç vereceğinden dolayı, oluşan hava kabarcıkları toplu iğne vasıtası ile yok edildi. Daha sonra pleyt ELISA cihazına yerleştirilerek 540 nm'de her bir kuyucuğun absorbansı okundu.

Sonucun Değerlendirilmesi:

540 nm'de okunan optik dansite (OD) değerleri µM cinsinden NEFA parametresi olarak değerlendirildi.



Şekil 3.10. NEFA analizinde ELISA pleytindeki görüntü

3.2.8.2. Beta Hidroksi Bütirik Asit (BHB) Analizi

Reaktiflerin Hazırlanması ve Depolama Koşulları

Enzim Karışımı: Liyofilize BHB enzim karışımı kullanılmadan önce 220 µl BHB analiz tamponu ile yavaş bir şekilde pipetaj yapılarak çözündürüldü ve -20°C'de muhafaza edildi.

BHB Subsrat Karışımı: Kullanılmadan önce substrat karışımına 220 µl BHB analiz tamponu ilave edildi. İyice karıştırıldı. Işıkla teması engellenerek -20°C'de muhafaza edildi.

BHB Standart: Bu reaktif 10 mM derişimde olacak şekilde hazırlandı. Bu amaçla liyofilize haldeki BHB Standart 100 µl distile su içinde çözündürüldü ve -20 °C'de muhafaza edildi.

Testin Yapılışı

1. **Standart Eğrinin Hazırlanması:** 10 mM olarak hazırlanan BHB standart reaktifi 90 µl distile su ilave edilerek ve vortekslenerek 1.0 mM'a seyreltildi. ELISA pleytindeki ilk sekiz kuyucuktan 6' sına sırasıyla 0, 4, 8, 12, 16 ve 20 µl dilüe BHB standart solüsyonu ilave edildi. Her bir kuyucuktaki BHB standart miktarları (0, 4, 8, 12, 16 ve 20 µl) uygun hacimlerde BHB analiz tamponu ilave edilerek 50 µl'ye tamamlandı.
2. **Örneğin Hazırlanması:** Bu amaçla ELISA pleytinde kalan diğer kuyucuklara 5'er µl serum örneği ilave edildi. Daha sonra serum örneklerinin üzerine 45 µl BHB analiz tamponu ilave edilerek total hacim 50 µl'ye tamamlandı.
3. **Reaksiyon karışımın hazırlanması:** Tek bir örnek/standart için 46µl BHB analiz tamponu üzerine 2µl BHB enzim karışımı ve 2µl BHB substrat karışımı ilave edilip karıştırılarak total hacmi 50 µl olacak şekilde reaksiyon karşımı hazırlandı.
4. **Testin Yapılışı**

   ELISA pleytindeki kuyucuklara daha önceden ilave edilen ve son hacimleri BHB analiz tamponu ile 50 µl'ye tamamlanan standart ve örneklerin üzerine hazırlanan reaksiyon karışımından 50'şer µl ilave edildi ve dikkatli bir şekilde karıştırıldı. Daha sonra karanlık ortamda oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. İnkubasyon süresi sonucunda ELISA okuyucusunda 450 nm'de örnek ve standartların OD'si ölçüldü.

   Hesaplama

   Örneklerin BHB konsantrasyonu (C) = Ay/Sv (nmol/µl)

   Ay : Standart eğride incelenen örneğin BHB (nmol) miktarı

   Sv : Kuyuya ilave edilen örneğin volümü (µl)

   β-Hidroksibütirik asitin molekül ağırlığı: 104.1

3.2.8.3. Aseto asetik asit (AcAc) Analizi

Standartların Hazırlanması: 5 µl AcAc standart solüsyonu 45 µl distile su ile karıştırılmak suretiyle 8 mM derişiminde standart solüsyon hazırlandı**.**

Çalışma Reaktifinin Hazırlanması: Pleytteki tek bir kuyucuk için 195 µl AcAc tampon, 8 µl AcAc Reaktif ve 0.5 µl HBDH Enzim içeren karışımı hazırlandı. Kuyucuk sayısına göre bu miktar modifiye edildi.

Blank Reaktifinin hazırlanması: 195 µl AcAc tampon ve 8 µl AcAc reaktif karışımı blank reaktifi olarak kullanıldı.

Testin Yapılışı

1. ELISA pleytindeki kuyucuklardan ilkine 5 µl distile su, ikincisine 5 µl AcAc standart solüsyondan (8 mM) ilave edildi. Daha sonraki iki kuyucuğa aynı serum örneğinden 5 µl konuldu. İki kuyucuktan birisi örnek diğeri örnek blank olarak değerlendirildi.
2. 195 µl çalışma reaktifi, distile su, standart ve örneklerin olduğu kuyucuğa ilave edildi. 195 µl blank reaktifini da örnek blank'inin olduğu kuyucuğa ilave edildi ve playt yavaş bir şekilde karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kuyucukların absorbansı 340 nm'de okundu.

Hesaplama

[AcAc] = (OD_{BLANK} − $OD_{ÖRNEK}$ / OD_{H2O} − $OD_{STANDARD}$) x 8 (mM) formulüne göre serum örneklerinin aseto asetik asit miktarları belirlendi.

Konvansiyonel biyokimya analizlerinden; glikoz, albumin, total protein, üre, kreatinin, AST, ALT, ALP, GGT, LDH, TG, amilaz, lipaz, LDL, HDL ve total kolesterol düzeyleri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuarı'nda tam otomatik biyokimya oto analiz cihazı (Abbott Architect C 16000, USA) kullanılarak belirlendi.

Koyun serum örneklerindeki insülin düzeyi de aynı şekilde Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda Immuno Assay System (Simens, Immulite 2000XPi, USA) cihazında tespit edildi.

3.2.9. Oksidatif Stress Parametrelerinin Belirlenmesi

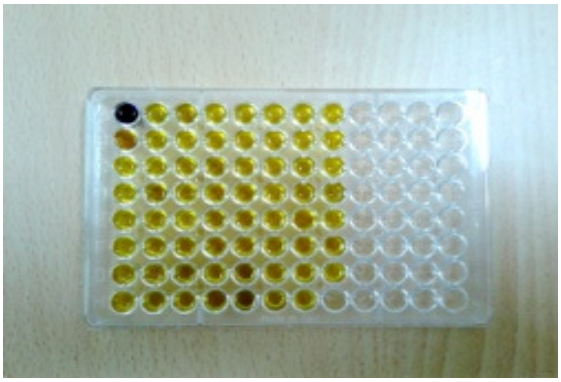
Total Oksidan Seviyenin (TOS) Belirlenmesi

Çalışma Standart Solüsyonunun Hazırlanması: Standart solüsyonu hazırlamak için Stok Stabil Standart Solüsyon (SSSS, 800 mM H_2O_2 Equiv/L) 40.000 kere deiyonize su ile dilüe edildi. Bu amaç ile 50 µl SSSS'na 10 ml deiyonize su ilave edilerek vortekslendi (1. adım dilüsyon). Hazırlanan bu solüsyondan tekrar 50 µl alınarak 10 ml deiyonize su ilavesi ile vortekslendi (2. adım dilüsyon). Bu şekilde Standart solüsyonun final konsantrasyonu 20 µM H_2O_2'e ayarlandı.

Testin Yapılışı:

1. ELISA pleytindeki ilk kuyucuğa 500 µl Reaktif 1 ve 75 µl çalışma standart solüsyondan ilave edildi. Pleytteki diğer kuyucuklara 500 µl Reaktif 1 ve 75 µl serum örneği konularak 530 nm de okunarak standart ve numunelerin de ilk absorbansı kaydedildi.

2. Daha sonra her bir kuyucuğa 25 µl Reaktif 2 eklenip, oda ısısında 10 dakika ya da 37 ºC'de 5 dakika inkübe edildikten sonra 530 nm'de ikinci absorbans değeri okutuldu.
3.



Şekil 3.11. TOS analizinde ELISA pleytindeki görünüm

TOS Değerinin Hesaplanması

TOS= (ΔAbs Örnek / ΔAbs Satandart 2) X 20(Standart 2 Değeri)

ΔAbsÖrnek= (Örneğin ikinci absorbans ölçüm değeri – Örneğin birinci absorbans ölçüm değeri)

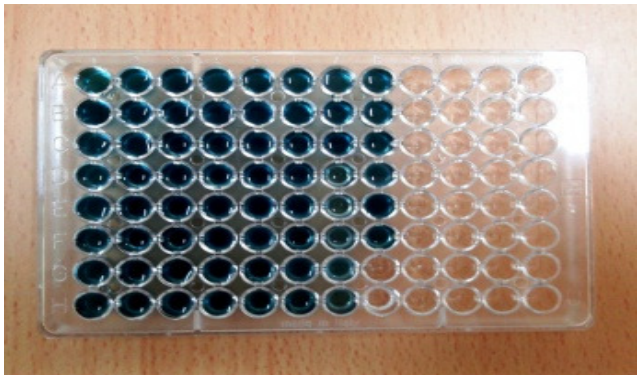
ΔAbs Satandart 2= (Standartın ikinci absorbans ölçüm değeri – standartın birinci absorbans ölçüm değeri)

Standart 2 Değeri= 20µmol H_2O_2 Equiv/L

Total Antioksidan Seviyenin (TAS) Belirlenmesi

Testin Yapılışı

1. ELISA pleytindeki ilk kuyucuğa 500 µl Reaktif 1 ve standart 1 (Deiyonize su), ikinci kuyucuğa 500 µl Reaktif 1 ve 30 µl standart 2'den, diğer kuyucuklara ise 30'ar µl numune ve 500 µl Reaktif 1 ilave edilerek 660 nm'de numune ve standartların ilk absorbansları kaydedildi.
2. Daha sonra her bir kuyucuğa 75 µl Reaktif 2 ilave edilip, oda ısısında 10 dakika ya da 37 ºC'de 5 dakika inkübe edildikten sonra 660 nm'de ikinci absorbans değerleri okutuldu.



Şekil 3.12. TAS analizinde ELISA pleytindeki görüntü

TAS Değerinin Hesaplanması

TAS değerinin hesaplanması için aşağıda belirtilen formül kullanıldı.

TAS = [(ΔAbs Std1) - (ΔAbs Örnek)] / [(ΔAbs Std1) - (ΔAbs Std2)]

ΔAbsorbans Değeri Standart 1= (Standart 1'in ikinci absorbans değeri – Standart 1'in ilk absorbans değeri)

ΔAbsorbans Değeri Standart 2= (Standart 2'nin ikinci absorbans değeri – Standart 2'nin ilk absorbans değeri)

ΔAbsorbans Değeri Örnek İçin = (Örneğin ikinci absorbans değeri – örneğin ilk absorbans değeri).

Oksidatif Stres İndeksinin Hesaplanması (OSİ)

Oksidatif stres indeksi aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

OSİ (%) = [TOS (mmol Trolox eqivalent/L) / TAS (μmol H_2O_2 equivalent/L)]

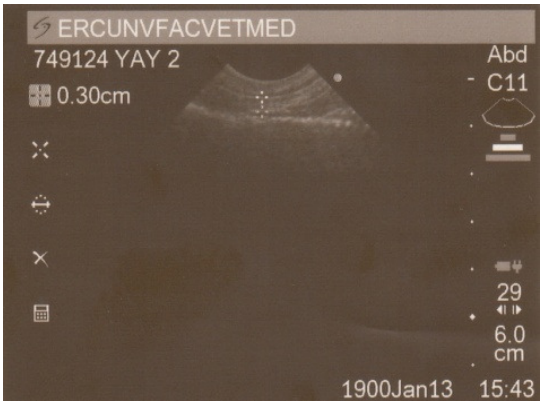
3.2.10. Ultrasonografik Muayene

Ultrasonografik muayeneler Schimatzu 350-A model ultrasonografi cihazında 5 MHz' lik konveks transduser kullanılarak yapıldı. 7. interkostal aralıktan son kostanın bir el ayası gerisi arasında kalan saha jilet ile tıraş edilip, alkol ile derinin yağı uzaklaştırıldıktan sonra, transmisyon jeli sürülerek 11 ve 12. interkostal aralıkta karaciğerin ultrasonografik muayenesi gerçekleştirildi. Ultrasonografik muayenede karaciğerin yapısı, portal ve hepatik venleri, diyaframatik ve visseral yüzeyleri yağlanma yönünden incelendi.

Ayrıca bu çalışmada, koyunların sırt bölgesindeki yağlanmayı belirlemek amacı ile çalışmadan önce (0.saat) ve çalışmadan sonra (120. Saat) 12.-13. torakal vertebralar arasındaki bölge tıraş edilip ultrasonografi aracılığı ile sırt yağı kalınlıkları ölçümü yapıldı.



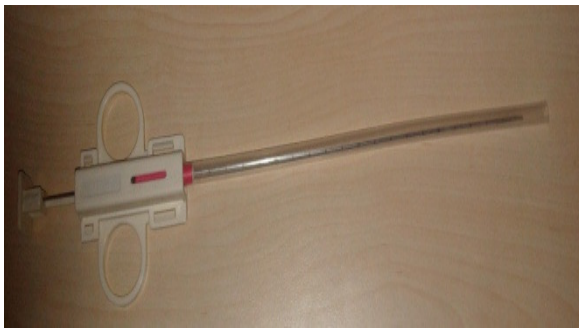
Şekil 3.13. Koyunların sırt bölgesindeki yağlanmanın ultrasonografi ile ölçülmesi



Şekil 3.14. Koyunların sırt bölgesindeki yağlanmanın ultrasonografik görüntüsü

3.2.11. Biyopsi Örneğinin Alınması

Karaciğerdeki yağlanmanın dercesini belirlemek amacı ile koyunların karaciğerinden biyopsi örnekleri alındı. Bu amaçla, 14G (Egemen International®, Türkiye) biyopsi iğnesi kullanıldı. Biyopsi 11. interkostal aralıktan gerçekleştirildi. Hayvanlardan biyopsi örnekleri, phlorizin uygulamasından 24 saat önce ve çalışma bitiminden 24 saat sonra (phlorizin uygulamasından sonraki 144. saatte) alındı. Biyopsi bölgesi traş edilip alkol ve betadin ile dezenfekte edildi. Hayvanlara biyopsi yapılmadan önce analjezi sağlamak amacı ile kas içi yolla 50 mg dozunda acepromazin ve derialtı yolla %2'lik lidokain'den 4 ml uygulandı. Steril bir bistüri ile biyopsi bölgesine ince bir kesit atıldı ve ultrason eşliğinde karaciğer biyopsisi yapıldı.



