

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**RATLARDA DEMİR YÜKLENMESİ İLE
OLUŞTURULAN OKSİDATİF STRESİN
ÖNLENMESİNDE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER'İN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Erkan CÜRE

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Güçhan ALANOĞLU**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından 1139-TU-05 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA

2007

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamda bana her türlü desteklerini esirgemeyen tez danışmanım ve emektar hocam Yrd. Doç. Dr. Emine Güçhan ALANOĞLU başta olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet Numan TAMER, Prof. Dr. Mehmet İŞLER, Prof. Dr. Mehmet Tuğrul SEZER, Prof. Dr. Ülkü SARITAŞ, Prof. Dr. Yıldırım SONGÜR, Doç. Dr. Şevket Ercan TUNÇ, Doç. Dr. Hasan Şenol COŞKUN, Doç. Dr. Muhammed Cem KOÇKAR, Yrd. Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN, Yrd. Doç. Dr. Zeynep Dilek AYDIN, Yrd. Doç. Dr. Altuğ ŞENOL, Yrd. Doç. Dr. Şeref YÜKSEL'e, Uzman Dr. Banu Kale KÖROĞLU, Uzman Dr. İbrahim GÖREN, Uzman Dr. Murat DEMİR'e, laboratuvar imkânlarını kullandıran Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK'e ve laboratuvar çalışmalarımda bana yol gösteren Doç. Dr. H. Ramazan YILMAZ ve Yrd. Doç. Dr. Efkân UZ'a, laboratuvar imkânlarını kullandıran Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Namık DELİBAŞ'a, yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Recep SÜTÇÜ'ye, laboratuvar imkânlarını kullandıran Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Nilgün KAPUCUOĞLU'na, laboratuvar çalışmamda emeği geçen Dr. Hakan ÇAM'a, vefakâr ve cefakâr arkadaşım Dr. Abdulkadir BAŞTÜRK'e, Dr. Kasım DEMİR başta olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma, projemizi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine, bu vesileyle sevgisiyle ve desteğiyle hep yanımda olan sevgili eşim ve hayat arkadaşım Dr. Medine Cumhur CÜRE'ye ve neşe kaynağım biricik kızım Fatma'ya en derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Erkan CÜRE

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	v
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Demir Metabolizması	3
2.1.1. Demir emilimi ve transferi	4
2.1.2. Serum Serbest Demiri	5
2.1.3. Demirin Vücuttan Atılımı	5
2.1.4. Transferrin	5
2.1.5. Hepsidin	6
2.1.6. Apoferritin	6
2.1.7. Ferritin	6
2.1.8. Hemosiderin	6
2.1.9. Aşırı Demir Yüklenme Nedenleri	7
2.2. Demirin Toksik Etkisi ve Serbest Radikal Oluşumu	9
2.2.1. Demir ve Serbest Radikal Oluşumu Arasındaki İlişki	9
2.2.2. Demirin Toksik Etkisi ve Sonuçları	10
2.2.3. Demirin Karaciğere Toksik Etkileri	10
2.2.4. Demirin Kalp Dokusuna Toksik Etkileri	11
2.3. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres	12
2.4. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları	13
2.5. Serbest Oksijen Radikal Türleri	14
2.6. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerine Etkileri	15
2.6.1. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler	15
2.6.2. Proteinlerde ve Nükleik Asitlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler	15
2.7. Enzimatik ve Nonenzimatik Antioksidan Sistemler	16
2.7.1. Nonenzimatik Antioksidanlar	16
2.7.2. Enzimatik Antioksidanlar	17

2.7.2.1. Glutasyon Peroksidaz	17
2.7.2.2. Katalaz	18
2.7.2.3. Süperoksit Dismutaz	18
2.8. CAPE'nin Yapısı ve Özellikleri	19
2.9. CAPE'nin Antioksidan Etkisi	19
3. MATERYAL ve METOD	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Deney Hayvanları	21
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	21
3.1.3. Deneyde Kullanılan Cihazlar	22
3.2. Metod	22
3.2.1. Deney gruplarının oluşturulması ve deneyin yapılması	22
3.2.2. Doku Örneklerinin Alınması	23
3.2.3. Örneklerin Homojenizasyonu ve Deney için hazırlanması	23
3.2.3.1. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler	23
3.2.3.2. Homojenizasyonda Yapılan İşlemler ve Numunelerin Hazırlanması	23
3.2.4. Dokularda Biyokimyasal Analizler	24
3.2.5. Histopatolojik İnceleme	24
3.3. İstatistiksel Analiz	25
4. BULGULAR	26
4.1. Biyokimyasal Parametreler	26
4.2. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları	28
4.2.1. Karaciğer dokusu Prusya boyası ile değerlendirilmesi	28
4.2.2. Kalp dokusu Prusya boyası ile değerlendirilmesi	28
5. TARTIŞMA	29
6. SONUÇ	34
7. ÖZET	35
8. SUMMARY	36
9. KAYNAKLAR	37

SİMGELER ve KISALTMALAR

O ₂ ⁻	Süperoksit anyonu
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
OH [·]	Hidroksil iyonu
SOR	Serbest oksijen radikalleri
LPO	Lipid peroksidasyonu
CAPE	Kafeik asit fenetil ester
MDA	Malondialdehit
SOD	Süperoksit dismutaz
CAT	Katalaz
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
DMT1	Divalan katyon taşıyıcı
TBOD	Transferine bağlı olmayan demir
PAYA	Poliansature yağ asitleri
NO	Nitrik oksit
HOCl	Hipokloröz asit
LOO [·]	Peroksil radikalleri
LOOH	Lipid hidroperoksit
GSSG	Okside glutatyon
GSH	Redükte glutatyon
GR	Glutatyon redüktaz
i.p.	İntraperitoneal
SF	Serum fizyolojik
A.D.	Anlamlı değil

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Moleküler oksijen, süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), geçiş metallere ait iyonları ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) önemli serbest oksijen radikalleridir (SOR). Enerji üretimi ve hücrelerin normal metabolizmasının idamesi sırasında meydana gelen birçok fizyolojik tepkimede SOR üretilebilmektedirler. Oksidatif stres durumunda ve demir gibi metal iyonlarının varlığında serbest radikallerin üretimi artar (1). Canlı organizmalarda $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 'in toksik etkileri bu maddelerin OH^{\cdot} ve reaktif metal komplekslerine dönüşmesi ile oluşur (2).

Hücrede SOR, lipid, protein, DNA ve karbonhidrat gibi önemli hücresel bileşen ve yapılara toksik etki gösterirler. Membran yapısındaki fosfolipidler, glikolipidler, doymamış yağ asitleri ve membran proteinleri serbest radikallerin hedefidir (2-4). Serbest radikaller lipidlere diğer biyomoleküllerden daha fazla afinite gösterirler (2).

Demir ve bakır gibi geçiş metalleri, fizyolojik şartlarda çeşitli oksidasyon basamaklarında görev alırlar. Bu özellikleri sayesinde geçiş metalleri serbest radikal tepkimelerini hızlandırarak katalizör görevi yaparlar. Metal iyonlarının serbest radikal tepkimelerinde görev almaları yanı sıra lipid peroksidasyonundaki (LPO) etkileri daha fazla önem arz etmektedir (5).

Demir yüklenmesi; herediter hemokromatozis, β -talasemi, sideroblastik anemi gibi kalıtsal ve miyelodisplastik sendrom (MDS) gibi edinsel hastalıklarda, Afrika tipi diyet alanlarda, intravenöz demir tedavisi sırasında görülmektedir (6). H_2O_2 , demirin katalizör olarak rol aldığı fenton tepkimesi ile hücre için son derece toksik olan OH^{\cdot} 'lerine parçalanır ve bunun sonucunda hücrede hasar meydana gelir (2). Demir birikiminin primer etkilediği organ karaciğerdir (7). Ek olarak kalp, tiroid, gonadlar, hipofiz, deri ve pankreasta demir birikimi sonucunda (8) siroz, hepatoselüler kanser ve diyabet mellitus gibi hastalıklar gelişebilmektedir.

Kafeik asit fenetil ester (CAPE) yapıcı flavonoidlere benzeyen bal arısı propolisinin aktif bir bileşenidir. Mikromolar konsantrasyonlarda linoleik asit ve araşidonik asitin 5'-lipooksijenaz tarafından oluşturulan oksijenasyonunu inhibe eder (9). *In vitro* koşullarda 10 μ mol/L konsantrasyonda nötrofiller veya ksantin/ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerini tamamen bloke ettiği

bildirilmiştir. CAPE'nin hepatotoksisiteden koruyucu, antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, immünomodülatör, nöroprotektif ve sitostatik özelliklerinin olduğu yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (10,11).

Klinikte sık kan transfüzyonu yapılarak aşırı demir yüküne maruz kalan hastalarda, serbest radikaller artarak dokularda hasar oluşmaktadır. Bilinen bir yan etkisi olmayan CAPE'nin ise antioksidan etkisi birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu araştırmada ratlara demir verilerek oksidatif hasar oluşturulması ve CAPE'nin oluşan bu hasarı önlemede etkinliğini göstermek için malondialdehit (MDA) seviyesi, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktiviteleri çalışıldı. Böylelikle demir yüküne maruz kalan hasta grubunda gelişecek hasarı önlemede CAPE'nin bir tedavi şekli olup olmayacağı hakkında soru işaretleri aydınlanabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Demir Metabolizması

Demir, vücudumuz için son derece önemli bir elementtir. Erkeklerde demir miktarı, kadınlardakinden fazladır. Vücuttaki total demir miktarı 70 kg ağırlığındaki erkekte yaklaşık 4 gr kadardır (8,12). Hemoglobin, miyoglobin, sitokromlar ve demiri kofaktör olarak kullanan enzimlerde fonksiyonel şekilde demir bulunmaktadır (13). Fonksiyonel şekilde bulunan demir, vücut total demirinin % 70-90'ıdır (8,13,14). Karaciğer, dalak, kemik iliği ve kasta ise geri kalan % 10-30'luk kısmı ferritin ve hemosiderin şeklinde depolanır (14). Yaklaşık 3 mg kadar demir ise demir bağlayıcı protein olan transferine bağlı olarak plazmada dolaşır halde bulunur (8).

Tablo 1: Erişkin bir insanda demirin vücutta dağılımı görülmektedir (8).

Kompartmanlar	Demir konsantrasyonu	
	<i>Erkek</i>	<i>Kadın</i>
1-Fonksiyonel demir		
Hemoglobin	31mg/kg	28 mg/kg
Miyoglobin	5 mg/kg	4 mg/kg
Hem enzimleri	1 mg/kg	1 mg/kg
Non hem enzimleri	1 mg/kg	1 mg/kg
2-Transport demiri		
Transferrin	< 1 (0,2) mg/kg	< 1 (0,2) mg/kg
3-Depo demiri		
Ferritin	8 mg/kg	4 mg/kg
Hemosiderin	4 mg/kg	2 mg/kg
Toplam	50 mg/kg	40 mg/kg

Normal diyetle günlük 12-18 mg kadar demir alınır. Alınan bu demirin ancak 1-2 mg'ı ince barsaklardan emilir (15). Demir vücutta tekrar kullanılabilirdiğinden günlük 1-2 mg kadar kaybedilir. Kaybedilen demir miktarı intestinal epitel hücreleri tarafından aynı oranda telafi edilir (8,16). Doğurganlık çağındaki kadınlarda menstrüel siklusta ve gebelik sırasında demir ihtiyacı belirgin artmaktadır (8). Demir Emilimi vücut demir depolarının doymuşluk oranına göre düzenlenir. Vücutta aşırı miktarda artmış olan demiri atmak için bir mekanizma olmadığı için barsaklardan demir Emilimi geri besleme mekanizması ile düzenlenir. Vücutta depo demiri

azaldığı zaman demir Emilimi artar (16). Eritropoezis hızı da demir Emiliminin tayininde rol oynar. Eritropoetik aktivite arttığı zaman demir Emilimi de artar (8).

Karaciğer ve daha sıklıkla dalakta retiküloendotelyal sistemde bulunan makrofajlar yaşlanmış, kusurlu ve olgunlaşmamış eritrositleri fagosite ederler. Fagosite edilen hücrelerden açığa çıkan demir, transferin ile kemik iliğine taşınarak burada hemoglobin sentezinde kullanılır (8,16).

2.1.1. Demir Emilimi ve Transferi

Demirin absorpsiyon yolu çok iyi bilinmemektedir. Tama yakın kısmı proksimal duodenumdan emilir. Diyetdeki inorganik demirin çoğu ferrik (Fe^{+3}) durumdadır, enterosit tarafından emilebilmesi için ferröz (Fe^{+2}) duruma indirgenmelidir. Bu indirgeme fırçamsı kenar epitelinde bulunan askorbat bağımlı demir redüktaz enzimi aracılığıyla olur. Oluşan ferröz durumdaki demir divalen kation taşıyıcı 1 (Divalent metal transporter 1, DMT1) aracılığıyla fırçamsı kenar membrandan hücre içine transfer edilir. Demirin bazolateral enterosit membranından hücre dışına transferi ferroportinin katkısı ile olur (17,18). Bu dönüşümü Vitamin C hızlandırır. Duodenal sitokrom B demir redüktaz ilk tanımlanan ferreredüktazdır. Demir eksikliği ve hipoksiye yanıt olarak ekspresyonu artar ve demir alımında önemli rol üstlenir (19). Bakır içeren, seruloplazmin homoloğu hephaestin, enterositleri terk eden Fe^{+2} 'yi Fe^{+3} 'e oksitler (17). Enterositler tarafından emilen demir ya ferritin şeklinde depo edilerek enterositin yaşlanıp dökülmesi ile feçese atılır ya da plazmaya transfer edilir. Portal sirkülasyonda demir hızla transferine bağlanır. Transferrinin Fe^{+3} e yüksek afinitesi mevcuttur ve hızlıca demiri bağlar (18). Transferrin demir metabolizmasında ana rol oynar. Demire nerede ihtiyaç varsa oraya taşır. Hücrelerin çoğu demiri plazmadan transferrin aracılığı ile alır (17,20).

