

**T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**RATLARDA KALP ÜZERİNE
KAFEİNİN ANTIOKSİDAN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

AHMED. A. HUSSEİN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU

ANKARA
Şubat 2011

**T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**RATLARDA KALP ÜZERİNE
KAFEİNİN ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

AHMED. A. HUSSEİN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
01/2007-86 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Şubat 2011



TEZ SAVUNMA TUTANAĞI

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI Anabilim Dalı'nda PROF.DR. HATİCE PAŞAOĞLU danışmanlığında, Doktora öğrencisi AHMED. A.HUSSEİN tarafından hazırlanan " RATLARDA KALP ÜZERİNE KAFEİNİN ANTIOKSİDANT ETKİLERİNİN İNCELENMESİ " konulu tez savunmasını yapmak üzere 22/02/2011 tarihinde saat... da Ana Bilim Dalı Başkanlığında toplanan jüri, yapılan tez savunma sınavı sonucunda Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinin 33(1) maddesi gereğince, tezin;

Oybirliği

Oyçokluğu ile,

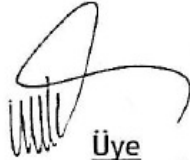
Başarılı olduğuna,

Düzeltilmesine,

Reddine, karar vermiştir.

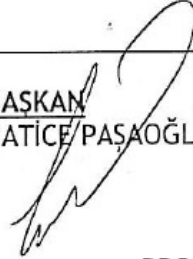
Gereğini saygılarımızla arz ederiz.

Tez hakkında Düzeltme veya Red kararının gerekçeleri


Üye

PROF.DR. NURTEN TÜRKÖZKAN

BAŞKAN
PROF.DR. HATİCE PAŞAOĞLU




Üye
PROF.DR. AYŞEL ARICIOĞLU


Üye

PROF.DR. NEDRET KILIÇ


Üye
PROF.DR.KADİRHAN SUNGUROĞLU(A.Ü.)

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	I
İçindekiler.....	II
Şekiller, Resimler, Grafikler.....	V
Tablolar.....	VI
Semboller, Kısaltmalar.....	VII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. KAFEİN.....	3
2.1.1. Kafein Metabolizması.....	6
2.1.2. Kafein ve Metabolitlerinin Atılımı.....	9
2.1.3. Kafeinin Organizmaya Etkileri.....	10
2.2. OKSİDATİF STRES VE SERBEST RADİKALLER.....	15
2.2.1. Serbest Radikallerin Tanımı ve Önemi.....	16
2.2.2. Serbest Radikal Kaynakları.....	17
2.2.3. Serbest Radikal Türevleri.....	23
2.2.3.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$).....	24
2.2.3.2. Hidroksil Radikali (OH^{\cdot}).....	26
2.2.3.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	28
2.2.3.4. Hipoklorik Asit ($HOCl$).....	29
2.2.3.5. Singlet oksijen (1O_2).....	29
2.2.3.6. Perhidroksil radikali (OOH^{\cdot}).....	30
2.2.3.7. Karbon merkezli radikaller (R^{\cdot}).....	31
2.2.3.8. Peroksil(ROO^{\cdot}) ve Alkoksil (RO^{\cdot}) radikalleri.....	31
2.2.3.9. Nitrik Oksit (NO^{\cdot}).....	32
2.2.3.10. Peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$).....	33
2.2.4. Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri.....	34
2.2.5. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu.....	35
2.3. ANTİOKSİDAN SİSTEM.....	38

2.3.1. Antioksidan Etki Tipleri.....	40
2.3.2 Nonenzimatik Yapıda Olan Antioksidanlar.....	41
2.3.2.1. Glutasyon (GSH).....	41
2.3.3. Enzimatik Yapıda Olan Antioksidanlar.....	43
2.3.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1).....	43
2.3.3.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px; EC 1.11.1.9) ve Glutasyon Redüktaz (GR; EC.1.6.4.2).....	44
2.3.3.3. Glutasyon-S-Transferaz (GST; EC 2.5.1.8).....	45
2.3.3.4. Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6).....	46
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	48
3.1. Deney Grupları.....	48
3.2.Kullanılan Aletler.....	50
3.3.Yöntemlerin Uygulanması.....	50
3.3.1. Lowry Protein Analizi.....	51
3.3.2. Kalp Dokusu Malondialdehit (MDA) Analizi.....	52
3.3.3. Kalp Dokusunda Glutasyon Düzeyi Analizi.....	54
3.3.4. Kalp Dokusunda Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini.....	56
3.3.5. Kalp Dokusunda Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi Tayini.....	59
3.3.6. Kalp Dokusunda Glutasyon-S-Transferaz Aktivitesi Tayini.....	61
3.3.7. Kalp Dokusunda Katalaz Aktivitesi Tayini.....	62
3.4. İstatistiksel Değerlendirme.....	65
4. BULGULAR.....	66
4.1. Kalp Dokusu MDA Düzeyleri.....	67
4.2. Kalp Dokusu Glutasyon Düzeyleri.....	69
4.3. Kalp Dokusu SOD Aktivitesi.....	70
4.4. Kalp Dokusu Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi.....	72
4.5. Kalp Dokusu Glutasyon S Transferaz Aktivitesi.....	73
4.6. Kalp Dokusu Katalaz Aktivitesi.....	75
4.7. Spearman Korelasyon Analizi.....	77

5. TARTIŞMA.....	82
6. SONUÇ.....	91
7. ÖZET.....	92
8. SAMMARY.....	94
9. KAYNAKLAR.....	96
10. EKLER.....	111
11. ÖZGEÇMİŞ.....	112

Şekil Listesi

Şekil 1. Kafeinin kimyasal yapısı.....	3
Şekil 2. Kafein Metabolizması.....	8
Şekil 3. Oksidan-antioksidan dengesi.....	16
Şekil 4. Radikallerin yol aştığı hücre hasarı.....	22
Şekil 5. Memeli hücrelerinde reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin Meydana gelişi.....	24
Şekil 6. Nitrik oksidin L-arjininden sentezi.....	33
Şekil 7. ROS ve RNS'nin birbirleriyle etkileşimi.....	34
Şekil 8. Metallerin katalizlediği lipit peroksidasyonu.....	36
Şekil 9. Lipit peroksidasyonunun kimyasal yolu.....	37
Şekil 10. Lipit peroksidasyonu ile oluşan aldehitler.....	38
Şekil 11. Memeli hücrelerinde antioksidan sistem.....	39
Şekil 12. Glutasyonun biyosentezi.....	42
Şekil 13. Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyon.....	45
Şekil 14. Oral kafein uygulaması.....	49

Grafik Listesi

Grafik1. Doku Protein Standart Grafiği.....	52
Grafik 2. Doku MDA Standart Grafiği.....	54
Grafik 3. Doku Glutasyon Standart Grafiği.....	56
Grafik 4. Doku Katalaz Standart Grafiği.....	65
Grafik 5. Kalp MDA (nmol/g doku) Düzeyleri.....	68
Grafik 6. Kalp Glutasyon (nmol GSH/mg protein) Düzeyleri.....	69
Grafik 7. Kalp SOD Aktivite (IU/mg protein) Düzeyleri.....	71
Grafik 8. Kalp Glutasyon Peroksidaz Aktivite (IU/mg protein) Düzeyleri...	72
Grafik 9. Kalp Glutasyon S Transferaz Aktivite (nmol/dk/mg protein) Düzeyleri.....	74
Grafik 10. Kalp Katalaz Aktivite (IU/mg protein) Düzeyleri.....	76

Grafik 11. Doku MDA Düzeyleri ile Doku GPx Aktivitesi Arasındaki Korelasyon.....	78
Grafik 12. Doku MDA Düzeyleri ile Doku Katalaz Aktivitesi Arasındaki Korelasyon.....	79
Grafik 13. Doku GPx Düzeyleri ile Doku Katalaz Aktivitesi Arasındaki Korelasyon.....	80
Grafik 14. Doku Katalaz Aktivitesi ile Doku GST Aktivitesi Arasındaki Korelasyon.....	81

Tablo Listesi

Tablo 1. Bazı içecek, yiyecek ve ilaçların kafein miktarları	4
Tablo 2. Oksijenin indirgemesi.....	21
Tablo 3. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu.....	22
Tablo 4. Doku Protein Tayini.....	51
Tablo 5. Doku MDA Tayini.....	53
Tablo 6. Doku Glutasyon Tayini.....	55
Tablo 7. Doku SOD Aktivitesi Tayini.....	58
Tablo 8. Doku GPx Aktivitesi Tayini.....	60
Tablo 9. Doku GST Aktivitesi Tayini.....	61
Tablo 10. Doku Katalaz Aktivitesi Tayini.....	64
Tablo 11. Kalp dokusu MDA ve GSH düzeyleri ile SOD, GSH-Px, GST ve Katalaz enzim aktiviteleri istatistik sonuçları.....	66
Tablo 12. Kalp MDA Düzeyleri.....	68
Tablo 13. Kalp Glutasyon Düzeyleri.....	70
Tablo 14. Kalp SOD Aktivitesi.....	71
Tablo 15. Kalp GPx Aktivitesi.....	73
Tablo 16. Kalp GST Aktivitesi.....	74
Tablo 17. Kalp Katalaz Aktivitesi.....	76
Tablo 18. Spearman Korelasyon Analizi Sonuçları.....	77

Kısaltmalar

MDA : Malondialdehit

SOD : Süperoksit Dismutaz

GSH : Redükte Glutatyon

GPx : Glutatyon Peroksidaz

GST : Glutatyon S Transferaz

1.GİRİŞ

Kafein, günümüz hayatında insanların düzenli olarak tükettiği içeceklerden kahve, çay, guarana ve eser miktarda kakao içinde bulunan, santral sinir sistemine etkisi ile beyine giden ve beyinden gelen sinyallerin hızlandığı; sonucunda kişinin daha enerjik, uyanık ve konsantre olmasını sağlayan bir uyarıcı olduğu ifade edilmektedir. Aşırı tüketildiğinde kişide uyku bozukluğu, sinirlilik, endişe ve kaygı durumlarına sebep olabilen bir pürin alkaloiddir ^{1,2}.

Kafeinin; solunum sisteminde bronkodilatasyona neden olması ^{3,4}, bazı ağrı kesicilerin (aspirin, asetaminopen gibi) içeriğinde bulunması ^{5,6} ve yeni doğan apnea tedavisine olan etkisi ⁷ gibi sebeplerle, günümüzde birçok amaç için kullanılmaktadır.

İnsan metabolizmasında kafeinin başlıca etkileri; merkezi sinir sisteminde psikotropik etki, kalp hızını artırıcı (pozitif inotropik) etkisi, lokomotor aktiviteyi artırması ve hafif diüretik etkisinin bulunması en önde gelenlerdir ²⁻⁸. Bu gibi etkilerinden dolayı günümüzde medikal tedavilerde ilaç olarak yerini almıştır ^{5,6}.

Çalışmamızın konusu olan kafein, kalp üzerine olan etkileri ve antioksidan özellik göstermesi nedeniyle bugün birçok araştırmacının dikkatini çekmektedir.

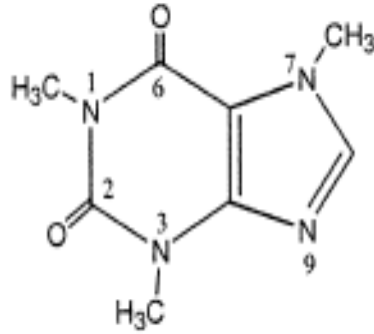
Biz çalışmamızın temel hedefi olarak, kısa süreli (14 gün) oral kafein alımının rat kalbinde olası antioksidan etkilerini 30 mg/kg ve 100 mg/kg olmak üzere iki farklı dozda araştırmaya çalıştık.

Kafein verilen ratların kalp dokularında lipit peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeylerini ölçtük. Bunun yanında kafeinin antioksidan özelliğini incelemek için, enzimatik ve non enzimatik antioksidan sistem üzerinde araştırmalar yaptık. Kalp dokularında süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S transferaz (GST), katalaz aktivitelerini ve glutatyon (GSH) düzeylerini ölçtük.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kafein

Kapalı formülü $C_8H_{10}N_4O_2$ olan kafeinin açık formülü şekil 1'de gösterilmiştir. Kafeinin molekül ağırlığı 194,19 olup %49,5 C, %5,2 H, %28,9 N, %16,5 O içermektedir. Kafeinin kimyasal adı 3,7-Dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purin-2,6-dion veya 1,3,7-Trimetilksantin'dir. Kafeinin diğer adları (sinonimleri) şunlardır: Coffeine, Oxopurpne, Thein, Guanine, Methyltheobromine, No-Doz⁹. Hafif acı bir tadı olan kafeinin, oda ısısında renksiz, kokusuz, bir tozdur. Kafeinin kaynama noktası 178-180 °C, erime noktası ise 235-238 °C'dir¹⁰.



Şekil 1: Kafeinin kimyasal yapısı¹

Kafein (1,3,7 trimetilksantin) bir pürin alkoloit olarak birçok yiyecek ve içeceğin içeriğinde bulunur¹. Kafein günümüzde her gün düzenli olarak tüketilen bir maddedir. Doğal olarak pek çok bitkinin meyvesinde, tohumunda ve yaprağında bulunur. Bununla beraber en bilinen kaynakları çay yaprakları, kahve ve kakao çekirdekleri ile kola tohumlarıdır, Ayrıca çeşitli durumlarda kullanılmak amacıyla tablet veya toz olarak da reçetesiz şekilde satılmaktadır^{7,11,12}.

Tablo 1 : Bazı içecek, yiyecek ve ilaçların kafein miktarları ¹¹

	Miktar	Kafein (mg)
İçecekler		
İnstant kahve	150 mL	60
Filtre kahve	150 mL	112
Espresso	30 mL	40
Starbucks Latte	480 mL	150
Nescafe Gold	225 mL	52
Nescafe Klasik	225 mL	72
Nescafe üçü bir arada	225 mL	70
Siyah Çay (5dk.demlenmiş)	150 mL	40-80
Yeşil Çay	150 mL	30-50
Soğuk Çay (ice tea)	360 mL	9-50
Sıcak Çikolata	150 mL	1-8
Çikolatalı süt	225 mL	2-7
Koka kola	330 mL	55-60
Diyet koka kola	330 mL	55-60
Pepsi kola	330 mL	50-55
Diyet pepsi kola	330 mL	50-55
Pepsi Max	330 mL	65
Sprite	330 mL	0
Red bull	250 mL	80
Burn	250 mL	35
Yiyecekler		
Kahveli dondurma	1 kase (200 ml)	40-60
Çikolatalı dondurma	50 g	2-5
Sütlü çikolata	50 g	1-15
Bitter çikolata	1 bar (40 g)	30
Çikolatalı gofret	1 bar (45 g)	5
İlaçlar		
Ağrı kesiciler	2 tablet	65-130
Bazı uyarıcılar	1 tablet	100-200
Zayıflama hapları	2-3 tablet	80-200

İnsanların son zamanlarda yapılan araştırmalara göre günde ortalama 300 mg'dan daha fazla kafein tükettiği belirtilmiştir ¹³. Bir kupa kahvede yaklaşık olarak 30-175 mg kafein bulunur ¹. Gün içerisinde, kişiden kişiye değişmekle birlikte alınan kafein miktarı eğer hesaplanırsa farkında olmadan günde 1 gramdan fazla kafein tüketildiği görülecektir.

Sağlıklı yetişkin bireylerde (vücut ağırlığı 65 kg olan 1 kişinin) günde 6 mg/kg kafein alımı durumunda toksik, kardiyovasküler yan etki veya kemik yapısındaki kalsiyum dengesinde herhangi bir farklılık yapmadığı gösterilmiştir ¹⁴.

Kafeinin günlük normal doz aralığında (yaklaşık 50-300 mg) tüketimi kişiye diüretik, kas ve sinirleri uyarıcı, mide salgısını uyarıcı ve metabolik hızı artırıcı olma yeteneği kazandırmakla birlikte aşırı tüketimi halinde (300-800 mg ve üstü) kişide uyku bozukluğu ve uykusuzluk hali, sinirlilik, endişe, panik atak ve kaygı hallerine sebep olduğu belirtilmektedir. Aşırı dozlarda istemsiz kasılmalar da görülebilir. Kafeinin insanda pekiştirici olduğu, tolerans ve fiziksel bağımlılık oluşturabildiği, bu olgularda kafeinin kesilmesinin, kendini disfori, başağrısı, irritabilite, zihinsel konsantrasyonun azalması ve anksiyete ile belli eden hafif bir yoksunluk sendromuna neden olduğu görülmüştür ^{7,15}.

Araştırmacılara göre kafein, piskouyarıcıdır ve amfetamin ve kokain gibi bağımlılık yaparak dopaminerjik sistemi aktive eder ¹⁵.

Kahvenin yüksek miktarlarda tanen de (kateşin analoğu) içerdiği, tanenin antioksidan, anti-mutajenik, anjiogenetik, antibiyotik, anti-hiperkolesterolemik, antihipertansif ve anti-inflamatuvar etkisi olduğu açıklanmaktadır ⁸.

Teobromin (3,7 dimetilksantin) ve ksantin, kafeinin katabolik ürünleridir. Bu ürünlerin antioksidan ve prooksidan özellikte oldukları, antioksidan olan ürik asit ile yapısal benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir¹⁶.

2.1.1. Kafein Metabolizması

Metilksantinlerin metabolizması ilk kez 1957'de in vivo olarak çalışılmıştır¹⁷, Hepatik sitokrom P4501A₂ (CYP1A₂) enzimi etkisiyle metabolize edilen kafeinin primer N-demetilasyon sonucu oluşan dimetilksantin metabolitleri, paraksantin (1,7-dimetilksantin), teobromin (3,7-dimetilksantin) ve teofilindir. Dimetilksantinler daha sonra monometilksantinler ile dimetilürik ve monometilürik asitlere metabolize edilir^{18,19}. Kafein, öncelikli olarak CYP1A2 tarafından metabolize edilir, fakat daha az olarak N-asetiltransferaz (NAT-2) ve ksantin oksidazın da substratıdır²⁰.

