

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KOBAYDA FARKLI DOKULARDAKİ DİFTERİ TOKSİNİ
ETKİSİ-ANTİOKSİDANLARIN BU ETKİDEKİ ROLÜ**

SABİHA TOK

**DANIŞMAN
PROF.DR.RÜSTEM NURTEN**


**BİYO FİZİK ANABİLİM DALI
BİYO FİZİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2009

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

21 / 12 / 2009


Prof. Dr. Tamer Demiralp
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Program Adı : Biyofizik Programı

Programın seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()

Anabilim Dalı : Biyofizik

Tez Sahibi : Sabiha Tok

Tez Başlığı : Kobayda Farklı Dokulardaki Difteri Toksini Etkisi-Antioksidanların Bu Etkideki Rolü

Sınav Yeri : İstanbul Tıp Fakültesi/Biyofizik Anabilim Dalı

Sınav Tarihi : 21 / 12 / 2009

Tez Sınav Jürisi

1. Prof. Dr. Rüstem Nurten (Tez Danışmanı) İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı



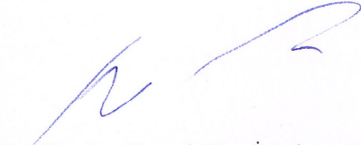
2. Prof. Dr. Bora Barutçu (Tez İnceleme Komitesi Üyesi) İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı



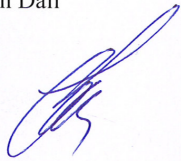
3. Doç. Dr. Işıl Albeniz (Tez İnceleme Komitesi Üyesi) İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı



4. Doç. Dr. Muhammet Bektaş (Tez İnceleme Komitesi Üyesi) İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı



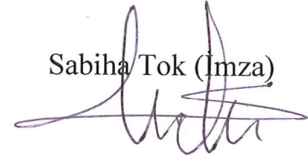
5. Doç. Dr. Handan Tuncel (Tez İnceleme Komitesi Üyesi) İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Sabiha Tok (İmza)



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini esirgemeyen danışmanım sayın Prof. Dr. Rüstem Nurten'e, çalışmalar ve deneyler sırasındaki yardımları için Prof. Dr. Asiye Nurten'e ve MSc. Aslı Zengin'e, kobayların teminindeki yardımlarından dolayı Nevra Alkanlı'ya, tüm Biyofizik Anabilim Dalı üyelerine, ailem ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T 2159

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İ
BEYAN	İİ
İTHAF	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar LİSTESİ	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	İX
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Difteri Toksini	3
2.2. Serbest Oksijen Radikalleri	8
2.2.1. Radyoaktif Işınlardan Hücre İçinde Serbest Radikal Oluşumuna Etkileri	10
2.2.2. Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)	11
2.2.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2).....	13
2.2.4. Hidroksil radikali (OH^{\cdot})	13
2.2.5. Hücrede Reaktif Oksijen Türleri Kaynakları.....	14
2.2.6. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkisi	16
2.2.7. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkisi	16
2.2.8. Serbest Radikallerin DNA ve Nükleik Asitlere Etkisi.....	17
2.2.9. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkisi	17
2.3. Oksidatif Stres	18
2.4. Antioksidanlar	19
2.4.1. α -tokoferol (Vitamin E).....	21
2.4.2. β -Karoten (A vitamini).....	24
2.4.3. Resveratrol.....	26
2.4.4. Kateşinler.....	30

2.4.4.1. Kateşin-Epikateşin	30
2.5. Sinir-Kas Kavşığı (Nöromusküler Kavşak).....	33
2.6. Kas Kasılmasının Özellikleri	34
2.6.1. Kasılma Tipleri (İzotonik ve İzometrik Kasılma).....	34
2.7. Çizgili Kasın Doğrudan ve Dolaylı Uyarılması	34
2.8. Frenik Sinir-Hemidiyafram	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. Gereçler	36
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	36
3.1.1.1. Antioksidanlar	37
3.1.1.2. Radyoaktif Maddeler	37
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	37
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Eriyikler	38
3.1.3.1. Lowry Yöntemi İçin Kullanılan Eriyikler	38
3.1.3.2. Radyoaktivite İçin Kullanılan Eriyikler	38
3.1.3.3. Doku Homojenatlarının Hazırlanması İçin Kullanılan Eriyikler.....	38
3.1.3.4. Organ Banyosu İçin Kullanılan Eriyikler	39
3.1.3.5. Antioksidan Çözücü Eriyikler.....	39
3.2. YÖNTEMLER	39
3.2.1. Kobaylara DT ve Antioksidan Verilmesi.....	39
3.2.2. Kobay Frenik Sinir-Hemidiyafram Preparatının Hazırlanması.....	40
3.2.3. Hemidiyafram Kasılmalarının İzometrik Kaydı.....	41
3.2.4. Dokuların Tartımı ve Parçalanması	43
3.2.5. Homojenleştirme	43
3.2.6. Doku Örneklerinin Protein Belirlenmesi İçin Hazır Hale Getirilmesi.....	43
3.2.7. Lowry Yöntemi İle Protein Belirlenmesi	43
3.2.8. Radyoaktivite Ölçümü.....	44
3.2.9. İstatistik Değerlendirme	45
4. BULGULAR.....	46
5. TARTIŞMA	56
KAYNAKLAR	59
ETİK KURUL KARARI.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	71

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4-1: Difteri toksini ve antioksidanların doğrudan uyarılara verilen yanıtlaE etkisi	54
Tablo 4-2: Difteri toksini ve antioksidanların dolaylı uyarılara verilen yanıtlaE etkisi	55
Tablo 4-3: Difteri toksini ve antioksidanların tetanik dolaylı uyarılara verilen yanıtlaE etkisi	55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: EF-2' nin ADP-ribozillenmesi.....	5
Şekil 2-2: Difteri Toksininin kristalografik yapısı.....	7
Şekil 2-3: α -tokoferolün kimyasal yapısı	23
Şekil 2-4: β -karotenin kimyasal yapısı.....	24
Şekil 2-5: Resveratrolün kimyasal yapısı	27
Şekil 2-6: (+)-kateşin ve (-)-epikateşinin kimyasal yapısı.....	32
Şekil 3-1: Kobay frenik sinir-hemidiyafram preparatının elektroda yerleştirilmesi.....	41
Şekil 3-2: Organ banyosu düzeneği	42
Şekil 3-3: Protein konsantrasyonu ve absorbans değerleri ile oluşturulan standart eğri.....	44
Şekil 4-1: Lowry yöntemi ile belirlenen protein miktarları ve radyoaktivite ölçümü sonuçları.....	46
Şekil 4-2: Karaciğer dokusunda gruptaki ortalama protein ve radyoaktivite miktarları.....	48
Şekil 4-3: Kalp dokusunda gruptaki ortalama protein ve radyoaktivite miktarları.....	49
Şekil 4-4: Kas dokusunda gruptaki ortalama protein ve radyoaktivite miktarları	50
Şekil 4-5: Mide dokusunda gruptaki ortalama protein ve radyoaktivite miktarları	51
Şekil 4-6: Diyafram dokusunda gruptaki ortalama protein ve radyoaktivite miktarları.....	51
Şekil 4-7: Gruplara göre tüm dokulardaki ortalama protein ve radyoaktivite miktarları.....	52
Şekil 4-8: Kalp ve mide dokularındaki cpm/mg protein miktarları	53

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Ach	Asetilkolin
ADP	Adenozin Difosfat
ATP	Adenozintrifosfat
BSA	Sığır Serum Albumini (Bowin Serum Albumin)
CAT	Katalaz
cpm	sayım/dak (counts per minute)
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır Sülfat 5 Hidrat
dak	dakika
dH ₂ O	distile su
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DT	Difteri Toksini
EF-2	Elongasyon Faktör-2
EK	Epikateşin
EGK	Epigallokateşin
EGKG	Epigallokateşingallat
EKG	Epikateşingallat
FA	Fragment A
FB	Fragment B
g	gram
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
Hz	Hertz
IgG	İmmünglobulin G
i.p.	İntraperitonel

i.m.	İntramüsküler
K	Kateşin
kDa	Kilo Dalton
KG	Kateşingallat
KKH	Koroner Kalp Hastalığı
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
mg	miligram
MLD	Minimum Letal Doz
mM	milimolar
ms	milisaniye
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
Nm	Nanometre
Ort	Ortalama
POPOP	(1,4-bis[5-fenil-2-oksazoli]-benzen;2,2'-p-fenilen-bis[5-feniloksazol])
PPO	2,5-difenil oksazol
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
sn	saniye
SOD	Süperoksit Dismutaz
SS	Standart Sapma
TCA	Triklorasetik Asit
5- HT	5-Hidroksitriptofan
μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar

ÖZET

Tok S. Kobayda farklı dokulardaki difteri toksini etkisi-antioksidanların bu etkideki rolü. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2009.

Difteri Toksini (DT), derinlemesine araştırılmış ve oldukça iyi anlaşılmış bakteriyel toksinlerden biridir. Toksin Fragment A (FA) ve Fragment B (FB) olmak üzere iki kesimden oluşmaktadır. FA kesimi, NAD'nin varlığında elongasyon faktör 2 (EF-2)'yi ADP-ribozilleyerek inaktifleştirir ve böylece protein sentezini durdurur. DT'nin, protein sentezini durdurucu etkisinin yanında, programlı hücre ölümünde (apoptoz) rolü olduğu gösterilmiştir. Vücutta normal metabolik olaylar sırasında serbest radikaller özellikle reaktif oksijen türleri üzerinden lipid, protein ve karbonhidratları etkileyerek DNA hasarına ve birçok hastalığın oluşumuna neden olmaktadır. Antioksidanların serbest radikallerle reaksiyona girerek doku hasarını, apoptozu ve birçok hastalığı engellediği bilinmektedir. DT'nin kalp kası üzerinden protein sentezini baskıladığı, bu baskılamanın mitokondri hasarı ile oluştuğu bilinmektedir. DT tüm dokuları hedef almasına karşın kalpte miyokardite, sinir sisteminde demiyelinizasyona neden olmaktadır. Bu nedenle DT'nin etkisi, DT'ye karşı duyarlı oldukları bilinen kobayların (Guinea Pigs), farklı dokularında incelenmiştir. Ayrıca çok yönlü antioksidan etkileri araştırılmış olan α -tokoferol, β -karoten, resveratrol, kateşin ve epikateşin gibi antioksidanların bu etkideki rolü incelenmiştir. Bu amaçla kobaylara belli sürelerde DT ve antioksidanlar enjekte edilmiş, radyoaktif işaretli lösin verilmiş, daha sonra belli dokuları alınarak, radyoaktivite ölçümü ile protein analizleri yapılmıştır. Farklı gruplar ve farklı dokular için, belirlenen protein miktarları ortalamaları alınmış, istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve bazı dokularda sonuçların anlamlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca frenik sinir-hemidiyafram preparatına organ banyosu uygulanarak kasılma yanıtları incelenmiş, DT ve antioksidanların sinir-kas kavşağına etkileri araştırılmıştır. Uyarılara karşı elde edilen kasılma yanıtları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler : Difteri Toksini, antioksidan, kobay (guinea pig), frenik sinir, protein sentezi.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T2159 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

ABSTRACT

Tok S. The Effect of Diphtheria Toxin on Different Tissues of Guinea Pig and the Role of Antioxidants on this Effect. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Biophysics. Master Thesis. . İstanbul. 2009.

Diphtheria toxin (DT) is one of the bacterial toxins which is deeply studied and fully understood. Toxin consist of two fragment known as Fragment A (FA) and Fragment B (FB). FA, in the presence of NAD, inactivate elongation factor 2 (EF-2) by ADP ribosylation and inhibits the protein synthesis. Beside the effect that DT inhibits protein synthesis, it has been also shown that it plays a role in the programmed cell death (apoptosis). During usual metabolic events in body, free radicals cause cellular damage and several disorders by effecting lipids, proteins and carbohydrates via especially reactive oxygen species. It's known that by reacting with free radicals, antioxidants prevent cellular damage, apoptosis and several diseases. It's also known that DT suppress protein synthesis via heart and this suppression occurs by mitochondrial damage. Although DT is on target of all tissues, it causes myocarditis in heart and demyelination in nervous system. Therefore, in this study; the effect of DT on various tissues of guinea pigs which are known to be sensitive to DT was investigated. Furthermore, the role of antioxidants such as α -tocopherol, β -carotene, resveratrol, catechine and epicatechine, the antioxidants properties of those have been studied well , on this effect was investigated. By the aim of this, DT and antioxidants were injected to the guinea pigs at specific times and radioactively tagged leucine was given and after extracting their tissues, protein analysis were performed by radioactivity measurement. For different groups and different tissues, determined protein quantities were averaged, evaluated statistically and it was shown that the results of some tissues are significant. Furthermore, the effects of DT and antioxidants on neuromuscular junction were investigated by studying strain responses of phrenic nerve-hemidiaphragm preparations by the method of tissue bath. The difference between the strain responses to stimulations was found to be significant.

Keywords: Diphtheria toxin, antioxidants, guinea pig, phrenic nerve, protein synthesis.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. T2159

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Difteri toksini (DT) *Corynebacterium diphtheriae*'den elde edilen bir sitotoksindir. DT düzlemsel çift katlı lipid membranlara ve pH'sı 5'in altında olan biyolojik membranların yapısına katılan bir proteindir. Toksinin amino ucundan orta dereceli proteoliz ile elde edilen A kesimi (FA), toksinin enzimatik olarak aktif kısmını oluşturur. Toksinin karboksil ucu, B kesimi (FB), birçok memeli hücrenin yüzeyindeki reseptörlere bağlanır ve düşük pH'da hücreye girmeyi sağladığı düşünülen hidrofobik bölgeler içerir. Sitozolda FA, NAD⁺ 'nın ADP-ribozil kısmının elongasyon faktör 2 (EF-2)'ye kovalent bağlanmasını katalizler, EF-2'yi etkisizleştirerek protein sentezini durdurur. DT'nin protein sentezi durdurucu etkisi, ilk olarak kalp, diyafram ve iskeletle ilgili kaslarda görülmektedir. DT'nin, protein sentezini durdurucu etkisinin yanında, programlı hücre ölümünde (apoptoz) rolü olduğu gösterilmiştir. Toksinin çeşitli organ ve dokulardaki etkisinden konağın ölümüne kadar yol açan olaylar zinciri hakkındaki bilgiler çok açık değildir ve daha fazla çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Canlılarda, kimyasal süreçler, özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Yüksek derecede reaktif olan serbest radikaller farklı moleküller ile kolayca reaksiyona girebilir ve böylece hücrelere, canlıya zarar verebilirler. Reaktif oksijen türlerinin proteinlere, lipidlere ve karbonhidratlara olumsuz etkileri bilinmektedir. Serbest radikallerin proteinlere etkisi proteinlerin amino asit dizisine bağlıdır. Özellikle kükürt içeren triptofan, tirozin, histidin, sistein gibi amino asit yönünden zengin proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Yüksek oranda serbest radikallerin oluşumu hücre ölümüne veya apoptoza neden olur.

Antioksidanlar ise serbest radikallerle reaksiyona girerek hücrelere zarar vermelerini önlerler. Lipid, protein ve DNA gibi yapılarda oluşmakta olan biyolojik moleküller hasarı onarırlar. Hücrede α -tokoferol gibi antioksidanların lipidler üzerinden apoptozu geciktirdiği ve durdurduğu gösterilmiştir. Bu yaklaşım ile antioksidanlarla etkileşebilecek amino asit içeriği ve disülfid bağlarının varlığı, DT'nin etkisinin bu yönüyle incelenmesi gerektiğini düşündürmüştür. Protein sentezini durdurucu etkisinin yanında, programlı hücre ölümünde de rolü olduğu bilinen DT ile antioksidanların etkileşmesi bu mekanizmaları aydınlatmaya katkı sağlayabilir. Bu nedenle çalışmada DT'nin farklı dokulardaki protein sentezine etkisinin, çeşitli çalışmalarda antioksidan

etkileri araştırılmış olan α -tokoferol, β -karoten, resveratrol ve kateşinler gibi bazı antioksidanlar ile birlikte araştırılması amaçlanmıştır. DT'nin sitotoksik etkisinin yanında apoptotik süreçteki etkisinde antioksidanların rolüne yeni bilgiler eklenebilecektir.

Difteri toksininin kalp kası üzerinden protein sentezini baskıladığı, bu baskılamanın mitokondri hasarı ile oluştuğu bilinmektedir. DT tüm dokuları hedef almasına karşın kalpte miyokardite, sinir sisteminde demiyelinizasyona neden olmaktadır. Bu ise kalp krizi ile ölüme neden olmaktadır. Bu nedenlerle de DT'nin bu etkisinin ayrıca çalışmada antioksidanlar ile birlikte sinir-kas kavşağında incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Difteri Toksini

Difteri toksini (DT) *Corynebacterium diphtheriae*' den elde edilen bir sitotoksindir. C. Diphtheriae; sporsuz, kapsülsüz, hareketsiz, aerop, pleomorfik boyanan, 2-6 µm boyunda ve 0,5-1 µm eninde gram pozitif çomak şeklinde bir bakteridir. DT, difteri basilinin hücre dışı bir ürünü olup, protein yapısındadır; ısı, ışık ve bekleme ile toksin özelliğini yitirir, toksoid hale döner.

DT (moleküler ağırlığı 63 kDa) düzlemsel çift katlı lipid membranlara ve pH'sı 5'in altında olan biyolojik membranların yapısına katılan bir proteindir (1, 2, 3). Toksinin amino ucundan orta dereceli proteoliz ile elde edilen A kesimi (fragmenti) FA (moleküler ağırlığı 24 kDa), toksinin enzimatik olarak aktif kısmını oluşturur (4, 5). Toksinin karboksil ucu, B kesimi (fragmenti) FB (moleküler ağırlığı 39 kDa), birçok memeli hücrelerinin yüzeyindeki reseptörlere bağlanır ve düşük pH' da hücreye girmeyi sağladığı düşünülen hidrofobik bölgeler içerir (4, 5) . Hücreyle etkileşim halindeyken FA'nın membran üzerindeki yer değişimi; toksinin endositozla içeri alınmasından sonra asidik hücre içi ile etkinin oluştuğu düşünülmektedir (2, 3, 6). Yer değiştirme süreci yapay olarak plazma membranında, yüzeylerinde toksin içeren hücreleri çevreleyen ortamı asitleştirerek başlatılabilir (2, 3). Sitozolde; FA, NAD⁺'nin ADP-ribozil kısmının elongasyon faktör 2'ye kovalent bağlanmasını katalizler, elongasyon faktör 2'yi inaktifleştirerek protein sentezini durdurur (4, 5).

DT'nin, protein sentezini durdurucu etkisinin yanında, programlı hücre ölümünde (apoptoz) rolü olduğu gösterilmiştir (7).

DT derinlemesine araştırılmış ve oldukça iyi anlaşılmiş bakteriyel toksinlerden biridir. 1800'lerin sonundaki keşfinden beri toksinoloji alanının, merkezi odak noktası olmuştur. Böyle olmasının çeşitli nedenleri vardır. Bu nedenlere; difterinin (*Corynebacterium diphtheriae*) sonuç üreten ajanının; ilk keşfedilen toksinler arasında, izole edilebilen ve saf kültür ortamında gelişebilen ilk bakteriyel patojenlerden biri olması gösterilebilir. Başka bir neden olarak ise, difterinin basit bir hastalık olması ve ana semptomlarının tek bir toksinin etkisine bağlı olması gösterilebilir. Bu gerçeğin farkına varılması ile tek bir molekülün etkinliğini anlayarak, biyokimyasal koşullarda,

bir bakterinin bir insanı nasıl öldürdüğü sorusuna cevap bulunabileceği umudu doğmuştur. Sonuç olarak; DT'nin çeşitli özellikleri, örneğin; genel sitotoksitesi, protein sentezini engelleyebilme kapasitesi ve membran geçişi özelliği, son on yıllarda DT'yi biyolojik bilimlerin en etkin ve heyecan verici konularının merkezine oturtmuştur.

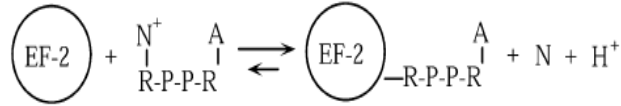
İlk olarak; DT'nin kimyasal doğasını belirleme girişimleri, DT'yi *C. diphtheriae*'nin çoğalabilmesi için gerekli olan kompleks ortamlardan izole edebilmek için elverişli yöntemlerin olmayışı engeline takılmıştır. Fakat; 1937'de, hem Pappenheimer hem de Eaton, toksini, bunun bir protein olduğunun saptamasına yetecek saflıkla izole etmeyi başarmışlardır (8, 9). Toksinin yapısı ve etki mekanizmasını anlamaya yönelik girişimlere II. Dünya Savaşı sekte vurmuştur.