Transferrin ile taşınan demirin çok az bir kısmı hepatositlere girmektedir. Hepatositlere transferrinle gelen demir dışında; haptoglobüline bağımlı hemoglobin, hemopeksine bağımlı hem ve dolaşımdaki ferritinin bir kısmındaki demir gibi muhtelif şekillerde demir girişi olur (8,14).

Transferin molekülü öncelikli olarak kemik iliğine gider. Eritroblast yüzeyinde reseptörle birleşince demir ayrılır ve hücre içine girer. Mitokondride protoporfirin halkasına bağlanarak hem oluşur. Hemoglobin yapımında kullanılır. Hem dışında

demir apoferritinle birleşerek ferritin şeklinde depolanır (8,14). Depo demiri vücuda demir alımı ve vücuttan demir kaybı ile değişen bir denge halindedir. Depo demiri ferritin ve hemosiderinden oluşur (14).

2.1.2. Serum Serbest Demiri

Serumda 100 µg/dl demir bulunmaktadır. Serumdaki demiri bağlamak üzere 250-450 µg/dl transferin hazır bulunmaktadır (8,14). Serum demirini bağlayan transferin düzeyi % 25-40'dır. Hemokromatozis, talasemi, MDS, orak hücre anemisinde transferine bağlı olmayan demir (TBOD) miktarı serumda artar. Kemoterapiye bağlı kemik iliği baskılanması sonucu kemik iliğinin transferrine bağlı demiri kullanımını azalır. Sonuç olarak TBOD miktarı serumda artar. TBOD düzeyi 10 µM düzeyine ulaştığında potansiyel toksik etki gösterir ve fenton tepkimesini katalizler (21).

2.1.3. Demirin Vücuttan Atılımı

Demir başlıca barsak hücreleri, safra, dışkı, tırnaklar, saç ve idrarla vücuttan atılır. Sağlıklı erişkin bir erkekte kaybın 1 mg/gün, kadınlarda ise menstrüasyonla kaybedilen demirin eklenmesi ile daha fazla olduğu saptanmıştır (8,14).

2.1.4. Transferrin

β1 globülin yapısındadır. Karaciğerde sentez edilen molekül ağırlığı 80 kDa olan bir glikoproteindir. Yarı ömrü 7,6 gündür (20). İki demir bağlama alanı vardır; tek demir bağlanırsa monoferrik, iki demir bağlanırsa diferrik transferrinden bahsedilir. Diferrik transferrinin kendi reseptörüne ilgisi diğerinden daha fazladır (8). Transferrin reseptörü eritroid öncü hücreler, plasenta ve karaciğerde çok sayıda olmak üzere bütün çekirdekli hücrelerde bulunur. Reseptörün transferrine afinitesi ortamın pH'sı ve transferrinin demir yükü ile ilişkilidir. Transferrin kendi reseptörüne bağlanınca klatrin kaplı membran içerisinde hücre içine alınır, burada ortam asidifiye edilir. Asit ortamda demir serbestleşir (8,14,18).

2.1.5. Hepsidin

İnsan hepsidini 25 aminoasit peptid yapısındadır (16). Hepsidin primer olarak karaciğerde sentez edilir (16). Böbrek, kalp, iskelet kasları ve beyin dokusundan da az miktarda salınır (22). Demir metabolizması üzerine negatif düzenleyici etkisi vardır. Kronik demir birikimi ve yüksek demir içeren diyetle beslenme ile hepsidin sentezi artar (16). Anemi, hipoksi, inflamasyon durumlarında ise hepsidin sentezi azalır (22). Hepsidin, ferroportin üzerine negatif düzenleyici etki eder. Makrofaj, hepatositler ve enterositlerden demir salınımı bu mekanizma ile bloklanır (23). DMT1 ve duodenal sitokrom B demir redüktaz üzerine de negatif düzenleyici etkisi vardır (23). Hepsidin bir akut faz reaktanıdır. Kronik hastalık anemisinin etiyolojisinde kilit rol oynar (24).

2.1.6. Apoferritin

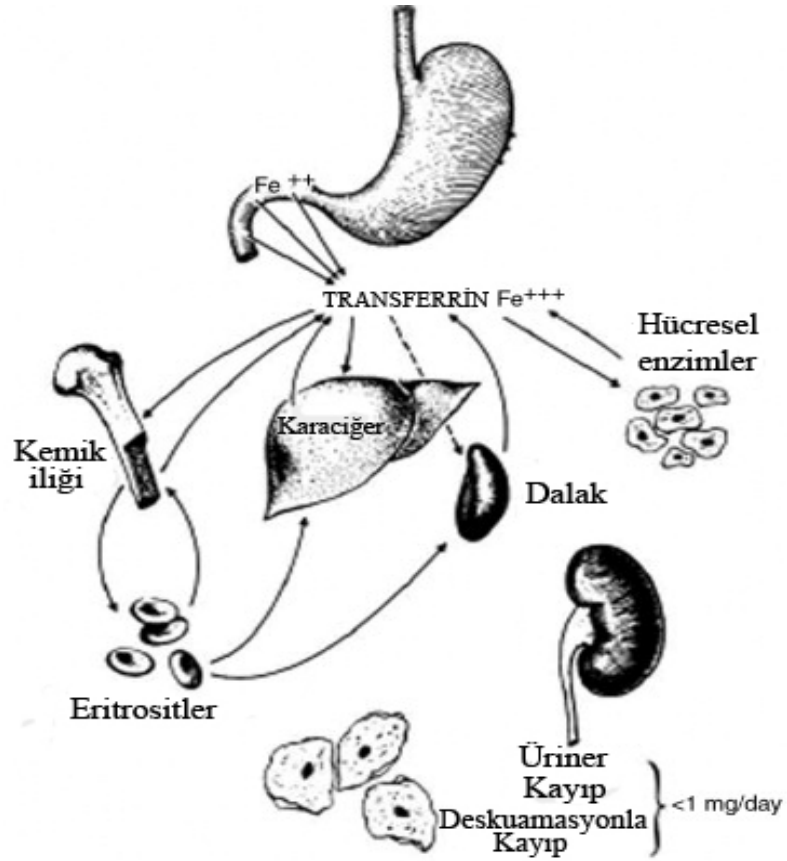
Globüler bir proteindir. 24 eş subunitten oluşmuştur. Birçok dokuda bulunan apoferritin demir ile birleşerek ferritini yapar (20).

2.1.7. Ferritin

Demiri depolama ve kullanılmayan demiri toksik olmayan halde tutma görevi olan bir proteindir. Demir bir ferrihidroksifosfat miçeli oluşturur, ferritindeki bu alt birimler oluşan miçeli çevreler. Bir ferritin molekülü 3000-4500 adet demir atomu içerir (23). Apoferritin Fe^{+2} 'yi alır Fe^{+3} 'e oksitler ve demir çekirdekte depolanır. Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye indirgenmesi ile demir salınır. Serum ferritin düzeyi vücut depo demirini yansıtır ancak ferritin aynı zamanda bir akut faz reaktanı olduğundan depo demirini belirtmekte yanıltıcı olabilir (8).

2.1.8. Hemosiderin

Demir ya ferritin şeklinde ya da hemosiderin şeklinde depolanır (14). Lizozomal zarlarda ferritin moleküllerinin demir içeren agregatlar şeklinde bir araya gelmesiyle oluşur (14). Hemosiderin suda erimez, monosit ve makrofajlar içerisinde oluşturulur. Patolojik durumlarda tüm dokularda fazla miktarda birikir. Genellikle aşırı demir yüklenmesi durumlarında görülür (6,14).



Şekil 1: Demir döngüsü (“Beutler E, Iron storage disease: facts, fiction and progress. Blood Cells Mol Dis 2007; 39: 140-147” makalesinden modifiye edilerek alınmıştır) (6).

2.1.9. Aşırı Demir Yüklenme Nedenleri

Vücutta demir yüklenmesi diyetle alınan demirin emiliminin artması, aşırı vitamin C alımı, parenteral demir tedavisi sırasında, hemoglobinopatiler, hemolitik anemiler ve hemokromatozis gibi patolojik durumlarda meydana gelmektedir (8,25). Demir yüklenmesinin belli başlı sebepleri tablo 2’ de görülmektedir.

Tablo 2: Aşırı demir yüklenmesinin sebepleri (8).

➤	Artmış demir emilimi
✓	Demir biyoyararlanımı normal olan diyetler Hereditör Hemokromatozis Demir yüklenen anemiler (hiperselüler eritroid kemik iliği ile refrakter anemi) Kronik karaciğer hastalığı (siroz, portakaval shunt) Porfiria kutenea tarda Konjenital defektler (atransferrinemi, vs.)
✓	Demir biyoyararlanımı yüksek olan diyetler Afrika tipi diyete bağlı demir yüklenmesi Medikal demir preparatı kullanımı
➤	Parenteral demir yüklenmesi Transfüzyona bağlı Tedavi için yapılan enjeksiyonlara bağlı
➤	Perinatal demir yüklenmesi Hereditör tirozinemi Serebrohepatorenal sendrom Perinatal hemokromatozis
➤	Fokal demir sekestrasyonu İdiopatik pulmoner hemosiderozis Renal hemosiderozis Hallervorden-Spatz sendromu

Hereditör hemokromatozis HLA A3 ile ilişkili otozomal resesif kalıtımla geçen bir hastalık olup demir yüklenme bozukluklarının sık nedenidir (% 0,05). Altıncı kromozomdaki HFE gen (C282Y) mutasyonu hemokromatozisten sorumlu tutulmaktadır. HFE proteininin, demir depolarına duyarlı olan duodenal kript hücrelerinin denetiminde görevli olduğu düşünülmektedir (12,21,25). Hemokromatozisli hastalarda vücut demir ihtiyacından uygunsuz olarak ince barsaktan aşırı derece artmış demir emilimi vardır (8). Artmış demir emilimine karşı, vücuttan yeteri miktarda demir atmak için fizyolojik mekanizmalar olmadığı için vücutta demir depoları giderek artmaktadır.

Vücutta demir yüklenmesi bulguları karaciğer parankim hücreleri başta olmak üzere pankreas, kalp, deri, endokrin organlar ve eklemlerde ortaya çıkar (8,25).

β-Talasemi hemoglobin molekülünün yapısında ki beta globin zincirlerinin sentezindeki bozukluğa bağlı oluşan otozomal resesif bir hastalıktır (26). Hipokrom,

mikrositer anemi ve hemoliz ile karakterizedir. Talasemili hastalar sık kan transfüzyonu almak zorunda olduklarından demir yüklenmesine maruz kalırlar (8). Afrika kıtasındaki bazı ülkelerde yüksek demir içerikli alkollü içeceklerin tüketilmesi de demir yüklenmesine neden olmaktadır (25).

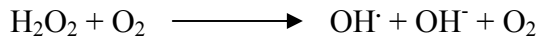
2.2. Demirin Toksik Etkisi ve Serbest Radikal Oluşumu

2.2.1. Demir ve Serbest Radikal Oluşumu Arasındaki İlişki

Fizyolojik şartlarda demir ve bakır gibi geçiş metalleri, çeşitli oksidasyon basamaklarında görev alırlar. Geçiş metalleri serbest radikal tepkimelerini hızlandırarak katalizör görevi üstlenirler. Bu tip maddelere oksidan stresör ismi verilmektedir (27,28). Metal iyonlarının serbest radikal tepkimelerinde, LPO üzerine etkileri vardır. Oksijenin kendisi, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} ve geçiş metallerinin iyonları SOR biyokimyasında önemli rol oynayan maddelerdir (1,29).

Canlı organizmalarda H_2O_2 ve O_2 'nin toksik etkileri, OH^{\cdot} ve reaktif radikal metal komplekslerine dönüşmeleri ile oluşur (1,2). H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ ile Haber-Weiss tepkimesi adı verilen tepkimeye girerek hücre için son derece toksik olan OH^{\cdot} 'lere parçalanır (2,3).

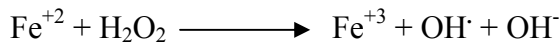
Haber-Weiss tepkimesi



Bu tepkime katalizör varlığında veya katalizör olmadan da oluşabilmektedir. Katalizör olmadan oluşan tepkime oldukça yavaş ilerler (27).

Tepkime eğer demir elementi ile katalizlenirse (Fenton tepkimesi) oldukça hızlı meydana gelir (27).

Fenton tepkimesi



Vücutta demir, transferine Fe^{+3} şeklinde bağlanarak plazmada taşınır (8) ve transferine bağlı demir serbest radikal oluşumuna katılmaz (30).

2.2.2. Demirin Toksik Etkisi ve Sonuçları

Vücutta aşırı demir varlığında retiküloendotelyal sistem hücreleri, makrofajlar, mikrogliya hücreleri, endotel hücreleri ve miyositlerde demir birikimi olur (8,14).