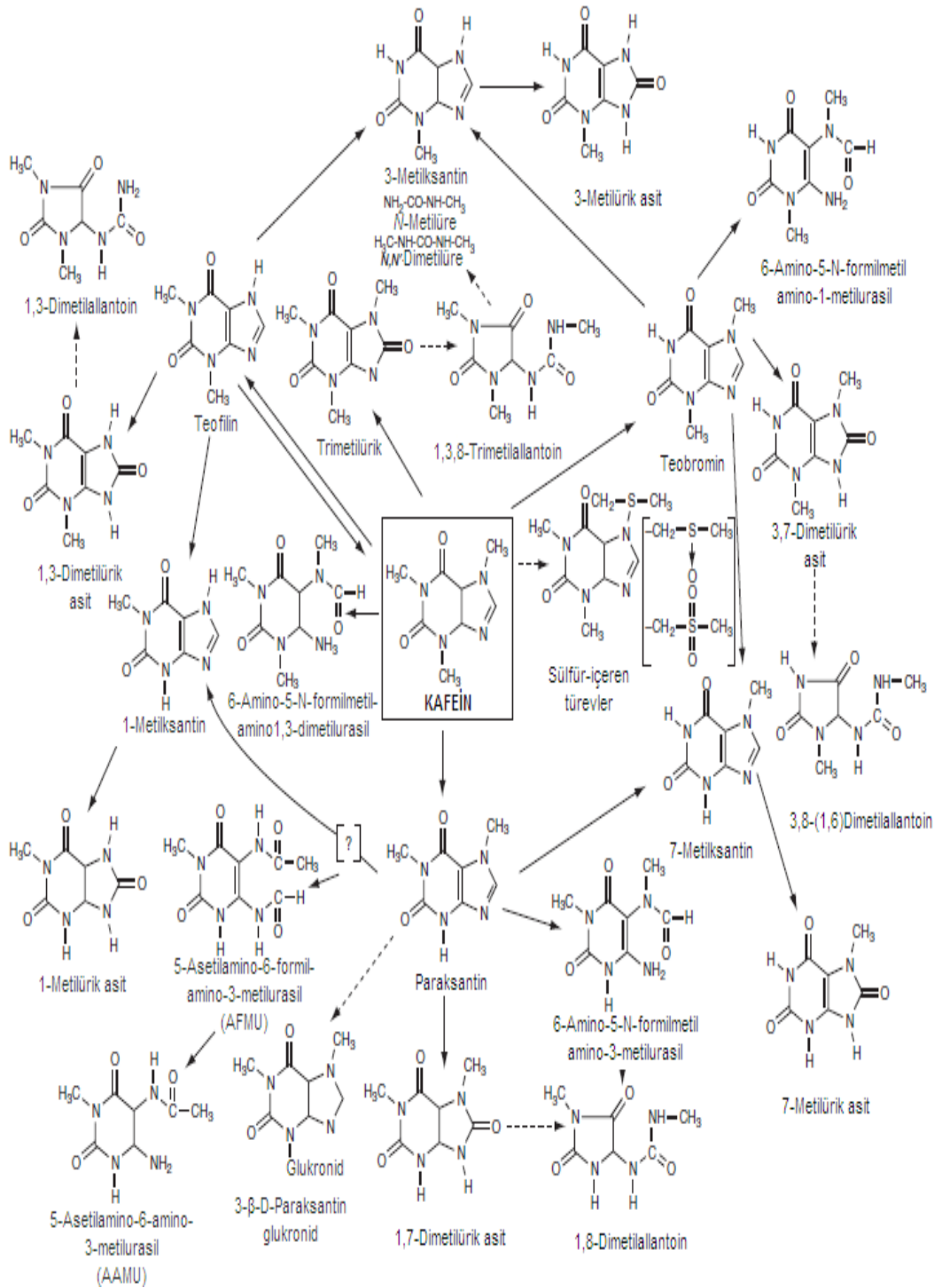
Ratlarda, kafein metabolitlerinin %40'ını trimetil türevleri oluşturur ki bu türevler insanlarda %6 civarındadır. İnsanlarda kafein metabolizması miktar olarak en fazla paraksantin (1,7 dimetilksantin) oluşumuyla karakterizedir. Bu basamak kafein metabolizmasının ilk basamağını oluşturmakla birlikte metabolizmasının %72-80'ini kapsar. Bazı kafein metabolitlerinin farmakolojik aktiviteleri vardır; örneğin, teofilin ve paraksantin, kafein içeren içeceklerde bulunur ve biyolojik aktiviteleri vardır. Kafein alınımından sonra santral sinir sisteminde teofilin ve paraksantin seviyeleri yükselir, fakat teofilin, paraksantinden daha güçlü etki göstermektedir².

Kafein metabolizması üç tip tepkime içermektedir.(şekil 2)

N-Demetilasyon: Ana maddenin 1,3 ve 7 pozisyonlarındaki metil gruplarının uzaklaştırılmasıyla, ilk aşamada monodemetilasyon ürünlerini (teobromin, paraksantin ve teofilin); demetilasyonun devamı sonucunda ise, monometilksantinleri (1-metilksantin, 3-metilksantin ve 7-metilksantin) açığa çıkarır.

8-Hidroksilasyon: Demetilasyon ürünlerini, üratlarına dönüştürür (1,7-dimetilürik asit, 1,3-dimetilürik asit ve 1-metilürik asit). Hidroksilasyon tepkimesinin demetilasyonlardan sonra geldiği kabul edilmektedir; üratların demetilasyonu gösterilmemiştir.

Halka açılması ve asetilasyon: Blinmeyen bir mekanizmayla, paraksantin üzerinden giden metabolik yola, N⁷-C⁸ bağının kırılması ve N⁷'nin asetilasyonu ile 5-asetilamino-6-formilamino-3metilurasil (AFMU)'in oluşumundan sorumludur²¹.



Şekil 2: Kafein metabolizması²²

Metilksantinler fizyolojik koşullarda lipofiliktir ve biyolojik zar yapısından geçişi hazırdır ¹⁰. Bu nedenle sindirim sisteminden etkin bir şekilde emilmekte ve ağızdan alındıktan 15-120 dakika sonra plazmada en üst konsantrasyonlarına ulaşmaktadır ^{23,24}. İnsanda 300 mg (yaklaşık 4 kupa kahve; 5mg/kg) kafein alınımından 1-2 saat sonrası plazma kafein pik seviyesi yaklaşık 7,5-9,0 µg/ml (39-46 µmol/L) dir. 5,30 mg/kg (ağır içici) kafein alınımı sonrasında plazma seviyesi yaklaşık olarak 50 µmol/L olacaktır. Normal içim 2,40 mg/kg olarak kabul edilir ¹⁹. Kahvedeki kafein; çay ve kolalı içeceklere göre daha kolay emilmektedir ²⁵.

Metilksantinler kan dolaşımı ile tüm hücre ve dokulara hızlı bir biçimde yayılır ²⁶. Kafein oral alınımından 5 dakika sonra tüm dokularda görülmeye başlamaktadır ²⁷. Kafeinin % 5'den daha azı metabolize olmadan idrarla atılır. Kafein plazmada en yüksek konsantrasyona ulaştıktan sonra, beyinde en az bir saat konsantrasyonu değişmeden kalır ²⁸.

Hidrofobik özelliğinden dolayı kafein kan-beyin bariyeri ve plasental bariyeri de kolaylıkla geçebildiği, ağır kafein tüketen hamile bayanların yeni doğan bebeklerinde yüksek seviyelerde kafein tespit edildiği görülmüştür. İnsanlarda kafeinin yarı ömrü 2,5-6 saat arasında değişmekle birlikte, fare ve sıçanlarda bu sürenin 0,7-1,2 saat olduğu, fetus ve yeni doğan döneminde kafeinin yarı ömrünün, kafeinin demetilasyonu için gerekli enzimlerin noksan olması nedeniyle yaklaşık 32-149 saat arasında değişmektedir ^{2,29}.

2.1.2. Kafein ve Metabolitlerinin Atılımı

Kafein ve metabolitlerinin önemli kısmı böbreklerle atılır. Böbreklerden atılım başlıca 2 işlem kapsar: ³⁰

-*Glomerüler filtrasyon*: Böbreğe gelen kandaki ilacın %20'sini hemen uzaklaştırır.

-*Aktif tübüler salınım*: Arta kalan %80'i iki bağımsız taşıyıcı sistem ile uzaklaştırır.

Kafein ve metabolitlerinin idrarla atılımı 3 grupta ele alınabilir:(i) Kafein (kendisinin),(ii) Dimetilksantinlerin ve (iii) Monometilksantin ve üratların atılımı.

2.1.3. Kafeinin Organizmaya Etkileri

Kafein; gastrik mukoza, miyokart, medulla, retiküler-aktive edici sistem, kan damarları iskelet kası, adrenal medulla ve böbrek kanalları gibi birçok bölgede direk etkiye sahiptir. kafeinin çeşitli bölgeler üzerindeki etkileri şöyledir ³¹⁻³³ :

- Adenozin reseptörlerine antogonistik etki
(A1 reseptörlerini kompetitif olarak bloke edip adenozinin nöronları deprese etmesini engeller) .
- Beyin sapındaki solunum merkezini güçlü şekilde uyarma.
- Psikostimülan etki.
Vijilansı (zihinsel çevikliği), dikkati artırır, yorgunluğu azaltır.
- Mide asidi, pepsin ve ince barsak salgılarında artış .
- Kalp atım hızı, atım hacmi (stroke volum), kardiyak output ve dinlenimdeki kan basıncında artış.
- Atriyel ve ventriküler taşikardiler (kalp ritminde bozukluklar).
- Sitololde Ca^{+2} seviyelerinin yükseltilmesi.
- Anti- inflamatuvar ve Analjezik etki.
- Lipolizide artış.
- Glukoz metabolizmasında artma.
- İskelet kasının kasılabilirliğinde artış.

- Hücre içi cAMP düzeylerinin artırılması.
- İdrar miktarında artış.
- Kafeinin; fizyolojik fonksiyona etkisi, adenozin ve fosfodiesteraz etkileşimi etkileyerek kardiyostimüle ve antiastimli etki göstermektedir³⁴.

Kafein; kan katekolamin düzeylerini artırarak veya fosfodiesteraz enzimini inhibe ederek hücre içi cAMP'yi artırmaktadır. Katekolaminler hücre membranlarındaki beta reseptörlere bağlanıp adenilat siklaz enzimini aktive ederek ATP'den AMP oluşumunu uyarırlar. Fosfodiesteraz cAMP'yi aktif olmayan 3'5' AMP'ye parçalayan bir enzimdir. Bu nedenle bu enzimin inhibe edilmesi cAMP'nin biyolojik yarı ömrünü uzatarak apoptosiz inhibe eder^{35,36}.

Metilksantinler, ürik asit, adenin, guanin, hipoksantin gibi pürinlerin kimyasal yapısı ile benzerlik göstermektedir. Bu pürin molekülleriyle ksantinlerin kimyasal benzerliği, biyokimyasal düzenleyici cAMP ile etkileşime girmeleri bakımından önem taşımaktadır³⁷.

Epidemiyolojik veriler ve laboratuvar yaklaşımlar 4 fincan (her fincan yaklaşık 160 mL) veya daha az çayın (yaklaşık 600 mL kadar, %1.5 solüsyonda) kronik hastalıkları önemli derecede korumada yeterli olmadığı gösterilmiştir. Günde tüketilen 6-10 kupa bardağı çayın (yaklaşık 960-1600 mL) kronik hastalıklardaki riski azaltmaktadır. Yetişkinlerde toplam önerilen sıvı miktarı 2.5 litre, bu miktarın 0.9-1.4 litresi çay olmalıdır¹⁴.

Kafein, hücreleri ve organizmayı radyasyondan koruyucu etkiye sahiptir. Ratlarda yapılan birçok çalışmada, kafein varlığında radyasyon ve diğer ajanlar tarafından arttırılmış hasara karşı kafein önemli derecede korumayı sağlar. 2mM kafeinin radyasyon öncesi ya da radyasyon sonrası hemen hemen tamamen hücrelerde radyasyonla

indüklenen apoptosisi önlediği belirtilmiştir. 1mM kafein rat karaciğer mikrozomlarında lipid peroksidasyonunu düşürdüğünü ve antioksidan olarak reaktif oksijen türleri tarafından oluşturulmuş hasara karşı membranları koruduğu belirtilmiştir ^{6,38}.

Kafeinli içecekler bazı spor dallarında fiziksel performansı arttırıcı olarak bilinmektedir. Bunun nedeni, kafeinin merkezi sinir sisteminde lipolitik hormonlar üzerinden uyarıcı etkisi ve yağ yıkımını hızlandırıcı etkisi ile açıklanmaktadır ³⁹.

Hayvanlarda kafeinin spontan lokomotor aktivitenin artışını adenozin reseptörlerinin blokajına bağlı olduğu belirlenmiştir. Beyinde elektriksel aktivitenin artması, uyanıklığı artırmak, Psikostimülan etki, dikkati artırma, yorgunluk ve sıkıntı durumunda zihinsel performansı etkilemektedir ²³.

Kafein akut olarak solunum üzerinde uyarıcı etkiye sahiptir. Medulladaki solunum merkezinde bulunun karbondioksit duyarlı kemoreseptörlerin duyarlılığını artırarak soluk hacmi ve solunum hızını artırdığını bulunmuştur ⁴⁰. Solunum frekansı kafein alımına bağlı olarak artabilmektedir ⁴¹.

Bazı epidemiyolojik çalışmalarda kafein tüketimiyle, barsak ve böbrekten mineral salınımı ve emilimi arasında negatif ilişkisi gösterilmiştir. Kafeinin birçok metal iyonlarını bağladığından ve insan vücut dengesini değiştirdiğinden şüphelenilmektedir. Kalsiyum, magnezyum, demir, çinko, manganez, kobalt, krom organizma için yararlı elementlerdir. Kafein ve metal iyonları arasındaki etkileşim, kafeinin oksijen ve nitrojen atomları boyunca oluşmaktadır. Kafein, metal iyonlarını oksijen atomları ile bağlar ¹.

Kafein sindirim sistemi salgılarını artırıcı etki yapmakta ve pepsin ile gastrin salınımını artırmaktadır ⁴².

Kafein hidroksil radikallerini ve singlet oksijeni temizler, lipid peroksidasyonunu inhibe eder, LDL oksidasyonunu düşürür. Ayrıca kafein protein oksidasyonu ile oluşan protein karbonillerinin seviyelerini de azaltmaktadır. Bu etkileriyle kafein, kardiyoprotektif olarak düşünülmektedir ^{43,44}.

İnsanda uzun süre kafein kullanımı plazma renin aktivitesini ve katekolamin seviyelerini yükseltip, renal fonksiyonların bozulmasına yol açarak renin konsantrasyonlarını arttırdığı söylenmektedir. Bunun sonucu olarak Kreatinin klirensi düşer, üriner protein atılımı artar. Kafein renal ve plazma norepinefrin konsantrasyonlarının artmasına neden olur ^{45,46}. Yüksek konsantrasyonlarda ve kronik olarak tüketiminde myokardı uyarır, kalp hızını arttırarak, kardiyak performans bozduğu, myokard infarktı riskini yükselttiği belirtilmiştir ^{8,47}.

Ratlarda kafein, çeşitli nörotransmittör sistemlerin fonksiyonunu değiştirir, duygusal bozukluk, korku, endişe ve uyku bozukluğuna neden olur. Kafein; serebral kortekste 25-100mg/kg dozlarında nöroaktif steroidlerin; pregnenolon, progesteron, allopregnanolon konsantrasyonunu arttırmıştır. Kafein plazmada da beyin ile benzer şekilde doza bağımlı olarak, pregnenolon ve progesteron seviyelerini arttırmıştır. Sonuç olarak kafein, plazmada kortikosteron seviyesini arttırır ⁷.

Kafein 10-20 mg/kg, ratlarda dalakta ve timusta adenozin deaminaz (ADA) aktivitesinde artmaya sebep olmuştur. Doz yükseldikçe aktivite de artmıştır. Kafeinin dalak ve timusta ADA'yı yükseltmesi immünitede rol oynadığını düşündürmektedir ⁴⁸.

Kafein; akut ve kronik olarak growth hormon (GH), tiroksin (T₄) ve tiroid uyarıcı hormon (TSH) seviyelerini arttırabilir. Yapılan çalışmalarda kafein tüketiminin benign veya malign tiroid neoplazisine karşı koruyucu rol oynayabileceği görüşü vardır. Geçmişteki çalışmalarda uzun süre içme suyuna kafein eklenen ratlarda, neoplazinin artmadığı görülmüştür. Kafeinin tek başına T₄ seviyelerini azalttığı TSH seviyelerini ise yükselttiği belirtilmiştir. Ancak 1500 ppm (yaklaşık 140 mg/kg/gün; yüksek doz) kafein ile tiroid foliküler hücre poliferasyonu ve karaciğer hipertrofisi tespit edilmiştir ¹².

Kafein, diabetik ratlarda glukoz homeostazını iyileştirmiş, glukozüriyi düşürmüş ve oral glukoz toleransını iyileştirmiştir ⁴⁹. Tip 2 diabet riskinin kahve tüketimi ile düştüğü belirtilmektedir ⁵⁰.

Farelerde, kafeinin oral alınımı tümör baskılayıcı genleri (p53 dahil) düzenlediği gösterilmiştir. Buna ek olarak kafeinin, mutasyonu hem baskılayıcı hem de arttırıcı etkisi de belirtilmiştir. Kafein ve katabolik ürünleri olan teobramin ve ksantin yüksek bakır konsantrasyonlarında, bakır iyonlarına bağlanarak, Cu(II) 'nin Cu(I)'e dönüşmesini azaltarak, prooksidan özellikte gösterir ve oksijen radikallerine öncülük eder. Ayrıca antioksidan olarak, DNA kırıklarını ve hidroksil radikallerini inhibe ettiği bildirilmiştir ¹⁶.

Kafein, histamin sekresyonunu düşürür. Yapılan araştırmalarda kafeinin 5-20 mM dozlarda, rat peritoneal mast hücrelerinden histaminin salınmasını önemli derecede inhibe ettiği gösterilmiştir. Kafeinin in vitro ve in vivo olarak alerjik reaksiyonları mast hücrelerini etkileyerek inhibe ettiği belirtilmiştir ⁵¹.

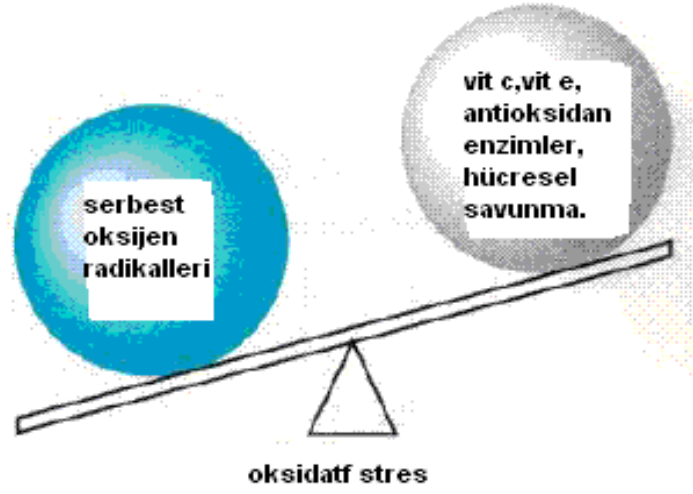
Kafein insanda, C- reaktif protein (CRP) artışına neden olabilir⁵². Aşırı kafein tüketimi, böbrekte kalsiyum oksalat taşı oluşumunu artırabilir⁵³.

İnsanda ve ratlarda yüksek doz kafein alınımı kan basıncını yükseltmiş, epinefrin salınmasını arttırmıştır. Bu durum yetişkin popülasyonda koroner kalp hastalığı riskini arttırmaktadır⁵⁴⁻⁵⁶.

Ratlarda kafein, bazal lipolizi arttırdığı⁵⁷, nötrofil aktivitesini arttırarak, superoksit üretimine etkisi olmadan myeloperoksidaz (MPO) enziminin salınmasını stimule ettiği düşünülmektedir⁵⁸.

2.2. OKSİDATİF STRES VE SERBEST RADİKALLER

Tüm organizmada, oksidan ve antioksidan yapılar arasında bir denge vardır. Bu denge, oksidatif denge olarak adlandırılır. Hücrelerin sağlıklı bir şekilde işlevlerini yerine getirebilmeleri bu dengeye bağlıdır. Serbest radikallerin oluşumu hızı ile ortadan kaldırılma hızı dengede olduğu sürece organizma bu bileşiklerden etkilenmemektedir. Buna karşılık bu zararlı bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa bu denge bozulur ve oksidatif stres ortaya çıkar⁵⁹.



Şekil 3: Oksidan-antioksidan dengesi⁶⁰.

2.2.1. Serbest Radikallerin tanımı ve önemi:

Oksijen canlılar için hayati önemi olan bir moleküldür ve hücrede enerji üretim basamaklarında kullanılır. Serbest oksijen radikalleri enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olup çok reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir⁶¹.

Serbest radikalın en yaygın tanımı moleküler ya da atomik yörüngesinde çok reaktif olan çiftleşmemiş elektron bulunduran bir kimyasal ürün olduğu şeklindedir⁶².

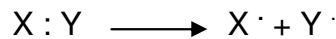
Bu eşleşmemiş elektron, serbest radikali kararsız bir konuma getirir. Serbest radikalın kararlı, stabil bir yapıyı tekrar kazanması amacıyla elektronunu bir başka elektronla eşleştirmesi gerektiğinden bu durum serbest radikale kimyasal olarak büyük bir aktivite kazandırır^{63,64}.