1957'de, düşük konsantrasyondaki DT'nin birçok memeli hücre soy çizgileri için öldürücü olduğunu ve birkaç gün içinde hücre çözülmesine yol açtığı gösterilmiştir (10). Daha sonra fare veya sıçan hücre soy çizgilerinin bu toksine dirençli olduğu bulunmuştur, bu bulgu bu hayvanların DT'ye karşı dirençli olduğu bilgisiyle uyushmaktadır.

Pappenheimer'la birlikte çalışan Strauss ve Hendee; DT'nin, kültür hücrelerinin metabolik işlevlerine olan etkisini ilk defa mercek altına almışlardır (11). 1958'de, bu araştırmacılar; doymuş konsantrasyondaki toksinin, HeLa hücrelerinde yaklaşık 1,5 saat içinde, protein sentezinin tamamen durmasına yol açtığını belirtmişlerdir. Toksinin, glikoliz, solunum, nükleik asit sentezi ve yapısı üzerine etkileri ise ancak bu 1,5 saatlik periyottan çok sonra gözlemlenebilmiştir (11). Bu çalışma, DT'nin özellikle protein sentezi üzerine etki ettiğini gösteren ilk ipucu olmuştur.

1960'lar, DT'nin etkisinin altında yatan temel biyokimyasal reaksiyonların aydınlatılmasına şahit olmuştur. Bu on yılın başlarında, Collier ve Pappenheimer göstermişlerdir ki; HeLa hücrelerinin ve tavşan retikülasitlerinin hücre dışı sistemlerinde; DT, radyoaktif işaretlenmiş amino asitlerin birleşerek proteinlere dönüşmesini engellemektedir (12). Daha da önemlisi, bu inhibisyonun, nikotinamid adenin dinükloid (NAD) olarak tanımlanan, hücrenin düşük moleküler kütleli bir bileşenine bağlı olduğunu bulmuşlardır. Daha sonra, Collier; ökoryotik hücrelerin protein sentezi mekanizmasının DT'ye duyarlı bileşeninin; ribozomlarda polipeptid zinciri uzamasında görev alan, 100kDa'lık bir protein olan elongasyon faktör-2 (EF-2) olduğunu tespit etmiştir (13). Bu bilginin üzerine, Honjo ve ark., Osamu Hayaishi'nin

laboratuvarında; radyoaktif işaretlenmiş NAD preparatı kullanarak, DT'nin; NAD'ın ADP-riboz kısmının EF-2'ye transferini katalize ettiğini kanıtlamışlardır (Şekil 2-1) (14). Bundan bağımsız olarak, Pappenheimer ile çalışan Gill ve ark. da bu mekanizmayı ispat etmiştir (15). Böylece, 1960'ların sonlarında, DT'nin; EF-2'nin ADP-ribozillenmesini katalizleyen bir enzim olduğu kabul edilmiştir.



Şekil 2-1: EF-2' nin ADP-ribozillenmesi.

Böylelikle DT, bakteriyel toksinler sınıfının, hedef proteinin ADP-ribozillenmesine etki ettiği belirlenen ilk üyesi olmuştur. Daha genel olarak ise DT, geniş toksinler sınıfının, sitozolde enzimatik olarak substratı değiştirdiğinin farkına varılan ilk üyesidir.

1969'da Collier ve Cole, DT'nin ADP-ribozillenme etkinliğinin holotoksinin bir özelliği değil, molekülün bir alt birimi veya kesiminin bir özelliği olduğunu bulmuşlardır (16). Collier'in laboratuvarında ve Gill ve ark. tarafından Pappenheimer' ın laboratuvarında yapılan, bunu takip eden çalışmalar, holotoksinin bir proenzim olduğunu ve enzimatik etkinliğinin açıklanabilmesi için kesimlere ayrılabilmesi gerektiğini göstermiştir (17, 18) . 193-kalıntı N-ucu kesimine (FA) toksinin ADP-riboziltransferaz işlevi ve 342-kalıntı C-ucu kesimine (FB) toksini hücre üzerindeki reseptöre bağlama görevi verilmiştir. Böylelikle DT, katalitik ve reseptöre bağlanma işlevleri ayrı polipeptilere bölünmüş A-B toksinlerinin ilk örneği olmuştur. Bu A-B motifinin bugün, hücre içinde etki eden toksinler için genel bir olgu olduğu bilinmektedir.

Safılaştırılmış DT'nin, sitozolik bir protein olan, EF-2'nin ADP-ribozillenmesini katalizlemesinin keşfi, toksinin sitozol-bitişik zarı geçtiğini işaret etmiştir. Bu düşünce, yaygın olarak kabul edilmiş, membranın proteinlere karşı geçirgen olmayışı kanısı ile çelişmiştir, bu durumda DT'nin sıradan bir protein olmaması ve fosfolipid çift katmanını geçebilmek için bir yol geliştirmiş olması gerektiği düşüncesi ortaya çıkmıştır.

1980'lerin başlarında, DT'nin membran translokasyonu ile ilişkili iki önemli keşif yapılmıştır. 1980'de Sandvig ve Oldness ve bundan bağımsız olarak Draper ve Simon; düşük pH'nın, hücre yüzeyine bağlanmış DT'nin A-zincirinin hücre membranından geçini tetiklediğini keşfetmişlerdir (19, 20). Sandvig-Oldness ve Draper-Simonun keşiflerinin açıklaması şöyle olmuştur: hücrede, sitozole translokasyonun düşük pH'ya cevap olarak meydana geldiği bölgelerde, reseptöre bağlı DT endositoza uğrar ve membrana bağlı asidik bölmelere çekilir.

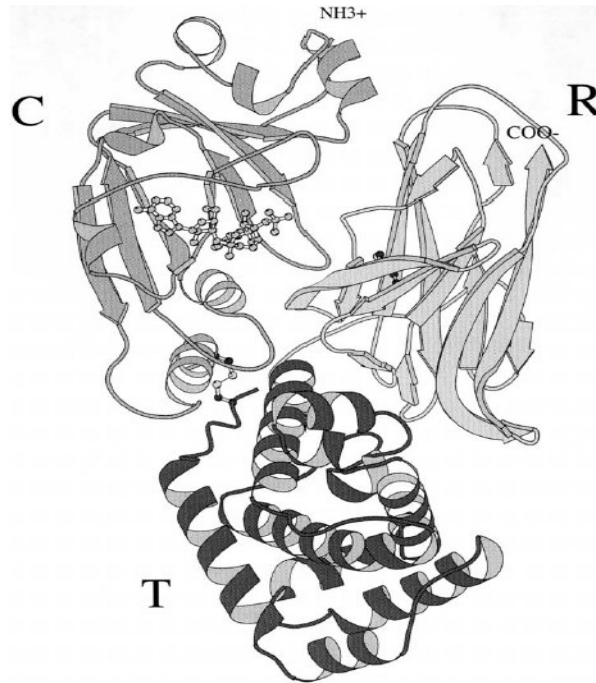
DT'nin translokasyonuna ilişkin ikinci önemli keşif ise Kagan, Finkelstein ve Colombini'nin 1981'de ki bulguları olmuştur (21). Bu bulgular, düşük pH'larda, FB zincirinin N-terminal bölgesinin, yapay membranlarda, iyon-geçirgen kanallar oluştuğuna işaret etmiştir. Donovan ve arkadaşları da DT'nin tamamı için de benzer gözlemler yapmışlardır (22). Daha sonra Roa ve ark., asidik şartlarda, DT'nin FA kısmının fosfolipid kabarcıklara translokasyonuna ilişkin kanıtlar elde etmişlerdir (23).

1980'lerde aynı zamanda DT'nin EF-2'yi inaktifleştirme mekanizmasına ilişkin ilginç gelişmeler kaydedilmiştir. 1980'de Bodley ve ark., EF-2'nin ADP-ribozillen amino asit kalıntısının aslında, çevirim sonrası değişime (post-translasyonel modifikasyon) uğramış bir histidin olduğunu göstermişlerdir (24). Bu kalıntıyı nikotinamid olarak adlandırmışlardır. Diftamidin EF-2'ye özgü olduğu ve bütün ökaryotlardaki EF-2'de bulunduğu saptanmıştır. Daha sonraki çalışmalarda, Bodley ve ark., ve Moehring ve Moehring, diftamidin bir çoklu-enzim reaksiyon zinciri sonucunda meydana geldiğini göstermişlerdir (25, 26). EF-2'nin bu çevirim sonrası değişiminin fizyolojik işlevi günümüzde halen bilinmemektedir ve DT'nin, EF-2'nin çevirim sonrası değişime uğramış bir bölgesini, modifiye etmesinin altında yatan evrimsel yol haritası henüz tam olarak açıklanamamıştır. EF-2'nin diftamidin kısmının ADP-ribozillenmesinin normal hücre fizyolojisinde düzenleyici bir olay olduğu düşünülmektedir ve bunun için bazı kanıtlar mevcuttur (27).

DT'nin EF-2'yi inaktiflestirmesiyle ilişkili diğer bir gelişme ise elverişli bir foto işaretleme reaksiyonunun keşfiyle, DT'nin çok can alıcı bir aktif kalıntısının kimliğinin belirlenmesi olmuştur. Çok önceleri, Kandel, Collier ve Chung; FA'nın NAD'ın basit bir molekülüne ($K_d \sim 8 \mu M$) bağlandığını göstermişlerdir. 1984'te Carrol ve Collier, UV ışınının etkisiyle NAD'ın nikotinamid kısmının, DT'nin özel bir kalıntısına (Glu-148) kovalent olarak transfer olduğunu rapor etmişlerdir (28, 29). Tweten ve ark. direk

mutagenез ile Glu-148'in ADP-ribozillenme katalizinin olmazsa olmazı olduğunu göstermişlerdir (30). Daha sonraları bu Glu' nun geniş ADP-riboziltransferaz enzim ailesinin evrensel olarak korunan tek aktif-yan kalıntısı olduğu belirlenmiştir (31). Montecucco, Papini ve beraberinde çalışanlar His-21'in, NAD bağlanmasında önemli olduğuna dair deliller sunmuşlardır (32). DT'nin ve diğer ADP-riboziltransferazların, bunlar ve diğer aktif-yan kalıntılarının işlevleri direk mutagenез ile derinlemesine incelenmiştir (33).

DT'nin 1992'de üç boyutlu yapısı ilk kez belirlenmiştir. Molekülün, toksinin temel işlevlerinden; kataliz, translokasyon ve reseptöre bağlanabilmesinden sorumlu üç temel katlanabilir bölgeden (C, T, R) meydana geldiği görülmüştür. Böylece C bölgesi FA ile, T ve R bölgeleri de FB ile ilişkilendirilmiştir. Bu bölgeler; T bölgesi alt, C ve R bölgeleri ise açılı üst kısmı oluşturacak biçimde, Y şeklinde dizilmiştir (Şekil 2-2). DT'nin kristalografik yapısının belirlenmesi, molekülün çeşitli işlevlerinin detaylı olarak anlaşılmasına zemin oluşturmuştur.



Şekil 2-2: Difteri Toksininin kristalografik yapısı

DT'nin davranışı hakkında bilinen bütün bu bilgiler ışığında, halen tamamlanamamış, cevabı bulunamamış sorular vardır. Birçok bilmediğimiz nokta olmasına karşın, belki de, bunlardan en önemli ikisi; translokasyonun atomik seviyede anlaşılması ve diftamidin fizyolojik işlevidir (34).

Translokasyonun süreci hakkında gitgide gelişen ayrıntılı bilgilere ulaşılmasına rağmen; halen T bölgesinin nasıl, çift katmanlı yapıdan C bölgesi translokasyonuna aracılık ettiği, temel sorusuna cevap bulunamamıştır. Bunun için T bölgesinin membran içindeki yapısı hakkında daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır. Porların yapısı nasıldır? Monomerik midir, oligomerik mi? Hangi yapısı TH8-TH9 sarmal kıvrımının ve geri kalan bölgesinin membrana uyum göstermesini sağlar? T bölgesinin içeri göçünde hangi olaylar zinciri rol alır? İçeri göç ve translokasyonu hangi enerjetik parametreler yönlendirir? Bu soruların cevabı sadece toksinlerin davranışları değil, aynı zamanda proteinlerin membranlarla etkileşimleri gibi daha genel sorulara da cevap olacaktır (34).

Bu güne kadar cevaplanamamış diğer bir soru ise diftamidin fizyolojik işlevidir. Bütün ökaryotlarda gözlemlenen bu çevirim sonrası değişim önemli bir işlevi işaret etmektedir, fakat bugünkü bilgiler ışığında bu problemin çözümlenmesinin zor olduğu düşünülmektedir. Mutasyon analizleri göstermektedir ki bu kalıntının hücrenin yaşamını sürdürebilmesinde rolü yoktur ve sentezlenmesinin durdurulmasının, hücrenin gelişmesinde temel bir etkisi yoktur (34).

Bu soruların ötesinde, toksinin çeşitli organ ve dokulardaki etkisinden konağın ölümüne kadar yol açan olaylar zinciri hakkındaki bilgiler çok açık değildir ve daha fazla çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2. Serbest Oksijen Radikalleri

Eşlenmemiş (ortaklanmamış) elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanırlar (35). Ancak Fe^{3+} , Cu^{2+} ve Mn^{2+} gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar.

Serbest oksijen radikalleri, oksijenin belirli koşullarda kısmen indirgenmesi sonucu oluşan çok kısa ömürlü ve güçlü oksidan nitelikli oksijen metabolitleridir. Bu

reaktif maddeler bazı biyolojik molekülleri hasara uğratabilirler. Çevrelerindeki moleküller ile reaksiyona girerek onlardan elektron alıp kararlı hale gelirler (36).

Serbest radikaller, hücrelerde iç ve dış kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Dış kaynaklı etmenler arasında; bazı kimyasalların etkisi altında kalma, ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler, antineoplastik ajanlar, alkol ve uyuşturucular gibi alışkanlık yapıcı maddeler bulunması nedeniyle, serbest radikaller toksikolojik açıdan da önemlidir (37).

Aerobik organizmalar için serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Çünkü oksijen, ortamda sürekli bulunan ve elektrofilik ataklara en müsait olan moleküldür (38). Moleküler oksijen (O_2), paralel spin durumlu iki eşleşmemiş elektrona sahiptir. Oksijen, çok güçlü bir oksidan olmamasına rağmen, suya redüksiyonu sonucu çok reaktif ara ürünler oluşmasına neden olur; diğer radikallerle reaksiyona girme özelliğine sahiptir (39).

Organizmada geçiş metallerini (Fe^{2+} ve Cu^+ gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronların transferi suretiyle oksitlenme reaksiyonları meydana gelir. Moleküler oksijen, yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturma eğilimindedir. ROS, normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot})'dir (40). Oksijenin kısmi indirgenmesiyle oluşan singlet oksijen, süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi aktifleşmiş oksijen türleri oldukça reaktiftir ve kalp gibi organlarda toksik etkilere yol açar (41).

Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin olduğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller (R^{\cdot}), peroksit radikalleri (ROO^{\cdot}), alkoksi radikalleri (RO^{\cdot}), tiyil radikalleri (RS^{\cdot}), sülfenil radikalleri (RSO^{\cdot}), tiyil peroksit radikalleri (RSO_2^{\cdot}) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar (40).

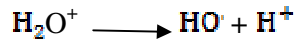
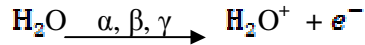
2.2.1. Radyoaktif Işınlarmın Hücre İçinde Serbest Radikal Oluşumuna Etkileri

Radyoaktif ışınlar hücre içinde iyonlaşmalara ve serbest radikal oluşumuna sebep olurlar. Gerek iyonlaşma ve gerekse radikal oluşumu öncelikle hücre kütesinin yaklaşık yüzde 70'ine karşılık gelen su içinde gerçekleşir. Normalde ışın etkisiyle meydana gelen başlıca birincil parçalanma ürünleri, hidrojen (H^{\cdot}) ve hidroksil (OH^{\cdot}) radikalleridir;

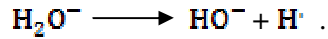
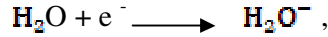


Hidroksil radikalleri genelde radyoaktif ışının bir elektronu açığa çıkarmasıyla iyonlaştırdığı su moleküllerinden türer:

iyonlaşma



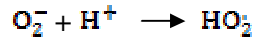
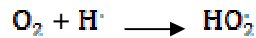
Açığa çıkan elektronun çevredeki su molekülleri ya da hidrojen iyonuyla birleşmesi ise hidrojen radikallerinin oluşumuna yol açar:



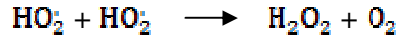
Açığa çıkan ve hidratlanmış elektron, bir hidrojen iyonuyla doğrudan birleşerek de hidrojen radikallerinin oluşumuna yol açabilir:



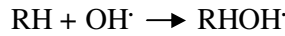
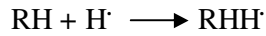
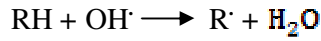
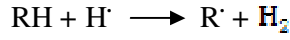
Hidrojen ve hidroksil radikalleri ile serbest hidratlanmış elektron çok reaktif yapılar olarak çevreye difüzlenip, çözülmüş başka yapılarla tepkimeye girer. Bu reaksiyonlar soğurulmuş ışın enerjisinin çevreye dağılımında aracı olur. Bu süreçte yeni, ikincil radikaller oluşabilir ve makromoleküller (ve diğer biyomoleküller) ikincil radikaller üzerinden değişikliğe uğrayabilir. Oluşabilen ikincil radikallerden biri çözülmüş oksijenden türeyen hidroperoksit radikali (H_2O^{\cdot}) dir:



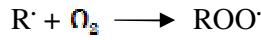
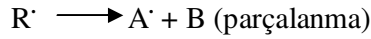
İki hidroperoksit radikalının birleşmesi ile görelî bir kalımlığa sahip, ancak oksitleyici etkisiyle biyolojik maddeye zarar verebilen hidrojen peroksit oluşur:



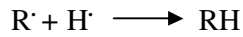
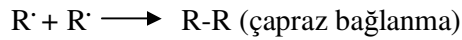
Radikallerin makromoleküllerle tepkimeleri sonunda makromolekül radikallerinin oluşumu gerçekleşir:



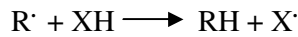
Makromolekül radikallerinin birbirleri ile ya da başka yapılarla tepkimeleri genelde bunların biyolojik işlevlerinin yitimiyle sonuçlanan yapısal değişikliklerle sonuçlanır (42);



(oksitleme)



(eski duruma dönüş)



2.2.2. Süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallerinin kendi kendini oksitlemesiyle süperoksit radikali meydana getirebilir (40). Süperoksit radikali, bir eşlenmemiş elektron içerdiğinden ne çok fazla reaktif, ne de güçlü bir oksidandır. Böyle olmasına rağmen iskemi-reperfüzyon hasarından sorumludur.

Süperoksit radikalinin toksisitesinden, günlük oluşumunun çok fazla olması sorumlu olabilir (43).

Süperoksit radikali kendisi doğrudan zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir, oksidan perhidroksi radikali (HO_2^\bullet) oluşturmak üzere protonlanır (40).

Aerobik canlılarda süperoksit radikali oluşmasına neden olan faktörler iki grupta incelenir, bunlar; çevresel faktörler ve enzimatik veya enzimatik olmayan reaksiyonlardır. Çevresel faktörlerden yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar (alfa, beta, gamma), oksijenden süperoksit radikali oluşumuna neden olurlar. Ayrıca organik moleküllerin bulunduğu ortamda, süperoksit radikali oluşumu iki kat artar. Katekolaminlerin, tiyollerin, ferrodoksinin ve hemoglobinin kendi kendini oksitleme gibi enzimatik veya enzimatik olmayan reaksiyonlar ile de süperoksit radikali meydana gelir (44).

Süperoksit radikali ile perhidroksi radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri oksitlenir diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir. Süperoksit radikali hem oksitleyici hem indirgeyici özelliğe sahiptir. Süperoksit radikalının fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO^\bullet) ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit (ONOO^-) meydana gelir. Peroksinitrit, nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) oluşturmak üzere metabolize edilir. Peroksinitrit, azot dioksit (NO_2^\bullet), hidroksil radikali (OH^\bullet), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşebilir ki nitrik oksitin (NO^\bullet) zararlı etkilerinden peroksinitrit sorumludur (40).

Süperoksit, nötrofillerin bakterisidal etkinliği, apoptoz, inflamasyon ve vasküler işlevlerin düzenlenmesi gibi yararlı etkilere sahiptir. Azalmış süperoksit düzeyleri, bakteriyel enfeksiyonlara artmış bir yatkınlığa yol açabilir. Artmış süperoksit düzeyleri ise süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene dönüştürülerek azaltılır. Böylece hücrel süperoksit düzeyleri sıkı kontrol altındadır. Süperoksidin aşırı yükselmiş glukoz tarafından bozulduğu durumlar da gerçekleşir. Bu

da diyabetin oluşumuna neden olur. ATP sentezi engellenir ve elektron transport zinciri yavaşlar (45).