Demir hepatosit ve miyosit hücrelerinde oldukça toksiktir. Membran poliansature yağ asitlerinin (PAYA) içeriğini azaltır. Mitokondride tiol bağımlı enzim aktivitelerinde kayıp olur. Süksinat dehidrogenaz ve NADH-sitokrom c oksidoredüktaz enzimleri inaktive olur. ATP miktarı azalır. Lizozomal frajilite artar. Lizozomal sindirim enzimleri hasarlanır. DNA hasarı sonucu hücre yaşlanması oluşur (31).

Aşırı demir yüklenmesi artmış deri pigmentasyonu, karaciğer hastalığı, kalp yetmezliği, diyabetes mellitus, gonadal yetersizlik ve diğer endokrin bozukluklar, artropati, nadir nörolojik ve psikolojik bozukluklara neden olur (8).

2.2.3. Demirin Karaciğere Toksik Etkileri

Demir birikiminin olduğu kalıtsal ve sekonder hemokromatoziste hepatosellüler hasarın mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (32). Demir birikiminin hepatosellüler hasara niçin yol açtığı kesin olarak bilinmemekle birlikte PAYA'nın peroksidasyonu yoluyla hasar yaptığı düşünülmektedir (33). Karaciğerde demir birikimi, direkt olarak lipositlerin aktivasyonuna ve kollajen tip I gen uyarılması ile liposit fibrogenezisi ve LPO yapmaktadır (34). Demir yükü ile hepatositlerde fosfalipaz A₂ enzim aktivasyonu artmakta ve peroksidatif hasar oluşmaktadır (35). Hepatik fibrozis ve sonuçta siroz gelişmektedir (36). Aşırı demir yükü antioksidanlardan plazmada askorbik asit, α - tokoferol, karaciğerde α - tokoferol, β karoten ve ubiquinol seviyelerinde aşırı azalmaya neden olmaktadır (37).

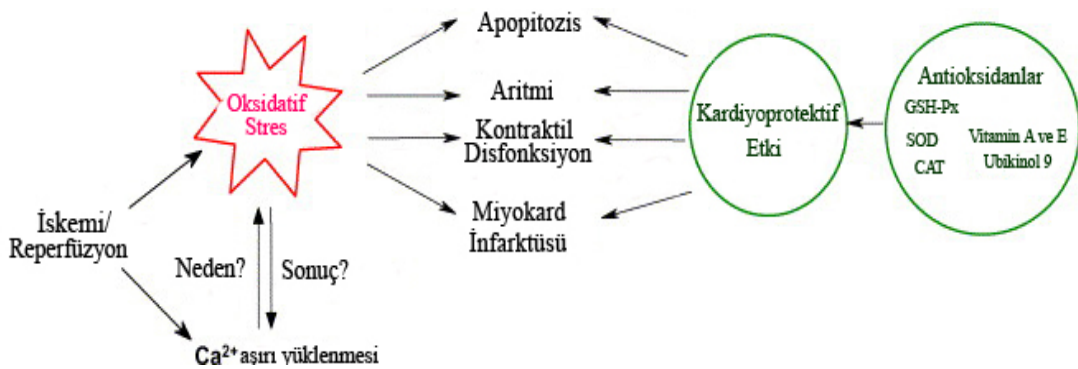
Çok sayıda transfüzyon sonucu, demir karaciğer dokusunda başlangıçta Kupffer hücreleri ve portal makrofajlarda birikir. Zamanla parankim hücreleri çevresinde yeniden dağılım olur (38). Karaciğerde normal şartlarda demir miktarı 20 μ mol/g kuru ağırlığın altındadır (38). Aşırı hepatik demir birikimi siroz ve hepatosellüler kansere yol açar. Karaciğerde uzun süreli demir birikimi sonucu olarak AST ve ALT değerlerinde yükseklik tespit edilir. Karaciğerde demir birikimi başlangıçta Rappaport zon 1 de lokalize iken ilerleyici seyirle zon 2 ve 3'e yayılır. Demir birikimi karaciğerde 60 μ mol/g kuru ağırlığa ulaştığında hepatik stellat

hücrelerde erken evre selüler aktivasyon görülür yani düz kas aktin ekspresyonu olur. Bu durum hepatik fibroz başlangıcında anahtar olaydır. Demir birikimi karaciğerde yaklaşık 250 $\mu\text{mol/g}$ kuru ağırlığa ulaştığında siroz gelişir (39). AST normal sınırlarda ve ferritin değeri 1000 ng/mL altında ise önemli derecede karaciğer sirozuna rastlanmaz (38).

2.2.4. Demirin Kalp Dokusuna Toksik Etkileri

Hereditör hemokromatoziste olduğu kadar talasemilerde ve sık transfüzyon gerektiren diğer anemilerde miyokardiyal demir birikimi meydana gelmektedir (8). Demir yüklenmesi ile OH \cdot oluşumu ve LPO, kardiyotoksisite meydana gelmesinde önemli rol oynar (33). Akut demir toksisitesinin miyokard hücrelerinde peroksidatif hasar, mitokondrial solunum enzimlerinde aktivite azalması, kontraktilitede bozulma ve ritim değişiklikleri yaptığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (40). Demir yüklenmesi ile fosfalipaz A₂ enzim aktivitesi artar ve bu yolla miyosit hücrelerinde peroksidatif hasar oluşmaktadır (41).

Serbest hem ve hemoliz sırasında oluşan eritrosit membran elementleri nitrik oksit (NO) ve arjinin kullanılabilirliğini azaltırlar, bunun sonucunda vazokonstriksiyon ve endotelial hasar oluşur. NO düzeyi daha fazla azalır ve yaygın elastik doku hasarı meydana gelir. Arteriyel sertleşme artar. Kalp kapaklarında, papiller kaslarda kalınlaşma ve kalsifikasyon oluşur (42).



Şekil 2: Kalp dokusunda oksidatif stresin yaptığı hasar ve önleyici mekanizmalar (1).

2.3. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan, hücre metabolizmasındaki tepkimeler esnasında ortaya çıkan ve diğer biyolojik materyaller ile tepkimeye girme eğilimi olan atom veya moleküllerdir (27,28). Eşleşmemiş elektronlar bitişiklerindeki lipidler, karbonhidratlar, proteinler ve DNA'ya karşı aşırı reaktiftirler. Serbest radikallerin hedefi olan membran yapısında bulunan fosfolipidler, glikolipidler, doymamış yağ asitleri ve membran proteinleri oksidan ajanların arttığı ve antioksidan ajanların azaldığı veya yetersiz kaldığı durumlarda oluşan oksidatif strese maruz kalırlar. Sonuçta serbest radikaller hücrel hasar meydana getirirler (28,43,44).

İnsan vücudundaki tüm hücrelere kolaylıkla girebilen ve en çok kullanılma özelliğine sahip moleküler oksijen (O_2), yapı itibariyle radikal olmaya çok uygundur. Fiziyojik şartlarda SOR; hücrede mitokondrial respirasyon, hücrenin sinyal iletim sistemi ve bakteri fagositozu gibi görevler için gereklidir. Serbest radikaller karaciğerde detoksifikasyon işlemi için kullanılmaktadır. Nötrofiller de zararlı patojenleri yok etmek için serbest radikalleri üretirler. Diyabet mellitus, kanser gelişimi, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın etiyolojisinde ve ilerlemesinde SOR'un rol oynadığı gösterilmiştir. (27,45,46).

Vücutta oluşan SOR ile antioksidan savunma sistemi denge halindedir. SOR üretiminin artması veya antioksidan savunmanın azalması durumunda biyomoleküllerin yapısal ve fonksiyonel yapılarında değişikliklere yol açar ve oksidatif stres oluşur. Polimorfonükleer lökositlerin aktive olması yoluyla ortaya çıkan NADPH oksidaz, SOD, nitrik oksit sentaz ve miyeloperoksidaz gibi enzimler, O_2^- , H_2O_2 , NO ve hipoklorik asit (HOCl) gibi reaktif ürünleri ile solunum patlaması oluşur (28,44,45). Oluşan bu serbest radikaller ortamda bulunan diğer atom veya moleküllerle bir atomun alınması ya da eklenmesi şeklinde olan tepkimelere girerler (27,47). Bu elektron alışverişi sonucu serbest radikaller, diğer atom veya moleküllerin kimyasal yapılarını değiştirip onları kararsız (reaktif) bir atom haline getirme eğilimindedirler.

Fiziyojik şartlarda serbest radikaller oluşabildiği gibi hipoksi, inflamasyon, ısı, yoğun egzersiz, iyonize radyasyon, iskemi, travma, fotokimyasal hava kirleri,

intoksikasyon ve benzeri durumlar gibi fizyolojik olmayan şartlarda da serbest radikaller oluşabilir (27,44).

Dokuda oksidatif hasar oluşumu ile radikal metabolitlerinin artması ve bunların oluşturduğu LPO ile protein ve DNA oksidasyonu sonucu olarak hücre membranında kontrol kaybolur, geçirgenlik artar ve hücrel ölüm gelişir (30, 44). Serbest radikaller ve serbest radikal tepkimeleri sonrası oluşan ürünlerde son 20 yıldır ciddi düzeyde artış olmuştur. Bunun sonucunda hücrel yaşam hasarı ve genetik mutasyonlar da artmıştır (1). Oksidatif strese yol açan faktörlerden kaçınılması birçok hastalığın oluşumu ve progresyonu açısından oldukça önemlidir.

2.4. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları

Serbest oksijen radikallerinin iki önemli kaynağı bulunmaktadır:

A) Endojen kaynaklar

- Yaşlanma (48)
- Peroksizomlarda var olan enzimler (49)
- Nükleus membran ve endoplazmik retikulumda bulunan elektron transport sistemleri (sitokrom p-450) (49)
- Mitokondriumda bulunan elektron transport sistemi (28)
- İskemi, travma, intoksikasyon gibi durumların sonucu oluşan oksidatif stres (27,28)
- Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, adenzin deaminaz, hemoglobin gibi enzimler ve proteinler (50)
- Katekolaminler, tioller, tetrahidroproteinler, hidrokinonlar gibi küçük moleküllerin otooksidasyonu (27,28).
- Geçiş metallerine afinitesi olan antibiyotikler (27,28)
- Makrofaj ve diğer fagositik hücrelerin aktivasyonu ile meydana gelen solunumsal patlama (28)
- NADPH oksidaz, lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz içeren plazma membranı enzimleri ve lipid peroksidasyonu (28).

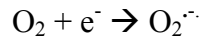
B) Ekzojen kaynaklar

- İyonize ve non iyonize radyasyon (27,28)

- Metal iyonları (20,28)
- Ksenobiyotikler: hiperoksi, hava kirliliği, anesteziik maddeler, pestisitler, solventler, aromatik hidrokarbonlar ve sigara dumanı (28,51,52)
- Bağışıklık yapan maddeler: alkol, uyuşturucu maddeler (53,54)
- Stres; stres durumunda vücutta katekolamin düzeyi artar ve artan katekolamin oksidasyonu ile radikal üretimi de artar (55)
- Yiyeceklerde bulunan çeşitli katkı maddeleri (54)
- Egzersiz (55)
- Sisplatin, doksorubisin, metotreksat, bleomisin, siklosporin gibi antineoplastik ilaçlar (56).

2.5. Serbest Oksijen Radikal Türleri

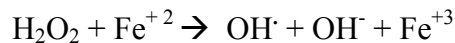
Oksijen metabolizması ara ürünleri olan oksijen türleri, brom ve klor gibi tek atomlu yapılar, sodyum ve potasyum gibi alkali metal atomları, bir orbitalinde tek elektron bulunduran NO, NO₂ gibi atom bileşikleri; oksijen radikalleri olarak bilinmektedir (28,57). İntoksikasyon, hemoraji, iskemi, radyoaktivite durumlarında mitokondride aerobik oksidatif fosforilasyon dengesi bozulur. Elektron taşıma sisteminden elektron kaçakları meydana gelir. Canlılarda tek bir elektronun transfer yoluyla oksijene verilip oksijenin tek değerlikli indirgenmesi ile O₂⁻ oluşmaktadır (47,57).



Oksijenin 2 elektronla redüklenmesi veya O₂⁻'nin dismutasyonu ile H₂O₂ oluşur (27).



Serbest radikallerin biyokimyasında H₂O₂ önemli bir yer tutar. Bunlar geçiş metal iyonlarının bulunduğu ortamda kolaylıkla parçalanıp oksijen radikallerinin reaktif olan ve biyolojik sistemlerde daha çok hasar oluşturan OH[•] oluşturur (27).



Fenton tepkimesinde Fe⁺² ile H₂O₂'in tepkimeye girmesi ile hücre için son derece toksik olan OH[•] oluşur (2).