Serbest radikaller hücrelerimizde DNA'ya, proteinlere ve lipidlere saldırarak zarar verir. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücrelerde antioksidan sistemler bulunur. Serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge olmalıdır. Eğer bu denge serbest radikaller lehine bozulursa, yani yapımdan daha yavaş nötralize edilirlerse, hücrede serbest radikaller artar. Serbest radikallerin hücrede artışı ve hücre fonksiyonları üzerinde yaptıkları olumsuz etkiye (oksidatif hasara) 'oksidatif stres' denir. Dengenin prooksidan ve oksidan maddelerin lehine kayması olarak tanımlanmaktadır ⁶¹.

2. 2. 2. Serbest Radikal Kaynakları

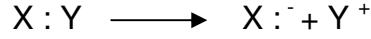
Serbest radikaller hücrede metabolik dengenin bir parçası olarak devamlı yapırlar ⁶⁵, Serbest radikaller üç temel mekanizmayla oluşmaktadır ⁶⁶ :

a) Kovalent bağların homolitik kırılması ile: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır ise; her iki atom üzerinde paylaşılmamış elektron kalır ve iki adet serbest radikal oluşur.

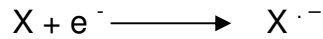


b) Normal bir molekülün elektron kaybetmesi veya heterolitik bölünmesi ile: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Askorbik asit, glutatyon (GSH) ve tokoferoller gibi hücrel antioksidanlar radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken; kendilerinin radikal formu oluşur. Bu tipteki bölünmede kovalen bağı

oluşturan her iki elektron; atomların birinde kalır ve serbest radikal değil iyonlar meydana gelir.



c) Normal bir moleküle elektron transferi ile: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir. Moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi radikal formu olan süperoksidin oluşumuna neden olur.



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelir ve serbest radikallerin çoğu oksijenin indirgenmesi ile oluşur. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral, organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler⁶⁷.

Serbest radikaller; normal metabolik olaylar sırasında meydana gelebildikleri gibi çok çeşitli dış etkenlere bağlı olarak da oluşabilirler^{68,69}.

Ekzojen Kaynaklar

- a) Radyasyon
- b) Alkol ve uyuşturucular
- c) Çevresel ajanlar (ksenobiyotikler, hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, pestisitler, sigara dumanı, solventler, anestezi maddeler, aromatik hidrokarbonlar gibi).

d) Stres: Streste katekolamin düzeyi artar, katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır ⁶².

Endojen Kaynaklar

a) Mitokondriyal elektron taşıma zinciri: Mitokondride elektron transportu sırasında serbest oksijen radikalleri oluşabilmektedir. Ubikinon-sitokrom b bölgesi radikal oluşumunda en etkili bölgedir. Ayrıca NADH dehidrogenaz reaksiyonunda katkısı vardır ^{70,71}.

b) Oksidatif hasar oluşturan türler (reaktif oksijen türleri, nitrojen ve klorin türleri); metabolizma ürünleri, fizyolojik mediyatörler ve sinyal molekülleri olarak ortaya çıkabilirler ⁷².

c) Geçiş metal iyonları: Cu^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+2} , Mo^{+3} gibi bazı geçiş metalleri de serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar ⁶⁷.

d) Enzimler ve Proteinler: Bazı enzim ve proteinler de katalitik döngüleri sırasında serbest oksijen radikalleri oluşturabilirler. Bu enzimlerden biri ksantin oksidaz olup, normalde Nikotinamid Adenin Dinükleotit (NAD) bağımlı dehidrogenaz olarak etki eder ve herhangi bir radikal oluşumuna neden olmaz. Fakat, *invivo* olarak oluşturulan iskemi, enzimin dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşümüne ve süperoksit radikalının oluşumuna neden olur. Benzer şekilde dihidroorotat dehidrogenaz, flavoprotein dehidrogenaz, aminoasid oksidaz ve triptofan dioksijenaz gibi enzimler de radikal oluşumuna neden olur ⁷³.

e) Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Çözünebilir özelliği olan ve nötral sıvı ortamında oksido-redüksiyon reaksiyonlarına girebilen küçük moleküller serbest radikal oluşturabilirler. Örneğin; tiyoller,

hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, flavoproteinler, tetrahidropridinler ve antibiyotikler⁷³.

f) Plazma membranı: Plazma membranındaki siklooksigenaz ve lipooksigenaz enzim sistemlerinin katalize ettiği araşidonik asit oksidasyonu sonucunda serbest radikaller meydana gelir. Fagositik hücrelerin uyarılması, zar siklooksigenaz, fosfolipaz ve protein kinaz enzimlerinin aktivasyonu plazma membranından araşidonik asit salınımına yol açar. Araşidonik asit metabolizması reaktif oksijen radikallerinin üretildiği önemli bir kavşaktır. Serbest radikallerle prostaglandin metabolizması yakından ilişkilidir. Reaktif oksijen metabolitleri fosfolipaz aktivasyonu yolu ile prostaglandin E2, F2, 6-keto PGI2 ve TxB sentezini sağlarlar. Ayrıca PGE ve PGI2' nin adenilat siklazı aktive ederek cAMP sentezini artırdığı ve benzer etkinin süperoksit radikali tarafından da gerçekleştirildiği bilinmektedir⁷⁴.

g) Aktive olmuş fagositler: Fagositoz sırasında hücrede önemli ölçüde serbest radikal meydana getirilir. Aktifleşmiş fagositler bakterileri öldürmek için hidrojen peroksit veya hipoklorik asit meydana getirirler. Bu işlem süperoksit myeloperoksidaz sisteminin bağımlı çalışması ile meydana getirilir. Nötrofillerde süperoksit üretimi NADPH oksidaz yolu ile olur ve burada da oksijen radikalleri meydana gelir^{62,75}.

h) Oksijen molekülü: Aerobik organizmalar için O₂ esansiyel bir moleküldür. Aynı zamanda O₂ oksidan bir ajandır. Normal koşullar altında moleküler oksijenin çoğu sitokrom sistemi gibi hücre içi sistemler içinde tetravalan redüksiyona uğramaktadır. Bununla birlikte %1-2 oranında bu yoldan sızan oksijenin biyolojik yapılarda univalan redüksiyonu sonucu serbest oksijen radikalleri olarak adlandırılan bir çok reaktif ürün ortaya çıkar. Aerobik organizmalarda radikaller daha çok oksijen radikalleri şeklinde bulunmaktadır⁵⁹.

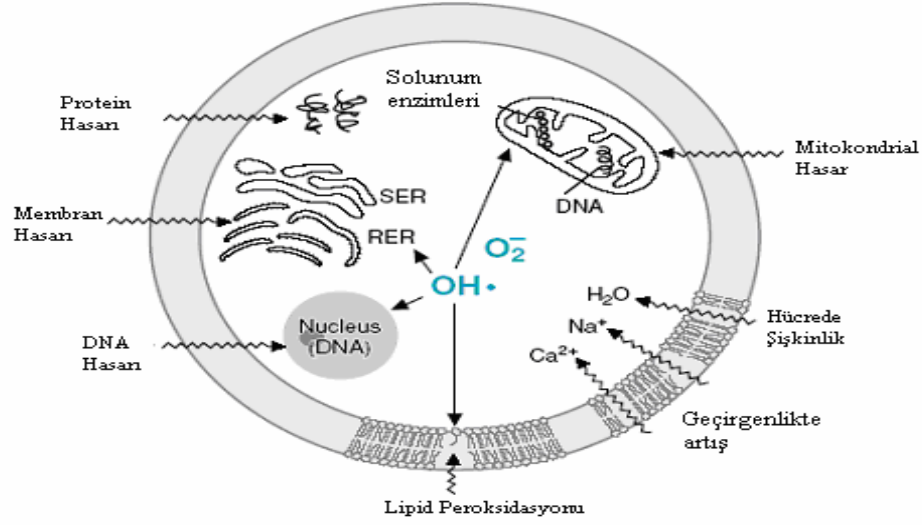
Fizyolojik koşullarda O₂'nin %98'i mitokondride bulunan sitokrom oksidaz tarafından indirgenmekte ve 4 elektron alarak suya dönüşmektedir.

Tablo 2: Oksijenin indirgenmesi

$O_2 + e + H^+ \rightarrow HO_2^{\cdot}$	Hidroperoksil radikali
$HO_2^{\cdot} \rightarrow H^+ + O_2^{\cdot}$	Süperoksit radikali
$O_2^{\cdot} + 2H^+ + e \rightarrow H_2O_2$	Hidrojen peroksit
$H_2O_2 + e \rightarrow OH^- + \cdot OH$	Hidroksil radikali
$\cdot OH + e + H^+ \rightarrow H_2O$	

Vücutta üretilen radikaller her zaman tehlikeli ve zararlı maddeler olarak değerlendirilmemelidir. Zararlı etkilerinin yanında vücut için gerekli birçok fonksiyonun gerçekleştirilmesinde önemli rol oynarlar⁷⁶. Steroid yapıdaki çok sayıda bileşimin üretimi, eikozanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, çok sayıda oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin etkileri ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için serbest radikal yapımı olmazsa olmaz bir koşuldur⁷⁷.

Organizma içindeki radikaller, geri dönüşümsüz hücre hasarına yol açan birçok tepkimeye neden olurlar (Şekil 4). Süperoksit ve hidroksil radikalleri hücre, mitokondrial, nükleer ve endoplazmik zarlarda lipit peroksidasyonunu başlatırlar. Geçirgenlikteki artış mitokondrial hasara neden olan Ca²⁺'un hücreye akın etmesine neden olur⁷⁸.



Şekil 4: Radikallerin yol açtığı hücre hasarı ⁷⁸.

Tablo 3: Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ⁷⁹.

Aktif oksijen türleri	Oluşum
Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$)	Oksijenin, enzimatik veya nonenzimatik yolla bir elektron redüksiyonu
Hidroksil Radikali (OH^{\cdot})	Suyun radyolizi, H_2O_2 'in metal-katalizli parçalanması, NO ve O_2^- etkileşmesi
Alkoksil ve peroksil radikalleri (LO \cdot), (LO $_2$)	Hidroperoksitlerin metal-katalizli parçalanması
Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	Süperoksitin dismutasyonu, şekerlerin oksidasyonu
Demir-oksijen kompleksi (Fe=O, vb.)	Hemoglobin, Miyoglobin, vb.
Singlet oksijen (1O_2)	Fotosensitizasyon ile oksidasyon, peroksil radikalleri arasındaki biyomoleküler etkileşimler, hipoklorit ve hidrojen peroksit reaksiyonu
Lipit ve protein hidroperoksitler	Lipit ve proteinlerin oksidasyonu
Nitrojen dioksit (NO_2^{\cdot})	Peroksil radikali ve NO reaksiyonu, hava kirliliği ve sigara
Nitrik oksit (NO \cdot)	Nitrik oksit sentaz, nitrozo tiyol ve hava kirliliği
Tiyil radikalleri (RS \cdot)	Tiyollerden hidrojen atomu transferi
Protein radikalleri	Proteinlerden hidrojen atomu transferi

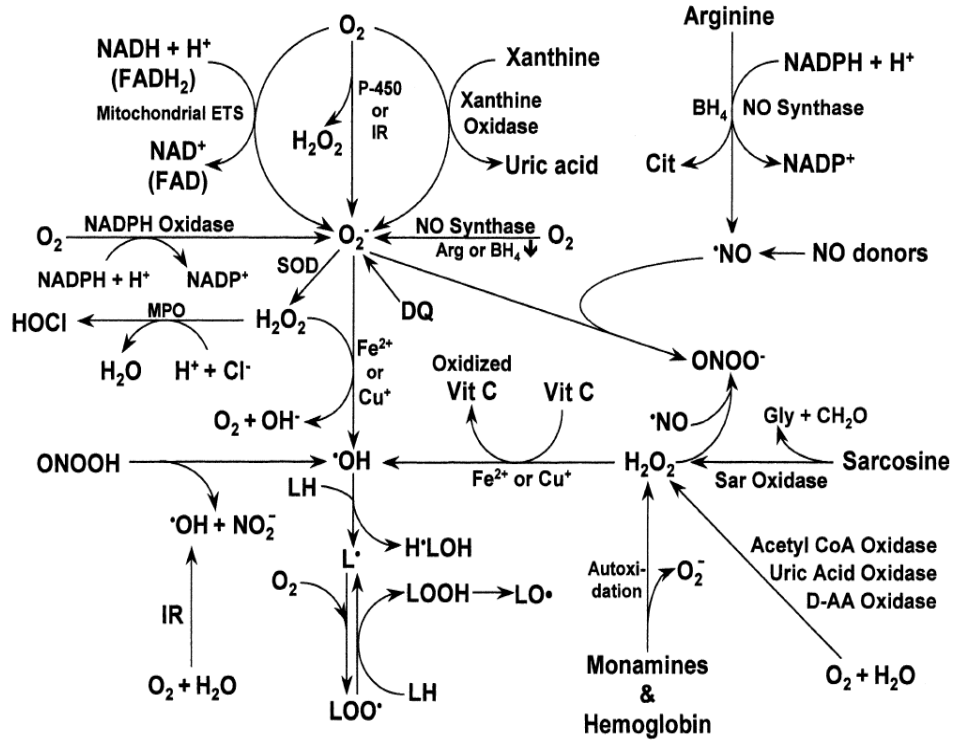
2.2.3. Serbest Radikal Türevleri

Moleküler oksijen dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektrona sahiptir. Bu elektronlar, spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken minimum enerji seviyesindedir. Başta organik moleküller olmak üzere atom ve moleküller orbitallerinde elektronları antiparalel ve eşleşmiş olarak içerirler veya paylaşılmamış elektronlar kovalent bağlarla kapatılırlar. Bunun sonucu oksijenin diğer moleküllere olan reaktivitesini son derece kısıtlamıştır. Bu kısıtlama spin kısıtlaması olarak bilinirken radikal tanımına göre de oksijen “diradikal” yapıya sahip bir moleküldür ⁸⁰.

Bununla birlikte canlı sistemlerde üretilen serbest radikal türlerinden en önemli grubu reaktif oksijen türleri oluşturur ⁸¹.

Reaktif oksijen türleri sadece serbest oksijen radikallerini içermeyip oksijen radikali üretiminde yer alan, radikal olmayan oksijen türlerini de içerir (tablo 3) ⁸⁰.

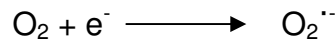
Nitrik oksit (NO^{\cdot}) ve nitrojen dioksit (NO_2^{\cdot}) radikalleri de RNS'yi oluşturur. Oksijen ve nitrojen serbest radikalleri, hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit (ONOO^-), hipoklorik asit (HOCl), hipobromöz asit (HOBr) gibi diğer reaktiflere dönüşebilir (Şekil 5).



Şekil 5 : Memeli hücrelerinde reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin meydana gelişi (İR:iyonize radyasyon, Sit: Sitrüllin, D-AA: D-Amino asit, BH₄: Tetrahydrobiopterin, Gly: Glisin, L': Lipit radikali, SOD: Süperoksit dismutaz, MPO: Myeloperoksidaz) ⁶⁸.

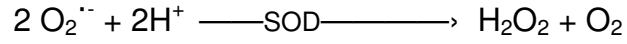
2.2.3.1. Süperoksit Radikali (O₂^{•-})

Moleküler oksijenin indirgeyici bir ajandan bir elektron alması sonucu süperoksit radikali (O₂^{•-}) oluşur ⁸².



Süperoksit Radikali (O₂^{•-}) Çok reaktif bir serbest radikal değildir ⁸³, nötral çözeltilerde negatif yüklüdür, lipit membranlara penetre olma özelliği yoktur, biyomembranları sadece anyon kanalları yoluyla asabilmektedir ve bu nedenle üretildiği kompartmanda kalmaktadır ^{84,85}.

Süperoksit radikali oluştuğu yerden fazla uzağa diffüze olamaz. Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla hasar vermez asıl önemli olan, H₂O₂ kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır⁸⁶. Süperoksit radikali sulu çözeltilerde H₂O₂ oluşturmaktadır. Süperoksitlerden biri elektronlarını diğerine verir böylelikle birinci süperoksit O₂'e okside olurken ikinci süperoksit H₂O₂'e redükte olur. Bu reaksiyon *dismutasyon* olarak adlandırılır⁸⁷.

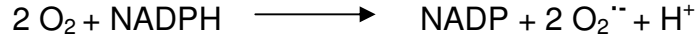


Süperoksit genel olarak anyon şeklinde tarif edildiği halde ortamın pH sına bağlı olarak protonlanarak katyon haline dönüşebilir. Bu durumda perhidroksi radikali(OH[·]₂) ismini alır⁸⁸⁻⁹¹.

Genellikle süperoksit hücre mitokondrisinde elektron transport zincirinde üretir. Mitokondriyal süperoksit, kompleks 1 ve 3 kaynaklı olup hızla organel membranını geçerek stozole geçer ve çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde rol alır^{92,93}.

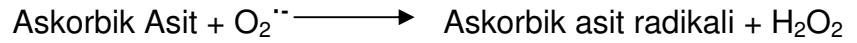
Bununla birlikte O₂ varlığında ksantin oksidaz' ın ksantini veya hipoksantini indirgemesiyle, NADPH' nin NADPH oksidaz ile oksidasyonu, mitokondriyal elektron transport sistemi ile NADH₂ ve FADH₂'nin NAD ve FAD'ye dönüşümü sırasında, O₂'nin iyonize radyasyonla, sitokrom P₄₅₀ ile ve arginin veya tetrahidrobiopterin eksikliğinde nitrik oksit sentazla indirgenmesiyle oluşur⁹⁴⁻⁹⁵.

Makrofajlar ve polimorf nüveli lökositler tarafından gerçekleştirilen fagositoz sırasında O₂ tüketimi artar ve bu durumda plazma membranında bulunan NADPH oksidaz tarafından O₂^{· -} oluşumu tetiklenir.



$O_2^{\cdot -}$ dioksijen redüksiyonunun, biyotik ve abiyotik sistemde en sık rastlanan ara üründür. $O_2^{\cdot -}$ 'nin fazla üretimi ya da enzimatik korumanın azalması, büyümenin yavaşlaması, mutagenез ve hücre ölümü ile sonuçlanır.

$O_2^{\cdot -}$ 'nin kimyasal davranışı nerede çözüldüğüne göre değişmektedir. Suda çok reaktif değildir. Bazen bir elektron alarak, okside edici ajan olarak davranabilir. Örneğin askorbik asidi okside etmektedir ⁹⁶.



Organik solventlerde daha reaktif ve tehlikelidir. Biyolojik membranlarda oluştuğunda oldukça fazla hasar meydana getirmektedir.

$O_2^{\cdot -}$ çeşitli organik ya da inorganik bileşiklerle de reaksiyona girebilir. Nitrik oksit ile reaksiyona girebilir. Nitrik asit ile reaksiyona girip peroksinitriti oluşturması önemlidir ⁹⁷.

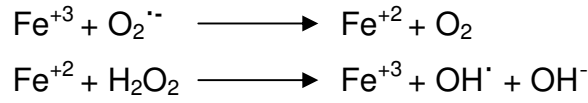
2.2.3.2. Hidroksil Radikali (OH[·])

Hidroksil radikali iyonunun nötral formudur. Yarılanma ömrü çok kısa olup (yaklaşık 10^{-9} sn) biyolojik sistemlerde üretilen en güçlü reaktiviteye sahip ve kuvvetli hasar oluşturur ⁹⁸.

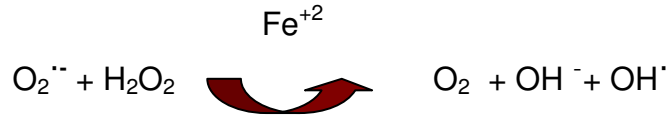
Oluşan hasar üç şekilde meydana gelir:

- 1) Protein ve lipidler arası çapraz bağlar oluşturarak,
- 2) Proton çıkararak,
- 3) Elektron transferi yaparak.