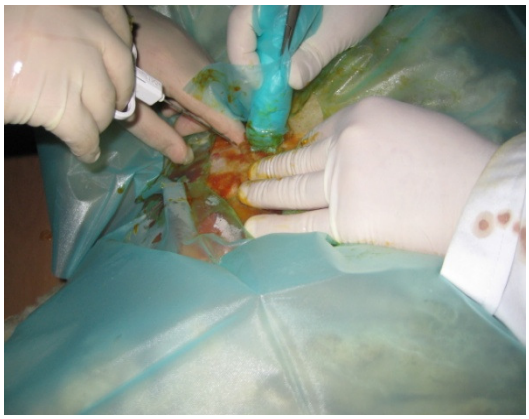
Şekil 3.15. Biyopsi İğnesi



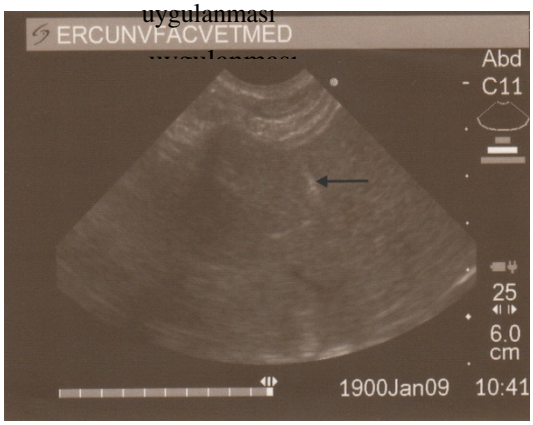
Şekil 3.16. Koyunlarda biyopsi alma işlemi öncesi karaciğerin ultrasonografik muayenesi



Şekil 3.17. Koyunlarda karaciğerden biyopsi alma işleminden önce bölgeye lokal anastezi uygulanması



Şekil 3.18. Koyunlarda karaciğerden biyopsi alınması



Şekil 3.19. Koyunlarda karaciğerden biyopsi alınması sırasında ultrasonografik görüntü. (Ok işareti= Biyopsi İğnesi)

3.2.12. Histopatolojik Analizler

Çalışmada kullanılan koyunlardan alınan karaciğer biyopsi örnekleri Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji anabilim dalında %4'lük nötralformalin solüsyonunda yarım saat ya da 1 saat bekletilerek tespit edildi. Dokullar rutin yöntemle takip edildikten sonra 3-5 µm kalınlığında kesitler alınarak ve hematoksilen-eozin (HE) ile boyanarak ışık mikroskobunda HxE., x200 büyütmede histopatolojik yönden incelendi

3.2.13. İstatistik Analizler

Veriler IBM SPSS Statistics 20 ve SigmaStat 3.5 istatistik paket programları ile değerlendirildi. Verilerin özet gösterimi ortalama ± standart sapma (ya da medyan, %25 ve %75 persentil) değerler olarak verildi. Farkların (verilerin) normalliğine Shapiro-Wilk testi ile bakıldı. İki ölçüm karşılaştırmalarında veriler normal dağılıyorsa bağımlı örnek t testi, veriler normal dağılmıyorsa Wilcoxon testi kullanıldı. İkiden fazla ölçümlerin bulunduğu karşılaştırmalarda veriler normal dağılıyorsa Tek Yönlü Tekrarlı Varyans Analizi, veriler normal dağılmıyorsa Friedman Analizi kullanıldı. Çoklu karşılaştırma testleri olarak parametrik ve parametrik olmayan Student-Newman-Keuls testleri kullanıldı. İstatistiksel olarak $p<0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. PHLORİZİN UYGULAMA SONRASINDA KLİNİK MUAYENE BULGULARI

Bu çalışmada kullanılan hayvanların phlorizin enjeksiyonundan sonra (120. saatte) yapılan klinik muayenesinde (genel görünümü, hayvanlarda vücudun tutuluşu, kıl örtüsünün, lenf yumrularının, mukozaların muayenesinde ve ayrıca iştahlarında) herhangi bir değişikliğe rastlanmadı.

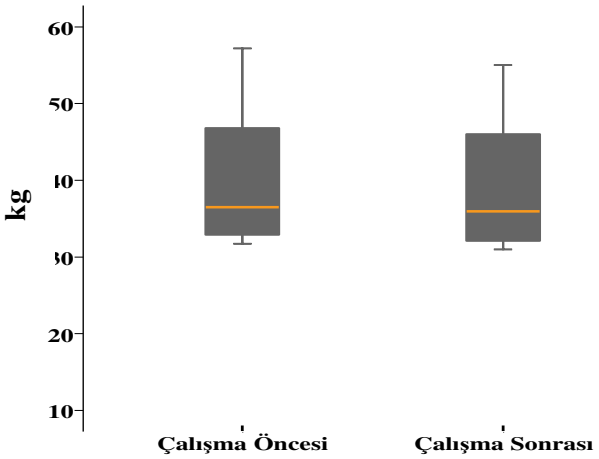
4.2. PHLORİZİNİN CANLI AĞIRLIK ÜZERİNE ETKİSİ

Bu çalışmada, koyunların phlorizin uygulandıktan 120 saat sonraki canlı ağırlıklarında, phlorizin uygulamadan öncesine (0. saat) göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü (p=0.015, Tablo 4.1, Şekil 4.1).

Tablo 4.1. Koyunlarda (*n*=10) ortalama canlı ağırlık değişimleri

Parametre	**Phlorizin uygulamasından önce (0. saat)** $\bar{X} \pm SS$	**Phlorizin uygulamasından sonra (120. saat)** $\bar{X} \pm SS$
Canlı ağırlık (kg)	40.15±8.59[a]	39.09±8.53[b]

[a, b]: Her iki sütun arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir (p=0.015).



Şekil 4.1. Phorizin uygulama öncesi (0. saat) ve sonrasında (120. saat) canlı ağırlık değişimleri

4.3. HEMATALOJİK ANALİZ SONUÇLARI

Bu çalışmada, koyunlardan phlorizin uygulamadan önce (0. saat) ve uygulandıktan sonra 12, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinin, kan sayım cihazında (Mindray BC-2800 Vet, Chiene) ölçülmesi ile elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; Ortalama WBC değerlerindeki 0.-96., 0.-120., 12.-96., 12.-120., 24.-96., 24.-120., 48.-96., 48.-120., 72.-96., 72.-120., saatler arasındaki azalma istatistiksel olarak önemli idi ($p<0.05$, Tablo 4.2). Ortalama RBC değerlerindeki değişikliklerin istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlendi (Tablo 4.2). Ortalama HGB değerlerinde 0. saate göre 12. saatte artış, 12.-48., 12.-96., 12.-120., 24.-48., 24.-72., 24.-96., 24.-120. saatler arasında azalmalar gözlemlendi. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde bu farklılıkların önemli olduğu tespit edildi ($p<0.001$, Tablo 4.2). Ortalama HCT değerleri için sadece 12.-48. saatler arasındaki azalma istatistiksel olarak önemli bulundu ($p=0.02$, Tablo 4.2). Ortalama MCV değerleri incelendiğinde, phlorizin uygulamasından öncesine göre 12. saatte MCV değerinin arttığı belirlenirken, 12.-24., 12.-48., 12.-72., 12.-96., 12.-120. saatler arasında ise azalma gözlemlendi. MCV değerlerindeki bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa sahip idi ($p=0.003$, Tablo 4.2). Phlorizin uygulanmasından sonra ortalama MCH düzeyi 48, 72, 96 ve 120. saatlerde azaldı. Aynı zamanda phlorizin uygulandıktan sonra 12.-48., 12.-72., 12.-96., 12.,120., 24.-48., 24.-72., 24.-96., 24.-120. saatler arasında da anlamlı bir azalma belirlendi ($p<0.001$, Tablo 4.2). Ortalama MCHC değerlerinde 0. saate göre, 12. saatte artış, 12.-48., 12.-72., 12.-96., 12.-120., 24.-72., 24.-120. saatler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0.05$, Tablo 4.2). Ortalama RDW değerleri arasındaki değişiklikler istatistiksel yönden önemsiz olarak belirlendi (Tablo 4.2). Ortalama PLT değerleri incelendiğinde, 0.-120., 12.-120.,24.-120., 48.-120., 72.-120., 96.-120. saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p=0.016$, Tablo 4.2). Ortalama MPV değerlerinde, 0.-12., 0.-24., 0.-72. arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma belirlenirken, 12.-48., 12.-96. saatler arasında istatistiksel olarak önemli bir artış vardı ($p=0.015$, Tablo 4.2). Ortalama PDW (Tablo 4.2) ve ortalama PCT (Tablo 4.2) düzeyleri değerlendirildiğinde herhangi bir istatistiksel fark tespit edilmedi (Tablo 4.2).

4.4. İDRAR ANALİZİ SONUÇLARI

Tablo 4.2. Çalışmada kullanılan hayvanlara (n= 10) ait hematoloji değerleri

Parametreler	**0.saat** $\bar{X} \pm SS$	**12.saat** $\bar{X} \pm SS$	**24.saat** $\bar{X} \pm SS$	**48.saat**	**72.saat** $\bar{X} \pm SS$	**96.saat** $\bar{X} \pm SS$	**120.saat** $\bar{X} \pm SS$	**P Değeri**
WBC (x10^9/L)	12.7±2.4^{a}	12.85±4.2^{a}	11.31±3.4^{a}	12.11±3.4^{a}	13.01±2.9^{a}	10.6±2.9^{b}	10.7±3.2^{b}	p<0.05
RBC (x10^12/L)	9.04±1.2	9.39±1.3	9.059±1.1	8.767±1.4	9.212±1.0	9.0±1.2	9.0±1.8	p>0.05
HGB (g/dL)	9.81±1.0^{bc}	10.31±1.1^{ad}	9.99±0.9^{ab}	9.45±0.8^{ce}	9.47±0.8^{cd}	9.3±0.8^{ce}	9.4±0.8^{c}	p<0.05
HCT (%)	27.78±3.3^{ac}	28.83±3.3^{a}	27.83±3.5^{ac}	27.05±4.3^{bc}	28.26±2.9^{ac}	27.7±3.6^{ac}	28.5±3.5^{ac}	p<0.05
MCV (fL)	30.92±2.5^{b}	31.23±2.5^{a}	30.84±2.5^{b}	30.98±2.6^{b}	30.85±2.5^{b}	30.8±2.5^{b}	30.8±2.4^{b}	p<0.05
MCH (pg)	10.86±0.6^{a}	11.1±0.4^{a}	11.02±0.5^{a}	10.43±0.4^{b}	10.28±0.5^{b}	10.4±0.6^{b}	10.5±0.6^{b}	p<0.05
MCHC (g/dL)	35.44±2.7^{bcf}	36.87±2.2^{a}	36.18±2.5^{abc}	35.2±2.4^{bcdf}	34.5±2.4^{def}	34.7±2.3^{bcdf}	34.3±2.2^{fg}	p<0.05
RDW (%)	15.78±0.7	15.68±0.8	16± 1.0	15.72±0.8	16.07±0.9	16.0±0.8	16.1±0.8	p>0.05
PLT (x10^9/L)	279.8±129.9^{a}	271.9±101.0^{a}	368.6±199.1^{a}	305.7±117.0^{a}	329.3±146.5^{a}	431.0±239.2^{a}	457.4±201.5^{b}	p<0.05
MPV (fL)	4.06±0.2^{a}	3.77±0.3^{cd}	3.87±0.3^{bc}	4±0.2^{ab}	3.89±0.2^{bc}	4.0±0.2^{ab}	3.9±0.3^{ac}	p<0.05
PDW (%)	15.79±0.5	15.82±0.5	14.87±3.3	15.85±0.5	15.69±0.3	15.9±0.5	15.6±0.7	p>0.05
PCT (%)	0.115± 0.1	0.1034±0.0	0.141±0.1	0.120±0.1	0.129±0.1	0.173±0.1	0.157±0.1	p>0.05

Çalışmada kullanılan koyunlardan 0, 12, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde idrar toplama kaplarına alınan idrar örneklerinin test stripleri ile muayenesinde lökosite rastlanmadı. İdrar analizi sonucunda idrar dansitesi, pH, glikoz ve keton cisimcikleri ile ilgili veriler Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'te gösterildi.

Tablo 4.3. İdrar Analiz Sonuçları

	Parametereler		
	Dansite $\overline{X} \pm SS$	**pH** $\overline{X} \pm SS$	**Protein** $\overline{X} \pm SS$
0.saat (*n=10*)	1007.0±4.2[a]	8.350±0.2	2.1±0.7[a]
12.saat (*n=10*)	1007.0±4.2[ac]	8.300±0.2	2.9±0.3[b]
24.saat (*n=9*)	1003.8±4.8[a]	8.333±0.2	2,6±1,1[b]
48.saat (*n=9*)	1007.2±3.6[ac]	8.222±0.2	1.9±1.0[a]
72.saat (*n=10*)	1009.0±4.5[ac]	8.150±0.2	1.4±1.3[a]
96.saat (*n=10*)	1005.0±4.7[ac]	8.200±03	1.4±1.5[a]
120.saat (*n=10*)	1010±4.9[bc]	8.100±0.7	1.5±1.4[a]

[a,b,c]: Her iki satır arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p<0.005$), *n*= hayvan sayısı

Bu çalışmada phlorizin uygulamadan önce (0. saat) ve uygulandıktan sonra 12, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerdeki idrar analiz sonuçları değerlendirildiğinde; dansite değerleri için, sadece 24.-120. saatler arasında istatistiksel olarak önemli bir artış görüldü ($p=0.019$, Tablo 4.3). pH değerlerinde ise phlorizin uygulamasından önce ve sonra yapılan ölçümler arasında istatistiksel bir fark bulunmadı (Tablo 4.3). İdrar protein oranı 0.-12., 0.-24. saatleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artma 12.-48., 12.-72., 12.-96., 12.-120., 24.-48., 24.-72., 24.-96., 24.-120. saatler arasındaki ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlendi ($p<0.05$, Tablo 4.3).

Çalışma sonucunda, idrar glikoz miktarında 0.-24., 0.-48., 0.-72., 0.-96., 0.-120., 12.-24., 12.-48., 12.-72., 12.-96., 12.-120. saatlerde yapılan ölçümlerde belirlenen artış istatistiksel olarak önemli idi ($p<0.001$, Tablo 4.4.). İdrar keton oranları için phlorizin uygulamasından önce ve sonra yapılan ölçümler arasında istatistiksel bir fark bulunmadı (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. İdrar glikoz değerleri

	Parametre					
	Glikoz		***n***	**Keton**		***n***
	Negatif (-)	Pozitif (+)		Negatif (-)	Pozitif (+)	
0.saat	10	0[a]	10	10	0	10
12.saat	8	2 [a]	10	10	0	10
24.saat	2	7[b]	9	6	3	9
48.saat	3	6[b]	9	9	0	9
72.saat	1	9[b]	10	9	1	10
96.saat	1	9[b]	10	9	1	10
120.saat	1	9 [b]	10	8	2	10
Total	26	42	68	61	7	68

[a,b,]: Her iki satır arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p<0.001$), *n*= hayvan sayısı

4.5. BİYOKİMYASAL ANALİZ SONUÇLARI

Bu çalışmada koyunlardan, phlorizin enjeksiyonundan önce (0. saat) ve enjeksiyondan sonra 12, 24, 48, 72, ve 120. saatlerde alınan serum örneklerine uygulanan ölçümler sonucunda elde edilen biyokimyasal parametreler Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

Çalışmada koyunlara phlorizin uygulanması sonucunda elde edilen biyokimyasal test sonuçları değerlendirildiğinde; 0.-12., 0.-24., 0.-48., 0.-72. ve 0.-120. saatler arasında serum ortalama glikoz