2.6. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri

2.6.1. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Okside edici radikaller, hücre membranlarında bolca bulunan PAYA'da kolaylıkla hasar oluştururlar. Oluşan hasar sonucunda membranın yapısı ve fonksiyonları büyük ölçüde bozulur. PAYA'da oluşan oksidatif hasar LPO olarak bilinmektedir (2,30). Lipid molekülünde iki doymamış bağ arasında yerleşmiş olan bir metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkarılması ile başlayan kompleks olay LPO'dur. LPO bir kez oluşuktan sonra hücrede kendi kendine devam eden zincir tepkimeler başlar (2). LPO sonucu oluşan lipid peroksil radikalleri (LOO[•]) bir sonraki PAYA'yı okside eder ve yeni zincirleme tepkimeleri başlatırlar (28). Devam eden tepkimeler sonucunda hidroperoksitler (LOOH) ve bunların da devam eden parçalanması ile daha şiddetli radikal özelliği olan türlere özellikle de rölatif olarak daha kararlı hal alan MDA'ya dönüşürler (1,2). Dokuda MDA seviyesinin artması o dokuda SOR'un arttığını gösterir (27). MDA oluştuğu ortamda diffüze olarak ya hücrenin dış ortamına ya da iç kısmına gidip hasar oluşturabilir. Hücre içine girince birçok yapı için zararlı etki gösterir (28).

2.6.2. Proteinlerde ve Nükleik Asitlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Proteinler, DNA tamir enzimleri ve DNA polimerazlar SOR'un major hedefleri arasındadır (58). DNA molekülü serbest radikaller için önemli bir hedeftir ve kolaylıkla hasara uğratılır (2). DNA molekülü hasarı sonucu kronik inflamasyon, enfeksiyon, yaşlanma, karsinogenezis, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli patolojilerin görüldüğü bilinmektedir (59). SOR protein yapısındaki enzimlerin aktivitelerini değiştirir, membran transporter proteinlerini ve reseptör etkileşimlerini bozar (2).

2.7. Enzimatik ve Nonenzimatik Antioksidan Sistemler

2.7.1. Nonenzimatik Antioksidanlar

E Vitamini: Lipid peroksidlerini inaktive eder. Ayrıca lipid peroksid zincirini kırar ve LPO tepkimelerini durdurur (28).

C vitamini: Hücre dışı sıvılarda bulunur. O_2^- ve OH^\cdot 'leri direkt olarak temizleyebilmektedir (28).

Seruloplazmin: O_2^- ve OH^\cdot 'leri temizler (60). Ferröz demirin, ferrik demire yükseltgenmesini sağlar böylelikle Fenton tepkimesini inhibe eder. Bu olayın sonucunda serbest radikal oluşumu inhibe olur (20).

Transferin: Dolaşımda serbest halde bulunan demiri bağlar (30).

Ürik asit: Normal plazma konsantrasyonlarında O_2^- , OH^\cdot ve peroksil radikallerini temizlemektedir (61,62).

Albümin: Geçiş metalleri bağlar, lipid hidroperoksit (LOOH) ve hipoklorit (HOCl) toplayıcısıdır (61,62).

Bilirubin: Serbest radikalleri tutar, O_2^- ve OH^\cdot toplar (61,62).

Piruvat: H_2O_2 tutucusudur, güçlü bir antioksidandır (63).

Taurin: Ksenobiotiklere bağlanır. Hipoklorit ile tepkimeye girer ve etkisini azaltır. LPO ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe eder. Antioksidan etkisinin olduğu gösterilmiştir. (64).

β -Karoten: A vitamininin öncüsüdür ve membranlarda bulunur. Serbest radikal temizleyicisidir. Peroksitlere doğrudan etki ederek peroksitleri inaktif hale getirir (56, 65).

Melatonin: Primer olarak pineal bezde sentezlenen, özellikle gece salgılanan ve triptofandan sentez edilen bir hormondur. Lipofilik özelliği yüksek olup membranları kolaylıkla geçer. Organizmada yapılan ve tahrip edici özelliği çok yüksek olan hidroksil radikali temizler (66).

Glutasyon: Glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden genetik bilgiye sahip olmadan karaciğerde tripeptid yapıda sentezlenmektedir. Glutasyon, oksidatif stresin ölçümünde kullanılan çok güçlü bir antioksidandır. Redükte glutasyon (GSH) / okside glutasyon (GSSG) oranı, oksidatif durumlarda azalmaktadır. Proteinlerdeki

-SH gruplarını redükte halde tutarak oksidasyondan korur. Serbest radikaller ve peroksitlerle tepkimeye giren glutatyon; hücreleri oksidatif hasara karşı korur (55).

Sistein: Potent bir antioksidandır. Glutatyon sentezi için prekürsördür (28).

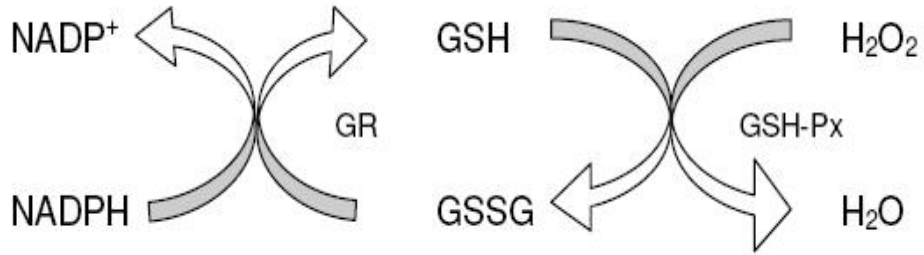
2.7.2. Enzimatik Antioksidanlar

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) belli başlı antioksidan enzimlerdir (55).

2.7.2.1. Glutatyon Peroksidaz

Yapısında selenyum metalini bulundurur. Bu nedenle metalloenzim grubunda değerlendirilir. İn vitro ortamda GSH'ı GSSG'ye çevrilir. Bu tepkimede H_2O_2 'yi yüksek özgülük ile katalizleyerek detoksifiye eder (şekil 3). Tepkimede GSH, GSSG haline dönüşürken glutatyon peroksidaz enzimi H_2O_2 'yi suya indirger. GSSG ise glutatyon redüktaz (GR) enziminin katalizlediği tepkimeyle NADPH harcanarak tekrar redükte hale çevrilir (55).

Tepkime aşağıda verilmiştir:



Şekil 3: Glutatyonun okside ve redükte formları arasında dönüşümü (GSH=Redükte glutatyon, GSSG=Okside glutatyon, GSH-Px=Glutatyon peroksidaz, GR=Glutatyon redüktaz, H_2O_2 =Hidrojen peroksit).

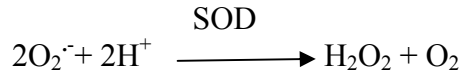
Ortamda H_2O_2 düşük konsantrasyonda bulunduğu GSH-Px enzimi CAT enziminine göre daha etkili bir antioksidandır (28).

2.7.2.2. Katalaz

CAT enzimi glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Ferriprotoporfirin grubu içeren dört alt üniteden oluşmuştur. Prostetik grubunda Fe^{+3} bulunan protoporfirin IX içerir. Dokularda enzimin aktivitesi büyük farklılık gösterir. Karaciğer ve böbrekte en yüksek aktivite, destek dokuda ise en düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (27). H_2O_2 'in yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda oldukça etkilidir (67). Ortamda oluşan H_2O_2 'yi okside edici enzimlerin etkisiyle direkt olarak suya dönüştürür. CAT enzim aktivitesi, ortamda H_2O_2 konsantrasyonunun çok arttığı durumlarda; aşikar olarak artmaktadır. Ortamdaki H_2O_2 konsantrasyonu düşük olduğu durumlarda hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (GSH-Px gibi) devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırırlar (68). CAT ve GSH-Px enzimlerinin benzer etkisi olduğu halde hücre içindeki yerleşim ve etki yerleri bakımından farklılık vardır. GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride bulunurken (28), CAT enzimi peroksizomlarda mevcuttur (2).

2.7.2.3. Süperoksit Dismutaz

SOD, $O_2^{\cdot-}$ 'in, H_2O_2 'e dismutasyonunu katalizleyen enzim grubudur. Katalizlediği tepkime aşağıda verilmiştir:

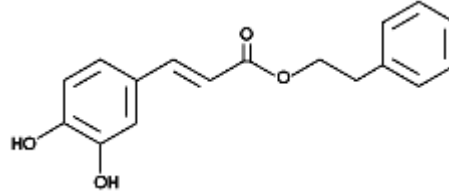


Spontan olarak bu tepkime oluşabilmektedir, SOD enzimi bu tepkimeyi katalize ettiğinde hız normale göre 4 kat artar (69).

Radikallere karşı hücreyi koruyan savunma mekanizmaları arasında SOD enzimi ilk görevi üstlenir. SOD enzimi ile katalizlenen tepkime sonucu oluşan ürünlerin birikmesi CAT enzimi tarafından bertaraf edilmektedir. Fizyolojik şartlarda metabolik aşamalarda $O_2^{\cdot-}$ radikalinin oluşumu oldukça fazladır. $O_2^{\cdot-}$ radikalinin hücre içi konsantrasyonunu düşük seviyelerde tutarak $O_2^{\cdot-}$ seviyelerinin kontrolünü sağlayıp hücreleri $O_2^{\cdot-}$ radikallerinin etkilerinden korur (28).

2.8. CAPE'nin Yapısı ve Özellikleri

CAPE [Phenethyl 3-(3-4 dihydroxyphenyl) acrylate] immünomodülatuar ve immünostimülatör etkisi daha önce gösterilmiş olan bal arısının ürettiği yapıcı flavonoidlere benzeyen, propolis maddesinin aktif bir bileşenidir (70). CAPE'nin hepatotoksisiteden koruyucu, antioksidan, antiinflatuar, antiviral, immünomodülatör, nöroprotektif ve sitostatik etkileri olduğu bilinmektedir (10,11). Diğer propolis bileşenlerine göre araşidonik asit kaskadını güçlü şekilde modüle ettiğinden antiinflatuar etkisi daha belirgindir (70). CAPE'nin iki halkasal yapısı vardır (71). Bu halkasal yapıdan bir tanesi, CAPE molekülünün neredeyse tüm kimyasal özelliklerini gösteren ve fonksiyonel iki OH⁻ grubu taşır (şekil 4). Bu hidroksil grupları, elektronları aktif bir şekilde alıp verir ve bu sayede oksitleyici ve redükleyici özellik gösterir. Aromatik ve alifatik yapıda çok uzun karbon grupları taşımaya bağlı olarak lipofilik özelliğe sahiptir (9, 72). Ornitin karboksilaz, 5- α redüktaz, proteaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz, HIV-1 integras gibi enzimlerin potansiyel inhibitörüdür (9,73,74,75). Nükleer transkripsiyon faktörü olan Nükleer Faktör Kappa-B'nin aktive olmasını özgül ve güçlü bir şekilde inhibe eder (76).



Şekil 4: Kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in kimyasal yapısı (71).

2.9. CAPE'nin Antioksidan Etkisi

Genellikle 10 μ mol/L konsantrasyonda in vitro koşullarda nötrofiller veya ksantin dehidrogenaz/ksantin oksidaz sistemi tarafından meydana getirilen reaktif oksijen türlerinin hepsini bloke ettiği bildirilmiştir (9). CAPE, linoleik asit ve araşidonik asitin 5'-lipooksijenaz enzimi tarafından oluşturulan oksijenasyonunu inhibe eder (70).

Yılmaz ve arkadaşlarının streptozosin ile ratlarda diyabetik örnek oluşturduğu bir çalışmalarında, ratların karaciğer dokusunda MDA seviyeleri, SOD ve CAT

enzim aktivitelerini incelemişlerdir. Streptozosinin oluşturduğu hasar üzerine CAPE'nin koruyucu etkisini araştırmışlardır (77). Diyabetik yapılan ratların karaciğer dokusunda MDA seviyesinin ve SOD, CAT enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre artmış olduğunu bulmuşlardır. Streptozosin+CAPE grubunda MDA seviyelerinin ve SOD, CAT enzim aktivitelerinin kontrol grubuyla benzer olduğunu görmüşlerdir. Yazarlar; diyabetik yapılan ratların karaciğer dokusunda oluşan oksidatif hasarı CAPE'nin önlediğini savunmuşlardır (77).

Gökalp ve arkadaşları izoniazid ile ratların eritrositlerinde oksidatif hasar oluşturarak CAPE'nin bu hasarı önlemede ki etkinliğini araştırmışlardır. Ratların eritrositlerinde MDA seviyeleri, GSH-Px, SOD ve CAT enzim aktivitelerini incelemişlerdir. İzoniazid grubunda eritrositlerde MDA seviyesinin kontrol grubuna göre artmış olduğunu bulmuşlardır. İzoniazid+CAPE grubunda ise MDA seviyesinin kontrol grubuyla benzer olduğunu görmüşlerdir. Yazarlar SOD enzim aktivitesini izoniazid grubunda anlamlı artmış bulmuşlardır. İzoniazid+CAPE grubunda ise SOD enzim aktivitesinde artış olmamasını, CAPE'nin ksantin oksidaz enzimi inhibisyonu yolu ile SOR'ları temizlemesine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. GSH-Px ve CAT enzim aktivitelerinin izoniazid grubunda azalmış olarak tespit edilmesinin artmış oksidatif stresi desteklediğini savunmuşlardır. İzoniazid+CAPE grubunda GSH-Px seviyesinin izoniazid grubundan yüksek tespit edilmesini CAPE'nin antioksidan enzim sistemi üzerine regülatör etkisine bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Yazarlar izoniazid ile ratların eritrositlerinde oluşan oksidatif hasarı CAPE'nin önleyebileceğini savunmuşlardır (78).