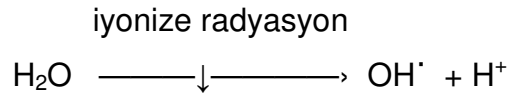
Toksik OH[•] oluşumunda demir, bakır gibi bazı metal iyonları da rol oynar. Asıl olarak Fe⁺² molekülünün de katıldığı Fenton reaksiyonu ile oluşur⁹⁹. Fe⁺³'ün O₂^{•-} ile indirgenmesi sonucu oluşan Fe⁺², H₂O₂ ile reaksiyona girerek OH[•] radikalini meydana getirir. Bu reaksiyon 'Fenton Reaksiyonu' olarak adlandırılır.¹⁰⁰



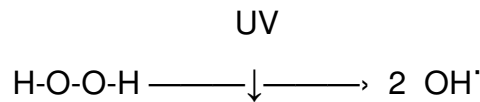
Haber –Weiss reaksiyonu ile ferik demir katalizörlüğünde, süperoksit radikalinin hidrojen peroksitle Etilleşmesi sonucu hidroksil radikali oluşur¹⁰¹.



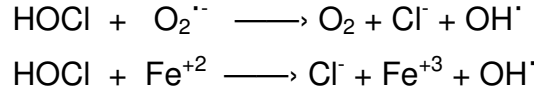
Hidroksil radikali yüksek enerjili iyonize radyasyon ile suyun radyolizi sonucu oluşabilmektedir⁸⁷.



Hidroksil radikali, UV ile indüklenen hidrojen peroksitin O-O bağlarının homolitik kırılması sonucu da oluşmaktadır⁸³.



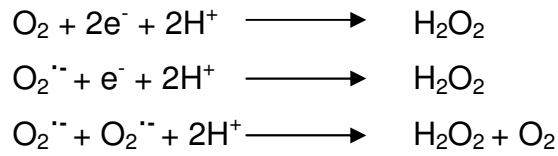
Hidroksil radikali hipokloröz asitin süperoksit veya bir demir kompleksi ile reaksiyona girmesiyle de oluşabilmektedir⁸⁵.



Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. Hücre zarı su içermediğinden OH[·] ın baslıca hedefi yağ asididir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir ¹⁰². Aminoasit rezidülerini schiff bazı oluşturmak üzere oksitler. DNA molekülünde pürin ve pirimidin bazlarında kimyasal değişikliklere ve kırılmalara neden olur ¹⁰³.

2.2.3.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Oksijen molekülünün iki elektron alarak indirgenmesi veya yapıya iki hidrojen atomunun eklenmesiyle oluşur ¹⁰⁴. Süperoksit radikalının yapısına bir elektron katılmasıyla da meydana gelmektedir. Biyolojik sistemlerde daha sık olarak iki süperoksit molekülü, iki protonla birleşerek hidrojen peroksit ve oksijen oluşturur.



H₂O₂ bir serbest radikal olmamasına karşın yüksüz bir molekül olduğundan hücre içerisine kolaylıkla girebilir.

H₂O₂, O₂[·] den iki elektronun sit p450, yağ-açıl KoA oksidaz, asetil KoA oksidaz, ürik asit oksidaz, α-hidroksiasit oksidaz veya D-amino asit oksidaz ile redüksiyonu ile oluşabilir. Ayrıca monoaminler (dopamin, epinefrin, norepinefrin), hemoglobinin otooksidasyonu ve glisin sentezinde de H₂O₂ oluşur ¹⁰⁵.

Peroksizomlar fazla miktarda oksidaz içerdiklerinden hücrel H₂O₂ için potansiyel kaynaktır. H₂O₂ özellikle Fe ve Cu gibi geçiş metal iyonlarının varlığında kolaylıkla yıkılır. Bu yıkım sonucu en reaktif radikal olan OH[·] oluşur⁶⁸.

2.2.3.4. Hipoklorik Asit (HOCl)

Nötrofiller, sitoplazmada bulunan myeloperoksidaz (MPO) enziminin katalizlediği reaksiyonla güçlü oksidatif bir yapı olan hipokloridi oluştururlar¹⁰⁶.

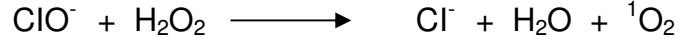


2.2.3.5. Singlet oksijen (¹O₂)

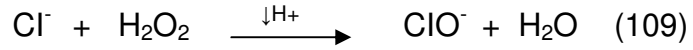
Singlet oksijen, moleküler oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış formudur. Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunun reaktivitesi çok yüksektir¹⁰⁷. Singlet oksijen molekül yapısında iki adet çiftlenmemiş elektron taşır¹⁰⁸.

Singlet oksijen, delta singlet oksijen (¹ΔgO₂) ve sigma singlet oksijen (¹ΣgO₂) olmak üzere iki farklı formda bulunmaktadır⁸³. Sigma singlet oksijenin ömrü çok kısadır ve hiçbir yapı ile etkileşmeden delta forma dönüşerek azalır. Bu nedenle singlet oksijenin sigma formunun herhangi bir biyolojik etkisi olmadığı düşünülmektedir. Buna karşın sulu ortamda delta singlet oksijen, biyolojik reaksiyonlara fırsat tanıyacak kadar uzun bir yarı ömre sahiptir. Delta formun yarı ömrü yüksek oranda ortamdaki çözücüye bağlı olarak değişmektedir⁸⁵.

Singlet oksijen kimyasal olarak hidrojen peroksit ve antimikrobiyal bir ajan olan hipoklorür iyonu (ClO^-) karışımından oluşmaktadır.



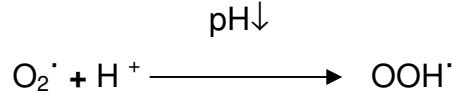
Bu reaksiyon biyolojik açıdan önemli bir reaksiyondur çünkü hipoklorür iyonu fagositoz esasında miyeloperoksidaz aktivitesiyle aşağıda gösterildiği şekilde oluşturulmaktadır.



Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Bu moleküllerin başında tokoferoller, fenoller, bilirubin, DNA, karotenler, kolesterol, NADPH, triptofan, methionin, sistein, ve histidin gibi bileşikler girer. Doymamış yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye girerek peroksi radikalini oluşturur ve hidroksil radikali kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir⁸⁰.

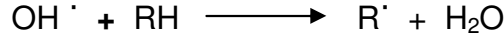
2.2.3.6. Perhidroksil radikali (OOH^\cdot)

O_2^\cdot radikali asidik ortamda daha reaktif olup protonlanarak kendisinden daha kuvvetli bir oksidan olan OOH^\cdot radikalini oluşturur¹⁰⁴. pH'ya bağlı olarak stozoldeki süperoksit radikalinin ancak % 3'ü protonlanmış halde bulunur¹¹². OOH^\cdot radikali O_2^\cdot radikalinden daha polardır ve membranlardan kolayca geçer. OOH^\cdot radikali yağ asitleri ile doğrudan etkileşebilir, linoleik, linolenik ve araşidonik asitlerin peroksitlerine dönüşümünden sorumludur^{67,111}.



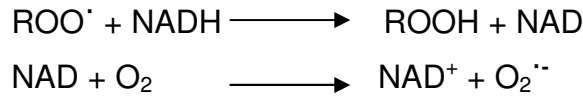
2.2.3.7. Karbon merkezli radikaller (R[·])

OH[·] lipid, protein gibi çeşitli biyomoleküllerden bir H atomunu ayırarak bu moleküllerin oksidasyonuna ve karbon merkezli radikallerin oluşmasına neden olur ¹¹².



2.2.3.8. Peroksil(ROO[·]) ve Alkoksil (RO[·]) radikalleri

Biyolojik sistemlerde oluşan alkoksil radikalleri, diğer radikallerin oluşması için hızla moleküler düzenlemeye uğrasa da genellikle peroksil ve alkoksil radikalleri iyi oksidan ajanlar olarak bilinmektedir. Peroksil radikalleri askorbat ve NADH'ı okside etmekte; oksijen varlığında NADH'ın oksidasyonu ise süperoksit oluşumuna yol açmaktadır ¹¹³.



Peroksil ve alkoksil radikalleri diğer moleküllerden hidrojen atomu alabilmektedir. Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin hücre membranlarındaki doymuş yağ asitleri, lipoproteinler veya serbest yağ asitlerinden hidrojen atomu çekmesiyle başlatılmakta ve zincir reaksiyonlar şeklinde devam etmektedir ¹⁰⁹.

Peroksil radikalleri ayrıca singlet oksijen oluşturmak üzere birbirleriyle reaksiyona girebilmektedir ¹¹³.

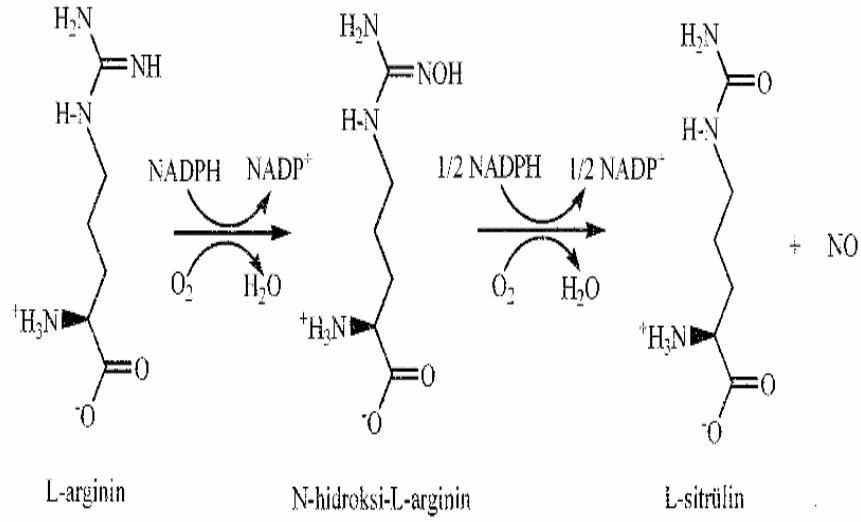
2.2.3.9. Nitrik oksit (NO)

Memelilerde NO'nun varlığı ilk kez 1916 yılında gösterilmiş, 1985 yılında ise aktive olmuş makrofajların NO saldığı bulunmuştur ¹¹⁴. NO, son yıllarda imaj değişikliğine uğramıştır. Geçmiş yıllarda otomobillerin eksoz gazlarında ve sigarada bulunan çevre kirletici bir ajan olarak bilinmekteyken günümüzde vücut sistemlerinde meydana gelen birçok biyolojik olayla yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir ¹¹⁵.

Fizyolojik derişimlerde üretilen NO esas olarak oksihemoglobinin tarafından nitrata (NO_3^-) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Nitrik oksit'in kendiliğinden oksidasyonu sonucu diğer reaktif nitrojen oksit türlerinde oluşabilir. Nitrik oksit'in tek elektronla indirgenmiş nitroksil iyonu (NO^-) veya tek elektron kaybetmiş formu olan nitrozonyum iyonu (NO^+) hatta aerobik sulu ortamlarda oluşturduğu dinitrojen tetraoksit (N_2O_4) formları birer reaktif nitrojen oksit türleridir ⁸⁰.

Nitrojenin yedi ve oksijenin sekiz elektronunun etkileşimi ile oluşan yüksüz NO molekülü üzerinde ortaklanmamış bir adet elektron taşır ve bu elektron NO molekülünün paramagnetik özellikli, yüksek reaktiviteye sahip bir radikal olmasına neden olur ¹¹⁶.

NO çeşitli enzimler tarafından farklı dokularda NADPH varlığında L-arjininden sentezlenir. Olay *nitrik oksit sentetaz* (NOS) tarafından gerçekleştirilir. NOS kaynak aldığı dokuya göre farklı isimler alır. Endotelyumda bulunan eNOS, santral sinir sisteminden köken alan nNOS, makrofajlar tarafından indüklenen ise iNOS adını alır. Yapılan araştırmalarla eNOS'un beyinde varlığı ispatlanmıştır ¹¹⁷.



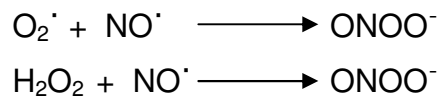
Şekil 6 : Nitrik oksidin L-argininden sentezi ¹¹⁵.

Radikal olarak reaktivitesi düşük olan NO, metal içeren merkezler ve radikallerle tepkimeye girer. Özellikle lipid radikallerle tepkimeye girmesi bu moleküle antioksidan bir etki kazandırır ⁸⁰.

Nitrik oksit organizmada nörotransmisyon, kan basıncı regülasyonu, savunma sistemi, düz kas gevşemesi ve immün regülasyonda gibi birçok fizyolojik süreçte görev almaktadır ¹¹⁸.

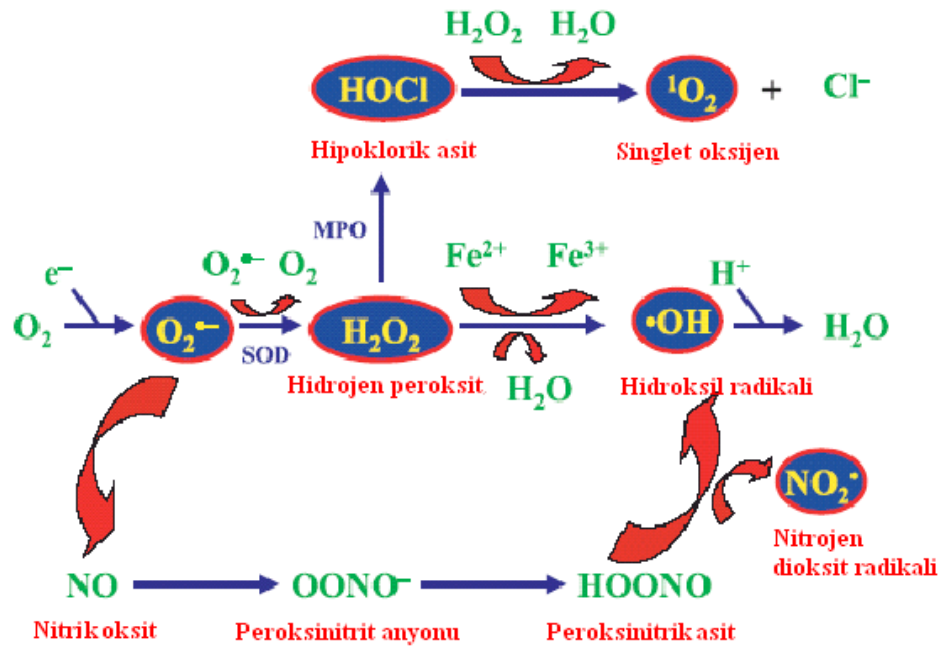
2.2.3.10. Peroksinitrit (ONOO⁻)

Süperoksit radikali veya hidrojen peroksidin NO[•] ile reaksiyona girmesi ile oluşur ¹¹⁹.



Oluşan peroksinitrit radikalinin oksidatif potansiyeli O₂^{•-} ve H₂O₂'ye göre daha yüksektir ⁶⁸.

Oksidatif stresle analog olmak üzere NO'nun ve NO'dan türeyen reaktif nitrojen türlerinin artan miktarları organizmada nitrozatif stresi meydana getirir ¹²⁰. Nitrozatif stres ile inflamasyon olayları, nörotoksisite ve iskemi gibi patolojik olaylarla bağlantılı bulunmuştur ¹²¹. Her iki stresi ortaya çıkaran reaktif türler birbirleriyle etkileşim halindedir ⁵⁶ (Şekil 7).



Şekil 7: ROS ve RNS'nin birbirleriyle etkileşimi ⁶¹.

2.2.4. Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri

Fizyolojik şartlarda organizmada oksidan-antioksidan sistemler denge halindedir. Bu dengenin antioksidan sistem yönünde bozulmasıyla serbest radikaller hücrelerin lipit, protein, karbohidrat, DNA ve enzim gibi tüm önemli bileşenlerine etki ederler. Hücre duvarı hasarı, DNA hasarı, kollajen yıkımı, lipitlerin depolimerizasyonu ve lipit peroksidasyonuna neden olurlar ⁵⁹.

2.2.5. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu

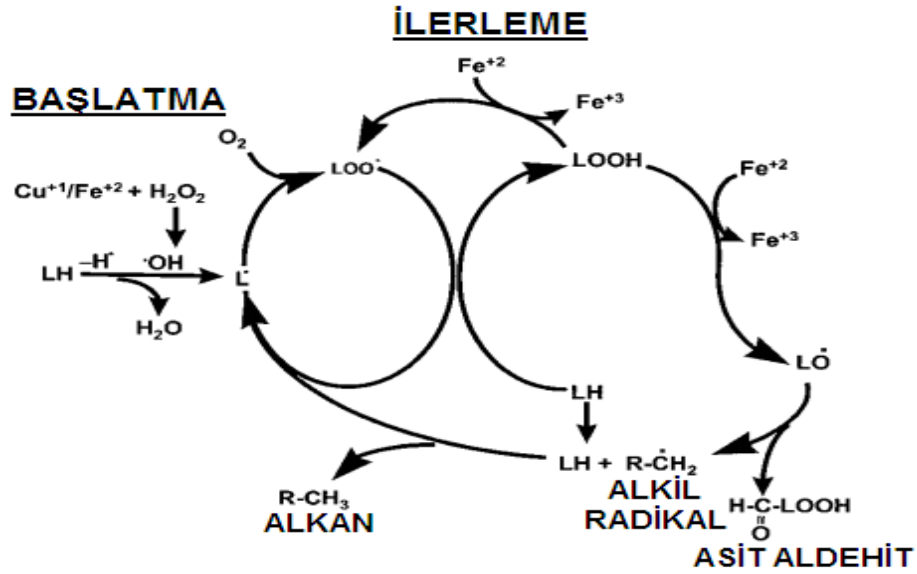
Serbest radikaller genellikle sitoplazmik membran, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi membranlara yakın yerlerde oluşturulduğundan özellikle hücre membranlarındaki doymuş fosfolipidler, glikolipidler ve kolesterol oksidanların saldırıları için önemli hedeflerdir. Oksidatif stres altında ilerleyen lipid peroksidasyonu, hedef sistemde yapı ve fonksiyon bozuklukların ve sitopatolojik sonuçlara yol açmaktadır ¹²².

Lipidler; bilinen biyolojik moleküler içinde reaktif oksijen türlerinin yıkıcı etkilerine en fazla maruz kalan moleküllerdir ¹²³. Lipid peroksidasyonu, oksijen türevi serbest radikaller tarafından tetiklenen oksidatif stresin en önemli organik göstergelerinden birisidir. Membran kolesterolü ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girip peroksidasyona neden olur ¹²⁴ (Şekil 8).

Biyolojik membranlar lipit ve proteinlerden oluşur. Protein miktarı membran fonksiyonlarının miktarına göre değişir. Lipit peroksidasyonu lipitler kadar membran proteinlerine de zarar verir. Sulu fazdaki fosfolipitler hızlıca sallandığında ya da sonike edildiğinde miseller oluşur. Lipozomlar, tek ya da birkaç lipit tabakasıyla çevrilidir. Lipit tabakası, hücrenin ya da organel membranlarının temel yapısıdır. Lipit moleküllerinin iki yarı lipit tabakasındaki yer değişimleri nadirdir. Membran akışkanlığı, membran lipitlerinin yan zincirlerinde bulunan doymamış yağ asitlerinden dolaydır. Doymamış yağ asitlerinin hasarı, membran akışkanlığı azaltıcı yöndedir ¹²⁵.