Tablo 4.5. Çalışmada kullanılan hayvanlara (n= 10) ait biyokimyasal değerler

Parametreler	0.Saat $\bar{X} \pm SS$	12.Saat $\bar{X} \pm SS$	24.Saat $\bar{X} \pm SS$	48.Saat $\bar{X} \pm SS$	72.Saat $\bar{X} \pm SS$	120.Saat $\bar{X} \pm SS$	P değeri
İnsülin (µIU/mL)	12.23±10.28^{a}	11.01±3.10^{a}	8.09±5.97^{b}	5.89±4.87^{c}	5.41±3.04^{c}	4.27±3.17^{c}	p<0.05
Glikoz (mg/dl)	60.1±11.52^{a}	51.3±9.37^{b}	51.1±3.28^{b}	51.9±5.40^{b}	56.1±5.65^{b}	52±5.06^{b}	p<0.05
Trigliserit (mg/dl)	28.4±13.94^{a}	23.6±9.99	26.3±11.40	21.6±7.09	20.7±5.48	17.9±5.26^{b}	p<0.05
Kolesterol (mg/dl)	63.7±11.05	63.8±11.03	64±12.53	63.4±12.92	62.9±12.11	67.1±13.87	p>0.05
HDL (mg/dl)	33.2±4.89	34.7±5.64	34.5±6.62	33.4±5.82	34.3±6.04	36.1±6.51	p>0.05
LDL (mg/dl)	24.818±8.12	24.378±7.84	24.238±7.69	25.675±8.70	24.458±7.29	27.416±7.86	p>0.05
BUN (mg/dl)	17.8±3.97^{a}	11.5±3.37^{b}	15.3±2.98^{a}	17.6±2.84^{ac}	16.1±2.96^{a}	19.6±4.17^{cd}	p<0.05
Kreatinin (mg/dl)	0.67±0.08^{ac}	0.62±0.09^{b}	0.68±0.08^{ac}	0.66±0.10^{a}	0.67±0.07^{ac}	0.7±0.07^{c}	P<0.05
Amilaz (U/L)	12.8±11.42	12.8±11.05	13±9.79	12.2±8.60	13.5±10.05	14.9±13.81	p>0.05
Lipaz (U/L)	20±4.16^{e}	22.5±5.13^{c}	24±6.18^{b}	22.2±6.43^{d}	27.2±6.56^{a}	21.5±7.98^{de}	p<0.05
GGT (U/L)	51.6±8.81^{a}	51.2±8.31^{a}	52±7.92^{a}	52.3±8.76^{a}	54.6±9.67^{a}	58.1±11.63^{b}	p<0.05
LDH (U/L)	714.9±305.51^{b}	733.5±235.74^{a}	642.5±182.64^{c}	622.1±159.88^{c}	670.3±252.92^{c}	588.8±91.81^{c}	p<0.05
AST (U/L)	150.1±60.64	153.6±65.24	145.8±60.04	136.5±52.08	153.8±70.14	138.2±54.73	p>0.05
ALT (U/L)	27.1±10.84	27.9±12.35	27.6±12.37	26.2±10.51	28.6±12.39	26.3±10.90	p>0.05
ALP (U/L)	128.2±43.98^{a}	124.1±36.99^{ac}	122.4±36.25^{ace}	107±28.60^{bce}	109.6±26.57^{bce}	104.3±23.41^{de}	p<0.05
T.Protein (g/dl)	7.02±0.37	6.9±0.63	6.93±0.43	6.73±0.63	6.99±0.61	7.24±0.53	p>0.05
Albumin (g/dl)	1.37±0.18	1.36±0.19	1.36±0.19	1.31±0.16	1.33±0.16	1.32±0.19	p>0.05

^{a,b,c,d,e}: Her iki sütun arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.

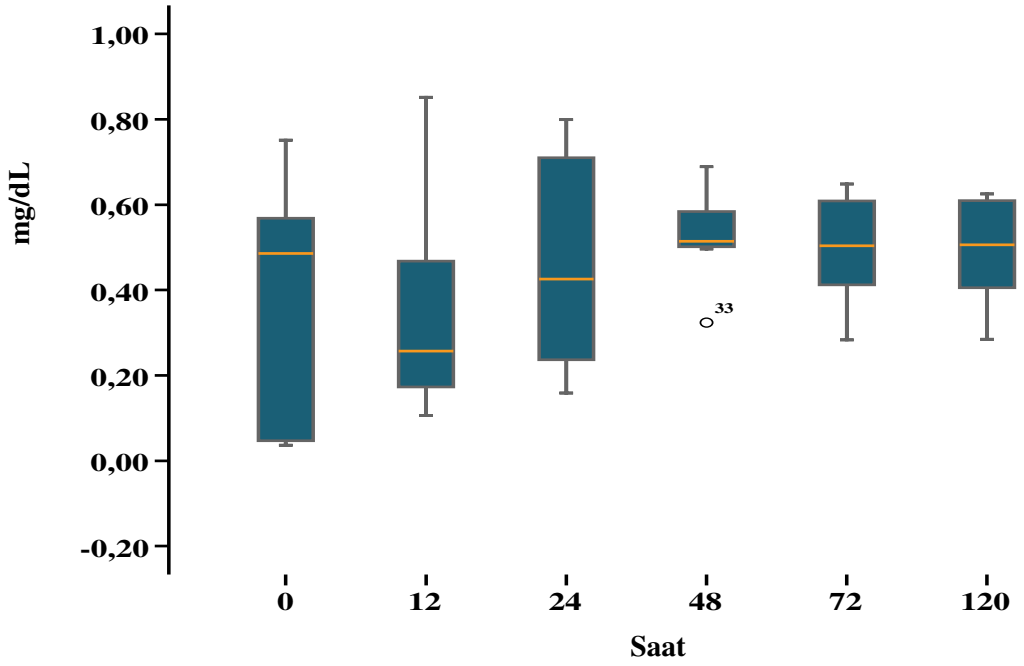
düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlendi (p=0.031, Tablo 4.5). Trigliserit düzeyleri incelendiğinde phlorizin uygulamadan önceye göre uygulama sonrasında ortalama serum trigliserit değerlerinde azalma görüldü. Ancak sadece 0.-120. saatler arasındaki azalma istatistiksel olarak önemli idi (p=0.046, Tablo 4.5). Ortalama kolestrol, HDL, LDL, amilaz, AST, ALT, total protein ve albümin değerleri arasındaki farklılıkların istatistiksel açıdan önemsiz olduğu belirlendi (Tablo 4.5). Ortalama BUN seviyesi, 0.-12. saatler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma görülürken, 12.-24., 12.-48., 12.-72., 12.-120., 24.-120., 72.-120. saatler arasında anlamlı bir artış görüldü ($p<0.05$, Tablo 4.5). Ortalama kreatinin düzeyleri, phlorizin uygulaması öncesine göre uygulamadan sonraki 12. saatte istatistiksel açıdan önemli bir şekilde azama, 12.-24., 12.-48.,12.-72.,12.-120.,48.-120. saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi (p=0.002, Tablo 4.5). Ortalama lipaz değerlerinde 0. saate göre phlorizin uygulandıktan sonra 12, 24, 48 ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. Yine 12.-24., 12.-72., 24.-72., 48.-72. saatlerde ki artışlarda istatistiksel olarak önemli idi. 12.-48, 12.-120., 24.-48., 24.-120. ve 72.-120. saatler arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma kaydedildi ($p<0.001$, Tablo 4.5). Ortalama GGT düzeyleri incelendiğinde, 0.-120., 12.-120., 24.-120., 48.-120., 72.-120. saatler arasındaki ortalama serum GGT seviyelerinde artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$, Tablo 4.5). Ortalama LDH düzeyleri 12. saatte 0. saate göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış, 24, 48, 72 ve 120. saatlerde istatistiksel olarak önemli bir azalma belirlendi (p=0.05, Tablo 4.5). Phlorizin uygulandıktan sonra 12.-24, 12.-48., 12.-72. ve 12.-120. saatlerde ortalama serum LDH düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi (p=0.05, Tablo 4.5). Ortalama ALP düzeylerinde ise 48, 72 ve 120. saatlerde 0. saate göre istatistiksel olarak önemli bir azalma görüldü ($p<0.05$, Tablo 4.5). Ortalama insülin değerleri incelendiğinde, 0.-24., 0.-48., 0.-72., 0.-120., 24.-48., 24.-72., 24.-120. saatlerde istatistiksel olarak önemli bir düşme gözlemlendi ($p<0.05$, Tablo 4.5).

Ortalama AcAc düzeyleri arasındaki artış istatistiksel olarak önemsiz (Tablo 4.6.) bulundu. Ancak ortalama BHB konsantrasyonlarında, 0. saat ile kıyaslandığında 12. saatte istatistiksel olarak önemsiz bir artış gösterirken, 0.-72., 0.-120., 12.-72., 12.-120, 24.-72., 24.-120. saatler arasındaki istatistiksel yönden anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0.05$, Tablo 4.6.). Ortalama NEFA düzeyleri ise 0. saate göre 12, 24, 48, 72 ve 120. saatlerde, ayrıca phlorizin uygulamasını takiben 12.-48., 12.-72., 12.-120., 24.-48., 24.-72., 24.-120., 48.-120 ve 72.-120. saatler arasında istatistiksel açıdan önemli bir artış belirlendi ($p<0.05$, Tablo 4.6.).

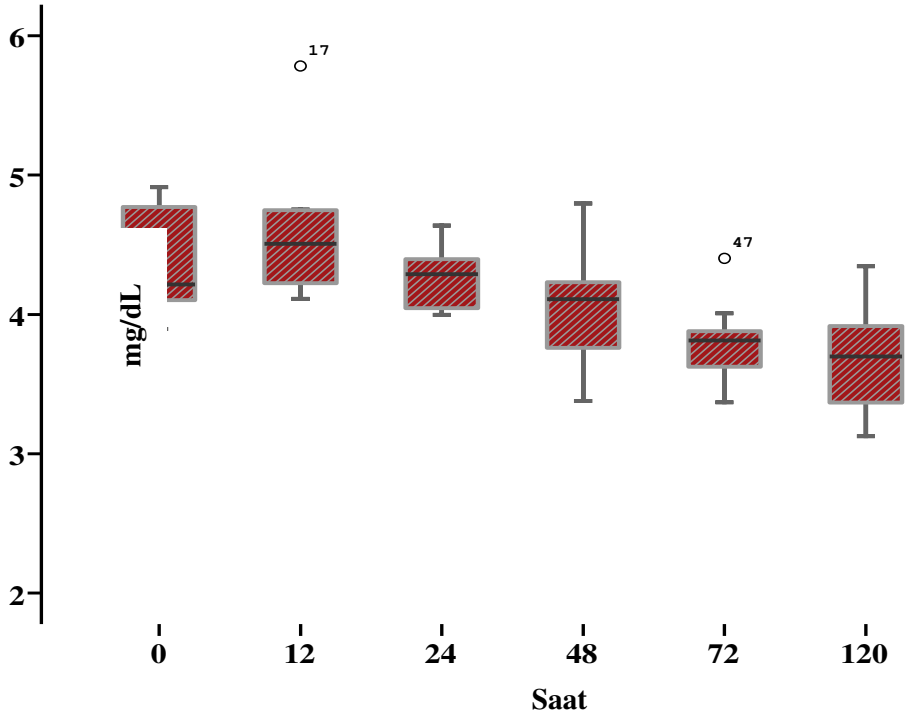
Tablo 4.6. Çalışmada kullanılan koyunların (*n*=10) ortalama BHB, NEFA ve AcAc seviyeleri

Parametreler	0.Saat $\bar{X} \pm SS$	12.Saat $\bar{X} \pm SS$	24.Saat $\bar{X} \pm SS$	48.Saat $\bar{X} \pm SS$	72.Saat $\bar{X} \pm SS$	120.Saat $\bar{X} \pm SS$
AcAc mg/dL	0.38±0.30	0.39±0.27	0.47±0.25	0.53±0.10	0.50±0.12	0.50±0.11
BHB mg/dL	4.39±0.41[a]	4.62±0.53[a]	4.25±0.22[a]	3.96±0.33[ac]	3.89±0.24[bc]	3.60±0.37[bc]
NEFA mg/dL	3.90±2.50[d]	4.98±1.89[c]	4.40±2.16[c]	6.60±2.21[b]	6.44±1.07[b]	7.17±1.81[a]

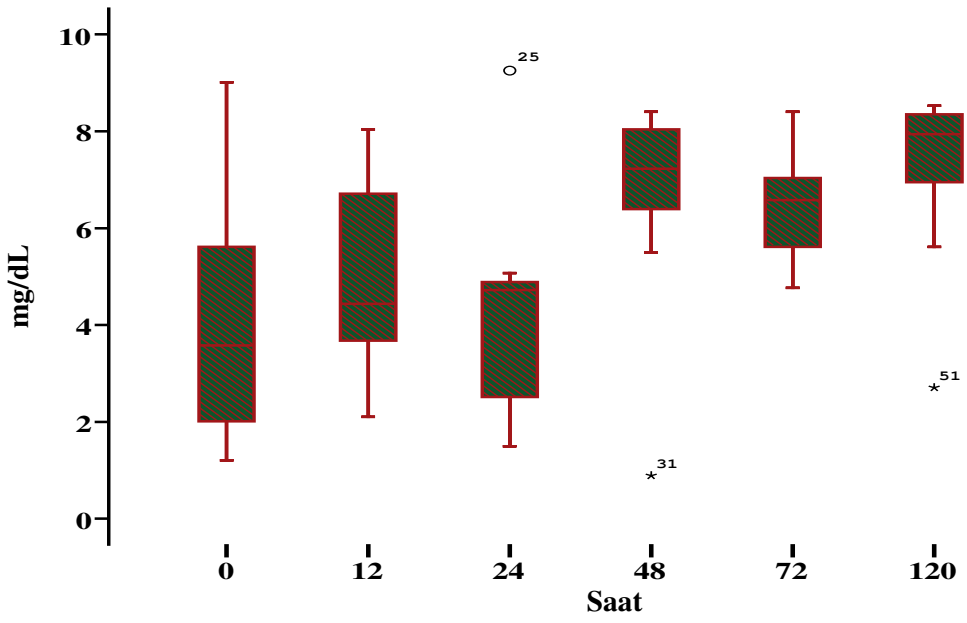
[a,b,c]: Her iki sütun arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.



Şekil 4.2. Phlorizin uygulama öncesi ve sonrasında serum AcAc düzeylerindeki değişimler



Şekil 4.3. Phlorizin uygulama öncesi ve sonrasında serum BHB düzeylerindeki değişimler



Şekil 4.4. Phorizin uygulama öncesi ve sonrasında serum NEFA düzeylerindeki değişimler

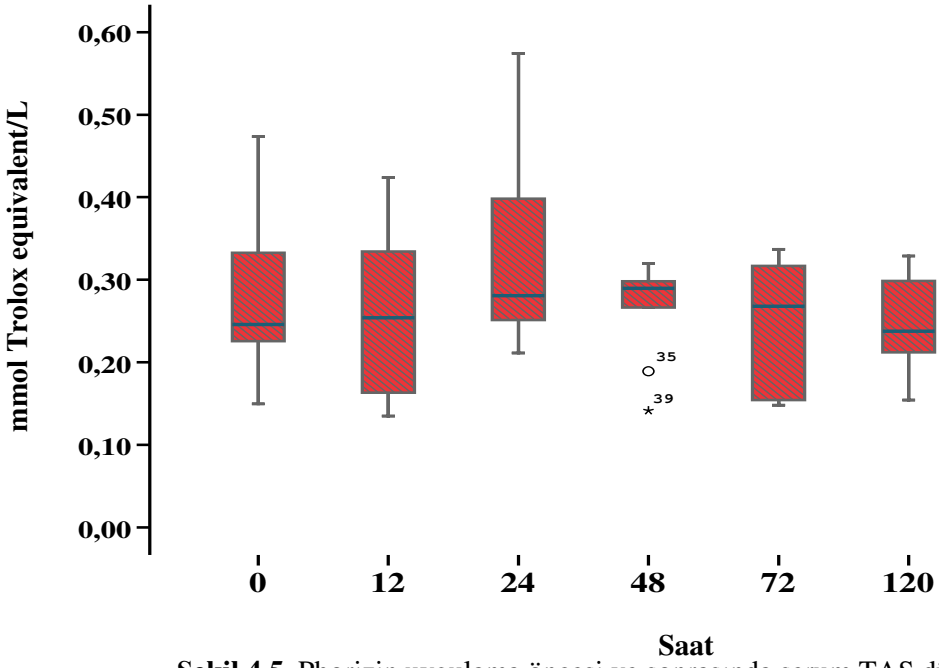
4.6. OKSİDATİF STRESS PARAMETRELERİ ANALİZ SONUÇLARI

Çalışmada koyunlara phlorizin uygulanması sonucunda elde edilen oksidatif stress parametrelerinden ortalama TAS düzeyleri arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemsiz olduğu tespit edilirken, ortalama TOS değerlerinde 0.-12., 0.-24., 0.-48., 0.-72., 0.-120., 24.-72., 24.-120. saatler arasında azalma ($p<0.05$) belirlendi (Tablo 4.7). Phlorizin uygulamasını takiben ortalama TOS değerlerinde 12. saate göre; 24. saatte artış ($p<0.05$), 48, 72 ve 120. saatlerde azalma belirlendi ($p<0.05$). Ortalama OSI değerlerinin phlorizin uygulanmadan önce ile kıyaslandığında phlorizin uygulaması sonrasındaki tüm saatlerde azaldığı belirlendi. OSI değeri için 12.-24. saatler arasındaki azalma istatistiksel olarak önemsiz iken, diğer saatler arasındaki azalmanın önemli olduğu belirlendi ($p<0.05$, Tablo 4.7).