Propolis bileşenlerinden biri olan galanginin ve CAPE'nin antioksidan etkinliğinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; her iki bileşenin de ortamdaki O_2^- radikallerini ve ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerini temizlediği gösterilmiştir. Ayrıca CAPE'nin O_2^- radikallerini ve ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerini galanginden daha belirgin temizleyici etkisinin olduğu da bildirilmiştir. CAPE'nin ortamdaki MDA seviyesini galanginden daha belirgin azalttığı bildirilmiştir (72).

3. MATERYAL ve METOD

Çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji, Patoloji ve Biyokimya Anabilim Dallarının laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 1139-Tu-05 proje numarası ile desteklenmiştir. Çalışma, deney hayvanlarının bilimsel amaçla kullanılabilmesi için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alınarak etik kurul kurallarına uygun bir şekilde yapılmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada; 40 adet Wistar-Albino cinsi, 8-12 haftalık, ağırlıkları 116–166 g arasında olan erkek rat kullanıldı. Çalışmadaki ratların hepsi deney süresince standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık) ve oda ısısı koşullarında (20-22 °C) bulunduruldu. Standart rat yemi ile beslendi. Ratların her bir grubu ayrı kafeslere konarak yeterli miktarda içme suyu ve standart rat pellet yemi verildi.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

CAPE, Sigma; Cosmofer® (Ferric hydroxid dextran), Say; genel anestezi için kullanılan Pentothal® (sodyum thiopental) Abbott firmasının üretimidir. Biyokimyasal ölçümler için kullanılan kimyasal maddeler; Folin & Ciocalteus's Phenol Reagent (2N), kloroform, n-Butanol, etanol Merck firmasının; glutathione redüktaz, glutathione-reduced form (GSH C10H17N3O6S), glycine (amino asetic acid; glycocoll) (C2H5N02), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form NADPH; C21H27N7O14P2Na2), nitroblue tetrazolium (NBT C40H30C12N10O6), Xanthine (C5H4N4O2), Xanthine Oxidase, Sigma firmasının üretimidir.

3.1.3. Deneyde Kullanılan Cihazlar

Deneyde kullanılan cihazlar tablo 3’de özetlenmiştir.

Tablo 3: Deneyde kullanılan cihazlar

1	Soğutmalı santrifüj	Eppendorf MR 5415 (Almanya)
2	Derin dondurucu	Facis (Fransa)
3	Hassas terazi	Scaltec (İsviçre)
4	Vortex (karıştırıcı)	Nüve NM 100 (Türkiye)
5	Otomatik pipetler	Gilson (Fransa) \ Eppendorf (Almanya)
6	UV spektrofotometre	Shimadzu UV 1601 (Japonya)
7	Homojenizatör	Ultra Turrax T25 (Almanya)
8	Abbott Aeroset cihazı	IL, (Amerika Birleşik Devletleri)

3.2. Metod

3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması

Ratlar rastgele 4 gruba ayrıldı.

Grup I (Kontrol grubu=10) (Kontrol): 5 gün boyunca günde bir kez 1 mL SF intraperitoneal (i.p.) yoldan verildi.

Grup II (CAPE kontrol grubu=10) (CAPE-K): 5 gün boyunca günde bir kez 10 µmol/kg CAPE i.p. yoldan verildi.

Grup III (Aşırı demir yükü grubu=10) (Demir): 5 gün boyunca günde bir kez 100 mg/kg düşük molekül ağırlıklı demir (Fe^{+3}) i.p. yoldan verildi.

Grup IV (CAPE grubu + Aşırı demir yükü =10) (CAPE+D): 5 gün boyunca günde bir kez 100 mg/kg düşük molekül ağırlıklı demir (Fe^{+3}) ve 10 µmol/kg CAPE i.p. yoldan verildi.

Deney başlangıcında ve 6. gün ratların ağırlıkları tartıldı. İlaç uygulamaları ratların ağırlıklarına göre yapıldı. Tüm grupların enjeksiyonu i.p. yoldan aynı gün başlandı ve 5 gün boyunca yapılarak aynı gün sonlandırıldı. Kontrol grubuna 1 mL SF i.p. yapıldı. Aşırı demir yükü ve CAPE+D gruplarına Cardoso ve Turbino-Ribeiro ve arkadaşlarının aşırı demir yükü oluşturdukları çalışmalara (79,80) uygun şekilde

100 mg/kg düşük molekül ağırlıklı demir dekstran, CAPE-K ve CAPE+D gruplarına Yılmaz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya (77) uygun şekilde 10 µmol/kg dozunda CAPE uygulandı.

3.2.2. Doku Örneklerinin Alınması

Ratlar, son enjeksiyondan 12 saat sonra (deneyin 6. günü) i.p. 20 mg/kg sodyum thiopental ile anestezi yapılarak sakrifiye edildi. Deney sırasında ve sonrasında ölüm olmadı. Orta hat median insizyonla ratların batinları açıldı. Portal venden kan numuneleri alındıktan sonra karaciğer ve kalp dokusu örnekleri çıkarıldı. Doku örnekleri biyokimyasal çalışmalar gerçekleştirilene kadar -20°C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.2.3. Örneklerin Homojenizasyonu ve Deney için hazırlanması

3.2.3.1. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler

Kalp ve karaciğer dokularının homojenizasyonunda ve biyokimyasal çalışmalarda pH: 7,5, 0,2 mM Tris-HCL tamponu kullanıldı (81).

3.2.3.2. Homojenizasyonda Yapılan İşlemler ve Numunelerin Hazırlanması

Kalp ve karaciğer dokularının yaş ağırlıkları tartıldı. Dokuların soğukluğu muhafaza edilerek cam tüpe kondu. Dokuların üzerine 2 ml Tris-HCL tamponu eklendi. Plastik kaplar içine buz dolduruldu ve cam tüpteki dokular plastik kapların içerisine yerleştirilerek 16000 devir/dakika hızda homojenize edildi. Son hacim, doku ağırlığının 2,5 katı olacak şekilde tampon ilave edilerek miktarları kaydedildi. Dokular tekrar homojenize edilerek süre 3 dakikaya tamamlandı. Homojenatın ısısı arttırılmadan eppendorf tüplerine kondu. Tüpler numaralandırıldı. Dokuların yaş ağırlıkları ve eklenen tampon miktarı kaydedildi. Elde edilen homojenatlardan MDA seviyesi ve homojenat protein tayini (Lowry metodu ile) yapıldı (82).

Homojenatlar, 5000 devir/dakika hızında 30 dakika süreyle +4 °C soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant sağlandı. Ayrılan süpernatantlardan GSH-Px,

CAT enzim aktivitesi ve protein tayini yapıldı. Süpernatant 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) ile vortekslenip cam tüpte 3200 devir/dakika hızında 40 dakika süreyle +4 °C’ de santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından protein ve SOD enzimi aktivite tayini yapıldı.

3.2.4. Dokularda Biyokimyasal Analizler

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında spektrofotometrik yöntemle MDA seviyeleri ve SOD, CAT, GSH-Px enzim aktivite ölçüldü.

MDA düzeyini tayin için Draper ve Hadley çift ısıtma yöntemi kullanıldı (83). SOD (EC 1.15.1.1) enzim aktivitesi Sun ve arkadaşlarının metoduna göre (84), CAT (EC 1.11.1.6) enzim aktivitesi Aebi metoduna göre (85), GSH-Px (EC 1.11.1.9) enzim aktivitesi Paglia metoduna göre çalışıldı (86).

Dokularda protein tayini Lowry metoduna göre yapıldı (82). AST, ALT ve ferritin seviyelerinin tayini Abbott Aeroset cihazı ile uygun ticari ELISA kitleri ile çalışıldı.

3.2.5. Histopatolojik İnceleme

Formolde (% 10’luk) fikse edilen kalp ve karaciğer dokusundan alınan örnekler doku takip cihazında izlemden geçirildikten sonra hazırlanan parafin bloklardan, mikrotomda 5 µm kalınlığında her bir örnekten lama kesitler alınmıştır. Kesitler demir içeriğini göstermek amacıyla Prusya mavisi ile boyanmıştır.

Karaciğer dokusunda Kupffer hücrelerinde demir birikiminin değerlendirilmesi Prusya mavisi boyaması ile yapılmıştır. Kupffer hücrelerinde demir birikimi değerlendirilmesi literatüre uygun şekilde 0-3 arasında skorlanmıştır (87,88) (Tablo 4).

Tablo 4: Kupffer hücrelerinde demir birikiminin sınıflandırılması

0	Demir birikimi yok
+	Hafif derecede demir birikimi
++	Orta derecede demir birikimi
+++	Yoğun miktarda demir birikimi

Kalp örneklerinde demir birikiminin değerlendirilmesi Prusya boyası ile literatüre uygun şekilde 0-3 arasında skorlanmıştır (87,88) (Tablo 5).

Tablo 5: Miyosit hücrelerinde demir birikiminin sınıflandırılması

0	Demir birikimi yok
+	Hafif derecede demir birikimi
++	Orta derecede demir birikimi
+++	Yoğun miktarda demir birikimi

3.3. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın analizi bilgisayar ortamında SPSS 9.0 istatistik programında yapıldı. Gruplarda yer alan sonuçların normal dağılıma sahip olup olmadıklarını belirlemek için non-parametrik testlerden one-sample Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Gruplar normal dağılım gösteriyordu. Analizde; ölçüm verileri aritmetik ortalama \pm standart sapma, gruplar arası farklılaşmanın önemini tespiti için Tek Yönlü ANOVA testi kullanıldı. Grupların karşılaştırılması Post Hoc testlerden LSD (Least significant difference) ile yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Parametreler

Biyokimyasal parametrelerin sonuçları Tablo 6, 7 ve 8’de verilmiştir.

Tablo 6: Karaciğer dokusunda ölçülen MDA seviyeleri ve enzim aktiviteleri

Gruplar	MDA (nmol/g protein)	SOD (U/mg protein)	CAT (k/g protein)	GSH-Px (U/g protein)
1- Kontrol (n=10)	28,80 ± 4,38	0,275 ± 0,033	3,66 ± 0,66	0,068 ± 0,019
2- CAPE-K (n=10)	31,56 ± 5,76	0,301 ± 0,021	3,25 ± 0,86	0,084 ± 0,021
3- Demir (n=10)	41,08 ± 2,19	0,376 ± 0,032	2,24 ± 0,76	0,100 ± 0,036
4-CAPE+D (n=10)	36,05 ± 3,06	0,299 ± 0,044	3,84 ± 1,23	0,083 ± 0,018
P değerleri				
1-2	A.D.	A.D.	A.D.	A.D.
1-3	0,0001	0,0001	0,001	0,006
1-4	0,0001	A.D.	A.D.	A.D.
2-3	0,0001	0,0001	0,017	A.D.
2-4	0,019	A.D.	A.D.	A.D.
3-4	0,009	0,0001	0,0001	A.D.

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. A.D. Anlamlı değil

Tablo 7: Kalp dokusunda ölçülen MDA seviyeleri ve enzim aktiviteleri

Gruplar	MDA (nmol/g protein)	SOD (U/mg protein)	CAT (k/g protein)	GSH-Px (U/g protein)
1-Kontrol (n=10)	4,263 ± 1,916	0,158 ± 0,028	0,200 ± 0,036	0,299 ± 0,070
2-CAPE-K (n=10)	4,628 ± 1,235	0,157 ± 0,015	0,196 ± 0,026	0,305 ± 0,069
3-Demir (n=10)	6,755 ± 1,904	0,210 ± 0,028	0,257 ± 0,044	0,388 ± 0,092
4-CAPE+D (n=10)	4,472 ± 1,015	0,164 ± 0,020	0,220 ± 0,044	0,345 ± 0,059
P değeri				
1-2	A.D.	A.D.	A.D.	A.D.
1-3	0,001	0,0001	0,002	0,010
1-4	A.D.	A.D.	A.D.	A.D.
2-3	0,005	0,0001	0,001	0,016
2-4	A.D.	A.D.	A.D.	A.D.
3-4	0,002	A.D.	0,036	A.D.

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. A.D. Anlamlı değil

Tablo 8: Ratların serumlarında AST, ALT ve ferritin değerleri

Gruplar	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ferritin (ng/mL)
1-Kontrol (n=10)	38,7 ± 5,51	26,8 ± 1,39	0,77 ± 0,13
2-CAPE-K (n=10)	34,4 ± 7,01	24,5 ± 4,30	0,80 ± 0,13
3-Demir (n=10)	50,2 ± 7,58	29,9 ± 3,10	3,60 ± 1,85
4-CAPE+D (n=10)	36,4 ± 6,07	27,4 ± 4,00	4,99 ± 2,07
P değerleri			
1-2	A.D.	A.D.	A.D.
1-3	0,0001	0,049	0,0001
1-4	A.D.	A.D.	0,0001
2-3	0,0001	0,001	0,0001
2-4	A.D.	A.D.	0,0001
3-4	0,0001	A.D.	0,033

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. A.D. Anlamlı değil

4.2. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

4.2.1. Karaciğer Dokusu Prusya Boyası ile Değerlendirilmesi

Kontrol ve CAPE-K grubundaki ratlarda demir birikimi görülmedi. Demir grubundaki ratların hepsinde grade III demir birikimi vardı. CAPE+D grubunda bir ratta grade II demir birikimi, diğer 9 ratta ise grade III demir birikimi görüldü. Grupların hiçbirinde fibrozis görülmedi. Karaciğer dokusunda Prusya boyası ile demir birikimi tablo 9’da görülmektedir.