Aköz solusyonların radyolizi sonucu, hidroksil radikali(OH[·]) oluşması lipitlerin peroksidasyonunu uyarır. Bu olay, sadece biyolojik membranlar ve yağ asitleri için değil, yiyecek lipitleri için de geçerlidir ⁸⁷. Peroksidasyon mannitol gibi OH[·] radikali tutucularla önlenir. O₂^{·-} in

protone formu olan **OOH'** daha reaktiftir ve linoleik asit gibi yağ asitlerinden **H** çıkarabilir ¹²⁵. **OOH'** yüksüz olduğundan dolayı tıpkı **H₂O₂** gibi membranları kolaylıkla geçebilir. Ancak **OOH'**, hücre membranlarında lipit peroksidasyonunu başlatamaz. Çeşitli demir-oksijen kompleksleri, hidrojeni çıkarıp, peroksidasyonu başlatabilir ¹²⁵.



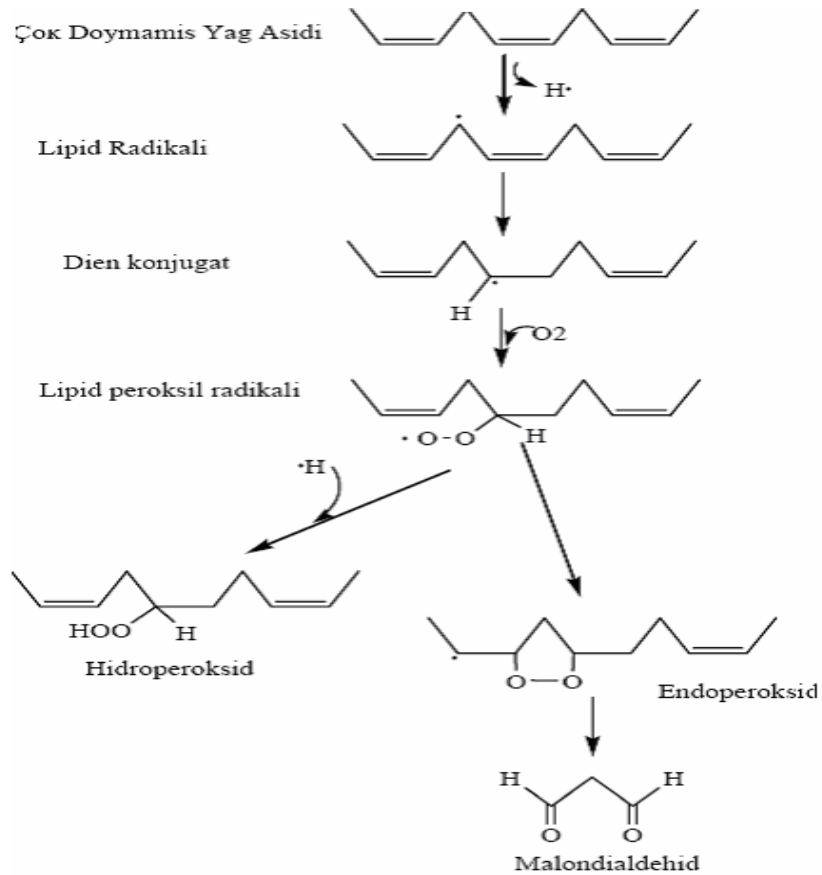
Şekil 8: Metallerin katalizlediği lipid peroksidasyonu ¹²⁶.

Lipit radikali, oksijen alarak peroksi radikalini oluşturur ⁸². Peroksil radikalleri, bir başka lipit molekülünden, hidrojen atomunu uzaklaştırabilirler. Bu, lipit peroksidasyonunun ilerleme (propagasyon) basamağıdır. Peroksil radikali hidrojen atomunu çıkararak kısaca lipit peroksit denilen lipit hidroperoksiti oluşturur. Lipit peroksit, LOOH türlerinin yanında, siklik peroksitleri de içerir ¹²⁵.

Lipit peroksitleri ve lipit peroksil radikalleri, toksik etkilerini oksijenden türeyen radikallerin reaksiyona girdikleri aynı hücre komponentleriyle reaksiyona girerek gösterirler. Lipit radikallerinin hidrofobik yapısından dolayı, pek çok reaksiyon membranla ilgili yapılarda gerçekleşir ¹²⁴.

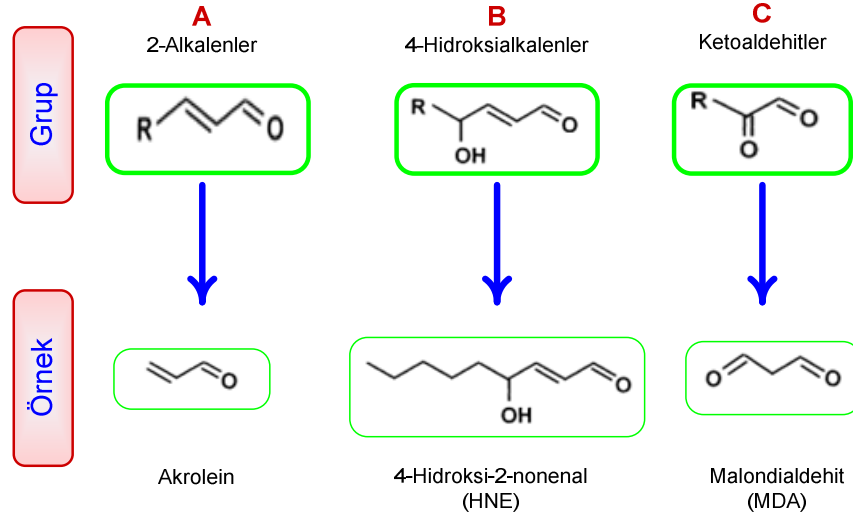
Lipit hidroperoksitleri, fizyolojik sıcaklıklara dayanıklı moleküllerdir fakat yıkılmaları geçiş metalleri ve metal kompleksleri tarafından katalizlenir ⁸². Üç karbonlu bir ketoaldehid olan Malondialdehid normal metabolik şartlarda, önce asetat veya malonata kadar okside olur, daha sonra krebs siklusu ile CO₂'e indirgenerek atılır. Fakat aşırı lipid peroksidasyonunda MDA konsantrasyonu artar ve dokulara hasar verir ¹²⁷.

Biyolojik sistemlerdeki oksidatif stresin ölçülmesinde günümüzde en yaygın metod MDA ölçümüdür. MDA, proteinlerin lizin rezidüleriyle ve fosfolipidlerin amin gruplarıyla reaksiyona girer ¹²⁸. MDA, kolaylıkla diffüze olabildiğinden, DNA'nın nitrojen bazlarıyla da reaksiyona girerek hasara neden olabilir ¹²⁹.



Şekil 9: Lipid Peroksidasyonunun kimyasal yolu

Peroksidasyon sonucu oluşan reaktif aldehidler; serbest radikallere göre daha stabildirler. Hücre içinde veya hücreden dışarıya çıkarak daha uzak bölgelerdeki proteinlerin serbest amino grupları, fosfolipidler ve nükleik asitlerle reaksiyona girebilirler. Bunun sonucunda molekül içi ve moleküller arası 1-amino-3-imino propen (AIP) köprüleri kurabilir ve biyolojik moleküllerde yapısal modifikasyonlar oluşturabilirler (Şekil 10).



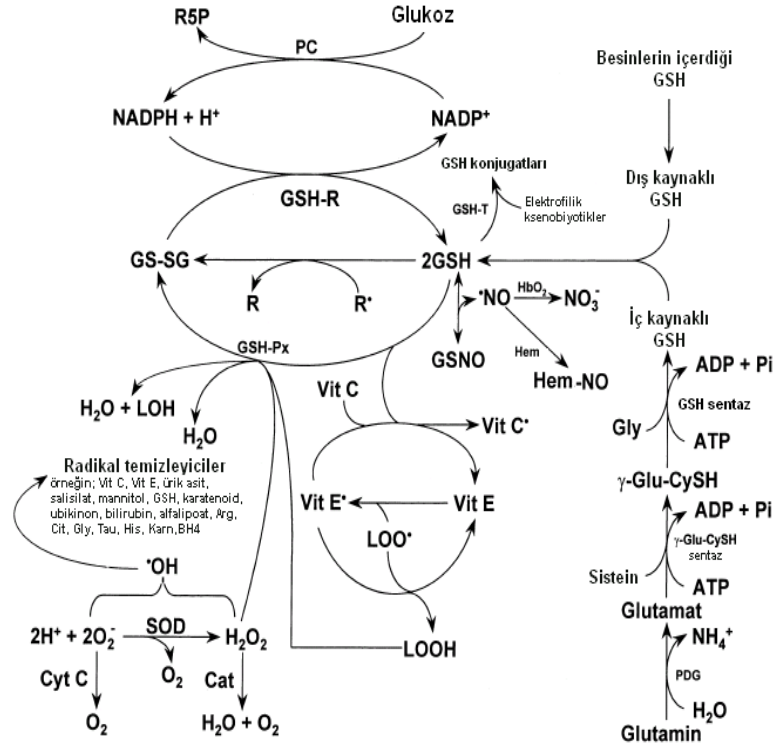
Şekil 10 : Lipid peroksidasyonu ile oluşan aldehidler ¹²⁹.

2.3. Antioksidan Sistem

Canlı organizma hücrelerinde serbest radikal oluşumu ve bu radikallerin hasar verici etkilerinin bulunması savunma mekanizmalarının gelişmesine neden olmuştur. Hasar önlemek için organizmada gelişen bu savunma mekanizmaları antioksidan sistemler veya antioksidanlar olarak bilinir ⁵⁹.

Hücre dışında ve hücrede farklı organellerde yerleşerek savunma mekanizmasında rol alan biyomoleküller (antioksidanlar) enzimatik yapıda olabilecekleri gibi non-enzimatik yapıda da olabilirler.

Enzimatik yapıdaki antioksidanlar içinde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz ve glutatyon S-transferaz sayılabilir. Enzimatik yapıda olmayanlar arasında askorbik asit, tokoferoller, β -karoten gibi vitamin yapıya katılan antioksidanlar sayılabileceği gibi glutatyon, α -lipoik asit, ubikinol, ürik asit, seruloplazmin, transferin ve selenyum gibi antioksidan özellik gösteren maddeler de sayılabilir ¹³⁰⁻¹³³ (şekil 11).



Şekil 11 : Memeli Hücrelerinde Antioksidan Sistem ⁶⁸.

Antioksidanlar ayrıca primer, sekonder ve tersiyer olarak da sınıflandırılmaktadır. Yeni serbest radikal formasyonun önleyen antioksidanlar primer antioksidanlar olarak adlandırılmaktadır. Örnek olarak SOD, GPx, metal bağlayan proteinler, ferritin, seruloplazmin, demir, hemopeksin ve haptoglobulin gösterilebilir. Bazıları ise metal iyonları ile reaksiyona girebilecek olan peroksitleri yok ederek serbest radikallerin oluşumunu önlemektedirler ¹³⁴.

Sekonder antioksidanlar, zincir kırıcı reaksiyon ile serbest radikalleri uzaklaştırmaktadırlar. Bilirubin, E vitamin, β -karoten, ürik asit ve albumin gibi maddeler bu sınıfta yer almaktadırlar. Lipid peroksidasyon zincirini kıran bir antioksidan olan α -tokoferol hücre zarında bulunmaktadır. Askorbik asit suda ermekte ve radikal toplayıcı olarak rol almakta, E vitamininin etkisini arttırmaktadır. Ürik asit ksantin oksidazı inhibe ederek serbest radikal oluşumunu azaltmaktadır ¹³⁴.

Tersiyer antioksidanlar, Glikozilaz, endonükleaz ve ekzonükleaz gibi enzimler bu grupta yer alır ve etkilerini radikallerin oluşturduğu biyomoleküler hasarı onararak gösterirler ¹³⁵.

2.3.1. Antioksidan Etki Tipleri

Antioksidan ajanlar, oksidan moleküllere karşı etkilerini dört yolla göstermektedirler ¹³⁶ :

1) Süpürücü etki gösterenler: Oluşturdukları etki ile yeni radikal oluşumunu engelleyip; oluşmuş olan radikalleri daha az zararlı hale getirirler. Bu gruba örnek olarak süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi enzimler; ferritin, serüloplazmin ve metallothionein gibi metal bağlayıcı proteinler verilebilir.

2) Giderici etki gösterenler: Oksidanlarla etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini inhibe eden bileşiklerdir. β -karoten, vitamin C ve vitamin E bu tür etkiye örnektir.

3) Zincir kırıcı etki gösterenler: Zincirleme olarak devam eden reaksiyonları belli yerlerinden kırarak, oksidan etkiyi durdururlar. Bunlara örnek olarak, bazı vitaminler, mineraller, hemoglobin, ürik asit, bilirubin ve albümin verilebilir.

4) Onarıcı etki gösterenler: Bu grupta DNA tamir enzimleri ve metiyonin sülfoksit redüktaz örnek gösterilmektedir.

2.3.2. Nonenzimatik Yapıda Olan Antioksidanlar:

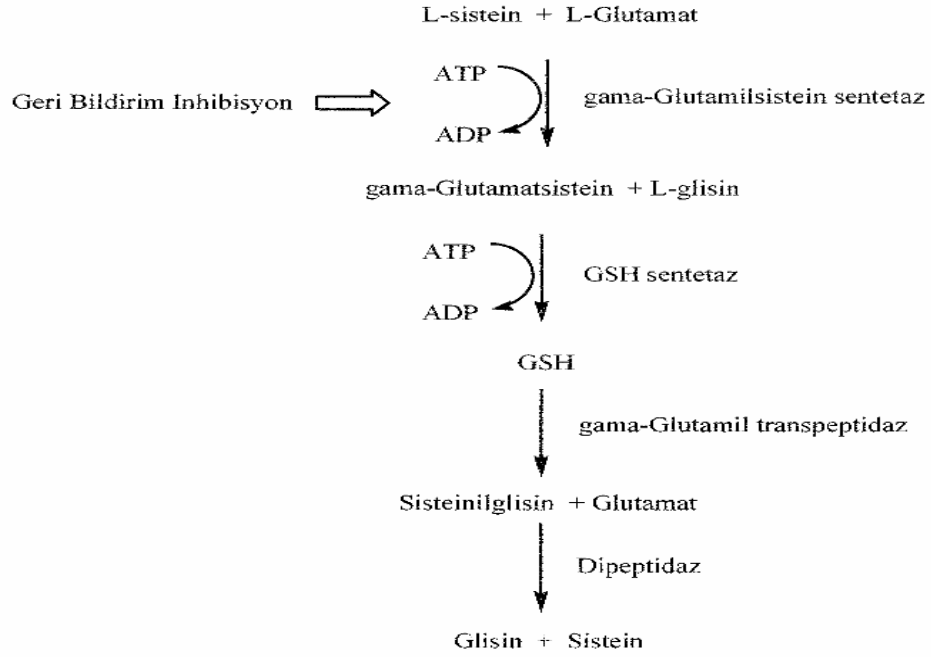
Ekzojen Kaynaklı Nonenzimatik Antioksidanlar: β -karoten, vitamin C ve vitamin E.

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

2.3.2.1. Glutatyon (GSH)

Glutatyon (γ -glutamilsisteinilglisin), düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptiddir. Glutatyon hücrelerde en çok bulunan protein dışı endojen tioldür. Doku GSH düzeyi sadece senteze katılan enzimler tarafından düzenlenmez, tiol içeren aminoasitlerin yeterince olması da oldukça önemlidir ^{137,138}.

GSH, tüm memeli hücrelerinde bol miktarda (0.5-10 mM) sentezlenir. Bu sentez iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, γ -glutamilsistein sentetaz enzimi GSH'ın prekürsör amino asitleri olan glutamat ve sisteinden, γ -glutamilsisteinin oluşumunu katalizler. İkinci basamakta ise, glutatyon sentetaz, glisin ve γ -glutamilsisteinden glutatyonu oluşturur. GSH negatif geri besleme (feedback) ile glutamilsistein oluşum hızını ve böylelikle kendi sentezini de denetler. Bu sentezde bir molekül GSH için 2 molekül ATP'nın hidrolizi gerekir ¹³⁹ (Şekil 12).



Şekil 12 : Glutasyonun biyosentezi ¹⁴⁰.

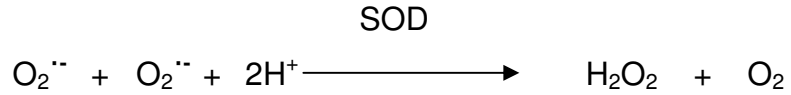
İn vivo sentezlenebilen ve ince bağırsaktan kısmen emilebilen GSH endojen ve eksojen bir antioksidandır. Glutasyon, GSH-transferaz ve peroksidazlar için bir substrat olup ksenobiyotik ve reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonuna katılır. Ayrıca, antioksidan etkili C ve E vitaminleri üzerinde orta düzeyde koruyucu etkiye sahiptir ^{68,138}.

GSH eksikliği hücre ölümüne yol açar. Karaciğer iki GSH havuzuna sahiptir. Birincisinin yarı ömrü 2-4 saat ve sitozoliktir, ikincisinin yarı ömrü 30 saattir ve mitokondriyaldir. Ökaryotik hücrelerde GSH'nin %90'ı sitozolde, %10'u mitokondride, çok azı da endoplazmik retikulumda bulunur ¹⁴¹. GSH oksidasyonu, apoptotik sürecin erken belirtisidir ve metabolik sinyal gibi davranabilir ¹⁴². GSH, DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır

2.3.3. Enzimatik Yapıda Olan Antioksidanlar:

2.3.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1)

Süperoksit dismutaz (SOD), $O_2^{\cdot -}$ radikalinin H_2O_2 'ye dismutasyonunu katalizleyen bir metaloproteindir. Hücredeki süperoksit düzeyleri kontrol etmede önemli bir rol oynar. Hücre içi serbest radikal üretimine karşı ilk enzimatik savunma sistemidir. O_2 başlı başına toksik olmamasına rağmen biyolojik membran ve diğer hücre komponentlerinden elektron kopararak serbest radikal zinciri reaksiyonlarına neden olabilir, bu nedenle O_2 'nin kontrol altında tutulması hücre için şarttır. 2 molekül $O_2^{\cdot -}$ 'ni 2 molekül proton ile reaksiyona sokarak H_2O_2 'e dönüştürür ¹²⁵.



3 farklı süperoksit dismutaz enzimi bulunmaktadır:

1. Aktif bölgesinde Cu^{+2} ve Zn^{+2} içeren süperoksit dismutazlar, tüm ökaryotik hücrelerin sitozolünde bulunur. Memeli hücrelerindeki Cu, Zn içeren SOD'ların (Cu-Zn SOD) molekül ağırlığı 32000 daltondur. İki protein alt birimi içerir. Herbir altbirim aktif kısmında bir bakır ve bir çinko içerir. Bu enzimlerin aktivitesinden bakır, stabilitesinden ise çinko sorumludur ¹⁴⁴.

2. Aktif bölgesinde manganez içeren SOD'lar prokaryot ve ökaryotların mitokondrisinde bulunur. Mn SOD, 6 nolu kromozomda lokalizedir. Mitokondriyal Mn SOD, sitozolik Cu-Zn SOD gibi siyanidle inhibe olmaz ¹⁴⁵. Mn SOD'lar bakterilerden yüksek yapıli organizmalara kadar pek çok kaynaktan izole edilmiştir. Yüksek yapıli organizmalardan elde edilen tüm Mn SOD'lar tetramerdir ve alt birimde 1.0 Mn^{+2} iyonu içerirler ^{125,144}.

3. Aktif bölgesinde demir içeren SOD'lar prokaryotlarda bulunur. Fe SOD'lar daha çok prostatik grup olarak demire gereksinen bakterilerde bulunur. Fe SOD'lar da Mn SOD'lar gibi CN⁻ ile inhibe olmamaktadır. Ayrıca hücre dışı sıvılarda çok az miktarda glikoprotein yapısında EC-SOD bulunduğu tespit edilmiştir. Bu sebepten dolayı hücre dışı sıvıda bulunan O₂⁻ radikalinin eritrosit membranına penetre olduğunda enzimatik olarak dismutasyona uğradığı gösterilmiştir ¹⁴⁴.