2.2.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksidin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu meydana gelir (40).

Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin ($O_2^{\cdot-}$) dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da SOD enzimi tarafından katalizlenir.

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde ROS kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali (OH^{\cdot}) oluşturur.

Hidrojen peroksit radikali; ATP düzeyini azaltır; hücre membranı, DNA, kalsiyum depoları ve mitokondri gibi hedef yapıların hasarına neden olur. Bu tür radikaller yüksek konsantrasyonda oldukları zaman hücrenin parçalanmasına yol açarlar (46).

2.2.4. Hidroksil radikali (OH^{\cdot})

Hidroksil radikali, Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır (40). Hidrojen peroksit radikalinin süperoksit radikali ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturduğu 1934' de Haber ve Weis tarafından gösterilmiştir. Hidroksil radikali serbest oksijen radikalleri içinde en aktif ve en toksik olanıdır (46).

Hidroksil radikali, oluştuğu yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS^{\cdot}), karbon merkezli organik

radikaller ($R\cdot$), organik peroksitler ($RCOO\cdot$) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur (40).

2.2.5. Hücrede Reaktif Oksijen Türleri Kaynakları

Hücrede birçok reaktif oksijen türü kaynağı bulunmaktadır. Bunlar;

1. Peroksizomlar

2. Mitokondriyal elektron transport zinciri: Normalde hücrelerde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirindedir. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforillenme zinciri bileşenleri büyük oranda indirgenmiş zaman mitokondriyal süperoksit radikal üretimi artar (40).

3. Enzimler: Enzimlerin katalitik döngüleri sırasında da serbest radikaller ortaya çıkar. Bu enzimlerden biri ksantin oksidaz olup, ksantin oksidazın iskemi-reperfüzyon hasarında önemli faktör olduğu düşünülmektedir. Dihidroorotat dehidrojenaz, flavoprotein dehidrojenaz, amino asit oksidaz ve triptofan dioksijenaz gibi enzimler de serbest radikal oluşmasına neden olurlar (47).

4. Araşidonik asit metabolizması: Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktifleşmesine ve plazma membranından araşidonik asidin serbestleşmesine yol açar. Araşidonik asidin enzimatik oksitlenmesiyle de çeşitli serbest radikal ara ürünleri meydana gelirler. Araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine "enzimatik lipid peroksidasyonu" denir (40).

5. Geçiş metalleri: Geçiş metalleri serbest radikal reaksiyonlarını hızlandıran katalizör vazifesi görürler. Demir ve bakır, tiyollerden tiyil sentezini H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ den $OH\cdot$ sentezini katalizlerler. Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki asıl önemi lipid peroksidasyonundaki etkileriyle ilgilidir. Geçiş metalleri lipid peroksidasyonunu başlatmaktan çok, sentezlenmiş olan lipid hidroperoksitlerinin (LOOH) parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize ederler. Böylece daha az zararlı olan radikalleri daha zararlı hale getirirler (40).

6. Aktifleşmiş fagositler: Fagositoz sırasında hücrede önemli ölçüde serbest radikal meydana gelir. Aktifleşmiş fagositler bakterileri öldürmek için hidrojen peroksit veya hipoklorik asit meydana getirirler. Nötrofillerde süperoksit üretimi NADPH

oksidaz yolu ile olur ve burada da oksijen radikalleri meydana gelir (36). Fagositler, kendilerini oksidanlarına karşı koruyabilirler. Fagositlerin antioksidan sistemleri, süperoksidi hidrojen perokside dönüştüren SOD, hidrojen peroksidi suya indirgeyen katalaz (CAT), hidrojen peroksidi detoksifiye edici glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz sistemi, antioksidan vitaminlerden α -tokoferol (vitamin E) ve askorbik asit (vitamin C) gibi antioksidanlardır (40).

7. Toksik maddeler: Bazı yabancı toksik maddeler de hücrede serbest radikal üretimini artırır. Bunlar doğrudan serbest radikal üretebilirler ya da serbest radikallerin ortadan kaldırılmasını sağlayan antioksidan etkinliği düşürürler. Bunları yaparken; toksinin kendisi bir serbest radikal olabilir, toksin bir serbest radikale metabolize olabilir, toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelebilir ya da toksin antioksidan etkinliği düşürebilir.

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu; enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek kısmi oksijen basıncı (pO_2), ozon (O_3) ve azot dioksit (NO_2), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar. Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler.

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Membranlarda lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran geçirgenliği artar.

Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer amino asit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur.

Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı olur. Hücrede ROS ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir. İskemi sonrasında reperfüzyon da ROS artışına bağlı olarak iskeminin oluşturduğu hücre hasarını artırır. Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarının birçok kronik hastalığın oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Aterogenez, amfizem/bronşit, Parkinson hastalığı, gebelik preeklampsisi, serviks kanseri, alkolik karaciğer hastalığı, hemodiyaliz hastaları, akut renal yetmezlik, Down sendromu,

yaşlanma, retrolental fibroplazi, serebrovasküler bozukluklar, iskemi-reperfüzyon injürisi gibi durumlarda serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarı söz konusudur.

2.2.6. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkisi

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve doymamış yağ asitleri, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu başlatır. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ($L\cdot$) ve lipid peroksit radikallerinin ($LOO\cdot$) oluşması, ROS'nin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri poliansatüre yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar. Lipid radikali ($L\cdot$) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin ($L\cdot$) moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri ($LOO\cdot$) oluşur. Lipid peroksit radikalleri ($LOO\cdot$), membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipidperoksitlerine ($LOOH$) dönüştürür ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitlerinin ($LOOH$) yıkımı geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Lipid peroksitleri ($LOOH$) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından difüzlenerak hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Doğrudan membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle dolaylı olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur (40).

2.2.7. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkisi

Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme derecesi amino asit

kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Serbest radikaller aminoasitler ile reaksiyona girerek sülfidril gruplarının kaybına ve karboksil gruplarının oluşumuna yol açarlar. Bu durum, protein yapısındaki enzimlerin özgün etkinliğini ortadan kaldırır. Hasar gören proteinler ya proteoliz ile ortadan kaldırılır ya da onarılırlar. Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan immüoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin üçüncül yapıları bozulur, normal işlevlerini yerine getiremezler (40).

2.2.8. Serbest Radikallerin DNA ve Nükleik Asitlere Etkisi

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali (OH[•]) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktifleşmiş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit (H₂O₂), membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına neden olur. Reaktif oksijen türleri, peroksidler ile başlayan DNA hasarı sonucu aktifleşen polimeraz enzimi ile reaksiyona girerek DNA' nın onarılması için gerekli NAD ve ATP' nin açığa çıkmasına neden olur. Bu durum hücrenin ATP oluşturma yeteneğini baskılar. Enerji yetersizliği ve kalsiyum dağılımındaki değişiklikler sonucu hücre ölümü meydana gelir (35, 47).

2.2.9. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkisi

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Diyabet, koroner kalp hastalığı (KKH), hipertansiyon, behçet hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları, kanser gibi birçok hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu düşünülmektedir.

Organizmada, çeşitli kaynaklardan gelen serbest radikallere maruz kalınması sonucu, birçok savunma mekanizması gelişir. Serbest radikallerle indüklenen oksidatif stres ile ilgili savunma mekanizmaları; onarım mekanizması, fiziksel savunma ve antioksidan savunmadır. Enzimatik antioksidan savunma kaynakları: süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalazı kapsamaktadır. Memeli hücrelerinde glutatyon ve glutatyon peroksidazlar antioksidan savunma sisteminde yer alırlar (48).

Enzimatik olmayan antioksidanlar askorbik asit, α -tokoferol, glutatyon, karotenoidler, flavonoidler, stilbenler ve diğere antioksidanlardır. Normal koşullar altında bu antioksidanların hücre içi düzeyi ve etkinlikleri arasında denge bulunmaktadır. Bu denge organizmanın canlılığı ve sağlığı açısından gereklidir (49).

2.3. Oksidatif Stres

Hücrede oluşan reaktif oksijen türleri, antioksidan savunma mekanizmalarıyla ortadan kaldırılırlar. Fakat bazen hücre sel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırıldandan daha fazla ROS oluşabilir. Organizmada hücre sel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırıldandan daha fazla ROS'nin meydana gelmesi yani normal fizyolojik şartlarda bir denge halinde olan bu durumun bozulması sonucunda, birçok hastalığın patogene zinden sorumlu tutulan oksidatif stres meydana gelir (50). Kısaca; oksidatif stres, serbest radikallerin oluşumu ve çeşitli antioksidan savunma sistemlerinin dengesizliği olarak tanımlanabilir (51).

Oksidatif stresin, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarıyla birçok kronik hastalığın oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir (40). Oksidatif stresin etkilediği en önemli hastalıklardan biri kalp yetersizliğidir. Kalp yetersizliği gelişen hastalarda SOD, CAT, GSH-Px ve E vitamini gibi miyokardiyal antioksidanlar azalırken, serbest oksijen radikallerinin ve oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir (52). İlaç tedavisiyle hemodinamik işlevi düzelen hastalarda antioksidan depolarında artma, oksidatif streste azalma sağlanabilmektedir (53).

Kalp yetersizliği olan hastalarda olduğu gibi, miyokard infarktüsü geçiren hastalarda da miyokardın infarkt bölgelerinde miyositlerin apoptozu söz konusudur (41). Ayrıca, in vitro çalışmalar ve hayvan modellerinde, iskemi-reperfüzyon, miyokard infarktüsü ve kronik basınç yüklenmesi (hipertansiyon) gibi durumların oksidatif stres oluşturarak apoptoz yoluyla miyosit kaybına neden olduğu gösterilmiştir (54). Oksidatif stresin apoptozdaki rolü birçok hücre tipinde ortaya konmuştur. Adriamisin, UV ışın ve tümör nekroz faktörü (TNF), serbest radikal oluşturarak apoptozu hızlandırır. Öte yandan, SOD, E vitamini ve troluks gibi antioksidanların apoptozu engellediği gösterilmiştir (41).

Beyin hücreleri özellikle oksitlenmenin sebep olduğu hasar riskini taşıdığından, oksidatif stres; Alzheimer's rahatsızlığını da içeren çeşitli nörodejeneratif düzensizliklerin patogenezi ile ilişkilendirilir (47, 55)

Antioksidanlar kültür nöronlarını oksidatif zarardan koruyabilirler ve son zamanlarda birçok antioksidan bileşiğin sinir koruyucu olduğu gösterilmiştir (51).

Reaktif oksijen türleri, hücrel makro moleküllerle etkileşime girebilirler ve bu nedenle hücre içi yapılara zarar verebilirler ve hücre ölümüne yol açabilirler. Çok çeşitli nöronal olmayan ve nöronal hastalıkların patogenezi, ROS'nin hasar verici etkisiyle ilişkilendirilmiştir (51).

2.4. Antioksidanlar

Antioksidanlar, ROS oluşumu sonucunda gelişen hasarı önlemek için vücutta geliştirilmiş olan savunma sistemleri olarak bilinirler (56). Aktif oksijen oluşumunu engelleyerek ya da oluşan aktif oksijenleri tutarak, oksitlenmenin neden olduğu zararları, hücrel düzeyde engellemekte ve dejeneratif hastalıkların oluşumunu durdurmaktadırlar (57). Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda bile hedeflerinin oksitlenme hızını anlamlı şekilde engelleyen moleküllerdir (50).

Canlılarda, kimyasal süreçler, özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Yüksek derecede reaktif olan serbest radikaller farklı moleküller ile kolayca reaksiyona girebilir ve böylece hücrelere, canlıya zarar verebilirler. Antioksidanlar serbest radikallerle reaksiyona girerek hücrelere zarar vermelerini önlerler. Bu özellikleriyle hücrelerin anomalileşme ve sonuç olarak tümör oluşturma risklerini azaltırlar. Antioksidan özelliği keşfedilen birçok farklı madde vardır. Bu maddelerin bir kısmını vücut diyetle alırken, bir kısmını kendisi, serbest radikallere karşı bir savunma sistemi olarak üretir. Vücudun serbest radikallere karşı savunma olarak ürettiği antioksidanlar; katalaz, glutatyon peroksidaz, ve SOD gibi enzimlerdir.

Normal aerobik metabolizma yolu ile bir çok hücrede oksijen ve metabolitleri oluşurken, patolojik durumlarda bu oluşum daha da artar ve oksidan oluşumu iç antioksidan mekanizmaları arttığı zaman doku hasarı gelişir. Normalde kanda ve hücrelerde lipid peroksidasyonunu indükleyen serbest radikal zincir reaksiyonu bloke edilerek, serbest radikal hasarı azaltılmaya çalışılır (58). Yüksek oranda serbest radikallerin oluşumu hücre ölümüne veya apoptoza neden olur (50).

İnsan sağlığı bakımından antioksidan işlevleri ile ön plana çıkan maddeler E ve C vitaminleri, karotenoidler ve fenolik maddelerdir. Fenolik maddeler, meyve, sebze, baharat, tahıl ve içecekler gibi bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır.

Flavanoller de içeren flavonoidlerin serbest radikalleri temizleme, güçlü antioksidan özelliği, hidrolitik ve oksidatif enzimleri (fosfolipaz A2, sitokrom oksijenaz, lipoksijenaz) tutma ve iltihap önleyici etkinlikleri bilinmektedir (57, 59).

Antioksidanların çeşitli çalışma mekanizmaları vardır; bunlar sırasıyla,

1) Onarıcı etki ile serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması: Lipid, protein, ve DNA gibi yapılarda oluşmakta olan biyolojik moleküler hasarı onarma (60),

2) Toplayıcı etki ile serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme,

3) Zincir kırıcı etki ile serbest oksijen radikallerini bağlayarak, zincirlerini kırıp işlevlerini engelleme (64); serbest radikal üreten kimyasal reaksiyonları durdurma (61),

4) Baskılayıcı etki ile serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak etkinliklerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme (40); reaksiyon hızını azaltma (62)

5) Hücresel kinaz yapılarını önleyip oksitlenme reaksiyonlarını durdurma (61),

6) Organizmadaki SOD gibi antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini artırma (63),

olarak yazılabilir.

Antioksidan tüketimindeki artış ve kanser görülme sıklığındaki düşüş arasındaki ilişki ile ilgili de bugüne kadar çok fazla şey irdelenmiştir. Hayvan modelleri ve hücre kültürleriyle yapılan çalışmalarla desteklenmiş epidemiyolojik çalışmaların sonuçları karsinogenez sürecinde oksidatif DNA hasarı olduğu teziyle uyusmaktadır (64). Bu sebeplerden, antioksidan destekleyiciler sık sık kanser önleyici diyet olarak önerilir (65). Ne var ki; reaktif oksijen türlerinin fazla düzeyde oluşumu, hücre ölümünde (apoptoz) hücrenin dahili programlarının etkinleşmesi için önemlidir ki; bunlar kanserli hücreleri öldüren önemli savunma mekanizmalarıdır (66). Bu mekanizmaların, aynı zamanda, etkin kanser kemoterapisi ve ışın tedavisi için kritik önemi vardır.

Apoptoz, iç denetleyicilerin bir hasar ya da işlev bozukluğu tespit ettiği durumlarda meydana gelir ve hücreyi öldüren kaspazlar ve endonükleazları etkinleştiren sinyaller dizisini tetikler. Apoptozun en önemli işlevlerinden biri preneoplastik ve neoplastik hücrelerin yok edilmesidir (67). Hücre ölümünün bir çok formunda, sinyaller

dizisi, reaktif oksijen türlerini temel ara haberci moleküller olarak kullanır (68). Bu, antioksidanların apoptozu engelleme yeteneğinin altında yatan nedendir. Hücrenin lipid bölümlerine ayrılabilen α -tokoferol gibi antioksidanlar apoptozu geciktirebilir veya durdurabilirler (69).

Antioksidan özelliği bilinen birçok madde vardır. Bunlardan bazıları; α -tokoferol (E vitamini), β -karoten (A vitamini), resveratrol ve kateşinler (kateşin, epikateşin)'dir.

2.4.1. α -tokoferol (Vitamin E)

E vitamini ilk defa Evans ve Bishop tarafından 1922 yılında bulunmuştur. Çok güçlü bir antioksidandır. E vitamini içinde alfa, beta, gama ve delta tokoferolleri bulunur. Bunların içinden özellikle α - tokoferol önemli bir antioksidandır. En çok buğday, mısır, pirinç gibi tahıllarda bulunmaktadır. Bunun dışında ayçiçek yağı, mısırözü yağı, ceviz, badem ve yerfıstığı gibi kuru yemişlerde ve yeşil sebzelerde de bulunmaktadır. E vitamininin bilinen en önemli özelliği doğal bir antioksidan olması, peroksidleri ve serbest oksijen radikallerini nötralize edebilmesidir.

E vitamini bulunduğu biyolojik ortamlardaki serbest radikal türlerini toplayarak peroksidasyonun erken döneminde zar fosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerini korumada oksidatif strese karşı ilk savunma hattını oluşturur (61, 63). Bir diğer yol ile de singlet oksijen, süperoksit ve daha çok hidroksil radikallerini indirger (62). Bu işlevini peroksidasyon reaksiyon zincirini sonlandırarak gerçekleştirir. Uzunca bir süre vitamin E'nin antioksidan etkinliğinin sadece bu reaksiyonun zincirini sonlandırarak gerçekleştiği kabul edilmesine karşın bugün E vitamininin radikal giderme, baskılama, onarma ve iç savunmayı artırma mekanizmalarının tümünü kullanabildiği, bu nedenle çok hızlı ve geniş bir antioksidan etki kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir (63).

E vitamini okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir. E vitamini ve C vitamini verilmesinin, yaşlı kişilerde ortalama kan lipid peroksit konsantrasyonlarında bir azalma sağladığı saptanmıştır. Glutatyon peroksidaz ile E vitamini, serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Glutatyon peroksidaz oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırırken E vitamini peroksitlerin sentezini engeller. Serbest radikallerin kanserin başlamasında rol aldığı ve E vitamini ile diğer antioksidanların antikanserojen

etki göstererek kanserin yayılmasını ve tümörün büyümesini önlediği kaydedilmiştir (40).

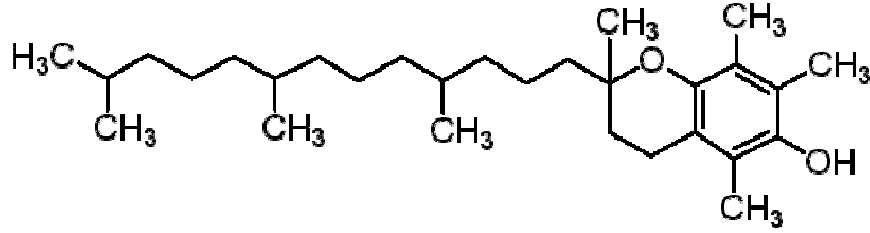
İnsanlarda E vitamini plazma ve eritrositlerde bulunan yağda eriyen ve zincir kıran tek antioksidandır. Membrana özgü bir antioksidan olan E vitamini organizmayı lipid peroksidasyonunun reaktif ürünlerinden ve doku yıkımından korur. Diyetle alınan α - tokoferol lipid peroksidasyona karşı koruma sağlar ve sonuçta steroidlerin neden olduğu karaciğer hücre hasarı ve tümör gelişimine karşı kullanılabilir (70).

E vitamini etkinliği gösteren 6 doğal tokoferol bulunmaktadır. Tokoferoller açık sarı renkte ve yapışkan maddelerdir. Bunlar lipidlerde ve birçok organik eriticide erir fakat suda erimezler; bununla beraber α - tokoferolün sodyum fosfat esteri suda erir. Vitamin E ısıya, alkalilere, asitlere ve ışığa karşı dayanıklıdır, fakat ultraviyole ışınlar karşısında kolayca bozulur (71). Oksitlenince biyolojik etkisini kaybeder, oksijensiz ısıya 200 °C'ye kadar dayanır (72). Tokoferoller kroman halkasındaki metil gruplarının sayısı ve yerlerinin farklı olmasıyla birbirlerinden ayrılırlar (73).

Tokoferollerin büyük kısmı kan dolaşımına lenf yoluyla girer. Tokoferollerin hızlı değişimi plazma lipoproteinleri ve eritrosit membranları arasında oluşur. Oral yolla alınan tokoferoller genellikle iyi absorbe edilirler. Yağlar ve safra tuzları, diğer yağda eriyen vitaminlerde olduğu gibi vitamin E'nin absorpsiyonunu kolaylaştırırlar (71). Tokoferoller ince bağırsakta safranın yardımıyla emülsiyon haline gelir ve sonra absorbe olurlar. Maksimum absorpsiyon E vitamini alındıktan birkaç saat sonra görülür (74). Bozulmuş yağlar E vitaminini oksitleyerek bozulmasına neden olur, mineral yağlar ise bu vitaminin absorpsiyonunu engeller (71, 74). E vitamini, karaciğer ve yağ dokularında depo edilir. Depolama miktarı yaşa ve cinsiyete göre değişir. Yaş ile depolama kapasitesi artar. Hücre içerisinde ise tokoferol mitokondri, mikrozom ve lizozomlarda konsantre olur (71).