Tablo 9: Karaciğer dokusunda Prusya boyası ile demir birikimi

Gruplar	Histolojik grade
Kontrol (n=10)	0,0 ± 0,00
CAPE-K (n=10)	0,0 ± 0,00
Demir (n=10)	3,0 ± 0,00 ^{a,b}
CAPE+D (n=10)	2,9 ± 0,31 ^{a,b}

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. ^a Kontrol grubuna göre p<0,0001, ^b CAPE grubuna göre p<0,0001.

4.2.2. Kalp dokusunun Prusya boyası ile değerlendirilmesi

Kontrol ve CAPE-K grubunda demir birikimi görülmedi. Grupların hiçbirinde fibrozis görülmedi. Kalp dokusunda Prusya boyası ile demir birikimi tablo 10’da görülmektedir.

Tablo 10: Kalp dokusunda Prusya boyası ile demir birikiminin histolojik değerlendirilmesi

Gruplar	Histolojik grade
Kontrol (n=10)	0,0 ± 0,00
CAPE-K (n=10)	0,0 ± 0,00
Demir (n=10)	1,6 ± 0,96 ^{a,b}
CAPE+D (n=10)	1,5 ± 0,70 ^{a,b}

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. ^a Kontrol grubuna göre p<0,0001, ^b CAPE grubuna göre p<0,0001

5. TARTIŞMA

Hereditör hemokromatozis, talasemi, orak hücreli anemi ve MDS'de vücutta demir birikimi olur. Orak hücre anemisi ve β talasemi major tanısı ile sık transfüzyon alan hastaların karaciğer ve kalp dokusunda demir birikimi olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (89-91).

Demir vücutta fenton tepkimesine girerek hücre için son derece toksik olan SOR'u oluşturur. SOR, PAYA'ları yıkarak membranlarda LPO'ya neden olmaktadır. LPO'nun son ürünü ve iyi bir göstergesi MDA'dır. SOD enzimi, O_2^- radikalini H_2O_2 'ya dönüştürerek ortadan kaldırırken, GSH-Px ve CAT enzimleri H_2O_2 'yi H_2O 'ya parçalayarak temizleyen başlıca antioksidan enzimlerdir. Ortamda O_2^- radikalinin artması SOD enzim aktivitesini, H_2O_2 'in artmış olması GSH-Px ve CAT enzim aktivitelerini dolaylı olarak arttırmaktadır (28).

Demirin oral (92,93), intramüsküler (94) ve i.p. (95,96) yollardan çeşitli dozlarda ve sürelerde verilmesi ile aşırı demir yükü oluşturulduğunun birçok deneysel çalışmada bildirilmiştir. Biz i.p. yoldan 5 gün boyunca demir dekstran 100 mg/kg verilerek karaciğer dokusunda demir birikimi oluşturulduğu histopatolojik olarak gösterilen çalışmaları (79,80) referans alarak ratlarda 100 mg/kg dozunda 5 gün i.p. dozunda demir dekstran ile aşır demir yükü oluşturmaya çalıştık. Önceki bir çalışmada i.p. yoldan verilen demir dekstranın aynı yoldan verilen eşit dozlardaki demir-glukonat, demir-sukrozdan daha fazla olarak kalp ve dalak dokusunda demir birikimine neden olduğu gösterildiğinden demirin bu formu seçildi (97).

Önceki çalışmalarda 100 mg, 200 mg, 400 mg i.p. yoldan demir verilerek doz bağımlı olarak hepatik (96) ve kardiyak (98) demir birikimi histopatolojik olarak gösterilmiştir. Biz çalışmamızda Demir ve CAPE+D grubuna 100 mg/kg dozunda 5 gün i.p. dozunda verdiğimiz demir dekstran ile her iki grupta kontrol ve CAPE-K gruplarına göre karaciğer ve kalp dokusunda anlamlı demir birikimi olduğunu histopatolojik olarak gösterdik. Bu bulgu verdiğimiz demir doz ve süresinin karaciğer ve kalp dokusunda demir yüklenmesi oluşturmak için yeterli olduğunu göstermiştir. Demir ve CAPE+D grubunda histopatolojik olarak benzer sonuçlar bulmamız CAPE'nin dokulara demir bağlanmasını önleyici etkisinin olmadığını göstermiştir.

Çalışmamızda Demir ve CAPE+D gruplarında kontrol ve CAPE-K grubuna göre serum ferritin düzeyi anlamlı yüksekti. Ferritin değerleri histopatolojik veriler ile uyumlu bulundu. Ferritin düzeylerinde aşırı yükselme olmaması ise çalışmanın süresi ve demir dozuyla ilişkili olabilir. CAPE+D grubunda Demir grubuna göre ferritin değerlerinde önemlilik sınırına yakın olarak yükseklik tespit edildi. CAPE ferritin dokulara bağlanmasını kısmen azaltmış böylelikle serum ferritini artmış olabilir. Demir grubunda diğer üç gruptan yüksek AST değerleri bulduk. ALT değerinde de diğer üç gruba göre artış görülmekle birlikte belirgin değildi. CAPE-D grubunda ise AST ve ALT, kontrol ve CAPE-K grubuyla benzer değerlerdeydi. Demirin karaciğer dokusunda oksidatif hasarına bağlı AST ve ALT artmış olabilir. CAPE'nin karaciğer üzerindeki koruyucu etkisinden dolayı AST ve ALT enzimlerinin yükselmesi önlenmiş olabilir.

Aşırı demir yükü oluşturulan önceki deneysel çalışmalarda MDA seviyesi doku ve serum örneklerinde kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu çalışmalarda aşırı demir yükü ile ortamda oksidatif stres oluştuğunu ve LPO'nun son ürünü ve iyi bir göstergesi olan MDA'nın bu yüzden artmış olabileceği fikri savunulmuştur (99-101).

Sık transfüzyona maruz kalan talasemili hastalarda aşırı demir yüküne bağlı olarak ortamda oksidatif stres oluştuğu ve SOD enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir (102,103). SOD enzimi, O_2^- radikalini H_2O_2 'e dönüştüren tepkimeyi katalizleyerek O_2^- radikallerinin hücre üzerine toksik etkilerini önlemektedir (27). Oluşan oksidatif stres sonucu ortamda artan O_2^- radikalini temizlemek için SOD enzim aktivitesinin artmış olabileceği bildirilmiştir (102,103).

Oksidatif stresde, hücrelerde oksidan/antioksidan dengenin korunması için SOD enzimi üretimi artar. SOR membran fosfolipidleri proteinleri ve nükleik asitleri etkileyerek doku hasarına neden olmaktadır. Serbest radikal toksikasyonunu engelleyen SOD enzim aktivitesinin, plazma demir artışıyla paralellik gösterdiği, plazma demiri arttıkça SOD enzim aktivitesinin de arttığı ileri sürülmektedir (104).

CAT enzimi H_2O_2 'yi temizleyen başlıca antioksidan enzimlerden biridir. Aşırı demir yükü ile oksidatif stres oluşturulan çalışmaların bir kısmında CAT enzim aktivitesi düşük bulunmuştur. CAT enzim aktivitesinde ki bu düşüşün gen

ekspresyonunun down regülasyonuna (105) ve SOR'un ortamda aşırı artması sonucu antioksidan savunma sisteminin bozulmasına bağlı olduğu savunulmuştur (106,107).

Ortamda H₂O₂'in artması CAT enzim aktivitesini dolaylı olarak artırmaktadır. Ortamda bulunan demir ve diğer metal iyonlarının oksidatif stres oluşturduğu ve CAT enzim aktivitesinin arttığı bilinmektedir (68). Demir maruziyeti sonrası CAT enzim aktivitesinin arttığı ve bu artışın oluşan oksidatif stres sonucu ortamda artan H₂O₂ radikalini temizlemek için olduğu fikri savunulmuştur (108).

Aşırı demir yükü ile oksidatif stres oluşumu deneysel hayvan modelleri üzerinde çalışılmış ve sıklıkla GSH-Px enzim aktivitesinde azalma saptanmıştır (109-111). Bazı çalışmalarda bu enzim aktivitesi değişmemiş (112) bir kısmında ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış bulunmuştur (113,114).

CAPE'nin belirgin antioksidan etkisi olduğu daha önceki rat çalışmalarında gösterilmiştir (78,115). Rat deneylerinde lityum, metotreksat gibi çeşitli ajanlarla oksidatif stres oluşturulan gruplara göre CAPE'nin koruyucu ilaç olarak verildiği gruplarda, MDA seviyesinin anlamlı olarak düşük bulunduğu bildirilmiştir. CAPE'nin ortamda oksidatif stres oluşmasını önleyerek MDA seviyesinde yükselmeyi önlediği görüşü literatürde vurgulanmıştır (116,117). Önceki çalışmalarda CAPE'nin antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki artışı, SOR'ları temizleyici etkisinden dolayı önlediği fikri savunulmuştur (77,118). Antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki azalmayı önleyici etkisinin ise tam olarak bilinmediği ancak transkripsiyonel ve translasyonel yollar üzerine etkisi ile olabileceği spekülasyonu yapılmıştır (119,120).

Çalışmamızda Demir ve CAPE+D gruplarının karaciğer dokusunda kontrol ve CAPE-K grubuna kıyasla MDA seviyesi anlamlı olarak yüksek tespit edildi. CAPE+D grubunda MDA seviyesi Demir grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. MDA seviyesinin Demir grubunda, kontrol ve CAPE-K grubuna göre yüksek olması demir yüklenmesi ile oksidatif hasarın oluştuğunu göstermektedir. MDA seviyesinin CAPE+D grubunda Demir grubuna göre anlamlı olarak düşük olması; CAPE'nin oluşan oksidatif stresi önlediğini göstermiştir. CAPE+D grubunda kontrol ve CAPE-K grubuna göre MDA'nın anlamlı olarak yüksek olması da CAPE'nin demir yüklenmesi ile karaciğerde oluşan hasarı önlemede kısmen etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Demir grubunun kalp dokusunda MDA seviyesini diğer 3 gruptan anlamlı olarak yüksek bulduk. CAPE+D grubunda ise MDA seviyesi kontrol ve CAPE-K grubu ile benzer, Demir grubundan anlamlı olarak düşük bulundu. Demir grubunda MDA seviyesinin yüksek bulunması aşırı demir yükü ile kalp dokusunda oksidatif stres oluştuğunu gösterdi. CAPE+D grubunda MDA düzeyinin Demir grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunması ise CAPE'nin aşırı demir yükü ile kalp dokusunda oksidatif stres oluşmasını önlediğini göstermektedir.

Çalışmamızda Demir grubunun karaciğer dokusunda SOD enzim aktivitesinin artmış olduğunu tespit ettik. Demir toksisitesi ile oluşan oksidatif stres sonucu ortamda artan O_2^- radikalini temizlemek için SOD enzim aktivitesinin artmış ve CAPE'nin serbest oksijen radikallerini temizleyici etkisinden dolayı SOD enzim aktivitesinde yükselmeyi önlemiş olabilir. Demir grubunun kalp dokusunda da SOD enzim aktivitesinin kontrol ve CAPE-K gruplarına göre artmış olduğu tespit edildi. CAPE+D grubunda SOD aktivitesi artışı bir miktar önlenmiş ancak bu demir grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu bulgu CAPE'nin kalp dokusunda SOD enzim aktivitesindeki yükselmeyi önlemede kısmi etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada Demir grubunun karaciğer dokusunda CAT enzim aktivitesinin azalması, ortamda H_2O_2 'nin aşırı artması sonucu CAT enziminin fazla tüketilmesine bağlı olabilir. Kalp dokusunda oluşan oksidatif stres sonucu ortamda artan H_2O_2 radikalini temizlemek için CAT enzim seviyesi artmış olabilir. CAPE, SOR'ları temizleyici etkisinden dolayı kalp dokusunda CAT enzim aktivitesinde yükselmeyi önlemiş olabilir.

Demir grubunda her iki dokuda da GSH-Px enzim aktivitesini yüksek bulduk. Karaciğer dokusunda bu enzim aktivitesinde ki artış daha belirgindi. Demir grubunun karaciğer dokusunda GSH-Px enzim aktivitesi artışı sadece Kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur. Demir grubunun kalp dokusunda bu enzimin aktivitesi kontrol ve CAPE-K grubuna göre önemlilik sınırına yakın olarak artmış bulundu. Oksidatif stres sonucu, H_2O_2 'nin düşük konsantrasyonlarda oluştuğu ortamlarda GSH-Px enzimi etkili iken H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda CAT enzimi oldukça etkilidir (13). Her iki dokuda da demir toksisitesi ile muhtemelen

yüksek konsantrasyonlarda H₂O₂ oluşmuş ve bu yüzden GSH-Px düzeyinde belirgin olmayan bir artış olmuş olabilir.

Karaciğer dokusunda α -tokoferol, glutatyon, SOD, CAT, GSH-Px, GR gibi antioksidan ve sitoprotektif enzimler diğer dokulardan daha fazla bulunmaktadır. Kalp dokusunda ise bu antioksidan ve sitoprotektif enzimler karaciğer ve dalak dokusundan daha az bulunurken beyin dokusundakinden ise daha fazladır (20). Enzim düzeylerinin dokularda farklılık göstermesi çalışmamızda kalp ve karaciğer dokularında enzim düzeylerini farklı bulmamızı açıklayabilir. Demirin i.p. olarak verilmesi portal dolaşıma daha fazla geçmesine ve karaciğer dokusuna daha fazla toksik etki yapmasına neden olmuş olabilir.