2.3.3.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx; EC.1.11.1.9) ve Glutasyon Redüktaz (GR; EC.1.6.4.2)

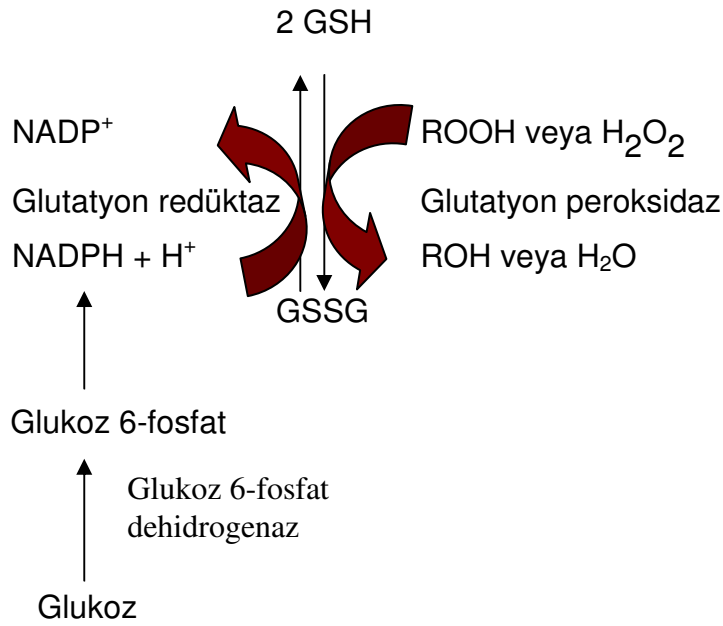
GPx, lipit peroksidlerini daha az toksik yağ asitlerine indirger. Kofaktör olarak glutasyonu (GSH) kullanmaktadır.

GPx, hücrede H₂O₂'nin temizlenmesinden sorumlu iki enzimden biri olup diğer enzim ise katalazdır. Glutasyon-GPx sistemi H₂O₂'nin H₂O'ya indirgenmesini katalizlerken organik hidroperoksidleri de parçalamaktadır ⁵⁹.

Genel olarak GPx'ın H₂O₂'e karşı en belirgin savunma sistemi olduğu düşünülmektedir. Tetramerik yapıda olan enzim en çok karaciğer ve eritrositte aktif olarak bulunmaktadır. Kalp, akciğer ve beyinde orta, kasta ise düşük aktivitede bulunur. %60-75'i stoplazmada, %25-40'ı mitokondride yer alır.

Selenyuma bağımlı ve bağımsız iki tipi mevcuttur. Selenyuma bağımlı olan GPx (Se-GPx) sitozol ve mitokondride bulunmaktadır ve hem H₂O₂ hem de lipit hidroperoksidleri metabolize eder. Selenyumdan bağımsız olan GPx (non-Se GPx) ise sadece lipit hidroperoksidleri metabolize eder. Bu fonksiyonu ile lipit peroksidasyonunun başlamasını ve ilerlemesini önlemektedir ¹⁴⁶.

GR; hücresel GSH redox siklusundan sorumlu olup endojen peroksitlerin detoksifikasyonu için önemlidir ¹⁴⁷. GPx peroksitleri temizlemek için hidrojen donörü olarak GSH'a ihtiyaç duymaktadır. Okside formu olan GSSG, glutatyon redüktaz ile yeniden glutatyona dönüşmektedir. Gerekli olan NADPH pentoz fosfat yolundan sağlanmaktadır ⁹⁶.



Şekil 13: Glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon

2.3.3.3. Glutatyon-S-Transferaz (GST; EC 2.5.1.18)

Ökaryotik hücrelerin sitozollerinde bulunan dimerik yapıda bir enzimdir. GST'ların homo ve heterodimerik çok farklı yapıları ve izoenzim formlarının bulunduğu bilinmektedir. İzoenzim dağılımlarıyla ilgili belirgin bireysel farklılıklar görülmektedir. Karaciğer başta olmak üzere böbrek, adrenal, akciğer, eritrosit, plasenta, testis, iskelet ve kalp kasında bulunur ^{148,149}.

Başta araşidonik asit ve lineloat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı GST'lar selenyum bağımsız glutatyon peroksidaz aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluştururlar.



GST enzimleri katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyon sahiptirler. Hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak; yabancı maddeleri glutatyondaki sisteine ait –SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize ederler ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlarlar. Oluşan bu glutatyon (GSH) konjugatları böylece organizmadan atılabilir. GSH'dan glutamat ve glisinin koparılmasından sonra sisteinin serbest amino grubu asetillenerek merkaptürik asitlere dönüştürülür. Ksenobiyotiklerin klasik atılım ürünleri olan bu merkaptürik asitler, yani N-asetil sisteinin S-alkile olmuş türevleri, daha sonra safra ile atılırlar. Bu yol, GST'ların kanserojen, mutajen ve diğer zararlı kimyasalların hücre içi detoksifikasyonunda rolleri olduğunu gösterir. Metabolize edilmeyen lipofilik-hidrofobik pek çok bileşiği bağlamaları ise bu enzimlerin hücre içinde sınırlı çözünürlüğe sahip moleküller için depo ve taşıma rolü üstlendiğini gösterir ¹⁵⁰⁻¹⁵³.

2.3.3.4. Katalaz (CAT EC 1.11.1.6)

Pek çok memeli dokusunda peroksizom olarak bilinen küçük organellerde bulunan katalaz, hidrojen peroksiti direkt oksijene yıkmak suretiyle uzaklaştırmaktadır.



Çok yüksek H₂O₂ yıkma kapasitesine sahip olmasına rağmen H₂O₂'e afinitesi düşük olan katalazın hızlı çalışabilmesi için yüksek H₂O₂ konsantrasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır. Başka bir deyişle katalaz düşük konsantrasyonlu H₂O₂ ile yavaş çalışmaktadır ⁸⁷.

Aynı zamanda fenol ve alkollerin de detoksifikasyonunu sağlayan katalaz; hidrojen peroksitin fenton reaksiyonları ile demir ve bakır iyonları tarafından reaktif hidroksil radikaline dönüşümünü engeller ⁸⁴.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Deney Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2007-86 proje numarası ile desteklenmiştir. Bilimsel araştırma için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hayvan Etik Kurul'undan izin alınmıştır (G.Ü.E.T.-07.031). Deney hayvanları Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi hayvan laboratuvarı (GÜDAM)'ndan temin edilmiştir.

3.1. Deney Grupları

Çalışmada toplam 30 adet Wistar cinsi dişi rat (ortalama 250 gr ağırlığında) kullanılmıştır. Ratlara 14 gün boyunca oral yolla kafein verilmiş ve deney sonunda ratlar intramuskuler ketamin (60 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) anestezisi altında sakrifiye edilmiştir. Kalp dokuları çıkartılarak hemen sıvı azota konulup dondurulmuş, analiz gününe kadar -80°C de saklanmıştır. Kalp dokularında MDA ve GSH düzeyleri, SOD, GPx, GST ve katalaz aktiviteleri ölçülmüştür.



Şekil 14 : Oral kafein uygulaması.

Çalışmada hayvanlar 3 eşit gruba ayrılmıştır.

Grup I- Kontrol grubu (n=10)

Grup II- Hayvanlara 14 gün boyunca oral yolla 30mg/kg kafein, vücut ağırlığı oranında 1 ml distile suya karıştırılmış ve günlük doz ikiye bölünerek verilmiştir. (n=10)

Grup III- Hayvanlara 14 gün boyunca oral yolla 100mg/kg kafein, vücut ağırlığı oranında 1 ml distile suya karıştırılmış ve günlük doz ikiye bölünerek verilmiştir. (n=10)

Son uygulamadan 24 saat sonra ratlar feda edilip, kalp dokuları çıkartılmıştır. Dokular, serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra derhal sıvı azot içinde dondurulmuştur. Kalp dokuları çalışma gününe kadar -80°C ' de saklanmıştır.

3.2. Kullanılan Aletler

Hassas terazi (Schimadzu, Libror, AEG 220)

Homojenizatör (Virtis-Virtisheur)

Vorteks (Heidolf Reax 200)

Benmari (Heto)

Santrifuj (Hermle Z 380K)

Soğutmalı santrifuj(Damon IEC, B-20A soğutmalı, Hermle Z 323K)

Spektrofotometre (Schimadzu, UV1601)

Tecan Eliza okuyucu ve yıkayıcı

pH metre (Jenway)

3.3. Yöntemlerin Uygulanması

Kalp Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi

Kalp doku örneklerinde parametreler çalışılacağı zaman dokular dondurucudan çıkarılıp ve 1/10 oranında 50 mM Tris-HCl (pH=7.4) tamponda, buz içinde, soğukta homojenize edilmiştir. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş, santrifüj sonucu elde edilen süpernatantlardan doku malondialdehit, doku protein ve doku glutatyon düzeyi, katalaz, glutatyon s transferaz aktiviteleri tayini yapılmıştır ¹⁵⁴. Kalan süpernatant, kloroform/etanol karışımı ile 1/1 (v/v) oranında muamele edilip, 5000 x g'de +4°C'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatandan süperoksid dismutaz, glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi tayini ve protein tayini yapılmıştır. Protein miktarları Lowry metodu ile ölçülmüştür ¹⁵⁵.

3.3.1. Lowry Protein Tayini (Doku protein tayini)

Kullanılan Reaktifler:

A reaktifi : % 2'lik Na₂CO₃ içinde 0,1 N'lik NaOH

B1 reaktifi : %2'lik Na-K tartarat

B2 reaktifi: %1'lik CuSO₄

Folin ciocalteu's fenol

Standart: 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA) kullanılmıştır.

C solüsyonu: 1 ml B₁+ 1 ml B₂+ 33 ml A solüsyonu.

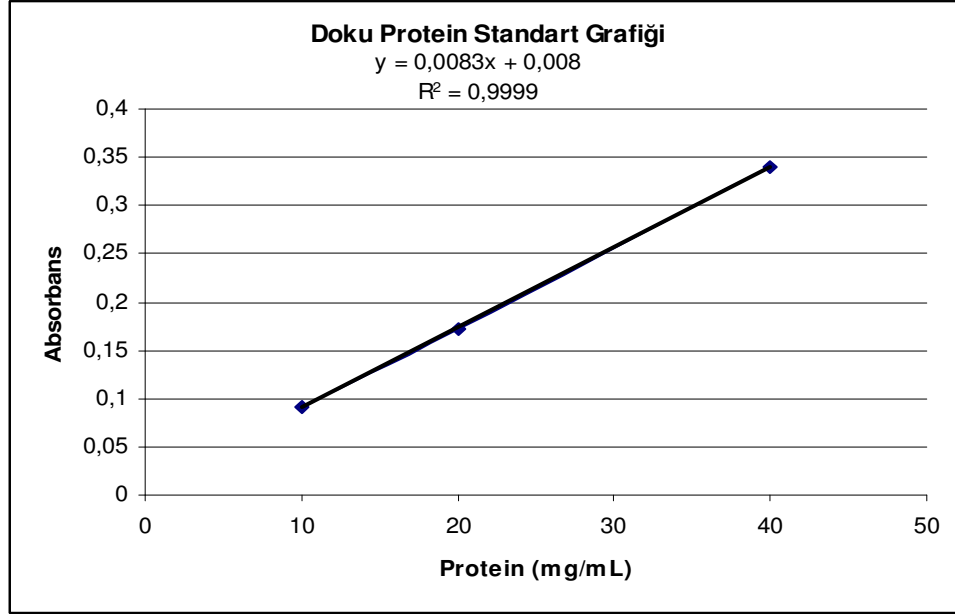
Folin reaktifi; 1 hacim Folin ciocalteu's fenol + 1 hacim distile su.

Deneyin Yapılışı: (tablo 4)

Tablo 4: Doku Protein Tayini.

Tüpler	BSA	Numune	Distile su	C solüsyonu
Kör	-	-	100 µl	2 ml
Standart-1	10 µl	-	90 µl	2 ml
Standart-2	20 µl	-	80 µl	2 ml
Standart-3	40 µl	-	60 µl	2 ml
Numune	-	10 µl	90 µl	2 ml

Deney tüpleri vortekslenildikten sonra, 15 dakika bekletilmiştir. Daha sonra deney tüplerine 200 µl folin reaktifi eklenerek iyice vortekslenip ve 1 saat karanlıkta bekletilmiştir. Tüpler 750 nm'de köre karşı okunmuştur.



Grafik 1: Doku Protein Standart Grafiği.

Hesaplama:

$$\text{Protein miktarı} : \frac{\text{Numune Abs}}{\text{Standart Abs}} \times \text{standart konsantrasyonu.}$$

Sonuçlar **mg/ml** olarak verilmiştir.

3.3.2. Kalp Dokusu Malondialdehit (MDA) Tayini

Doku MDA düzeyleri Ohkawa ve arkadaşlarının¹⁵⁶ tarif ettiği yöntemle göre tayin edilmiştir. Bu yöntemin ilkesi; homojenattaki proteinlerin sodyum dodesil sülfat (SDS) ile bağlanmasıyla, örnekte bulunan MDA'nın tiobarbitürik asit (TBA) ile ortam pH'sı 3,5 olduğu şartlarda oluşturduğu komplekse bağlı kırmızı rengin spektrofotometrik ölçümüne dayanır.

Kullanılan Reaktifler:

% 8,1 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) : Distile su içinde hazırlanmıştır.

% 0,8 Tiobarbitürik asit (TBA) : Distile su içinde hazırlanmıştır.

% 20 Asetik asit : Distile su içinde hazırlanmıştır (NaOH ile pH=3,5'a ayarlanmıştır).

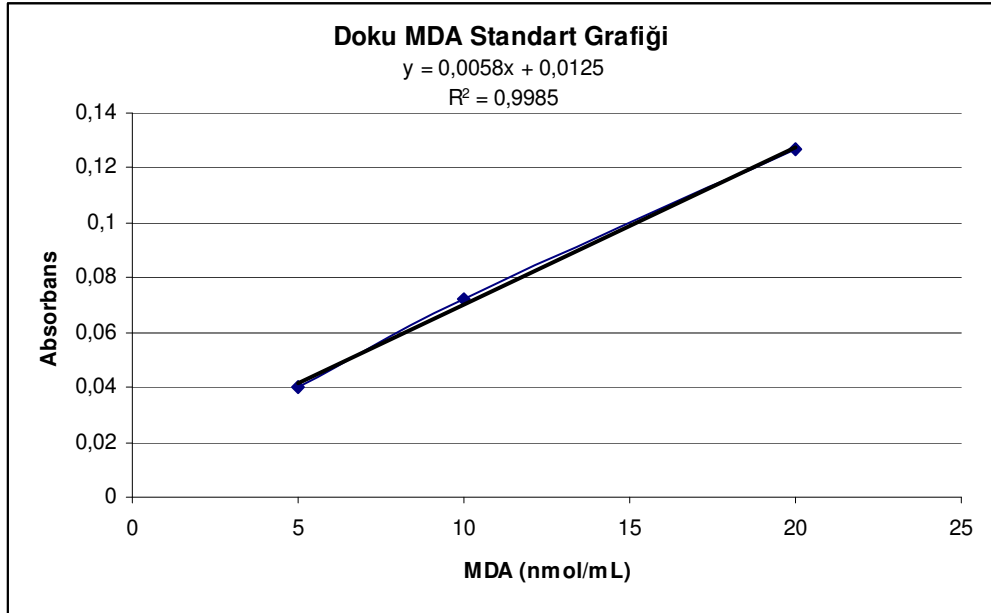
n-butanol/ piridin : (15:1, v/v).

Tablo 5: Doku MDA Tayini.

	Numune	Standart 1	Standart 2	Standart 3
Standart	-	50 µl	25 µl	12,5 µl
Distile su	150 µl	150 µl	175 µl	187,5 µl
Numune	50 µl	-	-	-
SDS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TBA	375 µl	375 µl	375 µl	375 µl
Asetik asit	375 µl	375 µl	375 µl	375 µl
Tüpler 60 dakika, 95 °C'de su banyosunda kaynatılmıştır.				
Bundan hemen sonra örnekler soğutularak,				
Distile su	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl
n- butanol/piridin	1250 µl	1250 µl	1250 µl	1250 µl

Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip üst faz 532 nm.'de n-butanole karşı okunmuştur.

MDA standart olarak **1,1,3,3- tetraetoksi propan** kullanılarak standart grafik elde edilmiş (grafik 2) ve örneklerin absorbans değerleri kullanılarak nmol/ml cinsinden MDA miktarı saptanmıştır. Çıkan sonuç homojenizasyon sırasındaki dilüsyon faktörü ile çarpılıp sonuçlar '**nmol/g yaş doku**' cinsinden belirlenmiştir.



Grafik 2: Doku MDA Standart Grafiği.

3.3.3. Kalp Dokusunda Glutatyon (GSH) Düzeyi Tayini

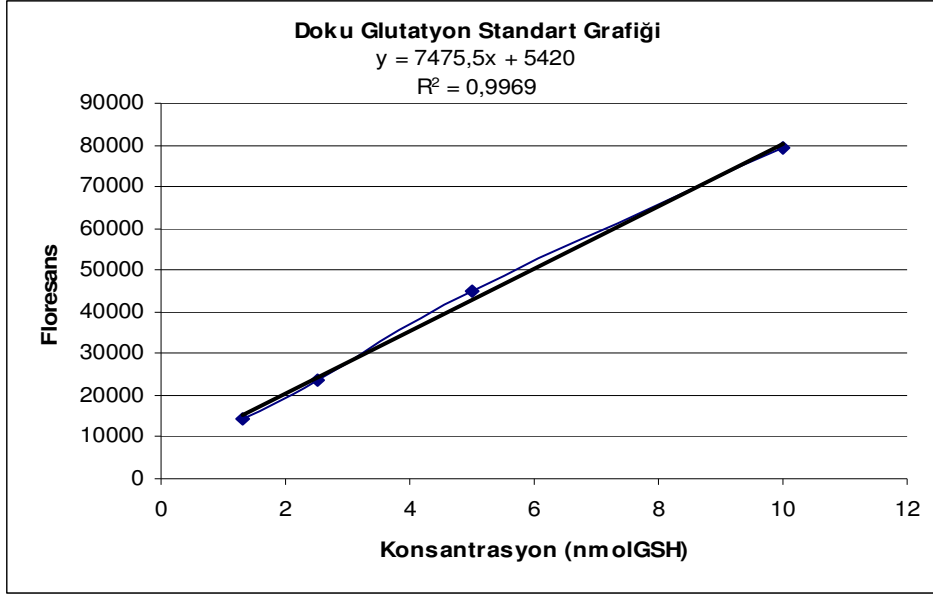
Sigma Fluorometric Glutathione Assay Kit (Catalog No:CS1020) ile ölçülmüştür. Bu kit plazma membranını kolayca geçebilen serbest formda düşük floresans veren, ancak redükte glutatyona bağlandığında GST ile katalizlenen reaksiyonda güçlü floresans oluşturan monoklorobiman (monochlorobimane) kullanmaktadır.

Dokular tartılarak 1/10 oranında (w/v) 50 mM Tris-HCl (pH:7,4) tamponunda buzlu su banyosu içinde teflon uçlu homojenizatör ile homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat +4°C'de 15000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatandan redükte glutatyon çalışılmıştır. 1mM Redükte Glutatyon (GSH) standardı assay buffer ile hazırlanıp, stok standart olarak kullanılmıştır.

Tablo 6: Doku Glutatyon (GSH) Tayini.