Tokoferollerden α - tokoferol, hayvan dokularında, tokoferollerin yaklaşık % 90'nını içerdiği ve biyolojik aktivitede en fazla rol oynadığı için en önemli tokoferol sayılmaktadır (36). α - tokoferol, doğal olarak d izomeri halinde bulunur ve bu şekli ilaç olarak kullanılır; maksimum absorpsiyonu 294 nm'dir (75). Çok kolay oksitlenebilme yeteneğine sahiptir. E vitamininin biyolojik ortamlarda gerçekleştirdiği işlev büyük oranda bu özelliğine dayanmaktadır. Karbontetraklorür, etanol, trikloretilen, metanol, krom ve kromat gibi pek çok çevresel zararlı maddenin hücre üzerinde oluşturduğu

kromozom hasarı ve diğer lezyonların önlenmesinde α -tokoferol bir antioksidan olarak etkilidir. α -tokoferolün kimyasal yapısı şekil 2-3'te gösterilmiştir.



Şekil 2-3: α -tokoferolün kimyasal yapısı

α -tokoferol bir radikal-zincir kırıcısı olarak tanımlanır, ve hidrofobik davranışından dolayı lipid ortamlarda etki gösterir. Bu nedenle α -tokoferolün antioksidan etkisi; membran ve lipoprotein ortamlarındaki direk etkisiyle sınırlıdır (77).

Hayvan ve insanlarda yapılan çalışmalar tokoferollerin deri, mide, mesane, kolon, karaciğer, akciğer, meme ve prostat kanseri gibi deneysel olarak oluşturulan veya spontan meydana gelen tümörlerin gelişmesini geciktirici hatta iyileştirici bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (78-81). Oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda kanser gelişimi ve başta α -tokoferol olmak üzere tüm antioksidanlarda yetmezlik gözlemlendiği bildirilmiştir (82). Özellikle α -tokoferol ve β -karotenin antioksidan aktivitesi kanserle negatif ilişki göstermektedir (83).

E vitamininin antioksidan etkisi ile ilgili araştırmaların önemli kısmı α -tokoferolün deri antioksidan kapasitesini artırdığını ortaya koymaktadır. Cilt yaşlanmasına ve ışığın deri üzerindeki yıpratıcı etkisine karşı daha güçlü bir korunma oluşturmada E vitamini ve kombinasyonları önemli düzeyde etkili olduğu gösterilmiştir (84). Bu kanıyı destekler nitelikte bazı araştırmalara göre, UVA-ışın ve ozona maruz bırakılan hayvanlarda α -tokoferol ve β -karoten uygulamaları SOD ve katalaz gibi hücresel iç antioksidanların etkinliklerini artırarak deri hücrelerindeki yıkımı azaltmaktadır (60).

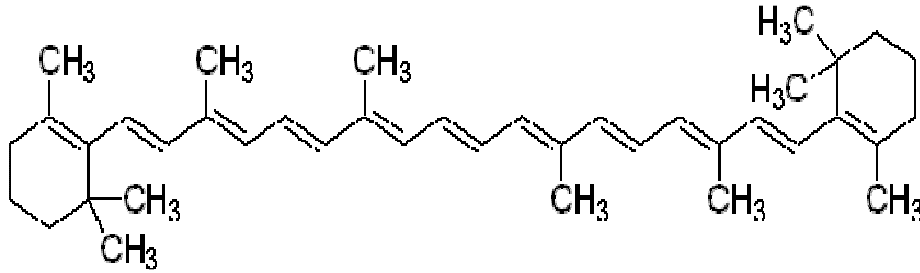
Güneş ışınları ile yoğun olarak karşı karşıya kalınması lipid oksitlenme düzeyini artırarak erken yaşlanma, kanser, kalp hastalığı riskini artırmaktadır. Güneş ışınları ve

diğer ışık kaynakları ile ozonun bu tip sakıncalı tesirlerine karşı E vitamini önemli bir antioksidan olarak kabul edilmeye başlanmıştır.

Erişkin bireylerin %30'unun sorunu olan hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklar da antioksidanlardan yetersiz beslenme ile ilişkilendirilmekte, özellikle E vitamini eksikliğinin rolü üzerinde durulmaktadır.

2.4.2. β -Karoten (A vitamini)

A vitamininin suda eriyebilen öncülü olan β -karoten bir antioksidan olup dokularda peroksit radikallerinin yakalanmasından sorumludur. β -karotenin özellikle kimyasal karsinogenezi de koruyucu rolü olduğu bilinmektedir (85). β -karoten, özellikle düşük oksijen geriliminde, peroksil radikallerini yakalar. Tek değerlikli oksijen radikallerini bağlayan serbest radikal tutucu olarak etkili bir antioksidan olmasının yanı sıra, kimyasal karsinogenezi de önler ve bu etkisini, diğer antioksidanlardan farklı olarak karsinogen ajanlarla çapraz bağlar kurarak gerçekleştirir (86). β -karotenin kimyasal yapısı şekil 2-4'de gösterilmiştir.



Şekil 2-4: β -karotenin kimyasal yapısı

A vitamini oksidatif nedenlerle oluşan hücre yıkımının tamirinde önemli rol oynayan bir vitamindir. A vitamini eksikliği olan sıçanlarda süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzim düzeylerinde azalma ve lipid peroksidasyonunda artma saptanmıştır. Bazı epidemiyolojik çalışmalarda ateroskleroz ve kanser insidansının uygun miktarda β -karoten ve diğer karotenoidleri alan kişilerde daha düşük olduğu saptanmıştır (87).

Karotenoidler, bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenip, hayvanlar tarafından sentezlenemeyen, birçok meyve ve sebze ye parlak rengini kazandıran, doğal

pigmentlerdir. Yediğimiz besinlerde onlarca karotenoid vardır ve bu karotenoidlerin çoğu antioksidan etkiye sahiptir. β -karoten şimdiye kadar üzerinde en fazla çalışılan karotenoidtir; bunun nedeni β -karotenin bir çok ülkede yetişen meyve ve sebzelerde en çok görülen ortak karotenoid olmasıdır. β -karoten ve diğer karotenoidlerin in vitro ve hayvan modellerinde antioksidan özellikleri vardır. Karotenoidlerin karışımı ya da diğer antioksidanlarla birlikteliği serbest radikallere karşı olan etkilerini artırır (88).

Karotenler oksijeni olmayan karotenoidlerdir. Oksijeni olan karotenoidler ksantofil olarak adlandırılır. Diyetle en bol bulunan karotenoid olan β -karoten insan vücudunda iki A vitamini molekülüne dönüşmektedir. β -karoten serbest oksijen radikallerinin oluşumunu önlemesinin yanı sıra radikallerle doğrudan reaksiyona girebilir (89). Sebze ve meyve yeme alışkanlığı az olan bireylerin plazma retinol ve β -karoten düzeyleri bu tür alışkanlığı fazla olan bireylerden düşük çıkmıştır (71).

Doğada 600'ün üzerinde karotenoid bulunur. Bunlardan ortalama 40'ı normal bir insanın diyetinde mevcuttur. Bu karotenoidlerden 14'ü ve bazılarının da metabolitleri insan kanında ve dokularda tespit edilmiştir (90). Birçok epidemiyolojik çalışma karotenoid tüketiminin artmasıyla, kronik hastalık görülme sıklığının azaldığına işaret eder. Ne var ki; bu koruyucu mekanizma tamamen anlaşılabilmiş değildir. Bu konuda çeşitli olasılıklar mevcuttur, bazı karotenoidler; retinoidlere dönüşebilirler (proenzim A etkinliğine sahiptirler), lipoksigenazların enzimatik etkinliğini düzenleyebilirler (proinflamatuvar veya bağışıklık düzenleyici molekül), antioksidan özelliğe sahip olabilirler, bir proteinin üretiminden sorumlu gen anlatımını aktifleştirebilirler (91).

Karotenoidlerin antioksidan etkisinin altında yatan; tek oksijeni tutma özellikleri ve peroksil radikalleri yakalama yetenekleridir (92). Likopen, doğal karotenoidler içinde en etkili, tek oksijen tutucudur (93).

Karotenoidler şu şekilde sınıflandırılır:

1) Karotenoid hidrokarbonlar: karotenler olarak bilinirler ve kendilerine özgü son gruplar içerirler. Likopenlerin iki asiklik son grubu vardır. β -karotenin iki siklohekzen tipi son grubu vardır.

2) Oksijenlenmiş karotenoidler: ksantofilsler olarak adlandırılırlar. Bu bileşiklere örnek olarak a)zeaksantin ve lutein (hidroksi), b)sipriloksantin (metoksi), c)ekinenon (okso), d) anteraksantin (epoksi) verilebilir (94).

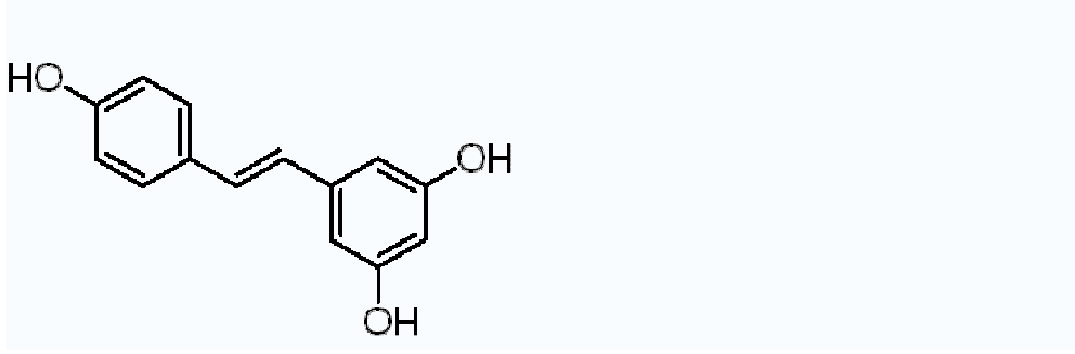
Karotenoidlerin bitkilerdeki biosentetik zinciri şöyledir; fitoen→ fitofuluen → ζ-karoten→nörosporen→likopen→γ-karoten ve β-karoten. Fitoenden likopene kadar olan her enzimatik adımda moleküle bir çift bağ eklenir, bunun sonucu olarak oluşan likopen 13 çift bağ içeren simetrik bir moleküldür. Likopenden sonraki biosentetik adım, son grupların enzimatik döngüsünü içerir, bu da γ-karoten (bir beta halkası) ve β-karotenle (çift beta halkası) son bulur. Moleküle oksijen eklenmesi ksantofil oluşumuna neden olur (94).

Bir meyve ya da sebzedeki her bir karotenoid konsantrasyonu, biosentetik zincirde hangi enzim ya da enzimlerin, enzimatik reaksiyonun hız limitinde olabileceği hakkında fikir verir. Örneğin; kırmızı domatesteki yüksek miktardaki likopen, likopenin γ-karotene dönüştürülmesi için yeterli derecede enzimatik etkinlik olmadığına işaret eder (95).

Meyve ve sebzelerde flavonoidlerin önemli kısmı kabuklarında yer alır. Bu nedenle kabuklarıyla beraber ya da kabuğu fazla derinden soymadan yemek daha faydalıdır. Sebzelerin az haşlanması da, vücudun beta karoteni daha iyi absorbe etmesine yardımcı olur. Havuç, domates, patates, kavun, karpuz, kayısı, mango zengin beta karoten kaynaklarıdır.

2.4.3. Resveratrol

Resveratrol (3,4,5-trihidroksistilben) üzüm tanelerinde bol miktarda bulunan polifenol yapıda doğal bir antioksidan maddedir. Çayda, kırmızı şarapta, üzümde, yer fıstığında, yaban mersininde ve diğer bazı meyvelerde bulunan resveratrolün biyolojik olarak etkinlik gösteren formu trans resveratroidir. Trans resveratrolün antiaterosklerotik, antiinflamatuvar ve kansere karşı koruyucu etkilerini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Resveratrolün trans izomerlerinin yanı sıra cis ve glikozit formu olan piceid formu da vardır (96). Piceid ve resveratrol birçok bitkide organizmanın strese yanıtının bir parçası olarak bulunur. Resveratrolün tüm formları kırmızı üzümde, yeşil üzüme oranla daha fazla miktarda bulunmaktadır. Resveratrolün kimyasal yapısı şekil 2-5'de gösterilmiştir.



Şekil 2-5: Resveratrolün kimyasal yapısı

Resveratrolün hidrofilik konjuge hale gelmesi, kana geçişini, vücutta dağılımını ve salgılanmasını kolaylaştırır. Resveratrol ve metabolitleri karaciğer ve safra kesesi tarafından kandan filtre edilerek safra ile bağırsaklara atılır. Daha sonra geri emilime uğrar. Resveratrol oral yolla alındıktan kısa süre sonra kolonda bulunur. Ancak dokulara dağılımı birkaç saat sürer. Resveratrol karaciğerde glukuronatlanır, karaciğer ve duodenumda sülfatlanır. Sülfatla konjugasyon resveratrolün biyoyararlanımında hız sınırlayıcı basamaktır. Diyetle alınan oral dozun % 70' i plazmada resveratrol ve konjugatları şeklinde tepe noktaya erişir; yarı ömrü dokuz saattir. Değişmemiş resveratrol eser miktarda plazmada saptanır (97).

Resveratrolün sudaki düşük çözünürlüğü göz önüne alındığında proteine bağlı taşındığı düşünülebilir. Hepatoblastoma hücrelerinde resveratrolün taşınma kinetiği incelenmiştir. Buna göre basit difüzyon taşıyıcı aracılı taşınmalar belirlenmiştir. Serum içeren hücre kültüründe resveratrolün pasif taşınmasının, serumsuz kültüre göre iki kat daha yavaş olduğu gösterilmiştir (98).

Biyolojik olarak pozitif etkileriyle tanınan resveratrolün vücuttaki taşınma dağılım mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Resveratrolün sıçanların karaciğerindeki lipid sentezini azalttığı, lökositlerdeki eikozanoid sentezini durdurduğu, araşidonat mekanizmasını engellediği, trombosit agregasyonunu ve bazı protein kinazların etkinliğini engellediği gösterilmiştir. Ayrıca düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL)'i oksitlenmeden korumada vitamin E'ye oranla daha iyi bir antioksidan olduğunu gösteren çalışmalar vardır (98).

Resveratrol izomerlerinin trombositlerde 5-Hidroksitriptofan (5-HT) geri alımı üzerine olan etkileri incelendiği bir çalışmada, cis resveratrolün 5-HT geri alımını engellemede trans izomerine göre daha az etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca major depresyon tedavisinde kullanılan monoaminoksidaz-A (MAO-A) inhibitörleri gibi trans resveratrolün de monoaminoksidaza seçici bir inhibisyon etkisi olduğu gösterilmiştir. Resveratrol bu biyokimyasal etkisini in vivo da gösterirse, doğal bileşenlerin depresyonun tedavisinde kullanılabileceği ileri sürülmektedir (96).

Hücre kültür çalışmalarında resveratrolün birçok tümör hücre serisinde apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca düşük mikromolar derişimlerde resveratrol, antiapoptozisi ve proliferasyonu başlatıcı etkiye sahiptir. Serbest radikaller yüksek derişimde bulduklarında yok edici bir etkiye sahipken, düşük derişimlerdeki radikaller sitokinlerin sinyal mekanizmasını aktive ederek proliferatif yanıt oluştururlar. Resveratrolün siklooksijenaz I ve siklooksijenaz II ile lipooksijenaz izoenzimlerinden LOX-5 ve LOX-15'i engelleyerek apoptozu önlediği gösterilmiştir (99).

Resveratrolün kanseri önleyici özellikleri üzerinde yeterince araştırma yapılmamış olmasına rağmen, ilk araştırmaların sonuçları umut vericidir. Deneysel çalışmalarda kanser oluşumunu engellediği, oluşmuş kanserleri duraklattığı ve tümörün vücudun diğer taraflarına yayılmasını önlediği gösterilmiştir. Antikarsinojen etkisini, bazı enzim sistemlerini ve bağışıklık sistemini uyararak oluşturduğu anlaşılmaktadır (100). Yapılan bir araştırmada, resveratrolün, kanserli hücrelerin kendi kendilerini imha etmelerini sağladığı gözlemlenmiştir. Kanserli hücreler parçalara ayrıldıktan sonra, diğer hücreler tarafından temizlenmiştir. Bu etki, meme, deri ve kan kanseri üzerinde yapılan deneylerde elde edilmiştir. Diğer bazı araştırmalarda da prostat kanseri hücrelerinin artışının durması gözlemlenmiştir. Ayrıca resveratrolün antikarsinojenik etkisini trozin kinaz etkinliğini durdurarak gösterdiği düşünülmektedir. Resveratrol meme kanseri hücrelerinde östrojen reseptör agonisti olarak rol oynamaktadır (101).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda resveratrolün kardiyoprotektif özelliği tespit edilmiştir. Kardiyak hasarın akut ve kronik modellerinde, resveratrol miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarının şiddetini azaltmaktadır (101). Resveratrolün iskemik-reperfüzyon kalpte apoptotik kardiyomiyositleri azalttığı gösterilmiş ve anti-apoptotik etkileri desteklenmiştir. Resveratrol, oksidatif stresin indüklediği apoptotik hücre ölümünü önleyerek ve H₂O₂ yakalayarak, vasküler oksidatif strese direnci

arttırmaktadır. Sığan koroner arter endotel hücresinde resveratrol glutatyon peroksidaz-1 ve hem oksijenaz-1 ifadenmesini arttırarak antioksidan etkilerini göstermektedir. Resveratrol, H₂O₂ ile oluşan apoptotik hücre ölümündeki artışa karşı endotel hücresini korur ve damarların oksidatif strese direncini arttırır (102).

Resveratrol, yüksek oranda doymuş yağ alımıyla ilgili olan KKH azaltan bir maddedir. Resveratrolün, KKH'deki pozitif etkisini trombosit agregasyonunu engelleyerek ve LDL'yi oksitlenmesinden koruyarak gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Düzenli ve ölçülü bir şekilde özellikle kırmızı şarap içilmesinin, trans-resveratrol içerdiğinden dolayı, bu hastalığa yakalanma riskini azalttığı gösterilmiştir (102).

Resveratrol in vivo antioksidan olarak işlev görür, kalpte peroksil radikalini yakalayabilir ve bu yolla iskemi-reperfüzyon hasarından kalbi korur (103). Brito ve ark. (104) sığır aortik endotel hücresinde peroksinitritin aracılık ettiği endotel hücre toksitesinde resveratrolün değişik doz ve sürelerinin etkisini hücre canlılığı, okside ve redükte glutatyon düzeyi ile değerlendirmişlerdir. Resveratrolün peroksinitritin indüklediği oksidatif strese karşı hücre içi indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyini arttırarak kardioprotektif etki sağladığını göstermişlerdir. Glutatyonun hücre yaşamındaki önemi dikkate alındığında; resveratrol, antioksidan özelliği ile kardiyovasküler sistemi koruyucu etkisine yeni bir yaklaşım sağlamakta ve yeni tedavi stratejilerinin gelişimine katkıda bulunmaktadır (105).

Fransa'da kırmızı şarap tüketimi ile kardiyovasküler hastalık sıklığı arasında ters orantı saptanmıştır (Fransız paradoksu) (106). Resveratrol'ün doğal antioksidan rolü üç farklı antioksidan mekanizma ile açıklanmaktadır. Bunlardan biri, koenzim Q ile yarışmak ve ROS oluşum yerinde oksidatif zincir kompleksini azaltmak; diğeri, mitokondride oluşan süperoksit radikalini yakalamak, sonuncusu ise fenton reaksiyonu ürünleri tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunun inhibisyonudur. Birçok çalışmada resveratrolün hem süperoksit hem de hidroksil radikalini yakalama yeteneğinin olduğu gösterilmiştir. Ancak bu özellik diğeri pek çok güçlü antioksidandan daha zayıftır. Resveratrolün hidroksil radikalini yakalayabilmesi, askorbik asit gibi potent bir radikal yakalayıcısından daha yavaştır. Resveratrol in vitro koşullarda ROS'un zayıf yakalayıcısı olmasına rağmen in vivo olarak güçlü bir antioksidan işlevini görür. Resveratrolün in vivo antioksidan özelliği nitrik oksit sentezini arttırma yeteneği ile güç kazanmaktadır. Burada in vivo antioksidan olarak, nitrik oksit süperoksidi

yakalama yeteneğine sahiptir. Resveratrol biyolojik sistemlerde bulunan antioksidanların hücre içi konsantrasyonlarının sürdürülmesini de sağlamaktadır (107). Resveratrolün hidrojen peroksit ile etkinleşen insan lenfositlerinde glutasyon miktarını arttırdığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada da insan lenfositlerinde resveratrolün glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz ve glutasyon-S transferaz gibi glutasyon metabolizması ile ilgili enzimlerin miktarını arttırdığı gösterilmiştir (101).