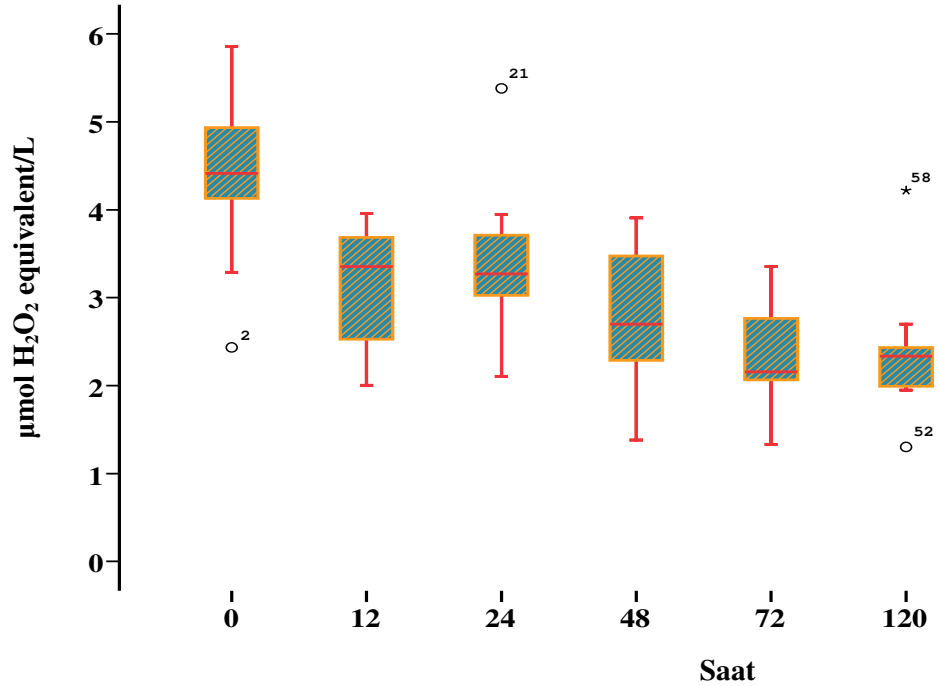
Tablo 4.7. Çalışmada kullanılan koyunların (*n*=10) ortalama oksidatif stres parametreleri

	Parametereler		
	TOS (μmol H_2O_2 equivalent/L) $\overline{X} \pm SS$	**TAS** (mmol Trolox equivalent/L) $\overline{X} \pm SS$	**OSI** (%) $\overline{X} \pm SS$
0.saat	4.38±0.99[a]	0.27±0.10	17.46±6.21[a]
12.saat	2.81±1.20[c]	0.26±0.10	11.26±5.09[b]
24.saat	3.45±0.84[b]	0.33±0.12	11.11±2.90[b]
48.saat	2.79±0.82[c]	0.27±0.06	10.56±2.81[c]
72.saat	2.33±0.65[d]	0.25±0.08	9.89±3.15[d]
120.saat	2.37±0.75[d]	0.25±0.06	9.72±3.14[e]

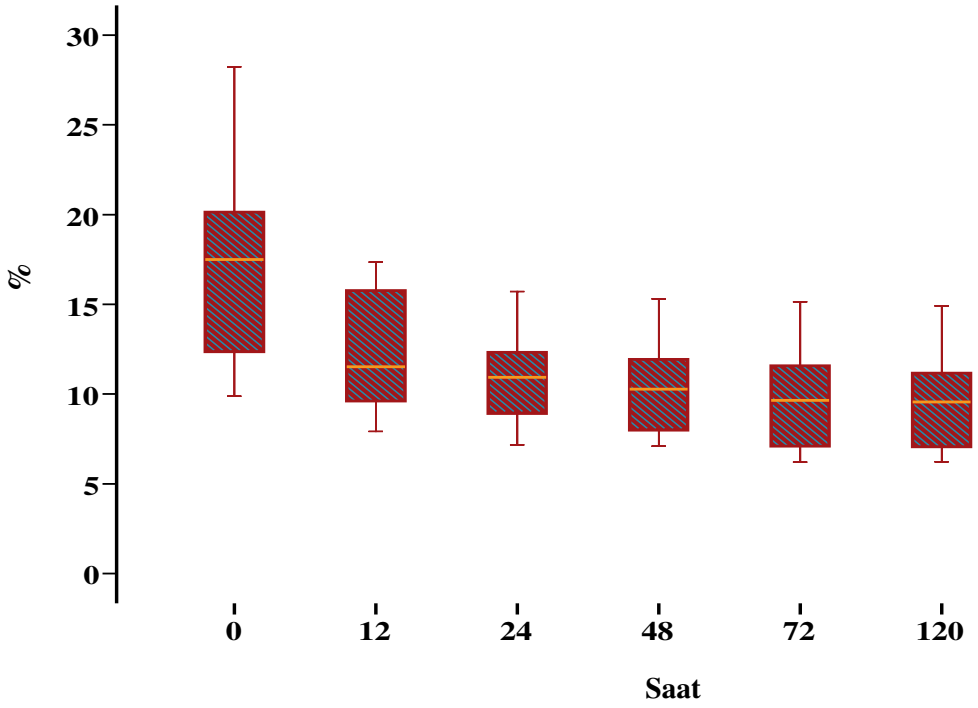
[a,b,c,d,e]: Her iki satır arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p<0,05$).



Şekil 4.5. Phorizin uygulama öncesi ve sonrasında serum TAS düzeylerindeki değişimler



Şekil 4.6. Phorizin uygulama öncesi ve sonrasında serum TOS düzeylerindeki değişimler



Şekil 4.7. Phorizin uygulama öncesi ve sonrasında serum OSI düzeylerindeki değişimler

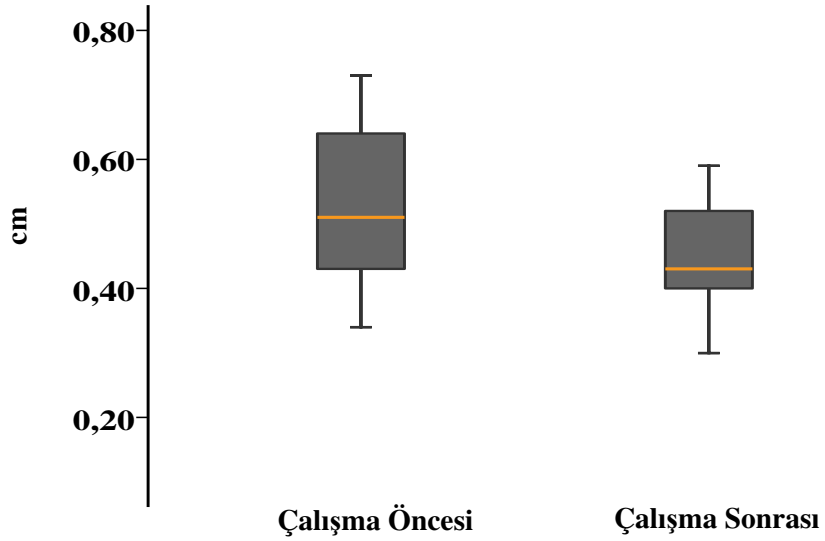
4.8. ULTRASONOGRAFİK MUAYENE BULGULARI

Çalışmada koyunların sırt bölgesindesi yağlanmayı belirlemek amacı ile 12.-13. torakal vertebralar arasındaki bölge üzerinden 0 ve 120. saatlerde ultrasonografi ile vücut yağı ölçümü yapıldı. Ultrasonografi sonucunda, phlorizin uygulaması sonrasındaki 120. saatte koyunların sırt bölgesindeki yağ kalınlığında phlorizin uygulamadan öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü (p=0.008, Tablo 4.8., Şekil 4.5).

Tablo 4.8. Çalışmada kullanılan koyunların (*n*=10) ortalama sırt yağ kalınlıkları

Parametre	**Phlorizin uygulamasından önce (0. saat)** $\overline{X} \pm SS$	**Phlorizin uygulamasından sonra (120. saat)** $\overline{X} \pm SS$
Sırt Yağı Kalınlığı (cm)	0.524±0.12[a]	0.44±0.09[b]

[a, b]: Her iki sütun arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir (p=0.008).

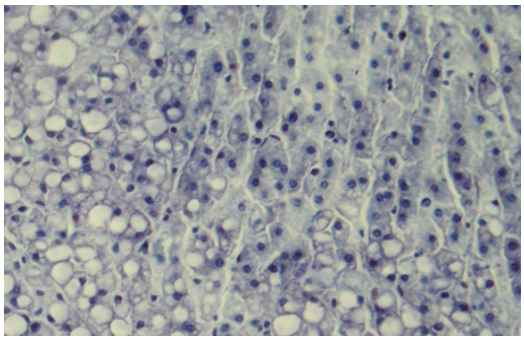


Şekil 4.8. Phlorizin uygulamasından önceki (0. saat) ve sonraki (120. saat) ortalama sırt yağı kalınlıkları

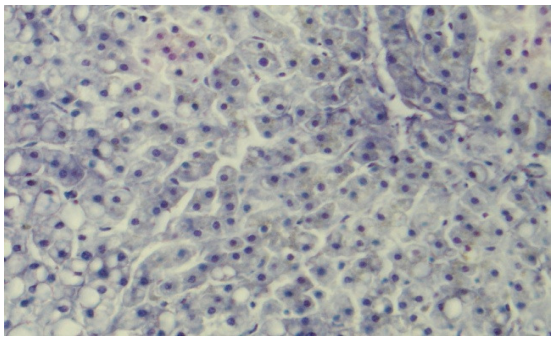
4.9. HİSTOPATOLOJİK ANALİZ SONUÇLARI

Çalışmada, phlorizinin karaciğer üzerindeki etkisini belirlemek için, çalışmadan 24 saat önce ve çalışma sonuçlandıktan 24 saat sonrasında (144. saat) iki adet besi performansı iyi koyundan biyopsi örnekleri alındı. Biyopsi sonrası histopatolojik inceleme sonucunda; iki hayvanda da pholorizin uygulama öncesinde karaciğer epitelyum hücrelerinin birçoğunun stoplazmasında büyüklükleri farklı, elipsten yuvarlağa kadar değişen, keskin kenarlı yağ vakuollerine rastlandı. Ayrıca Kupfer hücrelerinin sayıca fazla olması dikkat çekti (Şekil 4.6, Şekil 4.8).

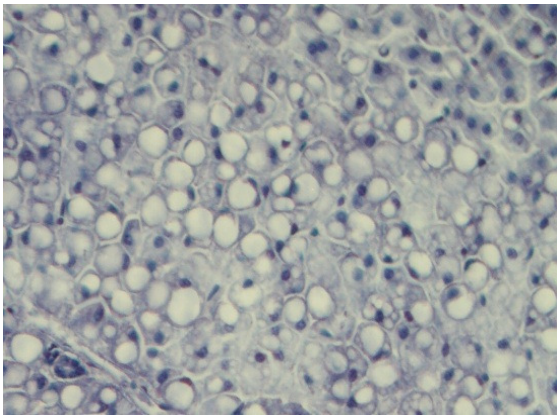
Phlorizin uygulandıktan sonra (144. saat) ise iki hayvanda da çok dikkat çekici şekilde olmasa da fokal alanlar tarzında hepatositlerin stoplazmalarındaki yağ vakuollerinin sayısında azalma görüldü. Kupfer hücrelerinin görünümü çalışma öncesine benzer şekilde tespit edildi (Şekil 4.7, Şekil 4.9).



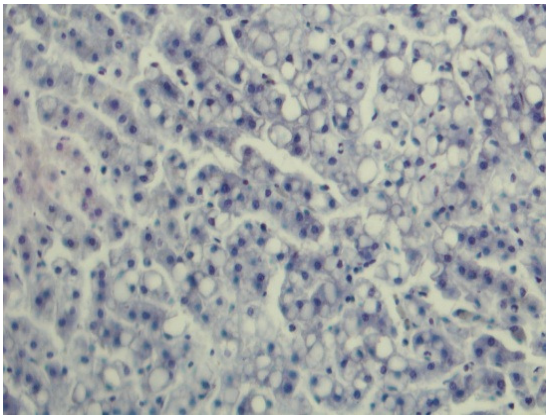
Şekil.4.9. Phlorizin uygulamasından önce 1 numaralı hayvanın karaciğerinin histopatolojik görünümü (HxE., x200)



Şekil.4.10. Phlorizin uygulamasından sonra (144. saat) 1 numaralı hayvanın karaciğerinin histopatolojik görünümü (HxE., x200)



Şekil.4.11. Phlorizin uygulamasından önce 2 numaralı hayvanın karaciğerinin histopatolojik görünümü (HxE., x200)



Şekil.4.12. Phlorizin uygulamasından sonra (144. saat) 2 numaralı hayvanın karaciğerinin histopatolojik görünümü (HxE., x200)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Phlorizin sığırlarda (5) ve koyunlarda (6) renal glikoz reabsorbsiyonunu ve ratlarda intestinal absorbsiyonu engellemek için kullanılmaktadır (7,8). Lyle ve ark. (48) tarafından düvelerde 1.3 butanediol ve phlorizin ile meydana getirilen ketoziste, bu kimyasal maddelerin; glikoz atılımını hızlandırdıkları, plazma glikoz konsantrasyonunu düşürdükleri, ketonemi ve ketonüri oluşturdukları, serbest yağ asiti konsantrasyonunu arttırdıkları, klinik belirtilere neden oldukları saptanmıştır. Aynı araştırmacılar, phlorizin enjeksiyonunun, glikozun kinetik metabolizmasını etkileyerek glikozüri ve ketonemiye neden olduğu, glikozun renal tubular reabsorbsiyonunun hem kompetatif hem de non kompetatif inhibisyonu sonucu glikozürinin şekillendiğini bildirmişlerdir (48).