	1mM GSH std (μ l)	Serum (μ l)	Assay Buffer (μ l)	GST (μ l)	Substrat (μ l)
Kör	—	—	92,5	5	2,5
1,3 nmol GSH std	1,3	—	91	5	2,5
2,5 nmol GSH std	2,5	—	90	5	2,5
5 nmol GSH std	5	—	87,5	5	2,5
10 nmol GSH std	10	—	82,5	5	2,5
Numune	—	20	72,5	5	2,5

Florometre eksitasyon dalga boyu 390 nm, emisyon dalga boyu 478 nm olacak şekilde ayarlanmıştır.

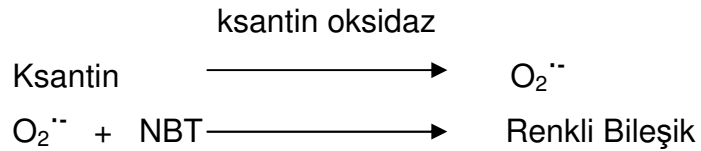


Grafik 3 : Doku Glutasyon Standart Grafiği.

Sonuçlar standart grafiğe göre (grafik 3) hesaplanmıştır. Doku proteinine bölünerek **nmol GSH / mg protein** cinsinden verilmiştir.

3.3.4. Kalp Dokusunda Süperoksid Dismutaz (SOD) Tayini

Doku SOD aktivitesi, Yi-Sun'un tanımladığı ¹⁵⁷, ksantin ksantin oksidaz ile $O_2^{\cdot\cdot}$ oluşturması ve bunun da NBT ile renkli bir bileşik oluşturarak bu renk şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar fazla ise $O_2^{\cdot\cdot}$ 'yi ortadan kaldıracadığı için oluşan rengin şiddeti o kadar az olacaktır.



Kullanılan Reaktifler :

Tris-HCl: 0,05 M pH=7.4

Stok ksantin: 3 mmol/L

NBT: 150 µmol/L

Na₂CO₃: 400 mmol/L

BSA: 1mg/mL

CuCl₂: 0,8 mmol/L

EDTA: 0,6 mmol/L

Ksantin oksidaz (XO) enzim çözeltisi: 25 U' lik enzim 1/100 (v/v) 2 M' lik amonyum sülfat çözeltisi ile dilüe edilir.

Kloroform/etanol: 3/5 (v/v)

Reaktif karışımı: 80 ml 10 kat dilüe edilmiş stok ksantin çözeltisi + 40 ml EDTA + 40 ml NBT + 24 ml Na₂CO₃ + 12 ml BSA karıştırılır.

Deneyin Yapılışı:

Dokuları tartarak 100 mg doku 1/10 oranında (w/v) 0,05 M Tris-HCl (pH=7,4) tamponunda buzlu su banyosu içinde teflon metal uçlu homojenizatör ile homojenize edilmiştir. 15000 xg' de +4 °C' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant, kloroform/etanol karışımı ile 1/1 (v/v) oranında karıştırılmış, 5000 xg' de +4 °C' de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Enzim aktivitesi tayini (tablo 7) ve protein tayini bu süpernatandan yapılmış olup protein miktarları Lowry metodu ile ölçülmüştür.

Tablo 7: Doku SOD Tayini.

	Kör	Numune
Reaktif Karışımı	2900µl	2850 µl
Numune	--	100µl
Distile su	50µl	--
XO çözeltilisi	50µl	50 µl
20 dakika oda ısısında inkübasyondan		
CuCl ₂	1000 µl	1000 µl

560 nm' de distile suya karşı okunmuştur.

Hesaplama:

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(\text{Kör abs} - \text{Numune abs})}{\text{Kör abs}} \times 100$$

% 50 inhibisyonu 1 U aktivitenin sağladığı düşünülerek hesap yapılmıştır. SOD enzim tayini sonucu elde edilen sonuçlar protein miktarlarına bölünerek **U/mg protein** olarak verilmiştir.

3.3.5. Kalp Dokusunda Glutasyon Peroksidaz (GPx) Tayini

Doku Glutasyon Peroksidaz (GPx) aktivitesi Cayman Glutathione Peroxidase Assay Kit (Catalog No:703102) ile ölçülmüştür. Bu kit doku homojenatındaki glutasyon bağımlı peroksidazları ölçer. GPx aktivitesi ölçümü indirek olarak yapılır. Hidroperoksitler (R-O-O-H) redukte glutasyon (GSH) ile Glutasyon Peroksidaz varlığında indirgenirken redukte glutasyon okside (GSSG) olur. Co-substrat karışımının içindeki Glutasyon Redüktaz katalizörlüğünde yine Co-substrat karışımında bulunan NADPH'in NADP'ye oksidasyonu ve okside glutasyonun tekrar redukte forma dönüşümü gerçekleşir. NADPH' in bu oksidasyonu sırasında 340 nm de absorbans azalması takip edilir. Absorbansın azalma hızı ile numunedeki GPx aktivitesi direkt orantılıdır.

Reaktifler ve Hazırlanışları:

- 1- Assay Buffer (x) :** pH:7,6 50 mM Tris-HCl (5mM EDTA içerir) Konsantre Assay Bufferın distile suyla 10 kat dilüe edilmesiyle hazırlanır.
- 2- Sample Buffer (x) :** pH=7,6 50 mM Tris-HCl (5mM EDTA ve 1 mg/mL BSA içerir) Konsantre Sample Bufferın distile suyla 10 kat dilüe edilmesiyle hazırlanır.
- 3- Glutasyon Peroksidaz (kontrol) :** Dilüe sample buffer ile hazırlanır, buzda saklanır.
- 4- Co- substrat karışımı:** NADPH, Glytasyon, Glutasyon redüktaz içerir. Distile su ile hazırlanır.
- 5- Kümen Hidroperoksid:** Kullanıma hazır.

Deneyin yapılışı :

Dokulardan 100 mg 1/10 oranında (w/v), 0,05 M Tris-HCl (pH=7.4) tamponunda buzlu su banyosu içinde teflon metal uçlu

homojenizatör ile homojenize edilmiştir. 15000 xg' de +4°C' de 15 dakika santrifüj edilip, süpernatant, kloroform/etanol karışımı ile 1/1 (v/v) oranında karıştırılmıştır. 5000 xg' de +4°C' de 30 dakika santrifüj edilmiş, enzim aktivitesi tayini (tablo 8) ve protein tayini bu süpernatandan yapılmıştır. Protein miktarları Lowry metodu ile ölçülmüştür.

Tablo 8: Doku Glutasyon Peroksidaz (GPx) tayini.

	Kontrol	Numune
Assay Buffer	100 µl	100 µl
Co-substrat karışımı	50 µl	50 µl
GPx Kontrol	20 µl	-
Numune	-	20 µl
Kümen hidroperoksit	20 µl	20 µl

340 nm' de 0. ve 5. dakikada absorbanlar okunmuş, NADPH için 340 nm'de $0.00622 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ olan ekstinsiyon katsayısı kuyucuktaki solüsyonun yüksekliğinin 0.6 cm olmasından dolayı $0.00373 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ alınarak hesap yapılmıştır.

GPx Aktivitesi = $\Delta A_{340} / \text{dakika} \times 1/0.00373 \times \text{Toplam hacim} / \text{Numune hacmi} \times \text{dilüsyon faktörü}$ formülü ile bulunan değerler doku proteinine bölünerek sonuçlar **nmol/dakika/mg protein** cinsinden verilmiştir.

3.3.6. Kalp Dokusunda Glutasyon-S-Transferaz Aktivitesi Tayini

Glutasyon-S-transferaz aktivitesi, Habig ve arkadaşlarının¹⁵⁸, GSH ile 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)'nin 340 nm'de absorbans artışı ile izlenebilen bir konjugasyonla tioeter bağı oluşturmasına dayanan metodu ile çalışılmıştır.

Kullanılan Reaktifler:

Tris-HCl Tamponu (homojenizasyon tamponu): 0,05 M pH=7,4

CDNB: 25 mM (saf etanolde çözülür).

GSH: 25 mM (tamponda çözülür).

Fosfat Tamponu: 100 mM pH:6 Na₂HPO₄/KH₂PO₄

Deneyin Yapılışı:

Dokular tartılarak 1/10 oranında (w/v) 0,05 M Tris-HCl (pH:7,4) tamponunda buzlu su banyosu içinde teflon uçlu homojenizatör ile homojenize edilmiş, elde edilen homojenat +4°C'de 15000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenip. süpernatandan GST aktivitesi çalışılmıştır (tablo 9).

Tablo 9: Doku GST Tayini.

	Numune
Fosfat Tamponu	1850 µl
CDNB	50 µl
GSH	50 µl
Numune	50 µl

Spektrofotometre distile su ile sıfırlanmıştır. Absorbans artışı köre karşı 25°C'de 5 dakika boyunca izlenmiştir. CDNB için molar absorpsiyon katsayısı olan $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kullanılarak hesap yapılmıştır. Süpernatanda Lowry yöntemi ile protein tayini yapılmıştır.

Sonuçlar **nmol/dakika/mg protein** olarak verilmiştir.

3.3.7. Kalp Dokusunda Katalaz Aktivitesi Tayini

Doku katalaz aktivitesi Cayman Catalase Assay Kit (Catalog No:707002) ile ölçülmüştür. Kitin prensibi Hidrojen peroksitin optimal konsantrasyonlarında metanollü ortamda katalaz ile reaksiyonuna dayanır. Katalazın peroksidaz aktivitesi sonucu renksiz kromojen okside olup renklenir. Standart olarak formaldehit kullanılır. Kromojen katalaz varlığında formaldehitle etkileşip okside olur ve renklenir. Oluşan renk 540 nmde okunur, rengin şiddeti ile katalaz aktivitesi doğru orantılıdır.

Deneyin Yapılışı:

Dokular tartılarak 1/10 oranında (w/v) 0,05 M Tris-HCl (pH:7,4) tamponunda buzlu su banyosu içinde teflon uçlu homojenizatör ile homojenize edildi. Elde edilen homojenizat +4°C'de 15000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiş, süpernatandan katalaz aktivitesi çalışılmıştır.

Reaktifler ve Hazırlanışları:

1- Assay Buffer (x) : pH: 7,0 100 mM Potasyum Fosfat Tamponu. Konsantre Assay Buffer'dan distile suyla 10 kat dilüe edilmesiyle hazırlanır.

2- Sample Buffer (x) : pH: 7,5 25 mM Potasyum Fosfat Tamponu (1 mM EDTA, %0,1 BSA içerir) Konsantre Sample Buffer'dan distile suyla hazırlanır.

3- Katalaz (kontrol) : Sample Buffer (X) ile hazırlanır.

4- Formaldehit Standart: 4,25 mM . Sample Buffer (X) ile hazırlanır. Bu stok solüsyondan 0, 5, 15, 30, 60 ve 75 µM'lık 6 farklı konsantrasyonda standartlar hazırlanır.

5- Potasyum hidroksit: 10 mM. Distile su ile hazırlanır.

6- Hidrojen peroksit: 8,82 M. Distile suyla hazırlanır.

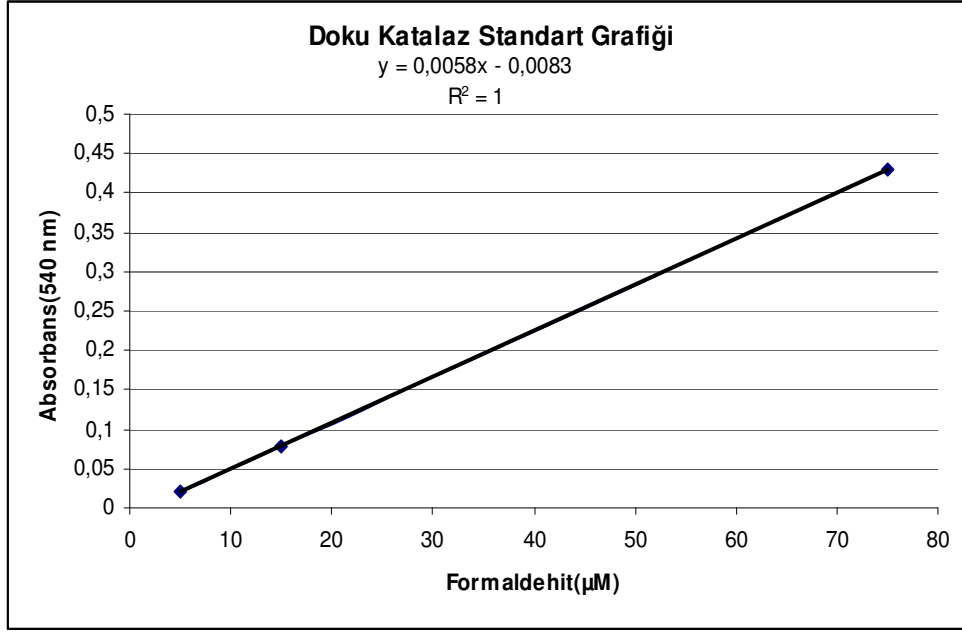
7- Purpald (Kromojen): 0,5 M HCl içinde 4 amino-3-hydrazino-5-mercaoto- 1,2,4-triazole

8- Potasyum Periodate: Kullanıma hazır.

Tablo 10: Doku katalaz tayini.

	Standart	Kontrol	Numune
Assay Buffer (X)	100 µl	100 µl	100 µl
Metanol	30 µl	30 µl	30 µl
Standart	20 µl	-	-
Kontrol	---	20 µl	---
Numune	---	---	20 µl
Hidrojen peroksit	20 µl	20 µl	20 µl
20 dakika oda ısısında inkübasyon			
Potasyum hidroksit	30 µl	30 µl	30 µl
Kromojen	30 µl	30 µl	30 µl
10 dakika oda ısısında inkübasyon			
Potasyum periodat	10 µl	10 µl	10 µl
5 dakika oda ısısında inkübasyon			

Absorbans 540 nm'de okunmuştur.



Grafik 4 : Doku Katalaz Standart Grafiği

Sonuçlar standart grafiğe göre (grafik 4) hesaplanmıştır. Doku proteinine bölünerek **nmol/dk/mg protein** cinsinden verilmiştir.

3.4. İstatistiksel Değerlendirme:

İstatistiksel hesaplamalar, istatistik paket programı SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Program, for windows 15.0) ve Microsoft Excel (for windows XP) programları ile yapılmıştır. Değerlendirmede Kruskal-Wallis varyans analizi ve gruplar arasındaki farklılığı tespit etmek için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Ayrıca gruplar spearman korelasyon analizine tabi tutulmuştur. $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Tüm sonuçlar tablo ve grafiklerde **ortalama ± standart hata** olarak verilmiştir.

4. BULGULAR

Tüm gruplara ait kalp dokusu MDA ve Glutasyon düzeyleri ile SOD, GSH-Px, GST ve Katalaz enzim aktivitelerinin istatistiksel sonuçları tablo 11’de sunulmuştur.

a : Grup 1 (Kontrol) ile diğer grupların karşılaştırılması

b : Grup 2 ile Grup 3’ün karşılaştırılması

Tablo 11: Kalp dokusu MDA ve Glutasyon düzeyleri ile SOD, GSH-Px, GST ve Katalaz enzim aktiviteleri istatistik sonuçları.

(ortalama \pm standart hata = **X \pm SE**)

Biyokimyasal Parametreler	Gruplar		
	Grup I (Kontrol)	Grup II (30mg/kg)	Grup III (100mg/kg)
Doku MDA (nmol/g doku)	74.20 \pm 4.64	58.10 \pm 2.77	48.44 \pm 3.68
Glutasyon (nmol GSH/mg protein)	0.14 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01
SOD (U/mg protein)	7.59 \pm 0.35	8.39 \pm 0.45	8.40 \pm 0.77
GSH-Px (nmol/dk/mg protein)	6.78 \pm 0.87	11.97 \pm 1.06	17.02 \pm 1.94
GST (nmol/dk/mg protein)	18.78 \pm 1.21	19.16 \pm 1.99	20.53 \pm 1.02
Katalaz (nmol/dk/mg protein)	15.32 \pm 1.11	17.74 \pm 1.12	24.81 \pm 1.67

Grup I - Kontrol grubu

Grup II - 30mg/kg kafein grubu

Grup III - 100mg/kg kafein grubu

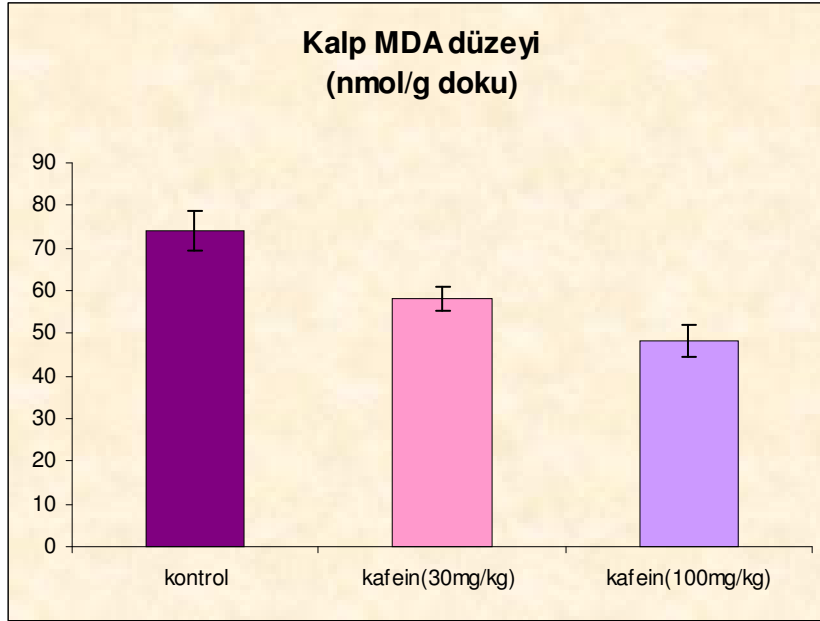
4.1. Kalp Dokusu MDA Düzeyleri

Kalp dokusu MDA düzeyleri doza bağılı olarak kafeinli gruplarda kontrole göre azalmış bulunmuştur (grafik 5). Ancak bu azalmanın doz ile istatistik olarak anlamlı bir ilişkisi tespit edilememiştir.

Kalp dokusu MDA düzeyleri için kontrol grubu (grup 1) ile 30 mg/kg doz kafein grubu (grup 2) karşılaştırdığımızda aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür (**p=0,012**; $p<0,05$).

Kontrol grubunu 100 mg/kg doz kafein grubu (grup 3) ile karşılaştırdığımızda aralarında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur (**p=0,002**; $p<0,05$).

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde düşme görülmekle birlikte aralarında anlamlı istatistiksel fark tespit edilmemiştir (**p=0,095**; $p>0,05$).



Grafik 5: Kalp MDA düzeyleri (Ortalama ± Standart Hata).

Tablo 12: Kalp MDA düzeyleri (Ortalama ± Standart Hata).