Antioksidan, anti-enflamatuvar, anti-apoptotik etkileri olan resveratrolün kardiyovasküler hastalıklarının patofizyolojisinde oksidatif hasara karşı koruma sağladığı gösterilmiştir fakat biyokimyasal ve hücre sel mekanizmaları tam olarak açıklanamamıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar iskemi-reperfüzyon hasarının koroner dolaşıma olan etkileri üzerine odaklanmıştır. Reaktif oksijen ürünleri, iskemi-reperfüzyon hasarında önemli olduğu için antioksidanlar hücre hasarını iyileştirmede kullanılmaktadır. Resveratrol antioksidan özelliği ile hücreyi oksidatif hasara karşı korumaktadır (105).

2.4.4. Kateşinler

2.4.4.1. Kateşin-Epikateşin

Serbest radikallerin zararlı etkileri bazı maddeler tarafından azaltılır veya tamamen ortadan kaldırılabilir. Bu maddelerden biri de kateşinlerdir. Bitkilerde yaygın olarak bulunan kateşinler, antioksidan özellikleri olan flavanoid ailesinin alt sınıfından, flavan grubuna dahil polifenolik bileşiklerdir. Yapılan bazı çalışmalarda kateşinin lipid peroksidasyon oluşumuna bağlı olarak artan malonilaldehit düzeyini önemli ölçüde engellediği gösterilmiştir (108).

Epidemiyolojik verilere göre; bitki polifenolü tüketimiyle koroner kalp rahatsızlıkları arasında negatif bir ilişki vardır (109). Kateşinler, serbest oksijen türlerinin neden olduğu kardiyovasküler, nörodejenaratif ve kanser gibi hastalıklara antioksidan etkinlikleri üzerinden etki eden moleküller olarak gösterilmektedir (110). Birkaç hidroksil grubu bulunan flavonoidler sebze ve meyvelerde çokça bulunur ve günlük diyetlerde bunlar sıkça tüketilir.

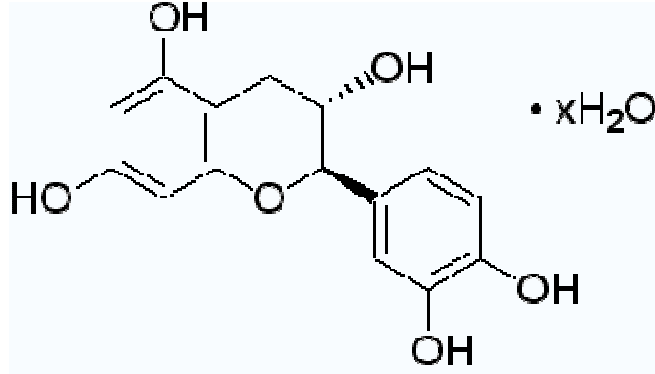
Kateşinler polifenoller grubundan, şarap, çay, meyve ve çikolatada bulunan flavanollerdir. Polifenolik kateşinler ayrıca meyvelerde de bulunmaktadır. Bu grup flavanoller, başlıca kateşin, epikateşin, epigallokateşin alt gruplarını içermektedir.

Kateşinler, doğal antioksidan etkinlikleriyle bilinirler ve bitkilerdeki bu polifenoller, vasküler, viral, gastrointestinal ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılırlar (111).

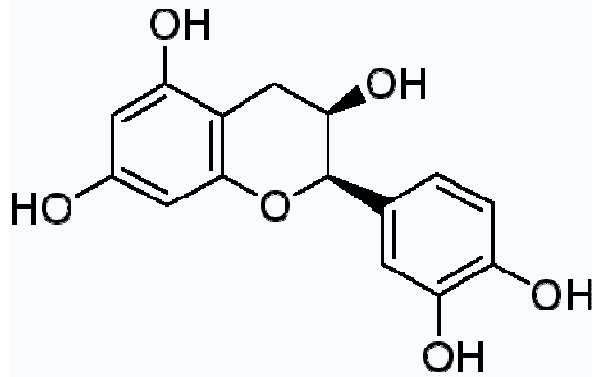
Flavanoidlerin içerdikleri 2,3 çift bağ nedeniyle 8 stereoizomeri bulunmaktadır. Bunlar; (+) kateşin (K), (-) epikateşin (EK), (+) gallokateşin (GK), (-) epigallokateşin (EGK), (+) kateşingallat (KG), (-) epikateşingallat (EKG), (+) gallokateşingallat (GKG), (-) epigallokateşingallat (EGKG)'dir.

Özellikle çayda bulunan kateşinler kimyasal olarak çözünebilen, renksiz moleküllerdir. Moleküllerin kimyasal farklılıkları heterosiklik oksijen halkasının moleküldeki konformasyonuna dayanmaktadır. Kateşinlerin antioksidan potansiyelleri EKG>EGKG>EGK>EK olarak sıralanmaktadır. Bilgilerin analizi sonrasında ortho konfigürasyona sahip olmanın ve içerdikleri hidroksil grubunun sayısının antioksidanların etkinliğini önemli ölçüde etkilediği hipotezi öne sürülmüştür (112). Çay kateşinleri antioksidan etkilerini, hidrojen atomundan serbest radikal alıcısı gibi davranarak, zincir oksitlenme reaksiyonunu keserek gösterirler (112).

Kateşinlerin en önemlileri kateşin ve epikateşindir. (+)-kateşin, C halkasında beta hidroksil (OH) grubu taşıırken, (-)-epikateşin C halkasında alfa OH grubu taşımaktadır (113) (Şekil 2-6). EGKG, çayda en çok bulunan flavanoiddir ve yeşil çay etkinliğinden asıl sorumlu olan bileşendir. Canlı sistemlerde yüksek antioksidan etkinlik gösteren (+)-kateşin ve (-)- epikateşin, sebzelerde bol miktarda bulunan iki flavanoid stereoizomerdir. Flavanoidlerin antioksidan etkinliklerini fenolik hidrojen atomlarını vermek suretiyle serbest radikalleri yakalayarak yaptıkları bilinmektedir. Ancak antioksidan etkinliğinin moleküler etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (113).



(+) -Kateşin



(-)-Epikateşin

Şekil 2-6: (+)-kateşin ve (-)-epikateşinin kimyasal yapısı

(+) -Kateşin ve (-)-epikateşin gibi kateşinlerin antioksidatif özellikleri açısından çeşitli fizyolojik etkileri olduğu bulunmuştur. Bir *ex-vivo* çalışma; yeşil çay tüketiminin, insanlarda LDH'ın oksitlenmesini önlediğini göstermiştir (114). Dahası, bir *in vivo* çalışmada, çay kateşinlerinin, apolipoprotein E eksikliği olan farelerde ateroskleroz oluşumunu azalttığı gözlemlenmiştir (115). Alzheimer's ve Parkinson rahatsızlıkları gibi nörodejeneratif bozuklukların önlenmesinde (-)-epikateşinin bir rolü olabileceği belirtilmiştir (114).

Bu onyılın başlarında yapılan bazı araştırmalar; oral yolla alınan (+)-kateşin ve (-)-epikateşinin sindirim sistemi tarafından emilip, metabolize edildiğini ve konjuge ve/veya metile olmuş formlarının plazmada bulunduğunu göstermiştir (114, 115). Aynı zamanda bazı çalışmalar, insan ve sıçanlarda; kakao tozundan alınan (-)-epikateşinin emildiğini, çeşitli konjuge ve metile formlara metabolize edildiğini ve idrar yoluyla

atıldığı göstermiştir (116). Kırmızı şarap tüketiminden sonra insan plazmasında; (+)-kateşinin konjuge ve/veya metile formlarının bulunduğu gözlemlenmiştir (117). Ayrıca insan ve sıçanlara yeşil çay verilmesinden sonra, plazmalarında (-)-epikateşine rastlanmıştır (118).

2.5. Sinir-Kas Kavşağı (Nöromüsküler Kavşak)

İskelet kas lifleri omuriliğin ön boynuzunun büyük motor nöronlarından başlayan büyük miyelinli sinir lifleri ile inerve edilir. Her sinir lifi normalde birçok kez dallanır ve üç ile birkaç yüz iskelet kas lifini uyarır. Sinir ucu, kas lifiyle lifin ortasına yakın bir yerde, sinir-kas kavşağı denilen bir bağlantı yapar ve aksiyon potansiyeli kas lifinin uçlarına doğru iki yönde yayılır. Kas liflerinin yaklaşık yüzde ikisi dışında, her lifte sadece bir kavşak vardır.

Sinir boyunca depolarizasyon dalgası şeklinde ilerleyen uyarının sinir sonuna geldiğinde kas hücrelerine geçişi (sinir-kas iletimi) bir kimyasal aracı ile sağlanır. Sinir-kas kavşağına asetilkolin (ACh) verilmesinin kas lifi membranında depolarizasyona yol açtığı ve yeterli yoğunluğa ulaştığında uyarının yayılarak kasılma sağladığı bilinmektedir.

Sinir lifi uç kısmında terminal dallara ayrılır ve kas lifinin içine doğru girer, fakat lifin plazma membranının dışında kalırlar. Bu yapının tamamına motor son plak denir. Bu yapı kendisini etraftaki sıvılardan ayıran bir veya daha fazla Schwann hücresi ile çevrilmiştir.

Membranın invajinasyonuna sinaptik oluk veya sinaptik çukur denir ve terminalle lif membranı arasındaki boşluğa sinaptik yarık denir. Bu alan 20-30 nanometre (nm) genişliğindedir. Oluğun tabanında subnöral yarık denen kas membranının yaptığı çok sayıda küçük kıvrım vardır, bunlar sinaptik transmitterin etkili olabileceği yüzey alanını büyük oranda genişletir.

Akson terminalinde bulunan çok sayıda mitokondri başlıca eksitatör transmitter olan ACh sentezi için gerekli enerjiyi sağlar. ACh kas lifini uyarır. ACh sinir terminalinin sitoplazmasında sentezlenir fakat hızla birçok küçük sinaptik veziküle absorbe edilir, bir son plak terminalinde normalde yaklaşık 300 000 adet vezikül vardır. Sinaptik aralıkta bulunan çok miktarda asetilkolinesteraz enzimi asetilkolini sinaptik veziküllerden saldıktan sonra yıkar.

Bir sinir uyarısı sinir-kas kavşağına ulaştığında, yaklaşık 125 ACh vezikülü terminalden sinaptik aralığa boşaltılır. Aksiyon potansiyeli terminal boyunca yayıldığı zaman voltaj kapılı kalsiyum kanalları açılır ve çok miktarda kalsiyumun terminal içine difüze olmasını sağlar. Kalsiyum iyonlarının ACh veziküllerini etkileyerek, onları nöral membranda yoğun çubuklara yakın bölgelere çektiği düşünülmektedir. Bazı veziküller membranla birleşir ve ACh içeriklerini ekzositozla sinaptik aralığa boşaltırlar.

Her reseptör, toplam molekül ağırlığı 275 000 olan büyük bir protein kompleksidir. Kompleks, iki alfa ve birer beta, delta, gama olmak üzere beş protein altbirimden oluşmuştur. Bunlar yan yana gelerek bir tübüler kanal oluştururlar. Kanal, iki alfa altbirim proteinine iki ACh molekülü bağlanıncaya kadar kapalı kalır. Bağlanma biçimsel bir değişikliğe neden olarak kanalın açılmasını sağlar.

ACh kanallarının açılmasının başlıca etkisi çok sayıda pozitif yükü taşıyarak lifin içine girmesidir. Bu, kas lifi membranında son plak potansiyeli denen lokal bir potansiyel değişiklik oluşturur. Daha sonra, son plak potansiyeli kas membranında aksiyon potansiyelini başlatır ve kas kasılmasına neden olur (119).

2.6. Kas Kasılmasının Özellikleri

Tek bir aksiyon potansiyelinin kasta kasılması ve gevşeme oluşturmasına kas sarsısı denir. Kas kasılmasının birçok özelliği tek bir kas sarsısı incelenerek anlaşılabilir. Bunun için bir kasın siniri elektriksel olarak uyarılarak veya kasın kendisine kısa süreli elektriksel uyarı verilerek saniyenin bölümleri içinde sonlanan tek, ani bir kasılma oluşturulur (119).

2.6.1. Kasılma Tipleri (İzotonik ve İzometrik Kasılma)

Kas esnekliği ve viskozitesi fazla olan bir dokudur. Bu özelliği nedeniyle boyunda kısılma olmadan kasılarak gerimini artırabilir; bu şekilde, kasın kısılmadan kasılmasına izometrik kasılma denir. Kastaki gerim sabit kalıp boyunun kısalarak kasılmasına izotonik kasılma denir.

2.7. Çizgili Kasın Doğrudan ve Dolaylı Uyarılması

Çizgili kas doğrudan veya dolaylı olarak uyarılabilir. Çizgili kasın motor sinir yoluyla gelen impulslarla uyarılmasına dolaylı uyarılma denir. Her ne kadar organizmada kasın uyarılması bu şekilde oluşsa da kasın kendine özgü bir uyarılabilirlik yeteneği olduğu da çeşitli şekillerde gösterilebilir. Kasın doğrudan uyarılma dediğimiz

bu yeteneğini göstermek amacı ile kürar denilen ve sinir yoluyla gelen uyarıların kasa geçmesini engelleyen bir maddenin etkisinden faydalanılır. Bir sinir-kas preparatına kürar uygulandıktan sonra siniri uyarılacak olursa, uyarın şiddeti ne kadar artırılırsa artırılırsın, kasta bir kasılma yanıtı meydana gelmez. Kürar, kasın dolaylı uyarılması için gerekli olan plak potansiyelinin doğmasını önler ve böylece sinir yoluyla gelen impulsları etkisiz hale getirir. Buna karşı, aynı preparatın kasına uyarıcı elektrotlar yerleştirilip uygun şiddette bir akım gönderilecek olursa, kas uyarana bir kasılma ile cevap verir. Bu şekilde direk olarak kasa uyarı verilmesiyle kasılmanın sağlanmasına doğrudan uyarılma adı verilir (120).

2.8. Frenik Sinir-Hemidiyafram

Diyafram, göğüs boşluğu ile karın boşluğunu ayıran, frenik sinir tarafından yönlendirilen bir kastır. Frenik sinir, omuriliğin ventral segmentinde bulunan servikal pleksusun üçüncü, dördüncü ve beşinci servikal spinal köklerinden çıkar ve kalp ile akciğerler arasından geçerek diyaframa ulaşır (120). Soluk alma sırasında diyaframın düzenli olarak kasılmasını frenik sinir sağlamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın etik kurul ilkelerine uygun olduğu, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deneysel Hayvanları Etik Kurulunun 26.12.2007 tarihli toplantısında 45 sayılı kararla onaylanmıştır.

3.1. Gereçler

Tez çalışması İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı ve kısmen Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Sinirbilim Anabilim Dalı'nda yürütülmüştür. Deneysel hayvanlar (Guinea Pigs), Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Birimi'nden temin edilmiştir.

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

BSA (Sigma)

CaCl₂ (Merck)

CuSO₄.5H₂O (Reidel)

DT (Sigma)

Folin Fenol Reagent (Fluka)

Glukoz (Sigma)

Hekzan (Merck)

KCl (Merck)

NaCl (Merck)

Na₂CO₃ (Sigma)

NaHCO₃ (Sigma)

NaH₂PO₄ (Merck)

Serum Fizyolojik

TCA (Reidel)

Dioksan, DMSO, Etanol, Eter, Etilen Glikol, Metanol, Naftalin, NaOH, NaK-Tartarat,

POPOP, PPO, Tween 20 ve diğ er t m kimyasal maddeler Sigma ve Merck firmalarından sağlandı.

3.1.1.1. Antioksidanlar

α -tokoferol (Sigma)

β -karoten (Sigma)

Resveratrol (Sigma)

(+)-Kateşin Hidrat (Sigma)

(-)-Epikateşin Hidrat (Sigma)

3.1.1.2. Radyoaktif Maddeler

L-[U- C¹⁴]L ösin (Amersham), 50 μ Ci, 3,8 mCi/mmol

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Sıvı Sintilasyon Cihazı (Tri-Carb 1000 Tr, Packard)

Spektrofotometre (SCHIMADZU)

Homojenleşt irici (Heidolph)

Bıçaklı Homojenleşt irici (IKA WERK)

pH Metre (HI 9321 Microprocessor)

Santrif üj (Hettich)

Isıtmalı Manyetik Karış tırıcı (Electro-mag)

Vorteks (Thermolyne)

Hassas Teraz i (Ragwag WAX110)

Buz Makinesi (HOSHIZAKI)

Hassas Tartı (SCALTEC)

Derin Dondurucu (-80) (NUAIRE)

Derin Dondurucu (-20) (Ş enocak)

İ zole Organ Banyosu Sistemi:

-Poligraf (Grass Mode 7400 Physiological Recorder),

- Veri Görüntüleme ve Analiz Sistemi (PolyVIEW v2.5),
- Termostat (May WBC3044V3)

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Eriyikler

3.1.3.1. Lowry Yöntemi İçin Kullanılan Eriyikler

Lowry A: % 2 Na₂CO₃ 0,1 M NaOH içinde çözüldü.

Lowry B: % 1 CuSO₄ dH₂O içinde çözüldü.

Lowry C: % 2 NaK Tartarat dH₂O içinde çözüldü.

Lowry Stok:

49 ml Lowry A

0,5 ml Lowry B

0,5 ml Lowry C

BSA Stok: 1 mg/ml BSA

Folin Dilüsyonu: Folin Fenol Reagent 1:1 oranında distile su ile seyreltildi.

3.1.3.2. Radyoaktivite İçin Kullanılan Eriyikler

Bray Eriyiği

4 g PPO

0,2 g POPOP

50 g Naftalin

100 ml Metanol

20 ml Etilen Glikol

Dioksan ile 1000 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.3. Doku Homojenatlarının Hazırlanması İçin Kullanılan Eriyikler

% 50 Alkol

% 95 Alkol

Eter-Alkol (1:1)

% 5 TCA Eriyiği

5 ml stok % 100 TCA eriğinden alınarak dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.4. Organ Banyosu İçin Kullanılan Eriyikler

Kreb's Eriyiği

133 mM NaCl

4,9 mM KCl

1,8 mM CaCl₂

11,9 mM NaHCO₃

0,7 mM NaH₂PO₄

11 mM Glikoz içerecek şekilde hazırlandı.

3.1.3.5. Antioksidan Çözücü Eriyikler

30 µg/ml DMSO

1.1 mg/ml Hekzan

% 50 Etanol

% 40 Etanol

% 30 Etanol

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Kobaylara DT ve Antioksidan Verilmesi

Çalışmada, DT'ye karşı duyarlı olması nedeniyle, her iki cinsiyetten 200-250 g arasında genç kobaylar kullanıldı. Kobaylar genel olarak; kontrol grubu, DT verilen grup, antioksidan verilen grup, DT+antioksidan verilen grup olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Çalışmada 5 farklı antioksidan kullanıldığından toplamda 12 grupta çalışma sürdürüldü:

1.Grup (kontrol grubu): Serum fizyolojik

2.Grup: DT

3.Grup: α-tokoferol

4.Grup: β-karoten

5.Grup: Kateşin

- 6.Grup: Epikateşin
- 7.Grup: Resveratrol
- 8.Grup: DT + α -tokoferol
- 9.Grup: DT + β -karoten
- 10.Grup: DT + Kateşin
- 11.Grup: DT + Epikateşin
- 12.Grup: DT + Resveratrol

Her grupta 6 kobay kullanıldı. Kobaylar, deneyin başlamasına 24 saat kala aç bırakıldılar. 1.Gruptaki kobaylara intramüsküler (i.m.) olarak 1ml/kg serum fizyolojik enjekte edildi. 2.Gruptaki kobaylara intramüsküler (i.m.) olarak 20 MLD DT enjekte edildi (Toksin 324 L_f Unite/mg içerecek şekilde çözüldü; 1.0 L_f birim yaklaşık 60 guinea pig MLD'a eşittir). Kobaylara enjekte edilen miktar, enjeksiyondan sonra 24-30 saat arasında kobayların ölümüne neden olmaya yetecek dozdur. Yaklaşık 20 saat sonra hastalık belirtileri görüldü. 3.Gruptaki kobaylara intraperitonel (i.p.) olarak 200 mg/kg olacak şekilde α -tokoferol enjekte edildi. 4.Gruptaki kobaylara i.p. olarak 100 mg/kg olacak şekilde β -karoten enjekte edildi. 5.Gruptaki kobaylara i.p. olarak 9 μ g/kg kateşin enjekte edildi. 6.Gruptaki kobaylara i.p. olarak 6 μ g/kg epikateşin enjekte edildi. 7.Gruptaki kobaylara i.p. olarak 40 mg/kg resveratrol enjekte edildi. 8.-12.Gruplardaki kobaylara i.m. olarak DT verilmeden yaklaşık 30 dakika önce, i.p. olarak yukarıda belirtilen antioksidanlar belirtilen miktarlarda enjekte edildi. Tüm gruplardaki kobaylara yaklaşık 20 saat sonra i.p. olarak [¹⁴C]-lösin enjekte edildi. [¹⁴C]-lösin verildikten yaklaşık 2 saat sonra kobaylara giyotinle dekapitasyon uygulandı. Dekapitasyondan sonra belli dokular (kalp, iskeletle ilgili kaslar, diyafram, vb) alınıp; daha sonra radyoaktivite ölçümü ve protein analizi yapılmak üzere -80 °C'de donduruldu. Frenik sinir hemi-diyafram preparatına ise organ banyosu uygulanarak kasılma yanıtları incelendi.