Koyun ve keçilere phlorizin enjeksiyonundan sonra hiypoglisemi, glikozüri, ketonemi ve serbest yağ asiti miktarında artışların olduğu tespit edilmiştir (6,50,176). Aç bırakılan koyunlarda bu etkinin daha fazla ve kısa sürede oluştuğu bildirilmektedir (6). Serbest yağ asiti konsantrasyonundaki artışın nedeni, idrar yoluyla atılan glikozun, total kan şekeri düzeyinde yetersizliğe neden olması sonucu adipoz dokudaki yağların mobilizasyonuna bağlanmaktadır (6). Ketozis ve gebelik toksemisinde insülin hormonu seviyesinin düşmesi sonucunda serbest yağ asiti mobilizasyonunun hızlanabileceği de Lyle ve ark. (48) tarafından vurgulanmaktadır. Ülkemizde de koyunlara phlorizin verilerek deneysel ketozis oluşturulabileceğini belirten çeşitli yayınlar bulunmaktadır (9,10,176). Ketotik sığırlarda hipoinsülineminin hipoglisemi ile ilişkili olduğu, eksojen keton cisimlerinin köpeklerde insülin seviyesini arttırdığı, benzer bir ilişkinin ruminantlarda da olduğu bildirilmektedir (48).

Bu çalışmada, vücut kondüsyon skoru yüksek, ince kuyruklu, ortalama 1 yaşlı 10 adet koyundan phlorizin uygulamasından önceki (0. saat) ve sonraki 12, 24, 48, 72 ve 120. saatlerde kan örnekleri alınarak uygulamadan önceki ve sonraki serum lipit profili ve oksidatif stres parametrelerinin yanı sıra keton cisimlerinin ve diğer kimyasal parametrelerin (insülin, glikoz, albumin, üre, kreatinin, AST, ALT, ALP, GGT, LDH, TG, total protein, amilaz ve lipaz) düzeyleri ölçüldü. Ultrasonografi ile sırt yağı ölçümü gerçekleştirildi. Ayrıca karaciğerden biyopsi örnekleri alınarak histopatolojik olarak incelemeleri yapıldı ve böylece phlorizinin karaciğer hepatositleri üzerindeki etkisi incelendi.

Bu çalışmada, phlorizin uygulanması öncesine (0. saat) göre koyunların ortalama canlı ağırlıklarında, phlorizin uygulanması sonrasındaki 120. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlendi ($p<0.05$, Tablo 4.1). Bu çalışmaya paralel olarak Cai ve ark. (177) farelerde, Najafian ve ark.(178) ve Lu ve ark. (179) ratlarda yaptıkları çalışmalarda phlorizin

uygulamasından sonra vücut ağırlıklarında önemli derecede azalma tespit ettiklerini rapor etmişlerdir. Ayrıca Najafian ve ark. (178) phlorizinin gıda tüketimin azaltmasına neden olduğunu bildirmişlerdir.Bu çalışmada hayvanların iştahlarında herhangi bir değişiklik görülmedi. Canlı ağırlık kaybı phlorizinin plazma glikoz seviyesini düşürmesine bağlı olarak şekillenen hipoinsülinemi sonucunda adipoz dokudaki lipolizin artmasına bağlanabilir.

Çalışmada koyunlara phlorizin uygulanması ile hematolojik parametrelerin, referans değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişebileceği belirlendi. Ortalama WBC değerinde 0. saate göre 12, 48 ve 72. saatlerde hafif derecede sayısal artış gözlenirken, 96 ve 120. saatlerde istatistiksel olarak azalma gözlemlendi ($p<0.05$, Tablo 4.2). RBC'nin ortalama değerinin 12 ve 72. saatlerde artarken, 48, 96 ve 120. saatlerde azaldığı belirlendi. Bu değişiklikler istatistiksel olarak önemsiz idi ($p>0.05$, Tablo 4.2). Ortalama HGB değerinin ise 12 ve 24. saatlerde arttığı, diğer zaman aralıklarında azaldığı belirlendi ($p<0.05$, Tablo 4.2). Kan parametrelerinden HCT'nin yüzde olarak ortalama değeri 0. saat ile kıyaslandığında 12, 24, 72 ve 120. saatlerde artarken, 48. saatte azaldığı ve 96. saatte değişmediği tespit edildi ($p<0.05$, Tablo 4.2). MCV'nin ortalama değeri 12 ve 48. saatte artarken diğer saatlerde azaldı ($p<0.05$, Tablo 4.2). MCH ortalama değerinin 12 ve 24. saatte yükseldiği diğer zaman aralıklarında azaldığı belirlendi ($p<0.05$, Tablo 4.2). MCHC ortalama değerinin 12 ve 24. saatte başlangıç değerine göre arttığı, diğer zamanlarda da azaldığı kaydedildi ($p<0.05$, Tablo 4.2). RDW düzeyinin yüzde olarak ortalama değeri 12 ve 48. saatlerde azalırken diğer saatlerde arttığı gözlemlendi ($p>0.05$, Tablo 4.2). Koyunlara phlorizin uygulanmadan önce ortalama PLT değerinin 12. saatte azaldığı diğer saatlerde arttığı tespit edildi ($p<0.05$, Tablo 4.2). MPV'nin ortalama değerinde 0. saatte göre bütün zaman aralıklarında azalma görüldü ($p<0.05$, Tablo 4.2). PDW değeri 0. saate göre 12, 48 ve 96. saatlerde artarken diğer saatlerde azaldı ($p>0.05$, Tablo 4.2). Çalışmada ölçülen PCT değerlerinin ortalamasında 0. saatte göre 12. saatte azalma görülürken diğer saatlerde artış görüldü ($p>0.05$, Tablo 4.2). Aslan ve ark.(100)'nın 5 koyuna günde iki kez phlorizin uygulaması yaptıkları çalışmada, phlorizin uygulamasının 12. gününde total lökosit (WBC) sayısının yükseldiğini, hemoglobin miktarının hafif düştüğünü, total protein miktarı ve yüzde hemotokrik değerlerinde ise önemli bir değişiklik olmadığını belirtmişlerdir. Bu parametreler göz önünde bulundurulduğunda Aslan ve ark. (99)'nın çalışmasındaki hematolojik parametre bulguları bu çalışmadakiler ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca bazı hematolojik parametrelerdeki yükselme ve azalmaların normal fizyolojik sınırlar içerisinde kalması nedeniyle bu dalgalanmaların phlorizin uygulaması ile doğrudan bağlantılı olamayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmadaki koyunlara ait idrar analiz sonuçları değerlendirildiğinde ortalama idrar dansitelerinin phlorizin uygulanmadan öncesine (0. saat) göre uygulama sonrası 12 ve 48. saatlerde değişmezken, 24 ve 72. saatlerde azaldığı, 72 ve 120. saatlerde arttığı belirlendi

($p<0.05$, Tablo 4.3).

Koyunların ortalama idrar pH'ları değerlendirildiğinde 0.saate göre 12, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatler kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişimin olmadığı tespit edildi ($p>0.05$, Tablo 4.3).

Çalışmada kullanılan koyunların idrarlarındaki ortalama protein miktarlarının phlorizin uygulanmasından önceki ile kıyaslandığında 12 ve 24. saatlerde arttığı, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde azaldığı belirlendi ($p<0.05$, Tablo 4.3). Bu çalışma sonucuna benzer olarak Janssen ve ark.(180) obez ratlarda, Malatiali ve ark. (181) ve Osorio ve ark.(182) diabetik ratlarda yaptıkları deneysel çalışmalarda, phlorizin tedavisinin proteinüriye neden olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada phlorizin uygulamasından sonraki bütün saatlerde glikozüri görülmüştür ($p<0.05$, Tablo 4.4). Bu çalışmaya paralel olarak çeşitli hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda (5,10,17,11,176,181,183) phlorizinin glikozüri oluşturduğu bildirilmiştir. Glikozürinin nedeni diğer çalışmalara paralel olarak phlorizinin SGLT2'yi inhibe etmesi sonucunda (71) proksimal renal tubullerinden glikoz reabsorbsiyonunun engellenmesi olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada phlorizin uygulanmasından sonraki 72, 96 ve 120. saatlerde az miktarda ketonüri görülmüştür ($p>0.05$, Tablo 4.4). Başoğlu ve ark.(10) tarafından koyunlarda yapılan bir çalışmada deney grubundaki bütün hayvanların idrarında keton cisimcikleri belirlendiği bildirilmiştir. Bu çalışma sonucu idrarda keton cisimciklerinin çalışmada kullanılan hayvanların bazılarında görülmesi ve phlorizin uygulanmasını takiben ketonürinin görüldüğü saatler açısından Başoğlu ve ark. (10)'nın yaptığı çalışma ile farlılık göstermektedir. Başoğlu ve ark (10)'nın deney grubunun hepsinde ve phlorizin uygulamasını takiben bütün saatlerde ketonüri görülmesinin sebebi phlorizin uygulaması ile birlikte hayvanların aç bırakılması ve buna bağlı olarak şekillenen açlık ketozisi ile açıklanabilir.

Çalışmada koyunlara phlorizin uygulanması sonucunda elde edilen biyokimyasal test sonuçları değerlendirildiğinde; phlorizin uygulanmasından sonraki bütün saatlerde ortalama serum glikoz düzeylerinde düşme gözlemlendi ($p<0.05$, Tablo 4.5). Bu çalışmaya paralel olarak çeşitli hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda (10,17,177-179,185-187), phlorizin uygulanması sonucu plazma glikoz seviyesinde hızlı bir düşüş görüldüğü rapor edilmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak Holtenius ve Holtenius (184) koyunlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, phlorizinin plazma glikoz ve insülin konsantrasyonunu önemli derecede etkilemediğini bildirmişlerdir. Herdt ve ark. (112) ise koyunlara uygulanan phlorizin tedavisi süresince başlangıçta glikoz değerlerinin arttığını, sonra ise bazal seviyesine geri döndüğünü tespit etmişlerdir. Bazı araştırmacılar (180-182) ise diabetik ve obez ratlarda yaptıkları deneysel çalışmalarda phlorizinin kan glikoz düzeyini normal seviyeye düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Kan glikoz seviyesinin düşmesi, plorizinin

sodyuma bağlı glikoz transportunu inhibe ederek renal glikozüri oluşturma ve bağırsaklardan glikoz emilimini bloke etme etkisine bağlı olabilir.

Bu çalışmada, serum insülin düzeylerinin phlorizin uygulanmasından sonra sürekli olarak azaldığı belirlendi. Bu çalışma sonuçlarına paralel olarak, bazı araştırmacıların (48,112,178,184) farklı hayvan türlerindeki çalışmalarında, phlorizin uygulanmasından sonra serum insülin seviyelerinin önemli derecede düştüğü belirtilmiştir. Aslan ve ark. (9) koyunlarda yaptıkları çalışmada, phlorizin uygulamasının 12. gününde kan şekerinin normalin yarısına kadar, insülin seviyesinin normalin 5 katı kadar azaldığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada insülinin seviyesinin azalması plazma glikoz seviyesinin azalması ile doğrudan ilişkili olabilir. Ayrıca diğer çalışmalardaki (9,48,112,178,184) insülin seviyesindeki azalmanın çok fazla olması phlorizinin yüksek dozlarda ve tekrarlayan uygulamalarına bağlanabilir. Bu çalışma sonuçlarından farklı olarak, bazı araştırmacılar (17,183,185,186) farklı hayvan türlerinde yaptıkları çalışmalarda, phlorizin enjeksiyonunun plazma insülin konsantrasyonunda önemli bir değişikliğe sebep olmadığını bildirmişlerdir. Yapılan araştırmalarda (17,183,185,186) insülin seviyesinde değişme belirlenemez iken, bu çalışmada insülin seviyesinin düşmesi hayvanların beslenme şekillerinin bu çalışmadaki ile farklı olmasından ya da kan glikoz miktarlarının farklı olmasından kaynaklanabilir. Glikoz konsantrasyonu ile insülin konsantrasyonunun hem koyunlarda (10) hem de diğer ruminantlarda (55) ilişkili olduğu, glikoz arttığında insülinin de arttığı, azaldığında ise insülinin de azaldığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Boer ve ark. (55), ketotik sığırlara glikoz enjekte ettikten sonra glikoz miktarı ile birlikte insülin hormonu miktarının da arttığını saptamışlardır.

Koyunlara phlorizin uygulandıktan sonraki bütün saatlerde ortalama serum trigliserit düzeylerinde azalma belirlendi ($p<0.05$, Tablo 4.5). Benzer şekilde farklı araştırmacıların (177-179,186) farklı hayvan türlerinde yaptıkları çalışmalarda, phlorizin uygulamasından sonra serum trigliserit seviyesinde önemli ölçüde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın, Herdt ve ark. (112) koyunlarda phlorizin ile yaptıkları çalışmada phlorizin uygulamasını takiben trigliserit düzeylerinde 48. saatte artış olduğunu, 24 ve 72. saatlerde ise herhangi bir değişiklik gözlemlenmezken 120. saatlerde total trigliserit seviyesinin tekrar arttığını bildirmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak Zhao ve ark. (17) farelerde phlorizin tedavisinin serum trigliserit seviyesinde değişikliğe sebep olmadığını belirtmişlerdir. Aynı şekilde Mills ve ark. (188) boğalar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, phlorizin tedavisinin hem hepatik glikojen hem de trigliserit konsantrasyonunu etkilemediğini vurgulamışlardır. Fakat bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgular koyunlarda phlorizin uygulamasının trigliserit seviyesini düşürdüğünü göstermiştir. Bunun nedeni olarak trigliseritlerin hidrolize olarak serbest yağ asitlerine dönüştürülmesi gösterilebilir.

Koyunların ortalama serum kolesterol düzeylerinde phlorizin uygulandıktan sonra sayısal olarak 12 ve 24. saatlerde artma, 48 ve 72. saatlerde azalma ve 120. saatte tekraren artma gözlemlenirken, bu değişimlerin istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlendi ($p>0.05$, Tablo 4.5). Herdt ve ark (112) koyunlarda yaptıkları bir çalışmada, phlorizin uygulamasını takiben kolesterol miktarında 48. saatte artış, 24 ve 72. saatlerde herhangi bir değişiklik gözlemlenmezken 120. saatlerde total kolestrol seviyesinde yine artış olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada total kolestrol düzeyinin dalgalı bir şekilde artış ve azalma göstermesi yönünden Herdt ve ark. (112)'nın çalışması ile benzerlik göstermektedir. Cai ve ark. (177) farelerde, Najafian ve ark. (178) ve Lu ve ark. (179) diabetli ratlarda phlorizin uygulanmasının kolesterol konsantrasyonunda düşüşe sebep olduğunu bildirirken, Ohta ve ark. (186) 21-24 haftalık yaştaki diabetik torii ratlarında phlorizin tedavisinin total kolesterol seviyesinde değişiklik oluşturmadığını vurgulamışlardır.

Koyunların ortalama serum HDL seviyelerinin phlorizin uygulanmasından sonraki bütün saatlerde arttığı belirlendi. Fakat bu artış istatistiksel olarak önemsizdi ($p>0.05$, Tablo 4.5). Bu çalışmaya paralel olarak Najafian ve ark. (178)'nın diabetik ratlarda yaptıkları bir çalışmada, phlorizin uygulamasının HDL değeri üzerinde önemli bir etkisi olmadığını bildirirken, Herdt ve ark.(112) bizim çalışmamızla uyumlu olarak koyunlarda phlorizin uygulamasını takiben 24. saat ve akabinde 72 ve 120. saatte HDL değerlerinde tedavi öncesine nazaran yükselme olduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmada kullanılan koyunların ortalama serum LDL seviyelerinin phlorizin uygulamasından sonraki 12, 24 ve 72. saatlerde arttığı, 48 ve 120. saatlerde azaldığı gözlemlendi. Ancak bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmadı ($p>0.05$, Tablo 4.5). Herdt ve ark.(112) koyunlarda phlorizin uygulamasını takiben 24. saat ve devamında 72 ve 120. saatlerde LDL düzeylerinde uygulama öncesine göre yükselme olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın Najafian ve ark. (178) diabetik ratlarda phlorizin uygulamasının LDL konsantrasyonunda düşüşe neden olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada ortalama BUN seviyesinin phlorizin uygulamasından sonraki 120. saate kadar azaldığı, 120. saatte arttığı tespit edildi ($p<0.05$, Tablo 4.5).