Aşırı demir yükü sonucu fenton tepkimesi ile doku ve hücrelerde SOR oluşmaktadır. Oluşan SOR'lar ise doku ve hücreler üzerine oldukça toksiktir. Çalışmamız kısa süreli de olsa aşırı demir yüküne maruz kalmanın doku ve hücrelerde oksidatif stres meydana getirdiğini ve dokularda demir birikimine neden olduğunu göstermiştir. CAPE'nin aşırı demir yükü ile oluşan bu oksidatif stresi azalttığı görülmüştür. CAPE'nin dokuda demir birikimini önleyici etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Talasemi ve diğer transfüzyon bağımlı anemilerde hastalar düzenli olarak transfüzyona ve dolayısıyla uzun süreli olarak aşırı demir yüküne maruz kalmaktadır. Bizim çalışmamız CAPE'nin demir yükü ile oluşan oksidatif stresi önlemede etkinliğinin araştırıldığı kısa süreli pilot bir çalışmadır. Literatürde bu konu ile ilgili bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Bu yüzden çalışmamız bundan sonraki talasemi ve diğer transfüzyon bağımlı anemi modellerine daha uygun olacak şekilde aşırı demir yükü oluşturulacak ve bu aşırı demir yükünün zararlarını önlemede CAPE'nin etkinliğinin araştırılacağı diğer çalışmalara ışık tutabilir.

6. SONUÇ

Beş gün boyunca i.p. yoldan 100 mg/kg dozda verilen düşük molekül ağırlıklı demir dekstranın histopatolojik olarak karaciğer ve kalp dokularında yoğun olarak biriktiği gösterilmiştir. Biyokimyasal parametreler değerlendirildiğinde aşırı demir yükünün LPO'nun son ürünü ve oksidatif stresin iyi bir göstergesi olan MDA seviyesini artırdığı görülmüştür. CAPE'nin ise aşırı demir yükü ile MDA seviyesinde meydana gelen yükselmeyi önlediği görülmüştür. Bu çalışma ile elde edilen veriler ışığında talasemi ve diğer transfüzyon bağımlı anemilerde aşırı demir yükü ile oluşan oksidatif stres sonucunda meydana gelen doku harabiyetini önlemede CAPE'nin yararlı bir ajan olabileceği düşünülmüştür. Şelatör tedaviye ek olarak CAPE'nin antioksidan ajan olarak kullanılmasının aşırı demir yüküne maruz kalan hastaların yaşam kaliteleri ve süreleri üzerine etkisinin araştırılması daha sonra yapılacak çalışmalarda planlanabilir.

7. ÖZET

RATLARDA DEMİR YÜKLENMESİ İLE OLUŞTURULAN OKSİDATİF STRESİN ÖNLENMESİNDE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER'İN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada, aşırı demir yüklenmesi sonucu oluşan oksidatif hasarın önlenmesinde kafeik asit fenetil ester (CAPE)' in etkinliği araştırıldı.

Çalışmamıza 40 erkek Wistar-albino rat alınarak, her grupta 10 rat olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna serum fizyolojik, CAPE-K grubuna 10 µmol/kg/gün CAPE, demir grubuna 100 mg/kg/gün demir dekstran, CAPE+Demir grubuna µmol/kg/gün CAPE ve 100 mg/kg/gün demir dekstran intraperitoneal olarak 5 gün boyunca verildi. Son enjeksiyondan 12 saat sonra ratların yaşamına son verilerek karaciğer ve kalp dokuları çıkarıldı. Karaciğer ve kalp dokusunda demir birikimi histolojik olarak değerlendirildi. Her iki dokuda malondialdehit (MDA) seviyesi, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktiviteleri ve serumda AST, ALT ve ferritin değerleri ölçüldü.

Demir ve CAPE+D grubunda histopatolojik olarak demir birikimi tespit edildi. Demir grubunda kalp ve karaciğer dokusundaki MDA seviyesi Kontrol ve CAPE+Demir grubuna göre anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla; kalp $p \leq 0,001$, $p \leq 0,002$; karaciğer $p \leq 0,0001$, $p \leq 0,009$). Demir grubunda SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri her iki dokuda artmış bulundu. Demir grubunda CAT enzim aktivitesinin kalp dokusunda artarken karaciğer dokusunda azaldığı bulundu. Demir ve CAPE+Demir grubunda ferritin değeri anlamlı artmış saptandı. Demir grubunda AST ve ALT değerlerinin kontrol grubuna göre arttığı görüldü. CAPE+Demir grubunda AST ve ALT değerleri Kontrol grubuyla benzer bulundu.

Bu bulgular sonucunda klinik kullanımda CAPE, karaciğer ve kalp dokusunda demir toksisitesi ile oluşan oksidatif stresin önlenmesinde etkin bir tedavi seçeneği olabilir.

Anahtar kelimeler: Aşırı demir yükü, kafeik asit fenetil ester (CAPE), oksidatif stres, karaciğer, kalp.

8. SUMMARY

EVALUATING THE EFFECT OF CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER (CAPE) ON IRON OVERLOAD INDUCED OXIDATIVE STRESS IN RAT

We investigated the protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on oxidative damage due to iron overload in rats.

Forty male Wistar rats were randomly divided into four groups. All medical administrations were performed intraperitoneally in all groups for 5 days. Control group received serum physiologic (0,9%, w/v); CAPE-Control group received 10 $\mu\text{mol/kg/day}$ CAPE; Iron group received 100mg/kg/day iron dextran; CAPE+Iron group received 10 $\mu\text{mol/kg/day}$ CAPE and 100 mg/kg/day iron dextran. All animals were sacrificed after 12 hours from last injections and liver and heart tissue samples were taken for histological evaluation of iron overload and determination of malonyldialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px). In addition serum AST, ALT and ferritin levels were also studied.

Iron overload was detected via histopathological evaluation in Iron and CAPE+Iron groups. In both liver and heart tissues, MDA level was found significantly high in Iron group as compared with Control and CAPE+Iron groups (respectively; heart $p \leq 0,001$, $p \leq 0,002$; liver $p \leq 0,0001$, $p \leq 0,009$). In Iron group, SOD and GSH-Px enzyme activities were found increased in both tissues. In Iron group, while an increase in CAT activity was observed in heart tissue, a decrease was found in liver tissue. Ferritin was found significantly increased in Iron and CAPE+Iron groups. AST and ALT were found increased in Iron group. AST and ALT levels were similar in Control and CAPE+Iron groups

According to our findings, CAPE may be an effective treatment option for the protection of iron induced oxidative stress in heart and liver tissues.

Key words: Iron overload, caffeic acid phenethyl ester (CAPE), oxidative stress, liver, heart.

9. KAYNAKLAR

1. VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN MT, MAZUR M, TELSER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
2. KARIHTALA P, SOINI Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 2007; 115: 81-103.
3. CADENAS E, DAVIES KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 222-230.
4. ORRENIUS S, GOGVADZE V, ZHIVOTOVSKY B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 143-183.
5. VALKO M, RHODES CJ, MONCOL J, IZAKOVIC M, MAZUR M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1-40.
6. BEUTLER E. Iron storage disease: facts, fiction and progress. *Blood Cells Mol Dis* 2007; 39: 140-147.
7. FAIRBANKS VF, FAHEY JL, BEUTLER E. Clinical Disorders of Iron Metabolism, 2 nd Ed. Grune and Stratton, New York. 1971, pp.: 213–253.
8. BRITTENHAM G. Disorders of iron metabolism: iron deficiency and overload. IN HEMATOLOGY, BASIC PRINCIPLES and PRACTICE 3 nd Ed. In: HOFFMAN R, BENZ E, SHATTIL S, FURIE B, COHEN H, SILBERSTEIN L, MCGLAVE P (eds). New York Copyright © 2000 Churchill Livingstone, 2000; pp.: 397-428.
9. SUD'INA GF, MIRZOEVA OK, PUSHKAREVA MA, KORSHUNOVA GA, SUMBATYAN NV, VARFOLOMEEV SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipooxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett* 1993; 329: 21-24.
10. CASTALDO S, CAPASSO F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 2002;73: 1-6.
11. DOBROWOLSKI JW, WOHORAQ SB, SHARMA K, SHAH SH, NAQVI SAH, DANDIYA PC. Antibacterial, antifungal, antiamoabic, antiinflammatory, and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol* 1991;35: 77-82.
12. SMITH LH JR. Overview of hemochromatosis. *West J Med* 1990;153: 296-308.
13. SHARMA N, BUTTERWORTH J, COOPER BT, TSELEPIS C, IQBAL TH. The emerging role of the liver in iron metabolism. *Am J Gastroenterol* 2005;100: 201-206.
14. BEUTLER E. Disorders of iron metabolism. *WILLIAMS HEMATOLOGY*, 7 nd Ed. In: LICHTMAN MA, BEUTLER E, KIPPS TJ, SELIGSOHN U, KAUSHANSKY K, PRCHAL JT (eds). New York: McGraw-Hill. 2006; pp.: 511–553.
15. CRICHTON RR, WILMET S, LEGSSYER R, WARD RJ. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorg Biochem* 2002; 91: 9-18.
16. GANZ T. Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology Am Soc* 2006;507: 29-35.
17. UMBREIT J. Iron deficiency: a concise review. *Am J Hematol* 2005; 78: 225-31.

18. ATANASIU V, MANOLESCU B, STOIAN I. Hepcidin--central regulator of iron metabolism. *Eur J Haematol* 2007; 78: 1-10.
19. ANDREWS NC, SCHMIDT PJ. Iron homeostasis. *Annu Rev Physiol* 2007; 69: 69-85.
20. Crichton R. Inorganic biochemistry of iron metabolism. From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences 2 nd Ed. John Wiley & Sons Ltd 2001.
21. SYED BA, SARGENT PJ, FARNAUD S, EVANS RW. An overview of molecular aspects of iron metabolism. *Hemoglobin* 2006;30: 69-80.
22. VYORAL D, PETRAK J. Hepcidin: a direct link between iron metabolism and immunity. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 1768-1773.
23. DUNN LL, RAHMANTO YS, RICHARDSON DR. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol* 2007; 17: 93-100.
24. MEANS RT JR. Hepcidin and anaemia. *Blood Rev.* 2004;18: 219-25.
25. NAIRZ M, WEISS G. Molecular and clinical aspects of iron homeostasis: From anemia to hemochromatosis. *Wien Klin Wochenschr* 2006; 118: 442-462.
26. RUND D, RACHMILEWITZ E. Beta-thalassemia. *N Engl J Med.* 2005; 353: 1135-1146.
27. VON SONNTAG C. Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2006.
28. GILBERT DL, COLTON CA. Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Inter disciplinary Approach. KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, 2002.
29. BURDON RH. Free radicals and cell proliferation. *FREE RADICAL DAMAGE and ITS CONTROL* 28 nd Ed. In: RICE-EVANS CA, BURDON RH (eds). 1994, pp.: 155–185.
30. HALLIWELL B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med* 1989;82: 747-752.
31. EATON JW, QIAN M. Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 833-840.
32. YOUNG IS, TROUTON TG, TORNEY JJ, MCMASTER D, CALLENDER ME, TRIMBLE ER. Antioxidant status and lipid peroxidation in hereditary haemochromatosis. *Free Radic Biol Med* 1994;16: 393-7.
33. HERSHKO C, LINK G, CABANTCHIK I. Pathophysiology of iron overload. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 850:191-201.
34. FRIEDMAN S. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-1835.
35. BECKMAN JK, BOROWITZ SM, BURR IM. The role of phospholipase A activity in rat liver microsomal lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1987; 262: 1479-1484.
36. BATALLER R, BRENNER DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115: 209-218.
37. DABBAGH AJ, MANNION T, LYNCH SM, FREI B. The effect of iron overload on rat plasma and liver oxidant status in vivo. *Biochem J* 1994; 300: 99-803.
38. DEUGNIER Y, TURLIN B. Pathology of hepatic iron overload. *World J Gastroenterol* 2007;13: 4755-4760.
39. PHILIPPE MA, RUDELL RG, RAMM GA. Role of iron in hepatic fibrosis: One piece in the puzzle. *World J Gastroenterol* 2007;13: 4746-4754.

40. LINK G, SAADA A, PINSON A, KONIJN AM, HERSHKO C. Mitochondrial respiratory enzymes are a major target of iron toxicity in rat heart cells. *J Lab Clin Med* 1998;131: 466-474.
41. MATTERA R, STONE GP, BAHUR N, KURYSHV YA. Increased release of arachidonic acid and eicosanoids in iron-overloaded cardiomyocytes. *Circulation* 2001; 103: 2395-2401.
42. AESSOPOS A, KATI M, FARMAKIS D. Heart disease in thalassemia intermedia: a review of the underlying pathophysiology. *Haematologica* 2007; 92: 658-65.
43. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet* 1984; 1: 1396-1397.
44. FREEMAN BA, CRAPO JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426.
45. HALLIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004;142: 231-255.
46. SCHEIBMEIR HD, CHRISTENSEN K, WHITAKER SH, JEGAETHESAN J, CLANCY R, PIERCE JD. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs* 2005; 21: 24-28.
47. THOMAS MJ. The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working? *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995; 5: 21-29.
48. OLINSKI R, SIOMEK A, ROZALSKI R, GACKOWSKI D, FOKSINSKI M, GUZ J, DZIAMAN T, SZPILA A, TUDEK B. Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases. *Acta Biochim Pol* 2007; 54: 11-26.
49. JEZEK P, HLAVATÁ L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 2478-2503.
50. UZ E, OKTEM F, YILMAZ HR, UZAR E, OZGUNER F. The activities of purine-catabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem* 2005; 277: 165-70.
51. PAGANO G. Redox-modulated xenobiotic action and ROS formation: a mirror or a window? *Hum Exp Toxicol* 2002; 21: 77-81.
52. SASAKI Y. Does oxidative stress participate in the development of hepatocellular carcinoma? *J Gastroenterol* 2006; 41: 1135-1148.
53. WU D, CEDERBAUM AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health* 2003; 27: 277-284.
54. CHOE E, MIN DB. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006; 46: 1-22.
55. URSO ML, CLARKSON PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003;189: 41-54.
56. DRISKO JA, CHAPMAN J, HUNTER VJ. The use of antioxidant therapies during chemotherapy. *Gynecol Oncol* 2003;88: 434-439.
57. CHEESEMAN KH, SLATER TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 481-493.