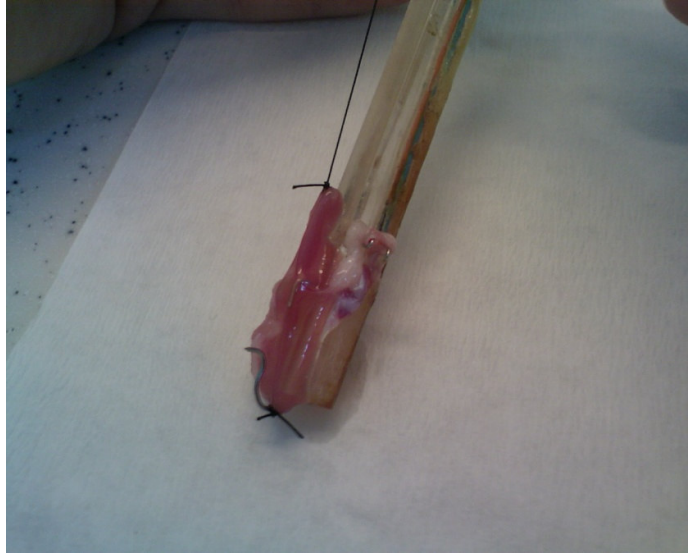
3.2.2. Kobay Frenik Sinir-Hemidiyafram Preparatının Hazırlanması

Çalışmada 200-250 g ağırlığındaki kobaylar (Guinea Pig) kullanıldı. Kobaya servikal dislokasyon uygulanarak baş, boyun hizasından kesilerek ayrıldı. Ksifoid çıkıntının kesilmesiyle oluşan boşluktan yararlanarak toraks ön duvarı açıldıktan sonra

kostalar kesilerek frenik sinirler görünür hale getirildi. Batın açılarak karaciğer ile diyafram arasındaki bağlar da ayrıldıktan sonra kostalardan destek alınarak diyafram tendon hizasından omurgaya kadar kesildi. Hemidiyaframların izole edilmelerinin ardından, önce sol frenik sinir daha sonra sağ frenik sinir timus hizasından diyaframı innerve ettiği bölgeye kadar izole edildi. Frenik sinir-hemidiyafram preparatları kostaların hemidiyaframı taşıyacağı şekilde çıkartıldı. Sağ ve sol preparatlar elektrotlara asılmadan önce organ banyosunda kandan arındırılmak üzere bir süre bekletilerek temizlenmeleri sağlandı.

3.2.3. Hemidiyafram Kasılmalarının İzometrik Kaydı

Dönüştürücüler ucundaki çengellere 2 g ağırlık asılarak veri görüntüleme ve analiz sisteminde izometrik yanıt belirlendi. Organ banyosunu sabit sıcaklıkta tutabilmek için su banyosu 37 °C' ye ayarlandı. Frenik sinir-hemidiyafram preparatı izole edilerek % 95 oksijen ve % 5 karbondioksit gaz karışımı ile havalandırılan organ banyolarına alındı. Kısa bir süre yıkanmaya bırakılan preparatlar elektrotlara bağlanmak üzere mumlu petri kutusuna geçirilerek kostalar üzerinde ağırlık oluşturabilecek dokulardan temizlendi. Hemidiyaframın ve frenik sinirin elektrot üzerindeki platin uçlara değmesi için, preparat kostalara bitişik kısmından elektrotlara sabitlendi (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: Kobay frenik sinir-hemidiyafram preparatının elektroda yerleştirilmesi

Dikey olarak organ banyosuna (şekil 3-2) yerleştirilecek olan preparat hemidiyaframın tendonla birleştiği noktadan dönüştürücüye ipek iplik ile bağlandı. Dönüştürücünün takılı olduğu sistemdeki mikro vida ile ipliği gerdirerek kasa 2 gramlık gerim uygulandı. Preparat, ortama uyum sağlayabilmesi için otuz dakika bekletildi. Dolaylı uyarılara karşı kasılma yanıtları frenik sinirin 0,1 Hz ve 5 ms, doğrudan uyarılara karşı kasılma yanıtları ise hemidiyaframın 0.1 Hz ve 100 ms kare dalga ile uyarılması sonucu elde edildi. Dolaylı ve doğrudan uyarılarla elde edilen supramaksimal kasılma yanıtları için gerekli voltaj belirlendi. Tetanik yanıtlar için frenik sinir-hemidiyafram preparatı dolaylı yoldan 50 Hz ve 3 sn kare dalga ile uyarıldı. Kayıt sonrasında 'PolyVIEW v2.5' veri görüntüleme ve analiz sistemi kullanılarak yanıtlar ölçüldü.



Şekil 3-2: Organ banyosu düzeneği

3.2.4. Dokuların Tartımı ve Parçalanması

Dokular (karaciğer, kalp, kas, mide, diyafram) -80°C 'de derin dondurucudan çıkarılarak yaklaşık yarım saat buz içinde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de çözülmeye bırakıldı. Çözülen dokular hassas terazide 0,5 g tartılarak, buz üzerinde, petri'ye aktarılıp, makas ve penset yardımı ile parçalandı.

3.2.5. Homojenleştirme

0,5 g tartılıp parçalanan dokulardan karaciğer, kalp ve mide, cam doku homojenleştirici preparatına aktararak üzerine 2 ml (4 katı) dH_2O eklenerek homojenleştirici ile homojenleştirildi. Kas ve diyafram ise aynı şekilde 2 ml dH_2O eklenerek bıçaklı homojenleştirici ile homojenleştirildi.

3.2.6. Doku Örneklerinin Protein Belirlenmesi İçin Hazır Hale Getirilmesi

Homojenleştirilen dokular, hassas terazide dengelenerek diferansiyel santrifüj yöntemi ile üst sıvıları alındı. Alınan üst sıvılar tekrar diferansiyel santrifüj yöntemi ile her biri 500 devir/dakika da 5 dakika olmak üzere, % 5 TCA (soğuk) ile 3 kez, % 50 alkol ile 1 kez, % 95 alkol ile 2 kez ve son olarak eter-alkol (1:1) ile 1 kez yıkandı. Hazır hale gelen doku homojenatlarının Lowry Yöntemi ile protein analizi yapıldı ve sıvı sintilasyon cihazı ile radyoaktivite miktarları belirlendi.

3.2.7. Lowry Yöntemi İle Protein Belirlenmesi

Lowry yöntemi ile protein analizi için Folin, BSA stok ve Lowry stok her seferinde taze olarak hazırlandı. Her grup için standart eğriler oluşturuldu. 1 grupta 6 kobay olduğundan ve her kobaydan 5 doku alındığından (30 doku) dolayı, 1 grup için toplamda 37 tüp ile çalışıldı.

İlk 7 tüp standart olmak üzere:

1.tüp: 100 μl dH_2O

2.tüp: 10 μl BSA + 90 μl dH_2O

3.tüp: 20 μl BSA + 80 μl dH_2O

4.tüp: 30 μl BSA + 70 μl dH_2O

5.tüp: 50 μl BSA + 50 μl dH_2O

6.tüp: 75 μl BSA + 25 μl dH_2O

7.tüp: 100 µl BSA

8. ve 37. Tüpler: 100'er µl doku örnekleri

-Tüm tüplere 1 ml Lowry stok eklendi.

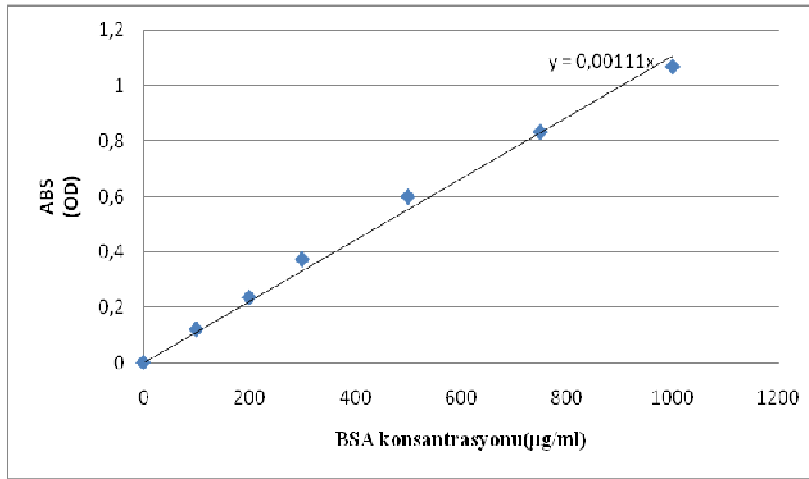
-30 dakika oda sıcaklığında bekletildi (inkübasyon).

-Tüm tüplere 100 µl Folin eklendi.

-30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

-595 nm'de spektrofotometrede absorbans değerleri ölçüldü.

-Protein miktarı ile absorbans değerleri arasında standart eğri çizilip, protein miktarları mg/ml cinsinden belirlendi.



Şekil 3-3: Protein konsantrasyonu ve absorbans değerleri ile oluşturulan standart eğri

3.2.8. Radyoaktivite Ölçümü

Doku homojenatlarından 200 µl alınıp, üzerine 4 ml (20 katı) Bray eriyiği eklenerek sıvı sintilasyon cihazında sayım/dakika (cpm) cinsinden radyoaktivite miktarı ölçüldü. 200 µl hacimde alınan sonuçlar 1 ml'lik hacme göre değerlendirildi. Daha sonra cpm/mg protein miktarları belirlendi.

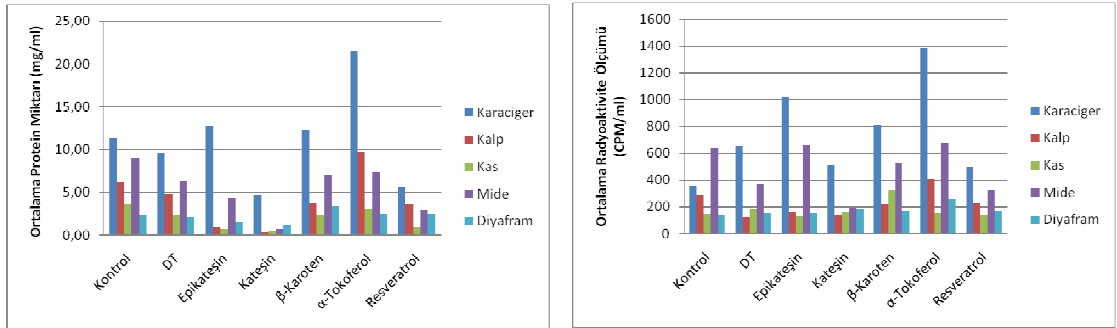
3.2.9. İstatistik Değerlendirme

Dokulardaki protein miktarları ve radyoaktivite ölçümleri farklılıkları tek yönlü ANOVA ve student-t testleri kullanılarak değerlendirildi. Diyaframdaki kasılma yanıtları ise Kruskal-Wallis Testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada DT'nin, kobayların çeşitli dokularında (karaciğer, kalp, kas, mide, diyafram) protein sentezini inhibe edici etkisi ve α -tokoferol, β -karoten, kateşin, epikateşin ve resveratrol gibi çeşitli antioksidanların bu etki mekanizmasını önleyici ya da destekleyici etkilerinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Bu amaçla kobaylar 12 gruba ayrılmıştır. Kobaylara, gruplarına göre belli sürelerde belli miktarlarda maddeler (DT ve antioksidanlar) enjekte edilmiş, daha sonra dekapitasyon işlemi uygulanarak karaciğer, kalp, kas, mide ve diyafram dokuları alınmış, bu dokulardaki protein miktar analizleri Lowry yöntemi ile; radyoaktivite ölçümü likit sintilasyon sayacı ile yapılmıştır (şekil 4-1). Ayrıca frenik sinir-hemidiyafram preparatı hazırlanarak kasılmaların izometrik kaydı organ banyosu kullanılarak, kasılma yanıtları kaydedilmiş ve DT'nin sinir-kas kavşağına etkisi incelenmiştir.



Şekil 4-1: Lowry yöntemi ile belirlenen protein miktarları ve radyoaktivite ölçümü sonuçları

Lowry yöntemi ile belirlenen farklı gruplardaki kobayların karaciğer, kalp, kas, mide, diyafram dokularındaki protein miktarlarındaki farklılıklar ve bu farklılıkların bir anlam ifade edip etmediğinin belirlenebilmesi için tek yönlü ANOVA testi uygulanmıştır. ANOVA testinin sonucunda, farklılıkların anlamlı bulunduğu dokularda, farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek amacıyla Bonferroni Post Hoc testi uygulanmıştır. Kobaylardan izole edilen frenik sinir-hemidiyafram preparatlarına,

dolaylı, doğrudan ve tetanik uyarılar verilmesiyle oluşan kasılma yanıtlarındaki farklılıkların da istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını belirlemek amacı ile Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır.

ANOVA testi sonucunda karaciğer dokusunda farklı gruplarda Lowry yöntemi ile belirlenen protein miktarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Aynı şekilde kalp, kas ve mide dokuları için de istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görülmüştür ($p<0.05$). Fakat diyafram dokusu için farklı gruplardaki protein miktarlarındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Radyoaktivite ölçümlerine göre ise; ANOVA testi sonucunda gruplardaki protein miktarı farklılıkları karaciğer, kalp ve mide dokularında anlamlı ($p<0.05$), kas ve diyafram dokularında anlamsız bulunmuştur.

ANOVA testi sonucunda anlamlı çıkan dokularda yapılan Bonferroni Post Hoc testinin sonuçları:

Karaciğer dokusu

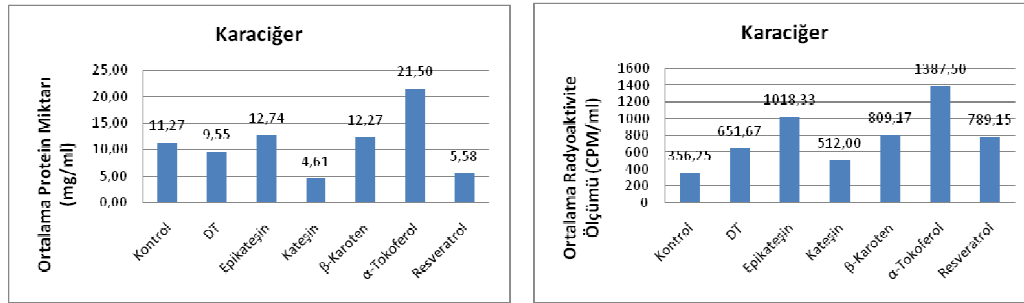
Lowry yöntemiyle elde edilen sonuçlara göre; Kontrol grubunda protein miktarı 11,27 mg/ml iken DT grubunda bu değer 9,55 mg/ml'ye düştüğü görülmüştür. Fakat bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Kontrol grubunda 11,27 mg/ml olarak belirlenen protein miktarı α -tokoferol grubunda 21,50 mg/ml'ye yükselmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Kontrol grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında ise bu değer kateşin grubunda 4,61 mg/ml'ye, resveratrol grubunda 5,58 mg/ml'ye düştüğü; β -karoten grubunda ise 12,27 mg/ml'ye, epikateşin grubunda 12,74 mg/ml'ye yükseldiği belirlenmiş fakat bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (şekil 4-2).

DT grubunda 9,55 mg/ml olan protein miktarı α -tokoferol grubunda 21,50 mg/ml'ye yükselmiş bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). DT grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında ise protein miktarlarındaki farklılıkların anlamsız olduğu görülmüştür (şekil 4-2).

Radyoaktivite ölçümleri ile elde edilen sonuçlara göre; kontrol grubunda 356,25 cpm/ml olan radyoaktivite değeri α -tokoferol grubunda 1387,50 cpm/ml'ye, epikateşin grubunda 1018,33 cpm/ml'ye yükselmiş, kontrol grubu ile bu gruplar arasındaki

farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (şekil 4-2).

DT grubunda 651,67 cpm/ml olan radyoaktivite değeri, α -tokoferol grubunda 1387,50 cpm/ml olarak bulunmuş, DT ile α -tokoferol grupları arasındaki bu fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). DT ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (şekil 4-2).



Şekil 4-2: Karaciğer dokusunda gruptaki ortalama protein ve radyoaktivite miktarları

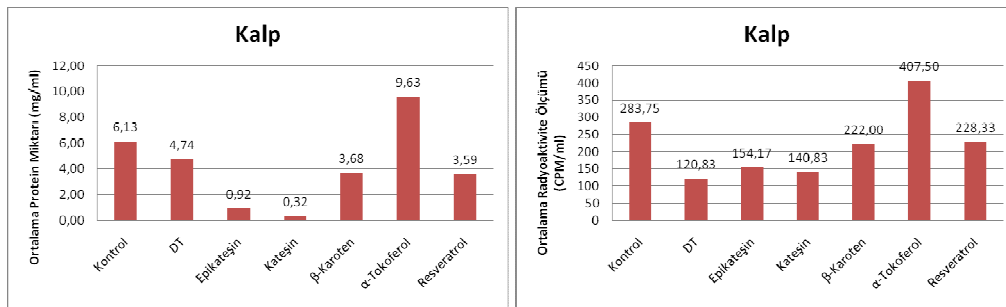
Kalp dokusu

Kontrol grubunda protein miktarı 6,13 mg/ml iken DT grubunda bu değer 4,74 mg/ml'ye düşmüştür. Protein miktarındaki bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubunda 6,13 mg/ml olan protein miktarı, epikateşin grubunda 0,92 mg/ml'ye, kateşin grubunda 0,32 mg/ml'ye düşmüştür, α -tokoferol grubunda ise protein miktarı 9,63 mg/ml'ye yükselmiş ve istatistiksel olarak bu farklılıklar anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). β -karoten grubunda protein miktarı 3,68 mg/ml'ye, resveratrol grubunda 3,59 mg/ml'ye düşmüş, fakat bu farklılıklar anlamlı bulunmamıştır (şekil 4-3).

DT grubunda 4,74 mg/ml olan protein miktarı, α -tokoferol grubunda 9,63 mg/ml, kateşin grubunda 0,32 mg/ml, epikateşin grubunda 0,92 olarak belirlenmiştir. DT grubu ile bu grupların protein miktarları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). DT grubundaki protein miktarı ile diğer gruplardaki protein miktarları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (şekil 4-3).

Radyoaktivite ölçümleri ile elde edilen sonuçlara göre; kontrol grubunda 283,75 cpm/ml olan radyoaktivite değeri α -tokoferol grubunda 407,50 cpm/ml'ye yükselmiş, DT grubunda 120,83'e düşmüş, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca kontrol ile kateşin ve epikateşin grupları arasındaki farklar anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür (şekil 4-3).

DT grubunda 120,83 cpm/ml olan radyoaktivite değeri, α -tokoferol grubunda 407,50 olarak belirlenmiş, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca DT grubu ile β -karoten ve resveratrol grupları arasındaki farklar anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). DT grubu ile diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark görülmemiştir (şekil 4-3).



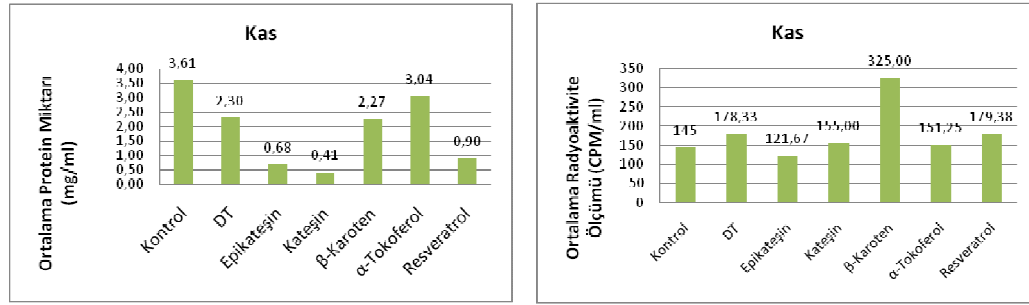
Şekil 4-3: Kalp dokusunda gruplardaki ortalama protein ve radyoaktivite miktarları

Kas dokusu

Kontrol grubunda protein miktarı 3,61 mg/ml iken DT grubunda bu değer 2,30 mg/ml'ye düşmüştür. Protein miktarındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubunda 3,61 mg/ml olarak belirlenen protein miktarı kateşin grubunda 0,41 mg/ml'ye düşmüş, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Protein miktarları epikateşin grubunda 0,68 mg/ml'ye, resveratrol grubunda 0,90 mg/ml'ye, α -tokoferol grubunda 3,04 mg/ml'ye, β -karoten grubunda 2,27 mg/ml'ye düşmüş fakat kontrol grubu ile bu gruplar arasındaki farklılıklar anlamlı bulunmamıştır (şekil 4-4).