Çalışmada kullanılan koyunların ortalama serum kreatinin düzeylerinin phlorizin uygulamasından sonraki 12 ve 48. saatlerde azaldığı, 24 ve 120. saatlerde arttığı ve 72. saatte ise değişmediği belirlendi ($p<0.05$, Tablo 4.5).

Phlorizin uygulanmasından sonra koyunların ortalama serum amilaz seviyelerinin 12. saatte değişmediği, 24, 72 ve 120. saatlerde sayısal olarak arttığı ve 48. saatte de yine sayısal olarak azaldığı tespit edildi ($p>0.05$, Tablo 4.5).

Koyunlara phlorizin uygulanmasından sonraki bütün saatlerde ortalama serum lipaz değerinin arttığı belirlendi ($p<0.05$, Tablo 4.5). Çalışmada serum lipaz konsantrasyonunun yükselme nedeni, glikozüri sonucu şekillenen enerji açığının yağ dokulardan karşılanması amacıyla fazla sentezlenmiş olmasına bağlanabilir. Ayrıca lipaz enziminin adipoz dokudaki trigliseritleri hidrolize ederek yağ asitlerinin serbestleşmesini sağladığı bildirilmektedir (189).

Ortalama GGT seviyelerinin phlorizin uygulaması sonrası 12. saat dışındaki tüm saatlerde referans değerleri aşmadan arttığı belirlendi ($p<0.05$, Tablo 4.5).

Koyunlara phlorizin uygulanmasından sonra 12. saat dışındaki tüm saatlerde ortalama serum LDH değerlerinin azaldığı belirlendi. Ancak bu azalma fizyolojik sınırlar aralığında idi ($p<0.05$, Tablo 4.5).

Phlorizin uygulamasından sonra çalışmada kullanılan koyunların ortalama serum AST değerlerine bakıldığında 12 ve 72. saatlerde hafif derecede artma ve diğer saatlerde aynı şekilde azalma görüldü ($p>0.05$, Tablo 4.5). Deng ve ark. (190) tarafından Karbon tetraklorür ile oluşturulmuş hepatik fibrosisli ratlarda, phlorizinin serum AST seviyesini önemli ölçüde düşürdüğü bildirilmiştir Deng ve ark. (190)'nın verileri bu çalışma sonucunu desteklemektedir.

Ortlama serum ALT değerleri phlorizin uygulamasından sonraki 12, 24 ve 72. saatlerde artış, 48 ve 120. saatlerde azalma göstermiştir ($p>0.05$, Tablo 4.5). Benzer şekilde Deng ve ark. (190) karbon tetraklorürle oluşturulmuş hepatik fibrosisli ratlarda phlorizinin serum ALT seviyesini önemli ölçüde düşürdüğünü rapor etmişlerdir.

Çalışmada kullanılan koyunların phlorizin uygulamasından sonraki ortalama total protein seviyelerinin 120. saate kadar olan ölçümlerde azaldığı, 120. saatte arttığı belirlenmiştir ($p>0.05$, Tablo 4.5).

Koyun serumlarındaki ortalama ALP değerlerinin phlorizin uygulamasından sonraki bütün saatlerde azaldığı belirlenmiştir ($p<0.05$, Tablo 4.5). Daha önceki çalışmalarda phlorizinin LDH ve ALP enzimleri üzerine nasıl etki gösterdiğine dair herhangi bir bulguya rastlanamamıştır.

Phlorizin enjeksiyonundan sonraki ortalama BHB değerlerinin 48. saate kadar değişmediği ancak 72 ve 120. saatlerde azaldığı belirlendi ($p<0.05$, Tablo 4.6). Bu çalışmanın aksine bazı araştırmacılar tarafından koyunlarda (112,184,185) ve boğalarda (194) yapılan çalışmalarda phlorizinin tekrarlayan deri altı enjeksiyonları sonucu ortalama BHB değerlerinin önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada, BHB konsatrasyonunun diğer çalışmalardan (112,184,185,194) farklı olarak fazla etkilenmemesinin nedeni, phlorizinin deri altı ve tek doz uygulanması olabilir.

Bu çalışmada koyunlarda phlorizin enjeksiyonundan sonra ortalama NEFA seviyelerinin bütün

ölçümlerde arttığı belirlendi ($p<0.05$, Tablo 4.6). Bu çalışmaya paralel olarak farklı araştırmacılar tarafından çeşitli hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda (10, 112,176,183-185), phlorizinin plazma NEFA konsantrasyonunda artışa yol açtığı belirtilmiştir. Çalışmada NEFA konsantrasyonundaki artışın nedeni, daha önce yapılan çalışmalarda (48,184,185) belirtildiği gibi phlorizin uygulanan hayvanlarda glikozüri nedeniyle total kan şekeri düzeyinin düşmesine bağlı olarak şekillenen hipoinsülemi sonucunda adipoz dokudaki lipolizise bağlanabilir.

Koyunlara phlorizin uygulamasından sonraki ortalama AcAc değerlerinin başlangıç değerine göre tüm saatlerde sayısal olarak arttığı belirlendi ($p>0.05$, Tablo 4.6).

Çalışmada koyunlara phlorizin uygulanması sonucunda elde edilen oksidatif stres parametreleri değerlendirildiğinde; phlorizin enjeksiyonundan sonra ortalama TOS seviyelerinin bütün saatlerde azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$, Tablo 4.7). Phlorizin uygulamasından sonra ortalama TAS değerlerinin 12, 72 ve 120. saatlerde azaldığı, 24 ve 48. saatlerde arttığı, fakat bu değişimlerin istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlendi ($p>0.05$, Tablo 4.7). Koyunlarda belirlenen ortalama oksidatif stres indeksinin değerleri phlorizin uygulamasından sonra 0. saate göre bütün saatlerde daha düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$, Tablo 4.7). Deng ve ark. (190) tarafından karbon tetraklorürle oluşturulmuş hepatik fibrosisli ratlarda phlorizinin serum malondialdehid (MDA) seviyesini önemli ölçüde düşürdüğü ve karaciğer dokusunda glutasyon peroksidaz (GSH Px) seviyesini, total antioksidan kapasitesini (T-AOC) ve total süperoksid dismutaz (T-SOD) seviyesini önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir. Osorio ve ark. (182) diabetik ratlara 4 hafta phlorizin uygulanmasının hiperglisemiyi ve böbreklerdeki oksidatif stresi engellediğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada, phlorizin uygulanması sonrasında oksidatif streste istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiş olması, phlorizinin oksidatif stresi azalması yönünde Deng ve ark. (190) ve Osorio ve ark. (182)'nın çalışmasına benzerlik göstermektedir. Baldisserotto ve ark. (191) phlorizinin antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar (11,15,49,192) da phlorizinin oksidatif stresi azalttığını belirtmişlerdir.

Çalışmada koyunların sırt bölgesindeki yağ kalınlığı ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde, phlorizin uygulaması öncesine (0. saat) göre phlorizin uygulaması sonrasında (120. saat) sırt yağ dokusunda azalma belirlendi ($p<0.05$, Tablo 4.8). Bu çalışmaya paralel olarak Zhao ve ark. (17)'nın farelerde yaptıkları çalışmada, phlorizin tedavisinin yağ kitlesinde azalmaya sebebiyet verirken, yağsız vücut kitlesinde değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir.

Pholorizin uygulamadan önce koyunların karaciğerlerinin histopatolojik değerlendirmesinde, karaciğer epitel hücrelerinin birçoğunun sitoplazmalarında büyüklükleri farklı, elipsten yuvarlağa kadar değişen keskin kenarlı yağ vakuollerine rastlandı. Ayrıca kupfer hücrelerinin sayıca fazla olması dikkat çekti. Phlorizin uygulandıktan sonra 120. saatten sonra alınan biyopsi örneklerinde,

fokal alanlar tarzında hepatositlerin stoplazmalarındaki yağ vakuollerinin sayısında azalma görüldü. Kupfer hücrelerinin görünümünde değişiklik gözlenmedi. Bradfort ve ark.(183) sığırlarda yaptıkları çalışmada, phlorizinin lipolizisi stimüle ettiği bildirilmiştir. Aslan ve ark.(9) koyunlarda yaptığı çalışmada, phlorizin uygulamasının 12. gününde karaciğerden alınan biyopsi materyalinde karaciğer epitel hücrelerinde diffuz tarzda lipit damlacıklarının toplandığı bildirilmiştir. Aslan ve ark (9) çalışması bu çalışmadan farklı olarak phlorizin uygunlaması sonucunda karaciğerde yağlanma olduğunu göstermektedir. Bu araştırmacıların hayvanları aç bırakarak ketozis oluşturmaları sonucunda oluşan serbest yağ asitlerinin karaciğerde birikip yağlanmaya sebep olması, bulguların bizim çalışma bulgularımızdan farklı olmasının sebebi olabilir. Herdt ve ark. (112) açlığın karaciğer yağlanmasını indüklediğini belirtmişlerdir. Bu çalışmalarda phlorizinin yoğun şekilde uzun süre kullanımı ve hayvanların aç bırakılmasına bağlı olarak, hepatositler ve yağ metabolizması üzerindeki olumsuz etkiler göz önünde bulundurulmalıdır.

Raoofi ve ark. (193) kuzulara uyguladıkları biyopsi işleminin vücut sıcaklığı, kalp ritmi, solunum oranı, hematolojik parametreler (PCV, WBC, nötrofil, lenfosit, eozinofil, monosit vb) ile biyokimyasal parametreler (serum total protein, AST, ALT vb) üzerinde önemli bir değişiklik yapmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da yapılan biyopsi işleminin hematolojik ve biyokimyasal parametreleri etkilemediği gözlemlendi.

Sonuç olarak, çalışmada denek olarak kullanılan koyunlara deri altı phlorizin enjeksiyonundan sonra, oksidatif stres indikatörlerinden TAS değerlerinde değişikliklik gözlemlenmezken TOS değerlerinin düşmesi ve buna paralel olarak OSI değerlerinde görülen azalma phlorizinin oksidatif stresi azalttığı görüşünü destekledi. Phlorizinin serum lipit profillerinden NEFA, HDL konsantrasyonu yükselttiği, trigilserid miktarını azalttığı, kan glikoz konsantrasyonu ve insülin seviyesini düşürdüğü ve karaciğer enzimlerinin miktarında azalmaya sebep olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar phlorizinin karaciğer fonksiyonlarını olumsuz etkilemediğini göstermektedir. Ohta ve ark. (186)'nın ratlarda phlorizin ile yaptıkları deneysel çalışmada, phlorizinin karaciğer fonksiyonlarını düzelttiğini belirtmesi bizim sonuçlarımızı desteklemektedir. Najafian ve ark.(178) phlorizinin diabetli ratlarda canlı ağırlığı azaltması ve lipitemik etki göstermesi nedeni ile antihiperlipitemik ve antihiperglisemik bir ajan olarak obesite tedavisinde kullanılabileceğini önermektedir. Ayrıca bu çalışmada da ultrosonografik muayenede vücut sırt yağının azalması ve karaciğerden alınan biyopsi örneklerinin histopatolojik incelemesinde hepatositlerdeki yağ vakuolü miktarının azalması phlorizinin uygun doz ve uygulama şekli ile yağ metabolizması bozukluklarından kaynaklanan hastalıkların tedavisinde olumlu etkiler yapabileceği gösterildi.

6. KAYNAKLAR

1. Hutchinson A, Taper C, Towers G. Studies of phloridzin in malus. Can J Med Sci 1959; 37: 901-9010.
2. de Koninck L. Observations sur les proprietes febrifuges de las phloridzine. Bull Soc Med Gand 1836; 1: 75-110.
3. Stiles PG, Lusk G. On the action of phlorizin. Am J Physiol 1903; 10: 61-79.
4. Chassis H, Jolliffe N, Smith H. The action of phlorizin on the excretion of glucose, xylose, sucrose, creatinine and urea by man. J Clin Invest 1933; 12: 1083-1089.
5. Young JW, Schmidt SP, Akawuah ES, et al. Effects of phlorizin on glucose kinetics in the bovine. J Dairy Sci 1974; 57: 689.
6. Burtis CA, Jackson HD, Packett LV, et al. Effects of glucagon, glycerol, and insulin on phlorizin induced ketosis in fasted, nonpregnant ewes. Am J Vet Res 1968; 29: 647.
7. Jervis EL, Johnson FR, Sheff MF, et al. The effect of phlorizin on intestinal absorption and intestinal phosphatase. J Physiol (Lond.) 1956; 134: 675.
8. Largis EE, Jacobs FA. Effects of phlorizin on glucose transport into blood and lymph. Biochim Biophys Acta 1971; 255: 301.
9. Aslan V, Aştı RN, Tiftik AM, et al. Effect of niacin on blood metabolities, rumen protozoa, insulin levels and fatty liver in experimentally induced ketosis in ewes. Selçuk Ü Vet Fak Derg 1988; 4: 109-121.
10. Başoğlu A, Turgut K, Eksen M, et al. Effect of phlorihizin-induced ketozis on riboflavin and niacin levels on sheep. Selçuk Ü Vet Fak Derg 1989; 9: 58-63.
11. Robak J, Gryglewski R. Flavonoids are scavengers of superoxide anion. Biochem Pharmacol 1988; 37: 83-88.
12. Kim DO, Lee KW, Lee HJ, et al. Vitamin C equivalent antioxidant activity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. J Agric Food Chem 2002; 50: 3713-3717.
13. Sorata Y, Takahama U, Kimura M. Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. Biochem Biophys Acta 1984; 799: 313-317.
14. Takahama U. Inhibition of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation by quercetin: mechanism of antioxidative function. Phytochemistry 1985; 24: 1443-1446.
15. Ridgway T, O'Reilly J, West G, et al. Antioxidant action of novel derivatives of the apple-derived flavonoid phloridzin compared to oestrogen; relevance to potential

cardioprotective action. Biochem Soc Trans 1997; 106: 125.

16. Liu T. Structure/Function Studies of the High Affinity Na+/Glucose Cotransporter (SGLT1). Doktora Tezi. Institute of Medical Sciences, University of Toronto. Toronto 2009: 169.

17. Zhao H, Yakar S, Gavrilova O, et al. Phloridzin improves hyperglisemia but not hepatic insulin resistance in a transgenic mouse model of type 2 diabetes. Diabetes 2004; 53: 2901-2909.

18. Boyer J, Liu RH. Apple phytochemicals and their health benefits. J Nutr 2004; 3: 5.

19. Petersen C. Analyse des Phloridzins. Ann Acad Sci France 1835; 15: 178.

20. Cox SD, Jayasinghe KC, Markham JL. Antioxidant activity in Australian native sarsaparilla (Smilax glyciphylla). J Ethnopharmacol 2005; 101: 162-168.

21. Dong H, Ning Z, Yu L, et al. Preparative Separation and Identification of the Flavonoid Phlorhizin from the Crude Extract of Lithocarpus Polystachyus Rehd. Molecules 2007; 12: 552-562.