58. WISEMAN H, HALLIWELL B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313: 17-29.
59. COOKE MS, OLINSKI R, EVANS MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta* 2006;365: 30-49.
60. ATANASIU RL, STEA D, MATEESCU MA, VERGELEY C, DALLOS F, BRIOT F, MAUPOIL V, NADEAU R, ROCHETTE L. Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties. *Mol Cell Biochem* 1998; 189:127 – 135.
61. EREL O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004; 37: 112-119.
62. AYCICEK A, EREL O, KOCYIGIT A. Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking. *Eur J Pediatr* 2005;164: 775-778.
63. FEDELI D, FALCIONI G, OLEK RA, MASSI M, CIFANI C, POLIDORI C, GABBIANELLI R. Protective effect of ethyl pyruvate on msP rat leukocytes damaged by alcohol intake. *J Appl Toxicol* 2007.
64. WRIGHT CE, TALLAN HH, LIN YY. Taurine, biological update. *Annu. Rev. Biochem* 1986; 55: 427–453.
65. KRINSKY NI, JOHNSON EJ. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* 2005; 26: 459-516.
66. TAN DX, MANCHESTER LC, REITER RJ, PLUMMER RF, LIMSON J, WEINTRAUB ST, QI WB. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin transformation. *Free Rad Biol Med* 2000; 29: 1177–85.
67. HALLIWELL B. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. *New Phyto* 1974; 73: 1075-1086.
68. DAT J, VANDENABEELE S, VRANOVÁ E, VAN MONTAGU M, INZÉ D, VAN BREUSEGEM F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 779-795.
69. VALKO M, IZAKOVIC M, MAZUR M, RHODES CJ, TELSER J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266: 37-56.
70. BORRELLI F, MAFFIA P, PINTO L, IANARO A, RUSSO A, CAPASSO F, IALENTI A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* 2002;73: 53-63.
71. WANG X, BOWMAN PD, KERWIN SM, STAVCHANSKY S. Stability of caffeic acid phenethyl ester and its fluorinated derivative in rat plasma. *Biomed Chromatogr* 2007; 21: 343-350.
72. RUSSO A, LONGO R, VANELLA A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 2002; 73: 21-29.
73. JAISWAL AK, VENUGOPAL R, MUCHA J, CAROTHERS AM, GRUNBERGER D. Caffeic acid phenethyl ester stimulates human antioxidant response element-mediated expression of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene. *Cancer Res* 1997; 57: 440-446.

74. HUANG MT, MA W, YEN P, XIE JG, HAN J, FRENKEL K, GRUNBERGER D, CONNEY AH. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in mouse skin and the synthesis of DNA, RNA and protein in HeLa cells. *Carcinogenesis* 1996;17: 761-765.
75. SON S, LOBKOWSKY EB, LEWIS BA. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): synthesis and X-ray crystallographic analysis. *Chem Pharm Bull* 2001; 49: 236-238.
76. NATARAJAN K, SINGH S, BURKE TR JR, GRUNBERGER D, AGGARWAL BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 9090-9095.
77. YILMAZ HR, UZ E, YUCEL N, ALTUNTAS I, OZCELIK N. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *J Biochem Mol Toxicol* 2004; 18: 234-238.
78. GOKALP O, UZ E, CICEK E, YILMAZ HR, OZER MK, ALTUNBAS A, OZCELIK N. Ameliorating role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against isoniazid-induced oxidative damage in red blood cells. *Mol Cell Biochem* 2006; 290: 55-59.
79. CARDOSO LM, PEDROSA ML, SILVA ME, MORAES MF, COLOMBARI E, CHIANCA DA JR. Baroreflex function in conscious rats submitted to iron overload. *Braz J Med Biol Res* 2005;38: 205-214.
80. TURBINO-RIBEIRO SM, SILVA ME, CHIANCA DA JR, DE PAULA H, CARDOSO LM, COLOMBARI E, PEDROSA ML. Iron overload in hypercholesterolemic rats affects iron homeostasis and serum lipids but not blood pressure. *J Nutr* 2003;133: 15-20.
81. AKKUŞ İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya.1995.
82. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
83. DRAPER HH, HADLEY M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990;186: 421-431.
84. SUN Y, OBERLEY LW, LI Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
85. AEBI H. Catalase In: Bergmeyer U, ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York and London: Academic Press, 1974; 673-677.
86. PAGLIA DE, VALENTINE WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
87. GUO L, ENZAN H, HAYASHI Y, MIYAZAKI E, JIN Y, TOI M, KURODA N, HIROI M. Increased iron deposition in rat liver fibrosis induced by a high-dose injection of dimethylnitrosamine. *Exp Mol Pathol* 2006; 81: 255-261.
88. GÜRKAN E, ERGUN Y, ZORLUDEMİR S, BAŞLAMIŞLI F, KOÇAK R. Liver involvement in sickle cell disease. *Turk J Gastroenterol* 2005;16: 194-198.
89. BALLAS SK. Iron overload is a determinant of morbidity and mortality in adult patients with sickle cell disease. *Seminars in Hematology* 2001; 38: 30-36.
90. VICHINSKY E, BUTENSKY E, FUNG E, HUDES M, THEIL E, FERRELL L, WILLIAMS R, LOUIE L, LEE PD, HARMATZ P. Comparison of organ dysfunction in transfused patients with SCD or beta thalassemia. *Am J Hematol* 2005; 80: 70-74.

91. BORGNA-PIGNATTI C, CAPPELLINI MD, DE STEFANO P, DEL VECCHIO GC, FORNI GL, GAMBERINI MR, GHILARDI R, ORIGA R, PIGA A, ROMEO MA, ZHAO H, CNAAN A. Survival and complications in thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1054: 40-47.
92. ASARE GA, MOSSANDA KS, KEW MC, PATERSON AC, KAHLER-VENTER CP, SIZIBA K. Hepatocellular carcinoma caused by iron overload: a possible mechanism of direct hepatocarcinogenicity. *Toxicology* 2006; 219: 41-52.
93. DOMITROVIC R, TOTA M, MILIN C. Oxidative stress in mice: effects of dietary corn oil and iron. *Biol Trace Elem Res* 2006; 113:177-91.
94. BHATT P, SWARUP D, PATRA RC, PATTANAIK AK, RANJAN R. Enhanced erythrocytic lipid peroxides level in rabbits after repeated parental administration of iron. *Indian J Exp Biol* 2005; 43: 854-8.
95. THEURL I, LUDWICZEK S, ELLER P, SEIFERT M, ARTNER E, BRUNNER P, WEISS G. Pathways for the regulation of body iron homeostasis in response to experimental iron overload. *J Hepatol* 2005; 43: 711-9.
96. MCCULLOUGH KD, BARTFAY WJ. The dose-dependent effects of chronic iron overload on the production of oxygen free radicals and vitamin E concentrations in the liver of a murine model. *Biol Res Nurs* 2007; 8: 300-304.
97. LEGSSYER R, GEISSER P, MCARDLE H, CRICHTON RR, WARD RJ. Comparison of injectable iron complexes in their ability to iron load tissues and to induce oxidative stress. *Biometals* 2003; 16: 425-433.
98. DAVIS MT, BARTFAY WJ. Dose-dependent effects of chronic iron burden on heart aldehyde and acyloin production in mice. *Biol Trace Elem Res* 2004; 99: 255-68.
99. MYERS BM, PRENDERGAST FG, HOLMAN R, KUNTZ SM, LARUSSO NF. Alterations in the structure, physicochemical properties, and pH of hepatocyte lysosomes in experimental iron overload. *J Clin Invest* 1991; 88: 1207-1215.
100. HORNE WI, TANDLER B, DUBICK MA, NIEMELÄ O, BRITTENHAM GM, TSUKAMOTO H. Iron overload in the rat pancreas following portacaval shunting and dietary iron supplementation. *Exp Mol Pathol* 1997; 64: 90-102.
101. BRUNET S, THIBAUT L, DELVIN E, YOTOV W, BENDAYAN M, LEVY E. Dietary iron overload and induced lipid peroxidation are associated with impaired plasma lipid transport and hepatic sterol metabolism in rats. *Hepatology* 1999; 29: 1809-181.
102. NAITHANI R, CHANDRA J, BHATTACHARJEE J, VERMA P, NARAYAN S. Peroxidative stress and antioxidant enzymes in children with beta-thalassemia major. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 46: 780-785.
103. MERAL A, TUNCEL P, SURMEN-GUR E, OZBEK R, OZTURK E, GUNAY U. Lipid peroxidation and antioxidant status in beta-thalassemia. *Pediatr Hematol Oncol* 2000; 17: 687-693.
104. SEYMEN HO, MENGI M, ÖZÇELİK D, GÜLYAŞAR T, SEYMEN P, YİĞİT G. Demir yüklemesinin plazma bakır ve çinko düzeylerine etkisi. *Cerrahpaşa J Med* 1999; 30: 155-158.
105. JAGETIA GC, REDDY TK, VENKATESHA VA, KEDLAYA R. Influence of naringin on ferric iron induced oxidative damage in vitro. *Clin Chim Acta* 2004; 347: 189-197.

106. KOYU A, OZGUNER F, CALISKAN S, KARACA H. Preventive effect of vitamin E on iron-induced oxidative damage in rabbit. *Toxicol Ind Health* 2005; 21: 239-242.
107. GULEC M, GUREL A, ARMUTCU F. Vitamin E protects against oxidative damage caused by formaldehyde in the liver and plasma of rats. *Mol Cell Biochem* 2006; 290: 61-67.
108. DORESWAMY K, MURALIDHARA. Genotoxic consequences associated with oxidative damage in testis of mice subjected to iron intoxication. *Toxicology* 2005; 206: 169-178.
109. SOCHASKI MA, BARTFAY WJ, THORPE SR, BAYNES JW, BARTFAY E, LEHOTAY DC, LIU PP. Lipid peroxidation and protein modification in a mouse model of chronic iron overload. *Metabolism* 2002; 51: 645-51.
110. BARTFAY WJ, BARTFAY E. Iron-overload cardiomyopathy: evidence for a free radical mediated mechanism of injury and dysfunction in a murine model. *Biol Res Nurs* 2000; 2: 49-59.
111. GALLEANO M, PUNTARULO S. Effect of mild iron overload on liver and kidney lipid peroxidation. *Braz J Med Biol Res* 1994; 27: 2349-58.
112. IBRAHIM W, LEE US, YEH CC, SZABO J, BRUCKNER G, CHOW CK. Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver: effects of dietary lipid, vitamin E and iron. *J Nutr* 1997; 127: 1401-6.
113. CARRIER J, AGHDASSI E, PLATT I, CULLEN J, ALLARD JP. Effect of oral iron supplementation on oxidative stress and colonic inflammation in rats with induced colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15:v1989-1999.
114. ZÖDL B, SARGAZI M, ZEINER M, ROBERTS NB, STEFFAN I, MARKTL W, EKMEKCIOGLU C. Toxicological effects of iron on intestinal cells. *Cell Biochem Funct* 2004; 22:v143-7.
115. OKTEM F, OZGUNER F, SULAK O, OLGAR S, AKTURK O, YILMAZ HR, ALTUNTAS I. Lithium-induced renal toxicity in rats: protection by a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem* 2005; 277: 109-115.
116. SAHIN O, SULAK O, YAVUZ Y, UZ E, EREN I, RAMAZAN YILMAZ H, MALAS MA, ALTUNTAS I, SONGUR A. Lithium-induced lung toxicity in rats: the effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Pathology* 2006; 38: 58-62.
117. UZAR E, SAHIN O, KOYUNCUOGLU HR, UZ E, BAS O, KILBAS S, YILMAZ HR, YUREKLI VA, KUCUKER H, SONGUR A. The activity of adenosine deaminase and the level of nitric oxide in spinal cord of methotrexate administered rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicology* 2006; 218: 125-133.
118. OKUTAN H, OZCELİK N, YILMAZ HR, UZ E. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clin Biochem* 2005; 38: 191-196.
119. OKTEM F, YILMAZ HR, OZGUNER F, OLGAR S, AYATA A, UZARE E, UZ E. Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol Ind Health* 2006; 22: 241-247.
120. IRAZ M, OZEROL E, GULEC M, TASDEMIR S, IDIZ N, FADILLIOGLU E, NAZIROGLU M, AKYOL O. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) administration on cisplatin-induced oxidative damage to liver in rat. *Cell Biochem Funct* 2006; 24: 357-361.