DT grubunda 2,30 mg/ml olarak saptanan protein miktarı, α -tokoferol grubunda 3,04 mg/ml'ye yükselirken, diğer gruplarda bu değer düşmüştür. DT grubu ile bu grupların protein miktarları arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır (şekil 4-4).

Radyoaktivite ölçümleri ile elde edilen sonuçlara göre; kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Aynı şekilde, DT grubu ile diğer gruplar arasında da anlamlı bir fark görülmemiştir (şekil 4-4).



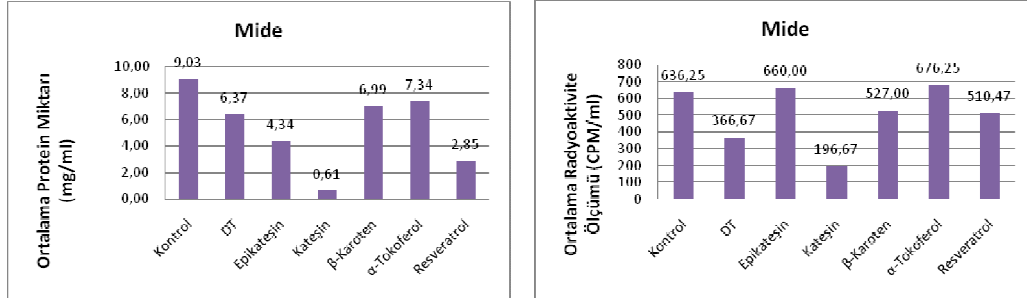
Şekil 4-4: Kas dokusunda gruplardaki ortalama protein ve radyoaktivite miktarları

Mide dokusu

Mide dokusu için kontrol grubunda protein miktarı 9,03 mg/ml iken DT grubunda protein miktarı 6,37 mg/ml'ye düşmüştür. Fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Kateşin grubunda ise protein miktarı 0,61 mg/ml'ye düşmüş, kontrol grubu ile kateşin grubu arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Kontrol grubunda 9,03 mg/ml olarak belirlenen protein miktarı, α -tokoferol grubunda 7,34 mg/ml'ye, β -karoten grubunda 6,99 mg/ml'ye, resveratrol grubunda 2,85 mg/ml'ye, epikateşin grubundada 4,34 mg/ml'ye düşmüştür. Kontrol grubu ile bu gruplar arasındaki protein miktarı farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (şekil 4-5).

DT grubunda 6,37 mg/ml olan protein miktarı, β -karoten ve α -tokoferol gruplarında artmış, diğer gruplarda azalmıştır. Fakat bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (şekil 4-5).

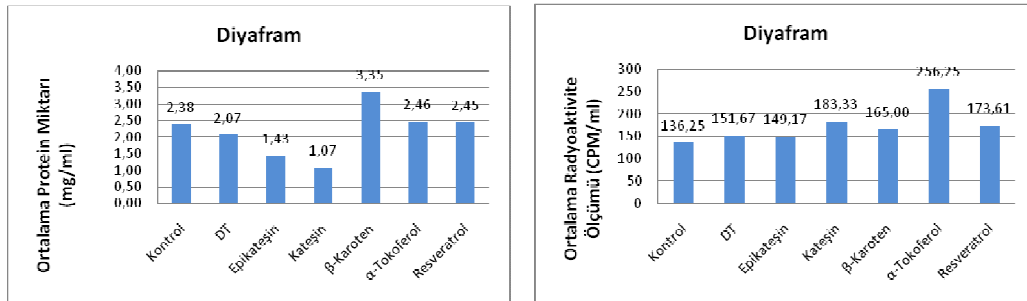
Radyoaktivite ölçümleri ile elde edilen sonuçlara göre; kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Aynı şekilde, DT grubu ile diğer gruplar arasında da anlamlı bir fark görülmemiştir (şekil 4-5).



Şekil 4-5: Mide dokusunda gruplardaki ortalama protein ve radyoaktivite miktarları

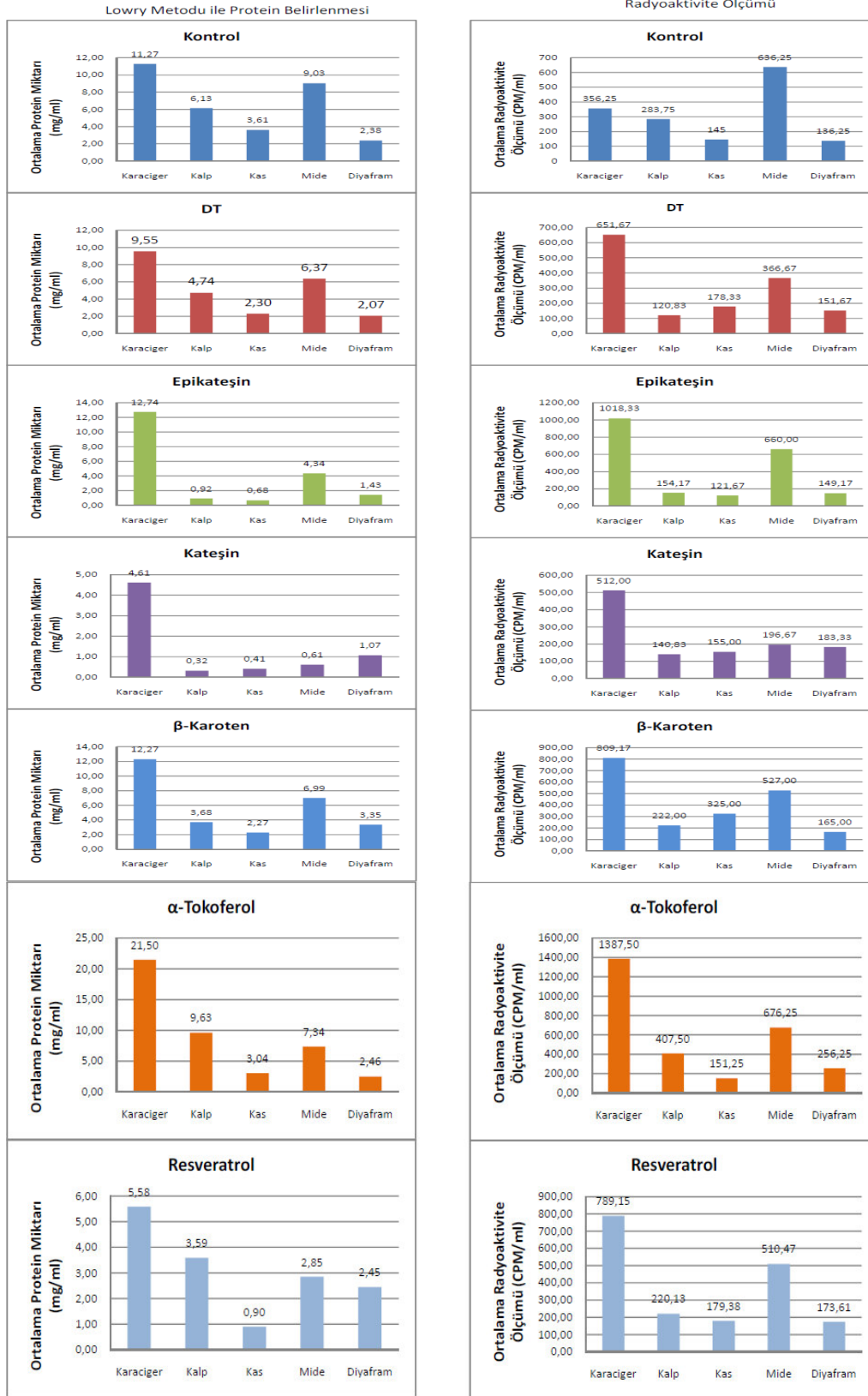
Diyafram dokusu

Diyafram dokusu için, Lowry yöntemi ve radyoaktivite ölçümleri ile elde edilen sonuçlara göre; kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Aynı şekilde, DT grubu ile diğer gruplar arasında da anlamlı bir fark görülmemiştir (şekil 4-6).



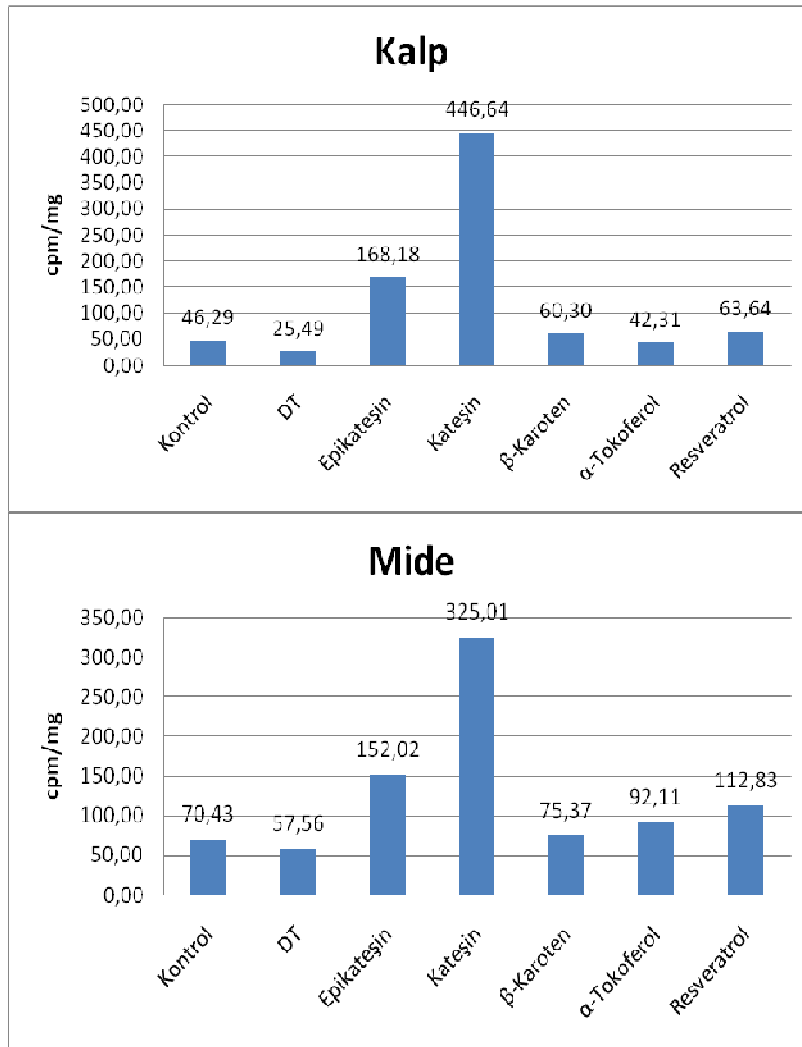
Şekil 4-6: Diyafram dokusunda gruplardaki ortalama protein ve radyoaktivite miktarları

Gruplara göre tüm dokulardaki ortalama protein ve radyoaktivite miktarları karşılaştırmalı olarak şekil 4-7’de gösterilmiştir.



Şekil 4-7: Gruplara göre tüm dokulardaki ortalama protein ve radyoaktivite miktarları

Şekil 4-7'deki değerler mg protein başına radyoaktiflik olarak birleştirilip, radyoaktivite değerleri miligram proteindeki dakikadaki sayım (cpm/mg) cinsinden ifade edilmiştir. Kontrol ve DT grupları karşılaştırıldığında; DT grubunda kontrole göre kalp ve mide dokularında inhibisyon görülmüştür. Kalp dokusunda; kontrol grubunda 46,29 cpm/mg olan değer DT grubunda 25,49 cpm/mg'a düştüğü görülmektedir. Mide dokusunda ise kontrol grubunda 70,43 cpm/mg olan değer DT grubunda 57,56 cpm/mg'a düştüğü görülmektedir (Şekil 4-8). Diğer dokularda ise anlamlı bir farka rastlanmamıştır.



Şekil 4-8: Kalp ve mide dokularındaki cpm/mg protein miktarları

Kobaylardan elde edilen frenik sinir-hemidiyafram preparatlarına dolaylı ve doğrudan, tek ve tetanik uyarılar verilmesiyle oluşan kasılma yanıtları Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde incelendi. Elektriksel uyarılmayla elde edilen bu izometrik yanıtlardaki farklılıkların anlamlı olup olmadığının belirlenebilmesi için Kruskal-Wallis testi uygulandı.

Bu test sonuçlarına göre; Tablo 4-1’de görüldüğü gibi DT uygulanan grupta kontrole göre doğrudan uyarılara verilen kasılma yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu saptandı. Antioksidan uygulanan gruplarda ise kontrol grubuna göre doğrudan uyarılara verilen kasılma yanıtlarında anlamlı değişikli olmadığı saptandı. DT uygulanan grupta antioksidan uygulanan gruplara göre de epikateşin grubu dışında doğrudan uyarılara verilen kasılma yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu saptandı (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: Difteri toksini ve antioksidanların doğrudan uyarılara verilen yanıtlara etkisi

	Doğrudan (ort ± SS)
Kontrol	1,92 ± 0,26
DT	0,98 ± 0,23 ^a
Epikateşin	1,23 ± 0,23
Kateşin	2,67 ± 0,23 ^{bbb}
Resveratrol	2,02 ± 0,24 ^b
Beta-karoten	1,83 ± 0,23 ^b
Alfa-tokoferol	2,45 ± 0,26 ^{bb}
^a	p < 0,05 Kontrol grubuna göre anlamlı
^b	p < 0,05 DT grubuna göre anlamlı
^{bb}	p < 0,01 DT grubuna göre anlamlı
^{bbb}	p < 0,001 DT grubuna göre anlamlı

DT uygulanan grupta ve epikateşin grubu dışında antioksidan uygulanan gruplarda Tablo 4-2’de görüldüğü gibi kontrole göre dolaylı uyarılara verilen kasılma yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu saptandı. DT uygulanan grupta antioksidan uygulanan gruplara göre dolaylı uyarılara verilen kasılma yanıtlarının ise epikateşin grubu dışında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptandı (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: Difteri toksini ve antioksidanların dolaylı uyarılara verilen yanıtlara etkisi

	Dolaylı (ort ± SS)
Kontrol	1,03 ± 0,20
DT	0,47 ± 0,17 ^a
Epikateşin	1,31 ± 0,17 ^b
Kateşin	0,84 ± 0,17 ^a
Resveratrol	0,61 ± 0,18 ^a
Beta-karoten	0,44 ± 0,17 ^{aa}
Alfa-tokoferol	0,55 ± 0,20 ^a
^a p < 0,05 Kontrol grubuna göre anlamlı ^{aa} p < 0,01 Kontrol grubuna göre anlamlı ^b p < 0,05 DT grubuna göre anlamlı	

Tetanik olarak doğrudan uyarılara verilen kasılma yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmadı. Tetanik dolaylı uyarılara verilen kasılma yanıtlarında ise DT uygulanması kontrol, alfa-tokoferol ve resveratrol uygulanan gruplara göre anlamlı azalmaya neden olurken, antioksidan uygulanan gruplarda dolaylı uyarılara verilen kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre anlamlı değişikliğe neden olmadığı saptandı (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: Difteri toksini ve antioksidanların tetanik dolaylı uyarılara verilen yanıtlara etkisi

Tetanik	Dolaylı (ort ± SS)
Kontrol	1,35 ± 0,42
DT	0,78 ± 0,42 ^a
Epikateşin	1,15 ± 0,42
Kateşin	1,52 ± 0,42
Resveratrol	2,56 ± 0,42 ^b
Beta-karoten	1,6 ± 0,39
Alfa-tokoferol	2,16 ± 0,42 ^b
^a p < 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı ^b p < 0,01 DT grubuna göre anlamlı	

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada DT'nin kobayda farklı dokulardaki etkisini ve antioksidanların bu etkideki rolünü araştırmak üzere, DT'ye karşı duyarlı oldukları bilinen kobaylar (guinea pigs) genel olarak 4 gruba ayrılmıştır (kontrol grubu, DT verilen grup, antioksidan verilen grup, DT ve antioksidan birlikte verilen grup). Bu gruplarla oluşturulan toplam 12 grupta sürdürülen çalışmada antioksidanların DT'nin etki mekanizmasında rolü incelenmiştir. Sonuçta antioksidanların DT'nin etki mekanizmasında rolünün olduğu belirlenmiştir.

Kobaylardan alınan dokuların protein analizleri yapıp, radyoaktivite miktarları belirlendikten sonra, farklı gruplardaki dokuların protein miktarları karşılaştırılmıştır. Yapılan bu karşılaştırmalar sonucunda, bir çok grupta belli dokularda belirlenen protein miktarları ortalamalarının farklı olduğu ve dahası bu farklılıkların yapılan istatistiksel testler sonucunda anlamlı olduğu belirlenmiştir. Karaciğer, kalp, kas ve mide dokularında protein miktarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak radyoaktivite ölçümlerine göre sadece karaciğer, kalp ve mide dokularında anlamlı fark görülmüştür. Kas dokusunda belirlenemeyen anlamlılık, kas dokusunun diğer dokulara göre kobayda kütle olarak daha büyük miktarda bulunmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Radyoaktivite değerleri mg proteindeki dakikadaki sayım (cpm/mg) cinsinden belirlenip kontrol ve DT gurupları karşılaştırıldığında, kalp ve mide dokularında inhibisyon olduğu görülmüştür. Bu da DT'nin protein sentezini durdurucu etkisini açık bir şekilde ortaya koymaktadır.

Kontrol ve DT gruplarına antioksidanların etkisinin dokulara göre incelenmesinde; karaciğer dokusunda her iki grupta alfa tokoferolün etkili olduğu, kalpte, kontrol grubunda epikateşin ve kateşinin, DT grubunda ise kateşin ve alfa tokoferolün etkili olduğu; kas dokusunda kontrol grubunda kateşinin, mide de kontrol grubunda kateşinin etkili olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar bazı dokularda belli antioksidanların etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

DT'nin protein sentezini inhibe edici etkisi nedeniyle, sadece DT uygulanan kobaylarda enjeksiyondan yaklaşık 20 saat sonra hastalık belirtileri gözlenmeye başlarken, antioksidan (α -tokoferol, β -karoten, resveratrol, kateşin epikateşin) ve DT'nin birlikte uygulandığı gruplardaki kobaylarda grubuna göre 10 ile 20 saat arasında

değişen sürelerde ölüm oluşmuştur. Bu sonuç oldukça ilginçtir, çünkü DT veya antioksidanların tek başına uygulamalarında ölüm ortaya çıkmamıştır. Antioksidan ile birlikte toksin uygulanan doku kültürü çalışmasında da apoptoz ve hücre ölümünün arttığı gösterilmesi bu bulgularımızı desteklemektedir (121). DT uygulanmasının hem sinirin hem de kasın uyarılması ile oluşan kasılma yanıtlarında azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Antioksidanların uygulanan dozlarda doğrudan uyarılara verilen yanıtlara etkili olmadığı ancak epikateşin hariç diğer antioksidanların bu dozlarda dolaylı uyarılara verilen yanıtları DT'nin etkisine benzer şekilde azalttığı belirlenmiştir. DT ve antioksidanların kasılma yanıtlarına benzer etkileri birlikte uygulandıklarında birbirlerinin etkilerini artırarak hayvanların ölümüne neden olacak harabiyete yol açabileceği ileri sürülebilir.

Antioksidanların, vücutta normal metabolik olaylar sırasında oluşan reaktif oksijen türlerini (ROS) engelleyerek etki ettikleri düşünülmektedir. Antioksidanlar ROS'ni inaktif edebilme özelliğine sahiptir, böylece oksidatif hasara karşı koruma sağlarlar ve apoptozu inhibe edici etki gösterirler (56, 57). Bu bilgiler ışığında, ROS, DT'nin yapısını bozabilir ve antioksidanlar ROS'ni engelleyerek DT'nin etkisini artırıcı rol oynamış olabilir veya ROS oluşumunu engelleyerek hücre membranının DT'ye karşı geçirgenliği arttırmış olabilirler. Bu nedenle çalışmanın bundan sonraki aşamasında ROS'nin etkisinin incelenmesi düşünülmektedir.