22. Hilt P, Schieber A, Yildirim C, et al. Detection of Phloridzin in Strawberries (Fragaria x ananassa Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR Spectroscopy. J Agric Food Chem 2003; 51: 2896-289.

23. Hancock CR, Harlow WB, Lacey HJ. The behaviour of phloridzin in the coleoptile straight-growth test. J Exp Bot 1961; 12: 401-408.

24. Grochowska MJ. Studies on natural growth regulators in apple trees in relation to biennial bearing. Bull Acad Pol Sci 1963; 9: 585-590.

25. Zhang JH, Mao ZQ, Wang LQ, et al. Bioassay and Identification of Root Exudates of Three Fruit Tree Species. Journal of Integrative Plant Biology 2007; 49: 257-261.

26. MacDonald RE, Bishop CJ. Phloretin: An Antibacterial Substance Obtained from Apple Leaves. Can J Bot 1952; 30: 486-489.

27. Noveroske RL, Williams EB, Kue J. B-glycosidase and phenoloxidase in apple leaves and their possible relation to resistance to venturia inaequalis. Pathol 1964; 54: 98-103.

28. Gessler, C, Patocchi A, Sansavini S, et al. Venturia inaequalis resistance in apple. Crit Rev Plant Sci 2006; 25: 473-503.

29. Bremner PD, Blacklock C, Paganga G, et al. Comparison of the phenolic composition of fruit juices by single step gradient HPLC analysis of multiple chromatographic runs

optimized for individual families. Free Radic Res 2000; 32: 549-559.

30. Escarpa A, Gonzalez M. High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. J Chromatogr 1998; 823: 331-337.

31. Ehrenkranz JRL, Lewis NG, Kahn CR, et al. Phlorizin: a review. Diabetes/ Metab Res Rev 2005; 21: 31-38.

32. Von Mering J. Ueber kunstlichen Diabetes. Centralbl Med Wiss 1886; 22: 531.

33. Whiting GC, Coggins RA. Estimation of the monomeric phenolics from ciders. J Sci Food Agric 1975; 26: 1833-1838.

34. Walle T, Walle UK. The beta-D-glucoside and sodium-dependent glucose transporter 1 (SGLT1)-inhibitor phloridzin is transported by both SGLT1 and multidrug resistance-associated proteins 1/2. Drug Metab Dispos 2003; 31: 1288-1291.

35. Ghanem E, Robaye B, Leal T, et al. The role of epithelial P2Y(2) and P2Y(4) receptors in the regulation of intestinal chloride secretion. Brit J Pharm 2005; 146: 364-369.

36. McCrimmon R, Evans M, Jacob R, et al. AICAR and phlorizin reverse the hypoglycemia-specific defect in glucagon secretion in the diabetic BB rat. Am J Physiol Endocrinol Metab 2002; 283: 1076-1083.

37. Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F. Intensive insulin therapy in critically ill patients. N Engl J Med 2001; 345: 1359-1367.

38. Puel C, Quintin A, Mathey J, et al. Prevention of bone loss by phloridzin, an apple polyphenol, in ovariectomized rats under inflammation conditions. Calcif Tissue Int 2005; 77: 311-318.

39. Hall JL, Reilly RT, Cottrill KL, et al. Phlorizin enhancement of memory in rats and mice. Pharmacol Biochem Behav 1992; 41: 295-299.

40. Boccia MM, Kopf SR, Baratti CM. Phlorizin, a competitive inhibitor of glucose transport, fa-cilitates memory storage in mice. Neurobiol Learn Mem 1999; 71: 104-112.

41. Ugocsai K, Varga A, Molnar P, et al. Effects of selected flavonoids and carotenoids on drug accumulation and apoptosis induction in multidrug-resistant colon cancer cells expressing MDR1/LRP. In Vivo 2005; 19: 433-438.

42. Veeriah S, Kautenburger T, Habermann N, et al. Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the

biotransformation of xenobiotics. Mol Carcinogen 2006; 45: 164-174.

43. Flint A. A treatise on the principles and practice of medicine. Lea and Brothers: Philadelphia, 1886; 929.
44. Chassis H, Jolliffe N, Smith H. The action of phlorizin on the excretion of glucose, xylose, sucrose, creatinine and urea by man. J Clin Invest 1933; 12: 1083-1089.
45. Shannon JA, Jolliffe N, Smith HW. The Excretion of Urine in the Dog. IV. The Effect of Maintenance Diet, Feeding, etc., upon the Quantity of Glomerular Filtrate. Am J Physiol 1932; 625.
46. Smith H. Lectures on the Kidney, University of Kansas Press: Lawrence, KS, 1943.
47. LaVeen H, Laven R, LaVeen E. Treatment of Cancer with Phlorizin and its Derivatives. US Patent 4,840.939, US Patent Office, Crystal City, VA, 1989.
48. Lyle RR, de Boer G, Mills SE, et al. Glucose kinetics, plasma metabolites, and endocrine responses during Experimental ketoin in steers, J Dairy Sci 1984; 67: 2255-2264.
49. Hertog M, Kromhout D, Aravanis C, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. Arch Intern Med 1995; 155: 381-386.
50. Goetsch GD, Pritchard WR. Effects of oral administration of fatty acidson certain blood urine constituents of fasted phlorizin-treated ewes. Am J Vet Res 1958; 19: 637.
51. Burtis CA, Jackson HD, Packett LV, et al. Effect of epinephrine lzydrocortisone, and thyroxine on phlorizin-induced ketosis in fasted, nonpregnant ewes. Am Vet Res 1966; 27: 879.
52. Hove K. Nocturnal plasma insulin levels in cows with vraying levels of plasma ketone bodies, relations to plasma sugar and acetoacetate, Acta Endocrinol 1974; 76: 513.
53. Madison LL, Mebane D, Unger RH, et al. The hypoglysemic action of ketones, II. Evidence for a stimulatory feedback of ketones on the pancreatic beta cells. J Clin Invest 1964; 43: 408.
54. Basett JM. Plasma glucagon cencentrations in slzeep: Their regulation to cencentrations of insulin and growth hormone. Aust J Biol 1972; 25: 1277.
55. Boer G, Trenkle A, Young JW. Glucagon, Insulin, Growth Hormone and same blood metahalites during energy restriction ketonemia of lactating cows, J Dairy Sci 1985; 68:

327-336.

56. Keller DM, Lotspeich WD. Effect of phlorizin on the osmotic behavior of mitochondria in isotonic sucrose. J Biol Chem 1959; 234: 991-994.

57. Alvarado F, Crane RK. Phlorizin as a competitive inhibitor of the active transport of sugars by hamster small intestine, in vitro. Biochim Biophys Acta 1962; 56: 170-172.

58. Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action. N Engl J Med 1999; 341: 248-256.

59. Stuart IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. Br J Nutr 2003; 89: 3-9.

60. Amsler K, Cook J. Development of a Na-dependent hexose transport in a cultured line of porcine kidney cells. Am J Physiol 1982; 242: 94-101.

61. Lee WS, Wells RG, Hediger MA. The high affinity Na/glucose cotransporter. Re-evaluation and distribution of expression. J Biol Chem 1994; 269: 12032-12039.

62. You G, LeeWS, Barros EJ, et al. Molecular characteristics of Na+-coupled glucose transporters in adult and embryonic rat kidney. J Biol Chem 1995; 270: 29365-29371.

63. Turk E, Martin MG, Wright EM. Structure of the human Na+/glucose cotransporter gene SGLT1. J Biol Chem 1994; 269: 15204-15209.

64. Mackenzie B, Panayotova-Heiermann M, Loo DDR, et al. SGLT1 is a low affinity Na=/glucose transporter and not an amino acid transporter. A reappraisal. J Biol Chem 1994; 269: 22488-22491.

65. John R. White PA, Pharm D. Apple Trees to Sodium Glucose Co-Transporter Inhibitors: A Review of SGLT2 Inhibition. Clin Diabetes 2010; 28: 5-10.

66. Moe OW, Berry CA, Rector FC: Renal transport of glucose, amino acids, sodium, chloride, and water. In: Brenner and Rector's eds. The Kidney. 6th ed. Brenner BM, Ed. Philadelphia, Pa., W.B. Saunders, 2000: p. 378-380.

67. Bakris GL, Fonseca V, Sharma K, et al. Renal sodium-glucose transport: role in diabetes mellitus and potential clinical implications. Kidney Int 2009; 75: 1272-1277.

68. Uldry M, Thorens B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. Pflugers Arch 2004; 447: 480-489.

69. Wright EM. Renal N^{+}-glucose transporters. Am J Physiol Renal Physiol 2001; 280: 10-18.

70. Caccia S, Casartelli M, Grimaldi A, et al. Unexpected similarity of intestinal sugar absorption by SGLT1 and apical GLUT2 in an insect (Aphidius ervi, Hymenoptera) and mammals. Am J Phyiol 2007; 292: 2284-2291.

71. Panayotova-Heiermann M, Loo DDR, Wright EM. Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na+/glucose cotransporter. J Biol Chem 1995; 270: 27099-27105.

72. Bell GI, Kayano T, Buse J, et al. Molecular biology of mammalian glucose transporters. Diabetes Care 1990; 13: 198-208.

73. Jabbour SA and Goldstein BJ. Sodium glucose co-transporter 2 inhibitors: blocking renal tubular reabsorption of glucose to improve glycaemic control in patients with diabetes. Int J Clin Pract 2008; 62: 1279-1284.

74. Ashiya M, Ret S. Non-insulin therapies for type 2 diabetes. Nat Rev Drug Discov 2007; 6: 777-778.

75. Takii H, Kometani T, Okada S, et al. Lowering effect of phenolic glycosides on the rise in postprandial glucose in mice. Biosci Biotechnol Biochem 1997; 61: 1531-1535.

76. Betz AL, Drewes LR, Gilboe DD. İnhibition of glucose transport in to brain by phlorizin, phloretin and glucose analogues. Biochem Biophys Acta 1975; 406: 105-515.

77. Yang XJ, Kow LM, Funabashi T, et al. Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. Diabetes 1999; 48: 1763-1772.

78. Gaisano H, Ostenson C, Sheu L, et al. Abnormal expression of pancreatic islet exocytotic soluble Nethylmaleimide- sensitive factor attachment protein receptors in Got-Kakizaki rats is partially restored by phlorizin treatment and accentuated by high glucose treatment. Endocrinology 2002; 143: 4218-4226.

79. Ersoy E, Bayşu N. Biyokimya. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları No:408. Ders Notları, Ankara Üniversitesi, Ankara, 1986.

80. Telefoncu A. Tıp ve Fen Bilimcileri için Biyokimya. Sermet Matbaası, Kırıklareli, 1988.

81. Kayaalp O. Hipolipidemik ilaçlar. In: Kayaalp O eds. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 8. Baskı. Ankara, Hacettepe TAŞ, 2000: 567-87.

82. Champe PC, Harvey RA. Bioquímica ilustrada, 2. ed., Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

83. Cathcart MK, McNally AK, Chisolm GM. Lipoxygenase medatedtransformation of human

low density lipoprotein to an oxidized and cytotoxic complex. J Lipid Res 1991; 32: 63-70.

84. Brzostowski H,Milewski S,Wasilewski A,Tanski Z. The influence of the reproductive cycle on levels of some metabolism indices in ewes. Arch Vet Pol 1995; 35: 53-62.
85. Özpınar A, Fırat A, Akın G. The plasma cholesterol levels of ewes during prepartal and postpartal periods. Hayvancılık Arastırma Dergisi 1995; 5: 32-34.
86. Lee DM. A simple and sensitive method in using the ratios of cholestryl ester molecular species as indexes of oxidative stress in plasma and lipoprotein fractions. Atherosclerosis 1999; 146: 221-235.
87. Asadian A, Mirhadi SA, Mezes M. Seasonal variation in the concentration of vitamins A and E in the blood plasma of fat-tailed sheep. Acta Vet Hung 1995; 43: 453-461.
88. Vieira OV, Laranjinha JAN, Madeira VMC. Rapid isolation of low density lipoproteins in a concentrated fractions free from water-soluble plasma antioxidants. J Lipid Res 1996; 37: 2715-2721.
89. Lacetera N, Bernabucci U, Ronchi B, et al. The effects of injectable sodium selenite on immune function and milk production in sardinian sheep receiving adequate dietary selenium. Vet Res 1999; 30: 363-370.
90. Rubins HB, Robins SJ, Collins D. For the Veterans Affairs Cooperative Studies Program High-Denstiy Lipoprotein İntervention Trial Study Group Baseline Characteristics of normocholesterolemic men with coronary artery disease and low levels of high-denstiy lipoprotein cholesterol. Am J Cardiology 1996; 78: 572-575.
91. Walker HK, Hall WD. Clinical Methods, Third Edition. In: Stoneham MA eds. 9. ed. Butterworth Publishers. 1990.
92. Zılva JF, Pannall PR, Mayne PD. Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment. Fifth ed. London, 1991.
93. Molvalılar S. Endokrin Hastalıkları. Nobel Tıp Yayıncılık İstanbul, 1993.
94. Karlıbaş H. Kanserli Hastalarla Kolesterol Düşüklüğü Arasında Sebep Sonuç İlişkisi. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği. Uzmanlık Tezi. İstanbul, 2008.
95. Başoğlu A, Sevinç M. Evcil Hayvanlarda Metabolik ve Endokrin Hastalıklar. Pozitif Matbaacılık, Konya, 2004.
96. İmren HY, Şahal M. Süt ineklerinde lipomobilizasyon sendromu. Etlik Vet Mikrob Deg 1989; 6: 119-131.

97. Tiftik AM. Biyokimya Ders Notları. Sağlık Eğitim Enstitüsü Yayınları. No: 1, Konya, 1991.

98. Ruckebusch Y, Phaneuf LP, Dunlop R. Physiology of small and large animals. In: Decker BC eds, Phladelphia, Hamilton, 1991.

99. Aslan V, Aştı RN, Nizamlıoğlu M, et al. Postpartum Dönem Hastalıklarının Yağlı Karaciğer Sendromu İle İlgisi. Selçuk Ü Vet Fak Derg 1989; 4: 43-51.

100. Aştı RN, Aslan V, Nizamlıoğlu M, et al. Süt İneklerinde Yağlı Karaciğer Sendromu Üzerine Araştırmalar. Selçuk Ü Vet Fak Derg 1989; 4: 21-36.

101. Nizamlıoğlu M, Aslan V, Aştı R, et al. Yağlı Karaciğer Sendromlu Süt Sığırlarında Vitamin A ve E Değerlerinin Araştırılması. Türk Vet ve Hay Derg 1994; 18: 293-298.

102. Rings DM. Hepatic Lipidosis: Mechanisms, Diagnostics and Treatments. The Bovine Proceedings 1990; 22: 19-23.

103. Barton MH. Liver disease. http://www.vet.uga.edu/LAM/teaching/barton/5350/Liver_slides.swf. (10.02.2013).

104. Blood DC, Radostıts OM. Veterinary Medicine. 7. Ed., Bailliere Tindall, London. l989; 1138-1142.

105. Lauener JW. Zweidimensionale Sonographie in der Fettleberdiagnostik bei Milchkühen Untersuchungen zur diagnostischen Sensivität und Spesifität. Inaugural Diss Hannover l993; 20: 76-91.

106. Holtenius P, Niskanen R. Leberzellverfettung bei Kühen mit Labmagenverlagerung. Dtsch Tierarztl Wochenschr l985; 92: 398-400.

107. Marrow DA. Fat Cow Syndrome. J Dairy Sci 1975; 59: 1625-1629.

108. Treacher RJ, Reid IM, Roberts CJ. Effect of Body Condition at calving on the Health and Performance of Dairy Cows. Anim Prod 1986; 43: 1-6.