Diyafram kası kasılma yanıtları sonuçlarına göre; DT uygulanan grupta kontrol grubuna göre doğrudan ve dolaylı uyarılara verilen kasılma yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu saptanmıştır. Bu bulgular DT'nin etkisini açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Antioksidan uygulanan gruplarda ise dolaylı uyarılara verilen kasılma yanıtlarında kontrole göre anlamlı azalma gözlemlenmiştir. Antioksidanların sinir kas kavşağına etkisini gösteren sınırlı sayıda çalışmada doza bağlı olarak yanıtların değiştiği gösterilmiştir. Bu çalışmada antioksidanların sistemik uygulanması ve uygulanan dozların etkisinin koyalarda dolaylı uyarı yanıtlarını azaltıcı yönde olduğu saptanmıştır. Farklı dozlar uygulanarak kasılma yanıtlarının etkilerinin incelenmesine gereksinim vardır.

Bu çalışmanın sonucunda, DT ile birlikte uygulanan antioksidanlar ve dozları ile koyalarn enjeksiyondan sonraki yaşam süreleri de göz önüne alındığında antioksidanların DT'nin etkisini artırıcı yönde etki oluşturduğunu ancak

antioksidanların bu etkiyi ne şekilde yaptığını anlayabilmek için, antioksidanların etki mekanizmalarının ve bu mekanizmalarda rol oynayan faktörlerin incelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Donovan J J, Simon MI, Draper RK, Montal M. Diphtheria toxin forms transmembrane channels in planar lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981; **78**: 172-176.
2. Draper RK, Simon MI. The entry of diphtheria toxin into the mammalian cell cytoplasm: evidence for lysosomal involvement. *J. Cell Biol.* 1980; **87**: 849-854.
3. Sandvig K, Olsnes S. Rapid entry of nicked diphtheria toxin into cells at low pH. *J. Biol. Chem.* 1981; **256**: 9068-9076.
4. Collier JR. Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriol. Rev.* 1975; **39**: 54-85.
5. Pappenheimer AM Jr. Diphtheria toxin. *Annu. Rev. Biochem.* 1977; **46**: 69-94.
6. Sandvig K, Olsnes S. Entry of the toxic proteins abrin, modeccin, ricin, and diphtheria toxin into cells. II. Effect of pH, metabolic inhibitors, and ionophores and evidence for toxin penetration from endocytic vesicles. *J. Biol. Chem.* 1982; **257**: 7504-7513.
7. Griffiths GD, Leek MD, Gee DJ. The toxic plant proteins ricin and abrin induce apoptotic changes in mammalian lymphoid tissues and intestine. *J. Pathol.* 1987; **151**: 221-229.
8. Pappenheimer AM Jr. Diphtheria toksin – I: isolation and characterization of a toxic protein from *C. diphtheriae* filtrates. *J. Biol. Chem.* 1937; **125**: 543.
9. Eaton MD. The purification and concentration of diphtheria toxin. *J. Bact.* 1936; **31**: 347.
10. Placido Sousa C, Evans DG. The action of diphtheria toxin on tissue cultures and its neutralization by antitoxin. *Brit. J. Exp. Path.* 1957; **38**: 640-644.
11. Strauss N Jr, Hendee ED. The effect of diphtheria toxin on the metabolism of HeLa cells. *J. Exp. Med.* 1959; **109**: 145-163.

12. Collier RJ, Pappenheimer AM Jr. Studies on the mode of action of diphtheria toxin-II: effect of toxin on amino acid incorporation in cell-free systems. *J. Exp. Med.* 1964; **120**: 1019-1039.
13. Collier RJ. Effect of diphtheria toxin on protein synthesis: inactivation of one of the transfer factors. *J. Mol. Biol.* 1967; **25**: 83-98.
14. Honjo T, Nishizuka Y, Hayaishi O. Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 1968; **243**: 3553-3555.
15. Gill DM, Pappenheimer AMJ, Brown R, Kurnick JT. Studies on the mode of action of diphtheria toxin. VII Toxin-stimulated hydrolysis of nicotinamide adenine dinucleotide in mammalian cell extracts. *J. Exp. Med.* 1969; **129**: 1-21.
16. Collier RJ, Cole HA. Diphtheria toxin subunit active in vitro. *Science* 1969; **164**: 1179-1181.
17. Collier RJ, Kandel J. Structure and activity of diphtheria toxin-I: thiol-dependent dissociation of a fraction of toxin into enzymically active and inactive fragments. *J. Biol. Chem.* 1971; **246**: 1496-1503.
18. Gill DM, Pappenheimer AMJ. Structure-activity relationships in diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* 1971; **246**: 1492-1495.
19. Sandvig K Jr, Olsnes S. Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *J. Cell Biol.* 1980; **87**: 828-832.
20. Draper RK, Simon MI. The entry of diphtheria toxin into the mammalian cell cytoplasm: evidence for lysosomal involvement. *J. Cell Biol.* 1980; **87**: 849-854.
21. Kagan BL, Finkenstein A, Colombini M. Diphtheria toxin fragment forms large pores in phospholipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981; **78**: 4950-4954.
22. Donovan JJ, Simon MI, Draper RK, Montal M. Diphtheria toxin forms transmembrane channels in planar lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981; **78**: 172-176.
23. Roa M Jr, Kagan BL, Boquet P, İçinde Falmagne P, Alouf JE, Fehrenbach FJ, Jeljaszewics J, Thelestam M, editörler. *Structure/funtion Relationships*

of Tetanus Toxin. A Comparison with the Diphtheria Toxin Molecule. New York, Bacterial Protein Toxins, 2nd European Workshop: Gustav Fischer Verlag; 1985. pp. 27-32.

24. Van Ness BG Jr, Howard JB, Bodley JW. ADP-ribosylation of elongation factor 2 by diphtheria toxin, NMR spectra and proposed structures of "rybosyl-diphthamide" and its hydrolysis products. *J. Biol. Chem.* 1980; **255**: 10710-10716.

25. Chen J-YC, Bodley JW. Biosynthesis of diphthamide in *Saccharomyces cerevisiae*. Partial purification and characterization of a specific S-adenosylmethionine: elongation factor 2 methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 1988; **263**: 11692-11696.

26. Moehring JM, Moehring TJ. Diphthamide: in vitro biosynthesis. *Methods. Enzymol.* 1984; **106**: 388-395.

27. Fendrick JL, Inlewski WJ, Moehring JM, Moehrin TJ. Characterization of the endogenous ADP-ribosylation of wild-type and mutant elongation factor 2 in eukaryotic cells. *European Journal of Biochemistry* 1992; **205**: 25-31.

28. Kandel J, Collier RJ, Chung DW. Interaction of fragment A from diphtheria toxin with nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Biol. Chem.* 1974; **249**: 2088-2097.

29. Carroll SF, McCloskey JA, Crain PF, Oppenheimer NJ, Marschner TM, Collier RJ. Photoaffinity labeling of diphtheria toxin fragment A with NAD: structure of the photo product at position 148. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985; **82**: 7237-7241.

30. Tweten RK Jr, Barbieri JT, Collier RJ. Diphtheria toxin. Effect of substituting aspartic acid for glutamic acid 148 on ADP-ribosyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* 1985; **260**: 10392-103094.

31. Bazan JF, Koch-Nolte F. Sequence and structural links between distant ADP-ribosyltransferase families. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 1997; **419**: 99-107.

32. Papini E, Schiavo G, Sandona D, Rappuoli R, Montecucco C. Histidine 21 is at the NAD⁺ binding site of diphtheria toxin. *J. Biol Chem.* 1989; **264**: 12385-12388.

33. Wilson BA Jr, Reich KA, Weinstein BR, Collier RJ. Active-site mutations of diphtheria toxin: effects of replacing glutamic acid-148 with aspartic acid, glutamine, or serine. *Biochemistry* 1990; **29**: 8643-8651.
34. Collier RJ. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon* 2001; **39**: 1793-1803.
35. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol* 1993; **23(1)**: 21-48.
36. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 1995; **41(12)**: 1819-28.
37. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet. Fak. Derg.* 2004; **15(1-2)**: 91-96.
38. Adalı M, Inal Erden M, Akalın A, Efe B. Effects of propylthiouracil, propranolol, and vitamin E on lipid peroxidation and antioxidant status in hyperthyroid patients. *Clin. Biochemistry* 1999; **32(5)**: 363-67.
39. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci C. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine* 2005; **39**: 841 – 852.
40. Altınışık M. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. 28.05.2007, www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf.
41. Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc. Res.* 1998; **40**: 426-32.
42. Bermek E, Nurten R, Tiryaki D, Gökçe S. *Biyofizik Ders Notları*, İstanbul: İstanbul Tıp Fakültesi Yayınevi.
43. Liochev SI, Fridovich I. The role of O₂ in the production of HO• in vitro and in vivo. *Free Radical Biol. Med.* 1994; **16**:29-33.
44. Hileman EA, Achanta G, Huang P. Superoxide dismutase: an emerging target for cancer therapeutics. *Expert Opin. Ther. Targets* 2001; **5(6)**: 697-710.
45. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 2001; **54**: 176-186.
46. Al Omar M, Beedham C, Alsarra I. Pathological roles of reactive oxygen species and their defence mechanisms. *Saudi Pharm J* 2004; **12(1)**: 1-18.

47. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen MT. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993; **90**: 7915-22.
48. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 2003; **349**: 1605-1613.
49. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007; **39**: 44-84.
50. Maxwell SRJ. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 1995; **49**: 315-61.
51. Behl C. Vitamin E protects neurons against oxidative cell death in vitro more effectively than 17- β estradiol and induces the activity of the transcription factor NF- κ B. *J. Neural Transm.* 2000; **107**: 393-407.
52. Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am. J. Pathol.* 1996; **148**: 291-300.
53. Khaper N, Singal PK. Effects of afterload-reducing drugs on pathogenesis of antioxidant changes and congestive heart failure in rats. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1997; **29**: 856-61.
54. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J. Clin. Invest.* 2005; **115**: 500-8.
55. Coyle JL, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; **262**: 689-695.
56. Halliwell B. Cellular stress and protection mechanisms. *Biochem. Soc. Transac.* 1996; **24**: 1023-7.
57. Tosun İ, Karadeniz B. Çay ve çay fenoliklerinin antioksidan aktivitesi. *OMÜ Zir. Fak. Dergisi* 2005; **20**: 78-83.
58. Reilly PM, Schiller J, Bulkley GB. Pharmacological approach to tissue injury mediated free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am. J. Surg.* 1991; **161**: 488-503.

59. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 1999; **64**: 555-559.
60. Evelson P, Ordonez CP, Llesuy S, Boveris A. Oxidative stress and in vivo chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. *J. Photochem. Photobiol. B* 1997; **38**: 215-219.
61. Van-Der-Meulen JH, McArdle A, Jackson MJ, Faulkner JA. Contraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats: The role of vitamin E. *J. Appl. Physiol.* 1997; **83**: 817-823.
62. Packer L. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991; **53**: 1050-1055.
63. Stratton SP, Liebler DC. Determination of singlet oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: Effect of beta-carotene and alpha-tocopherol. *Biochemistry* 1997; **36**: 12911-12920.
64. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003; **17**: 1195-1214.
65. Prasad KN, Kumar A, Kochupillai V, Cole WC. High doses of multiple antioxidant vitamins: essential ingredients in improving the efficacy of standard cancer therapy. *J. Am. Coll. Nutr.* 1999; **18**: 13-25.
66. Weijl NI, Cleton FJ, Osanto S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer Treat. Rev.* 1997; **23**: 209-240.
67. Tomlinson IPM, Bodmer WF. Failure of programmed cell death and differentiation as causes of tumors: Some simple mathematical models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995; **92**: 11130-11134.
68. Albright CD, Salganik RI, Craciunescu CN, Mar MH, Zeisel SH. Mitochondrial and microsomal derived reactive oxygen species mediate apoptosis induced by transforming growth factor-beta1 in immortalized rat hepatocytes. *J. Cell Biochem.* 2003; **89**: 254-261.
69. Takahashi H, Kosaka N, Nakagawa S. Alpha-tocopherol protects PC12 cells from hyperoxia-induced apoptosis. *J. Neurosci. Res.* 1998; **52**: 184-191.

70. Swierczynski J, Kochan Z, Mayer D, Dietary α -tocopherol prevents dehydroepiandrosterone - induced lipid peroxidation in rat liver microsomes and mitochondria. *Toxicol. Lett.* 1997; **91**: 129-136.
71. Aras K, Erşen G, Karahan S. *Tıbbi Biyokimya*. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi; 1976.
72. Ersoy E, Bayşu N, Ertürk K, Üstüdal KM. *Biyokimya*. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi; 1979.
73. Hawk PB. *Hawk's Physiological Chemistry*. McGraw Hill; 1965.
74. Zintzen H. *News and Reviews, Vitamin E /Selenium in Ruminants*. Basel: La Roche; 1972.
75. Meram İ, Köylüoğlu O, Tarakçıoğlu M. E vitamini ve klinik önemi. *İbni Sina Tıp Dergisi* 2001; **6**: 66-72.
76. Blankenship LJ, Carlisle DL, Wise JP, Orenstein JM, Dye LE, Patierno SR. Induction of apoptotic cell death by particulate lead chromate: differential effects of vitamins C and E on genotoxicity and survival. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 1997; **146**: 270-280.
77. Azzi A. Molecular mechanism of α -tocopherol action. *Free Radical Biology & Medicine* 2007; **43**:16-21.
78. Morreale M, Livrea MA. Synergistic effect of glycolic acid on the antioxidant activity of α -tocopherol and melatonin in lipid bilayers and in human skin. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1997; **42**: 1093-1102.
79. He Y, Root MM, Parker RS, Campbell TC. Effects of carotenoid-rich food extracts on the development of preneoplastic lesions in rat liver antioxidant status. *Nutr. Cancer* 1997; **27**: 238-244.
80. Mooney LA. Contribution of genetic and nutritional factors to DNA damage in heavy smokers. *Carcinogenesis* 1997; **18**: 503-509.
81. Sigounas G, Anagnostou A, Steiner M. dl- α -tocopherol induces apoptosis in erythroleukemia, prostate, and breast cancer cells. *Nutr. Cancer* 1997; **28**: 30-35.

82. Henning SM, Swendseid ME, Ivandic BT, Liao F. Vitamins C, E and A and heme oxygenase in rats fed methyl/folate-deficient diets. *Free. Radic. Biol. Med.* 1997; **23**: 936-942.
83. Squali Houssaini FZ, Arnaud J, Richard MJ, Renversez JC, Favier A. Evaluation of oxidative stress and antioxidant defences in malnourished Moroccan children. *Ann. Nutr. Metab.* 1997; **41**: 149-159.
84. Palomaki A, Malminiemi K, Metsa-Ketela T. Enhanced oxidizability of ubiquinol and alpha-tocopherol during lovastatin treatment. *FEBS Letters* 1997; **410**: 254-258.
85. Prakash P, Russell RM, Krinsky NI. In Vitro Inhibition of Proliferation of Estrogen Dependent and Estrogen- Independent Human Breast Cancer Cells Treated with Carotenoids or Retinoids. *J. Nutr.* 2001; **131(5)**:1574-80.
86. Hanukoglu I. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug Metab. Rev.* 2006; **38**:171-96.
87. Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: The role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991; **53**: 194S-200S.
88. Paiva SAR, Russel RM. β -carotene and other carotenoids as antioksidants. *J. Am. Coll. Nutr.* 1999; **18**: 426-433.
89. Burton GW. Antioxidant action of carotenoids. *J. Nutr.* 1989; **119**: 109-111.
90. Gerster H. The potential role of lycopene for human health. *J. Am. Coll. Nutr.* 1997; **16**: 109-126.
91. Bendich A. biological functions of dietary carotenoids. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1993; **691**: 61-67.
92. Stahl W, Sies H. Lycopene: a biologically important carotenoid for human? *Arch. Biochem. Biophys.* 1996; **336**: 1-9.
93. Krinsky NI. Overview of Lycopene, carotenoids, and disease prevention. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1998; **218**: 95-97.

94. Goodwin TW. *The Biochemistry of the Carotenoids Vol.1 Plants*. New York: Chapman and Hall; 1980. pp.203.
95. Beecher GR. Nutrient content of tomatoes and tomatoes product. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1998; **218**: 98-100.
96. Yanez M, Fraiz N, Cano E, Orallo F. Inhibitory effects of cis- and trans-resveratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamide uptake and on monoamine oxidase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; **344**: 688-695.
97. Walle T, Hsieh F, Delege M. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug. Metab. Dispos.* 2004; **32**: 1377-1382.
98. Jannin B, Menzel M, Berlot JP, Delmas D, Lanc A, Latruffe N. Transport of resveratrol a cancer chemopreventive agent, two cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochem. Pharmacol.* 2004; **68**: 1113-1118.
99. Galfi P, Jakus J, Molnar T, Neogrady S, Csordas A. Divergent effects of resveratrol, a polyphenolic phytoestrogen, on free radical levels and type of cell death induced by the histone deacetylase inhibitors butyrate and trichostatin A. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2005; **94**: 39-47.
100. Wadsworth TL, Koop DR. Effects of wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in raw 264.7 macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 1999; **57**: 941-949.
101. Das DK, Maulik N. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol. Interv.* 2006; **6**: 36-47.
102. Ungvari Z, Orosz Z. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; **292**: 2417-2424.
103. Moskaug J, Carlsen H, Myhrstad MCV. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005; **81**: 277-283.
104. Paula M Brito, Mariano A, Leonor M. Almeida, Dinis TCP. Resveratrol affords protection against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: A role for intracellular glutathione. *Chem. Biol. Interact.* 2006; **164**: 157-166.
105. Sayın O, Arslan N, Güner G. Resveratrol and Kardiyovasküler sistem. *Türk Biyokimya Dergisi* 2008; **33(3)**: 117-121.

106. Wenzel E, Germany SV. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005; **49**: 472–481.
107. De la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem. Soc. Trans.* 2007; **35**: 1156-1160.
108. Kurt H, Başaran A, Musmul A. Sıçanlarda karbon tetraklorit (CCl₄)’in oluşturduğu oksidatif stresin kateşin ile önlenmesi. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2004; **5**: 29-34.
109. Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br. Med. J.* 1996; **312**: 478-481.
110. Zaveri NT. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sci.* 2006; **78**: 2073-2080.
111. Gerhauser C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur. J. Cancer* 2005; **41**: 1941-1954.
112. Gramza A, Korczak J. Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Sci. Technol.* 2005; **16**: 351-358.
113. Mendoza-Wilson AM, Glossman-Mitnik D. Theoretical study of the molecular properties chemical reactivity of (+)-catechin and (-)-epicatechin related to their antioxidant ability. *J. Mol. Struct: Theocem* 2006; **761**: 97-106.
114. Miura Y, Chiba T, Miura S, Tomita I, Umegaki K, Ikeda M, Tomita T. Green tea polyphenols (flavan 3-ols) prevent oxidative modification of low density lipoproteins: an ex vivo study in humans. *J. Nutr. Biochem.* 2000; **11**: 216-222.
115. Miura Y, Chiba T, Tomita I, Koizumi H, Miura S, Umegaki K, Hara Y, Tomita T. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *J. Nutr.* **131**: 27-32.
116. Baba S, Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, Nakamura T, Terao J. Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Radic. Res.* 2000; **33**: 635-641.

117. Donovan JL, Bell JR, Kasim-Karakas S, German JB, Walzem RL, Hansen RJ, Waterhouse AL. Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *J. Nutr.* 1999; **129**: 1662-1668.
118. Kim S, Lee MJ, Hong J, Li C, Smith TJ, Yang GY, Seril DN, Yang CS. Plasma and tissue levels of tea catechins in rats and mice during chronic consumption of green tea polyphenols. *Nutr. Cancer* 2000; **37**: 41-48.
119. Guyton AC, Hall JE. *Tıbbi Fizyoloji*. 10. Baskı Tavashlı Matbaacılık 2001
120. Terziođlu M, akar L. *Fizyoloji Ders Kitabı: Cilt I*. 4.baskı. İstanbul: İÜ Basımevi ve Film Merkezi; 1997
121. Chung W-G, Miranda CL, Maiser CS. Epigallocatechin gallate (EGCG) potentiates the cytotoxicity of rotenone in neuroblastoma sh-sy5y cells. *Brain Res.* 2007; **1176**: 133-142.

ETİK KURUL KARARI

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Sabiha	Soyadı	Tok
Doğ.Yeri	Bakırköy	Doğ.Tar.	15.12.1979
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	23447731900
Email	sabihadogruyol@gmail.com	Tel	05334239405

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Yük.Lis.	Sağlık Bilimleri Enstitüsü/İstanbul Tıp Fak/Biyofizik	
Lisans	Işık Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü	2005
Lise	Uğur Koleji	1999

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araş.Gör.	İÜ Biyofizik Anabilim Dalı	2006-2009
2.	Araş.Gör.	Işık Üniversitesi Fizik Bölümü	2005-2006

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	İ.Ü.Yabancı Diller Bölümü İngilizce Sınav Puanı
ingilizce	iyi	iyi	iyi	62,5	67,5

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel

ALES Puanı	65,8	65,2	65,7
-------------------	------	------	------

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	İyi
C	İyi