109. Aytuğ CN, Alaçam E, Görgül S, et al. Sığır Hastalıkları. 2. Baskı. Tüm Vet Hayvancılık ve Veteriner Hizmetleri San. Tic. Ltd. Yayını No:3, İstanbul, 1991.

110. Gerloff BJ, Herdt TH, Emery RS. Relationship of Hepatic Lipidosis to Health and Performance in Dairy Cattle. JAVMA 1986; 188: 845-850.

111. Stevens JB, Olson WG. Free Fatty Acid-Induced Hypocalcemia in Food-Deprived Dairy

Cattle. Am J Vet Res 1984; 45: 2448-2450.

112. Herdt TH, Gerloff BJ. Hepatik Lipidosis and Liver Function in 49 Cows with Displaced abomasum, 12th. World Congress on Diseases of Cattle, The Natherlandds, 1984; 10: 522-525.

113. Braun U. Ultrasonographic examination of the liver in cows. Am J Vet Res l990; 5l: 1522-152697.

114. Hıdıroğlu M, Hartin KR. Vitamins A, E and Selenium Blood Levels in the Fat Cow Syndrome. Con Vet J 1982; 23: 255-258.

115. West HJ. Effect on Liver Function of Acetonaemia and the Fat Cow Syndrome in Cattle. Res Vet Sci 1990; 48: 221-227.

116. McCormack J. Fat Cow Syndrome and its Complications. Vet Med Small Anim Clin 1978; 73: 1057-1060.

117. Roberts CJ, Reid IM. Fat Cow Syndrome and Syndrome and Subclinical Fatty Liver. Current Veterinary Therapy Animal Practice. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986.

118. Reid IM, Dew SM, Collins RA, et al. The Relationship Between Fatty Liver and Fertility in Dairy Cows: Farm İnvestigation. J Agric Sci 1983; 101: 499-502.

119. Andrews AH, Laven R, Maisey I. Treatment and Control of an Outbreak of Fat Cow Syndrome in a Large Dairy Herd. Vet Rec 1991; 129: 216-219.

120. Nizamlıoğlu M, Aslan V, Durgun Z. Süt Sığırlarının Yağlı Karaciğer Sendromunda Bazı Kan Değerleri. Selçuk Ü Vet Fak Derg 1989; 4: 37-41.

121. Reid IM, Roberts CJ, Treacher, RJ, et al. Effect of Body Condition at Calving on Tissue Mobilization, Development of Fatty Liver and Blood Chemistry of Dairy Cows. Anim Prod 1986; 43: 7-15.

122. Grote D. Sonographische Untersuchungen zur Leberdiagnostik beim Rind unter besonderer Berücksictigung des Fettlebersyndroms. Inaugural Diss. Hannover l992; 66: 71- 91.

123. Gall T, Reid IM, Collins RA, et al. Comparision of Biochemical and Histological Methods of Estimating Fat Content of Liver of Dairy Cows. Res Vet Sci 1983; 34: 245-248.

124. Barr F. Ultraschalldiagnostik bei Hund und Katze. Gustav Fischer Verlag, l992; 21-37.

125. West HJ. Liver Function in Dairy Cows in Late Pregnancy and Early Lactation. Res Vet Sci 1989; 46: 231-237.

126. Smart ME, Northcote MJ. Liver Biopsies in Cattle. Comp Cont Educ Pract 1985; 7: 327-332.

127. Serafini M; Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the Total Antioxidant Capacity the right tool. Redox Report 2004; 9: 45-152.
128. Hermes-Lima M, Zenteno-Savın T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stres. Comp Biochem Phys 2002: 537-556.
129. Song O. Oxidative Stress: A Theoretical Model or Biological Reality. Biologies 2004; 327: 649-662.
130. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and The Mammalian Thioredoxin System. Free Radical Biol Med 2001; 31: 1287-1317.
131. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J 1984: 219; 1-14.
132. Kopáni M, Celec P, Danisovic L, et al. Oxidative stress and electron spin resonance. Clin Chim Acta 2006; 364: 61-66.
133. Staroverov VN, Davidson ER. Distribution of effectively unpaired electrons. Chem Phys Lett 2000; 330: 161-168.
134. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, 1. Baskı, Mimoza Yayınları, Konya 1995.
135. Flora SJ. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. Cell Mol Biol 2007; 53: 1-2.
136. Baskin SI, Salem H. Oxidants, antioxidants, and free radicals. Taylor and Francis eds., Washington DC, 1997, p.16.
137. Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, et al. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. Free Radical Biol Med 1999; 26: 202-22.
138. Aslan R, Şkeroğlu MR, Bayiroğlu F. Serbest Radikal Türlerin Membran Lipid Peroksidasyonuna Etkileri ve Antioksidan Savunma, Y Y Ü Sağlık Bil Derg 1995; 2; 137-142.
139. Büyükdoğan V. Deneysel akut pankreatitte oksidatif stresin rolü ve n-asetilsistein'in tedavideki yeri. Genel Kurmay Baskanlıgı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Baskanlığı. Uzmanlık Tezi. Ankara, 2001.
140. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease, J Clin Pathol 2001; 54: 176-186.
141. Fridovich I. Oxidative Stres. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, 2001.

142. Gülbayzar S. Yenidogan bebeklerde kord kanında oksidatif stresin göstergesi olarak malondialdehid. Sağlık Bakanlığı Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2006.
143. Becker LB, Vanden Hoek TL, Shao ZH, et al. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. Am J Physiol 1999; 277: 2240- 2246.
144. Sies H. Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. Am J Med 1991; 91: 31-38.
145. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed., Oxford University Pres, Newyork, 1999: 246-351.
146. Kontos HA, Wei EP, Ellis EF, et al. Appearance of superoxideanion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. Circ Res 1985; 57: 42-151.
147. Oruç Özcan E. 2,4-Diamin ve Azinfosmetilin Tilapia Nilotica'da Karaciğerde Antioksidan Enzim Aktivitelerine ve Lipid Peroksidasyonuna Etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 1998.
148. Şinoforoglu T. Akut ve düzenli antrenmanın hentbolcülerde oksidatif stres üzerine etkisi. Gazi Üniversitesi Saglık Bilimleri Enstitüsü Beden Egitimi ve Spor Anabilim Dalı. Ankara, 2007.
149. Winterbourn CC. Toxicity of Iron and Hydrogen Peroxide: The Fenton Reaction. Toxicol Lett 1995; 82: 969-974.
150. Aydın A, Sayal A, Isımer A. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi. Gata Basımevi, Ankara, 2001.
151. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and The Mammalian Thioredoxin System. Free Radical Biol Med 2001; 31: 1287-1317.
152. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chemistry 1995; 41: 1819-1828.
153. Gaetke ML, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. Toxicol 2003; 189: 147-163.
154. Kılınç K, Kılınç A Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri; Hacettepe Tıp Derg 2002; 33: 110-118.
155. De Zwart LL, Meerman JHN, Commander JNM, et al. Biomarkers of free radical damage applications in experimentals and in humans. Free Radic Biol Med 1999; 26: 202-226.
156. Attieh ZK, Mukhopadhyay CK, Seshadri V, et al. Ceruloplasmin ferroksidase activity stimulates celluar iron uptake by a trivalent cotion spesific transport mechanim. J Biol Chem 1999; 27: 1116-1123.
157. Güngör N, Knaapen AM, Munnia A, et al. Genotoxic effects of neutrophils and

hypochlorous acid. Mutagenesis 2010; 25: 149-154.
158. Moncada S, Palmer RMJ, Higs EA. Nitric oxide: Physiology, patophysiology, and pharmacology. J Pharmacol Review 1991; 43: 109-37.
159. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. J Biol Chem 1993; 268: 123-125.
160. Ellis G, Adatia I, Yazdanpanah M, et al. Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. Clin Biochem 1998; 31: 195-220.
161. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. Nutrition 2002; 18: 872-879.
162. Emecen Ö. Astımlı Hastalarda Serum Total Oksidan / Antioksidan Status ve ECP Düzeylerinin Değerlendirilmesi. Sağlık Bakanlığı Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2009.
163. Aruoma OL, Halliwell B, Loughtan MJ et al. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for iron (II) iron (III) complex. J Biochem 1989; 258: 617-620.
164. Meram İ, Aktaran Ş. Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 2002; 3, 299-304.
165. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chemistry 1995; 41: 1819-1828.
166. Kurutaş Belge E, İnanç Güler F, Kılınç M. Serbest Radikaller. Arşiv, 2004; 13: 120-13.
167. Dalle-Donne I, Giustarini D. A protein carbonylation in human diseases. Trends Mol Med 2003; 34: 367-70.
168. Groot H. Reactive oxygen species in tissue injury. Hepato-Gastroenterol 1994; 41: 328-332.
169. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am J Clin Nutr 1993; 57: 715-724.
170. Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. J Biol Chem 1973; 248: 4793-4796.
171. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mamalian glutathione synthesis. Free Radic Biol Med 1999; 27: 916-935.
172. Michiels C, Raes M, Toussaint O, et al. Importance of Seglutathione peroxidase, catalase, Cu-Zn superoxide dismutase for cell survival against oxidative stres. Free Radic Biol Med 1994; 17: 235-248
173. Mavelli I, Rotilio G. Enzymatic Protection against Intracellular Oxidative Processes, Advances on Oxygen Radicals and Radioprotectors, Edizioni Scientifiche 1984; 65-80.
174. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984; 121-126.

175. Dormandy TL. An approach to free radicals. Lancet 1983; 2: 1010-1014.
176. Kıyıcı Şıklaroğlu R.Deneysel ketozis oluşturulan koyunlarda parenteral lipit emilsiyonlarının tedavi edici etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2012: 89.
177. Cai O, Li B, Yu F, et al. İnvestigation of the protective effects of phlorizin on diabetic cardiomyopathy in db/db mice by quantitative proteomics. J Diabetes Res 2013; 1-9.
178. Najafian M, Jahromi MZ, Nowroznejhad MJ, et al. Phloridzin reduced blood glucose levels and improves lipids metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. Mol Biol Rep 2012; 39: 5299-5306
179. Lu WD, Li BY, Yu F, et al. Quantitative proteomics study on the protective mechanism of phlorizin on hepatic damage in diabetic db/db mice. Med Report 2012; 5: 1285-1294.
180. Janssen SW, Martens GL, Sweep PN, et al. Phlorizin treatment prevents the decrease in plasma insulin levels but not the progressive histopathological changes in the pancreatic islets during aging of Zucker diabetic fatty rats. J Endocrinol Invest 2003; 26: 508-515.
181. Malatiali S, Francis I, Barac NM. Phlorizin prevents glomerular hyperfiltration but not hypertrophy in diabetic rats. Exp Diabetes Res 2008; 7.
182. Osorio H, Bautista R, Rios A, et al. Effect of phlorizin on SGLT2 expression in the kidney of diabetic rats. J Nephrol 2010; 23: 541-546.
183. Bradford BJ, Allen MS. Phlorizin induces lipolysis and alters meal patterns in both early and late lactation dairy cows. J Dairy Sci 2007; 90: 1810-1815.
184. Holtenius BK, Holtenius P. Effects of peroral alanine administration in lactating ewes with decreased availability of glucose. Br J Nut 1997; 78: 805-813.
185. Overton TR, Drackley JK, Otteman-Abbamonte CJ, et al. Metabolic Adaptation to Experimentally Increased Glucose Demand in Ruminants. J Anim Sci 1998; 76: 2938-2946.
186. Ohta T, Morinaga H, Yamamoto T, et al. Effect of phlorizin on metabolic abnormalites in spontaneously diabetic torii (STD) rats. J Anim Sci 2012; 2: 113-118.
187. Egan AR, MacRae JC, Lamb CS. Threonine metabolism in sheep. I. Threonine catabolism and gluconeogenesis in mature Blackface wethers given poor quality hill herbage. Br J Nutr 1983; 49: 373-383.
188. Mills SE, Lyle RR, Beıtz DC, et al. In vitro hepatic gluconeogenesis during experimental ketosis produced in steers by 1,3-butanediol and phlorizin. J Dairy Sci 1984; 67: 2265-

2273.

189. Shepherd J. Lipids in health and disease. Biochem Soc Trans 2004; 32: 1051-1056.

190. Deng G, Wang J, Zhang Q, et al. Hepatoprotective effects of phlorizdzin on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride againist oxidative stress-triggered damage and fibrosisin rats. Biol Pharm Bull 2012; 35: 1118-1125.

191. Baldisserotto A, Malisardi G, Scalambra E, et al. Synthesis, antioxidant and antimicrobial activity of a new phloridzin derivative for dermo-cosmetic applications. Molecules 2012; 17: 13275-13289.

192. Shen L, You BA, Gao HQ, et al. Effects of phlorizin on vascular complications in diabetes db/db mice. Chin Med J (Engl) 2012; 125: 3692-3696.

193. Raoofi A, Asadi F, Mardjanmehr SH, et al. Blood parameters in female Zandi lambs as affected by liver biopsy methodology. Trop Anim Health Prod 2011; 43: 1385-1388.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı
ETİK KURULUN ADRESİ : Erciyes Üniversitesi

Tarih: 08.02.2012 **Toplantı Sayısı:** 02 **Karar No:** 12/37

Etik kurul toplantısı **08.02.2012** tarihinde Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul **Prof.Dr.Harun ÜLGER** Başkanlığı'nda gerçekleştirilmiştir.

Üye Adı/Soyadı	Unvanı	Bölümü	İmza
Harun Ülger	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	
Abdullah İnci	Prof. Dr.	Vet. Fakültesi	
Özlem Canöz	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	
Hatice Özbilge	Prof. Dr.	Ecz. Fakültesi	
Coşkun Tez	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Füsun F. Erdoğan	Doç. Dr	Tıp Fakültesi	
Serpil Sarıözkan	Doç. Dr.	DEKAM	
M. Betül Aycan	Yrd. Doç. Dr.	Ecz. Fakültesi(Farmakoloji)	
Servet Kesim	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Ahmet Öztürk	Yrd. Doç. Dr	Tıp Fakültesi	
Asiye Gökbelen	Yar. Sevenler Der. Baş.	Sivil top. kuruluşu temsilcisi	—
Serap A. Eroğlu	Avukat	Kurumla ilişkisi olmayan üye	—

Üniversitemiz Veteriner Fakültesi **Doç.Dr.Ali Cesur ONMAZ** tarafından yapılan **"Koyunlarda phlorizinin serum lipid profili ve oksidatif stress parametreleri üzerine etkisi"** adlı araştırma projesi incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına **oy birliğiyle** karar verildi.

ASLINA UYGUNDUR

Tarih : 08.02.2012

Etik Kurul Başkanı İmzası

Etik Kurul Başkanı : Prof.Dr.Harun ÜLGER

Prof Dr Harun Ülger

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı	: İlknur KARACA BEKDİK
Uyruğu	: Türkiye (T.C.)
Doğum Tarihi ve Yeri	: 10.07.1984, Gömürgen /KAYSERİ
Medeni Durumu	: Evli
Tel	: +90 554 860 49 91
Email	: ikaraca_38@hotmail.com
Yazışma Adresi	:Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Melikgazi-KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi…….	2007
Lise	Kağıthane Anadolu Lisesi İSTANBUL	2002

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

A.C. Onmaz, V. Güneş, Ö. Aslan, **İ.K. Bekdik**. Koyunlarda Deneysel Oluşturulan Rumen Asidozunun Elektrokardiyografik Parametreler Üzerine Etkisi, EÜ Sağ Bil Derg. 2011; 20(3): 210-216.