MDA (nmol/g doku)		
(1) Kontrol	74.20±4.64	n=10
(2) Kafein(30 mg/kg)	58.10±2.77^a	n=10
(3) Kafein(100mg/kg)	48,44±3,68^{a,b}	n=10

a : $p < 0,05$ (Grup 1 ile karşılaştırması)

b : $p > 0,05$ (Grup 2 ile karşılaştırılması)

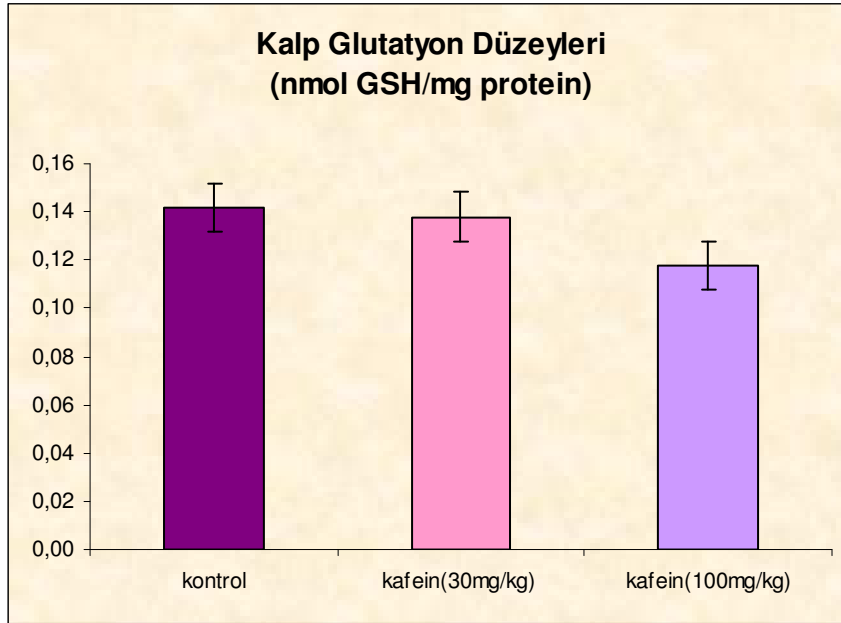
4.2. Kalp Dokusu Glutasyon(GSH) Düzeyleri

Kalp dokusu glutasyon düzeyleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre kafeinli gruplarda hafif düşüş tespit edilmiştir, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$), (grafik 6).

Kontrol grubu (grup 1) ile 30mg/kg doz kafein grubu (grup 2) karşılaştırıldığında $p=0,819$.

Kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup 3) ile karşılaştırdığında $p=0,211$.

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırdığında ise $p=0,254$ bulunmuştur.



Grafik 6: Kalp Glutasyon düzeyleri (Ortalama \pm Standart Hata).

Tablo 13: Kalp Glutasyon düzeyleri (Ortalama \pm Standart Hata).

Glutasyon (nmol GSH/mg protein)		
(1) Kontrol	0,14 \pm 0,01	n=10
(2) Kafein(30mg/kg)	0,13 \pm 0,01 ^a	n=10
(3) Kafein(100mg/kg)	0,11 \pm 0,01 ^{a,b}	n=10

a : p>0,05 (Grup 1 ile karşılaştırılması)

b : p>0,05 (Grup 2 ile karşılaştırılması)

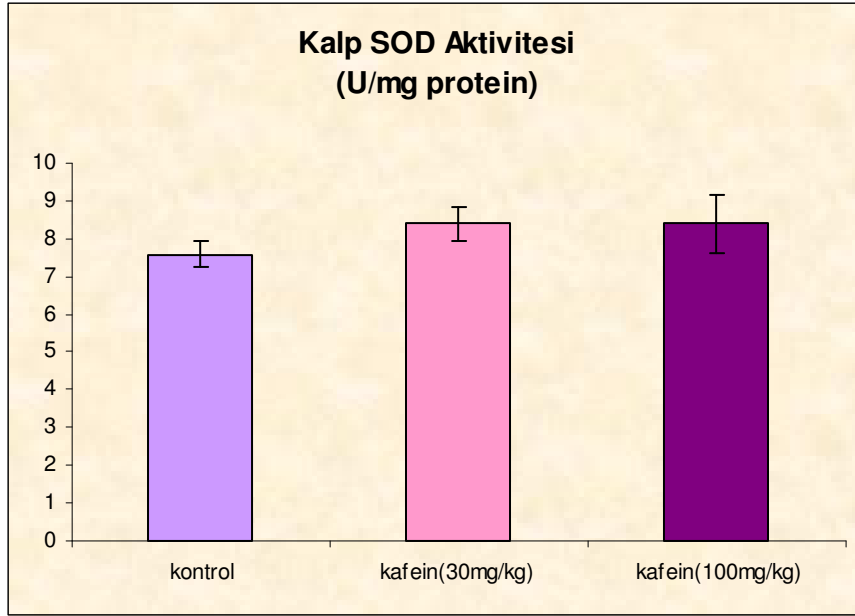
4.3. Kalp Dokusu SOD Aktivitesi

Kalp dokusu SOD aktivitesi, kafeinli gruplarda kontrole göre değişmemiştir (grafik 7).

Kalp dokusu SOD aktivitesi için kontrol grubu (grup 1) ile 30mg/kg doz kafein grubu (grup 2) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p=0,351$; $p >0,05$).

Kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup 3) ile karşılaştırdığımızda aralarında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p=0,456$; $p>0,05$).

Grup 2 ile grup 3 arasında da anlamlı istatistiksel fark tespit edilmemiştir ($p=0,777$; $p>0,05$).



Grafik 7: Kalp SOD Aktivitesi (Ortalama ± Standart Hata).

Tablo 14: Kalp SOD Aktivitesi (Ortalama ± Standart Hata).

SOD (U/mg protein)		
(1) Kontrol	7.59±0.35	n=10
(2) Kafein(30 mg/kg)	8.39±0.45 ^a	n=10
(3) Kafein(100mg/kg)	8.40±0.77 ^{a,b}	n=10

a : p>0,05 (Grup 1 ile karşılaştırılması)

b : p>0,05 (Grup 2 ile karşılaştırılması)

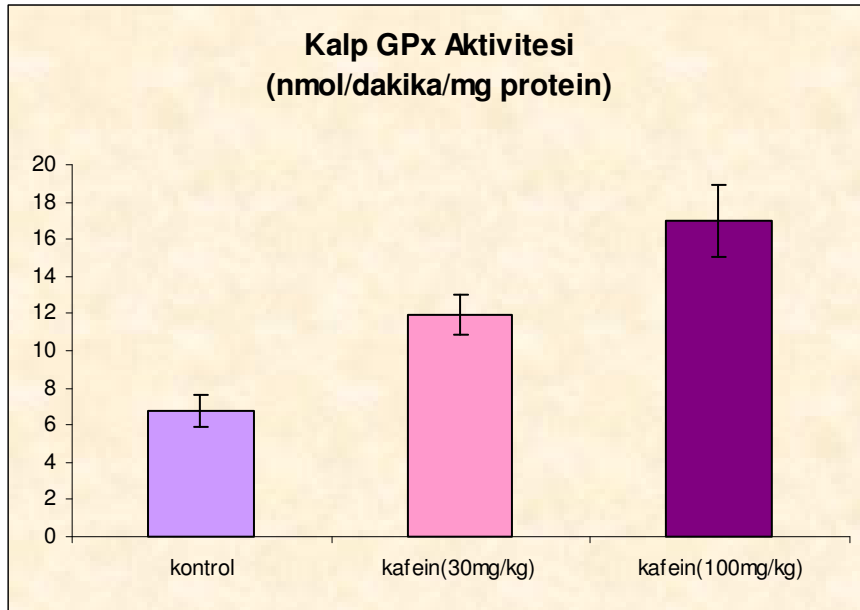
4.4. Kalp Dokusu Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi

Kalp dokusu GPx aktivitesi kafeinli gruplarda kontrole göre artmış olarak bulunmuştur (grafik 8). Kafeinin GPx aktivitesi üzerine etkisi dozla ilişkili görülmemiştir.

Kalp dokusu GPx aktivitesi için kontrol grubu (grup 1) ile 30mg/kg doz kafein grubu (grup 2) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,005$; $p<0,05$).

Kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup 3) ile karşılaştırdığımızda aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,000$; $p<0,05$).

Grup 2 ile grup 3 arasında da önemli istatistiksel fark tespit edilmemiştir ($p=0,070$; $p>0,05$).



Grafik 8: Kalp Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi (Ortalama \pm Standart Hata).

Tablo 15: Kalp Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi (Ortalama ± Standart Hata).

Glutasyon Peroksidaz (nmol/dakika/mg protein)		
(1) Kontrol	6.78±0.87	n=10
(2) Kafein(30mg/kg)	11.97±1.06^a	n=10
(3) Kafein(100mg/kg)	17.02±1.94^{a,b}	n=10

a : p<0,05 (Grup 1 ile karşılaştırılması)

b : p>0,05 (Grup 2 ile karşılaştırılması)

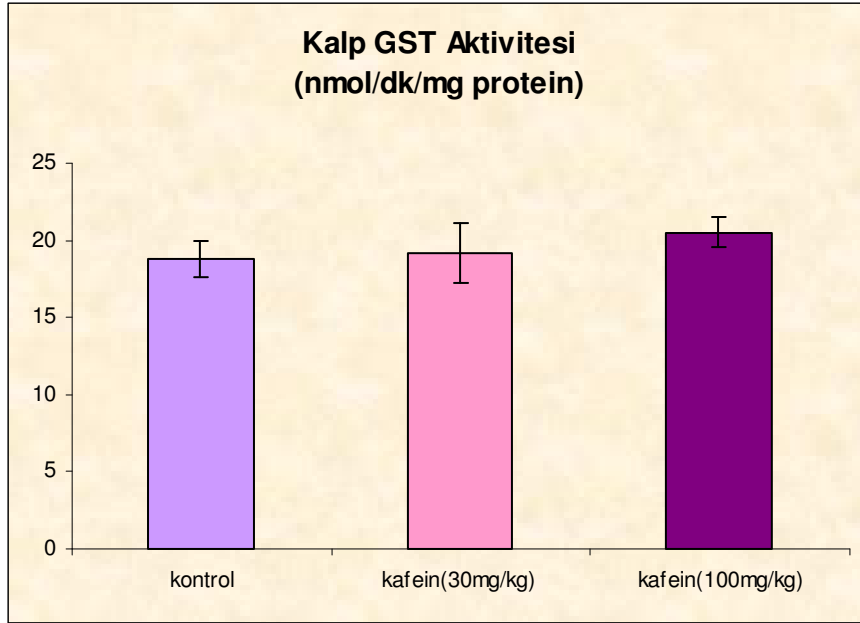
4.5. Kalp Dokusu Glutasyon S Transferaz Aktivitesi

Kalp dokusu GST aktivitesi kafeinli gruplarda kontrole göre artmış bulunmuş ve bu artışın istatistiksel açıdan dozla ilişkisi gözlenmemiştir (grafik 9).

Kalp dokusu GST aktivitesi için kontrol grubu (grup 1) ile 30mg/kg doz kafein grubu (grup 2) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (**p=1,000**; p>0,05).

Kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup 3) ile karşılaştırdığımızda aralarında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (**p=0,364**; p>0,05)

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında aralarında anlamlı istatistiksel fark tespit edilmemiştir (**p=0,326**; p>0,05).



Grafik 9: Kalp Glutasyon S Transferaz Aktivitesi (Ortalama ± Standart Hata).

Tablo 16: Kalp Glutasyon S Transferaz Aktivitesi (Ortalama ± Standart Hata).

Glutasyon S Transferaz (nmol/dk/mg protein)		
(1) Kontrol	18,78±1,21	n=10
(2) Kafein(30 mg/kg)	19,16±1,99 ^a	n=10
(3) Kafein(100mg/kg)	20,53±1,02 ^{a,b}	n=10

a : p>0,05 (Grup 1 ile karşılaştırılması)

b : p>0,05 (Grup 2 ile karşılaştırılması)

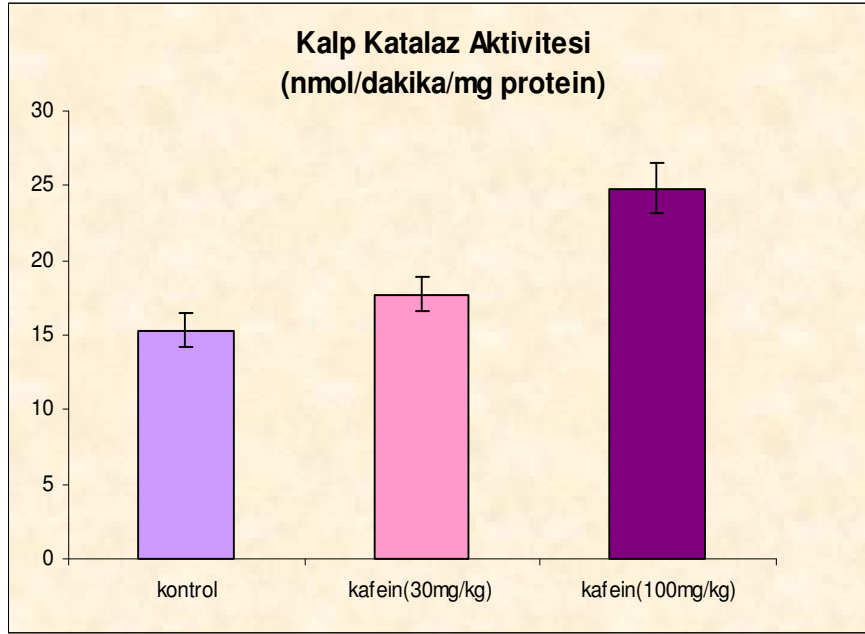
4.6. Kalp Dokusu Katalaz Aktivitesi

Kalp dokusu katalaz aktivitesi kafeinli gruplarda kontrole göre artmış olarak bulunmuştur. Artışın kafein dozuyla ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (grafik 10).

Kalp dokusu Katalaz aktivitesi için kontrol grubu (grup 1) ile 30mg/kg doz kafein grubu (grup 2) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,151$; $p>0,05$).

Kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup 3) ile karşılaştırdığımızda aralarında ($p=0,001$; $p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Grup 2 ile grup 3 arasında da anlamlı istatistiksel fark tespit edilmiştir ($p=0,005$; $p<0,05$).



Grafik 10: Kalp Katalaz Aktivitesi (Ortalama ± Standart Hata).

Tablo 17: Kalp Katalaz Aktivitesi (Ortalama ± Standart Hata).

Katalaz (nmol/dakika/mg protein)		
(1) Kontrol	15.32±1.11	n=10
(2) Kafein(30mg/kg)	17.74±1.12 ^b	n=10
(3) Kafein(100mg/kg)	24.81±1.67 ^{a,c}	n=10

a : p<0,05 (Grup 1 ile karşılaştırılması)

b : p>0,05 (Grup 1 ile karşılaştırılması)

c : p<0,05 (Grup 2 ile karşılaştırılması)

4.7. Spearman Korelasyon Analizi

Parametreler arasındaki korelasyonu incelemek amacıyla yaptığımız spearman korelasyon analizi tablo 18’de gösterilmiştir.

Tablo 18: Spearman korelasyon analizi sonuçları.

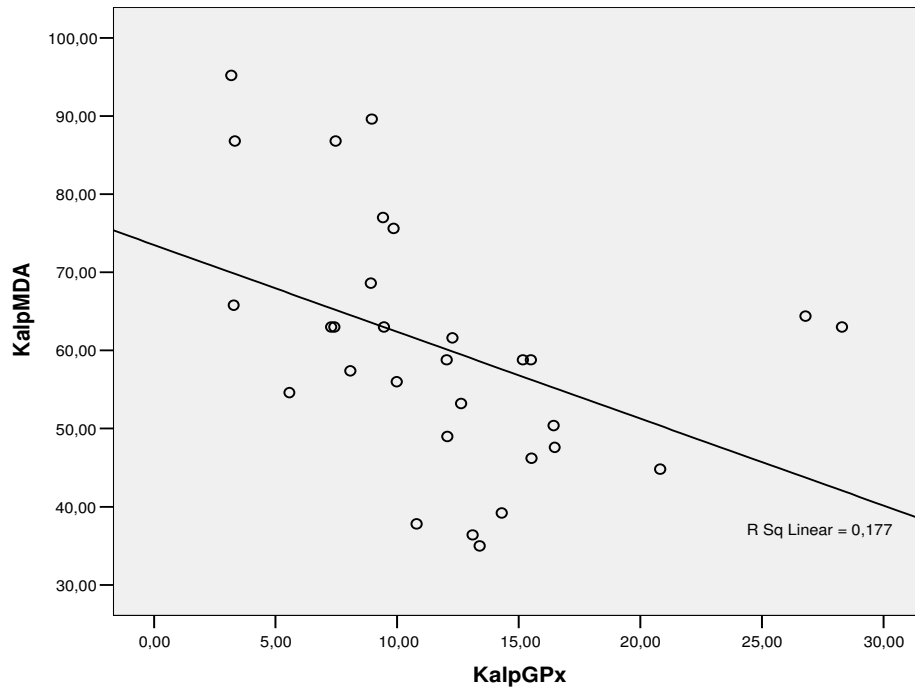
	r ve p değerleri					
	MDA	GSH	SOD	GPx	GST	KATALAZ
MDA	---	r=0,238 p=0,206	r=0,074 p=0,699	r=-0,565 p=0,001**	r=-0,179 p=0,343	r=-0,454 p=0,012*
GSH	r=0,238 p=0,206	---	r=-0,088 p=0,646	r=0,025 p=0,894	r=0,038 p=0,841	r=-0,181 p=0,339
SOD	r=0,074 p=0,699	r=-0,088 p=0,646	---	r=0,043 p=0,824	r=0,008 p=0,966	r=-0,035 p=0,855
GPx	r=-0,565 p=0,001**	r=0,025 p=0,894	r=0,043 p=0,824	---	r=0,343 p=0,064	r=0,681 p=0,000**
GST	r=-0,179 p=0,343	r=0,038 p=0,841	r=0,008 p=0,966	r=0,343 p=0,064	---	r=0,427 p=0,019*
KATALAZ	r=-0,454 p=0,012*	r=-0,181 p=0,339	r=-0,035 p=0,855	r=0,681 p=0,000**	r=0,427 p=0,019*	---

** güçlü korelasyon

* zayıf korelasyon

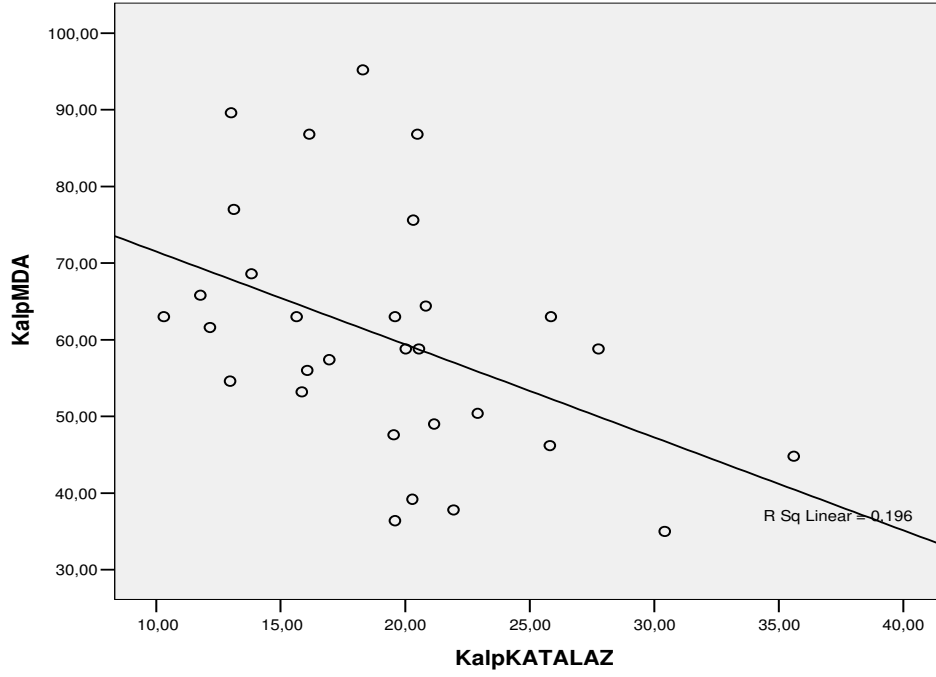
Spearman korelasyon analizi sonuçlarına göre :

Doku MDA ile doku GPx aktivitesi arasında güçlü negatif korelasyon bulunmuştur. Doku MDA düzeyi azalırken GPx aktivitesi artmıştır ($r = -0,565$; $p = 0,001^{**}$) (grafik 11).



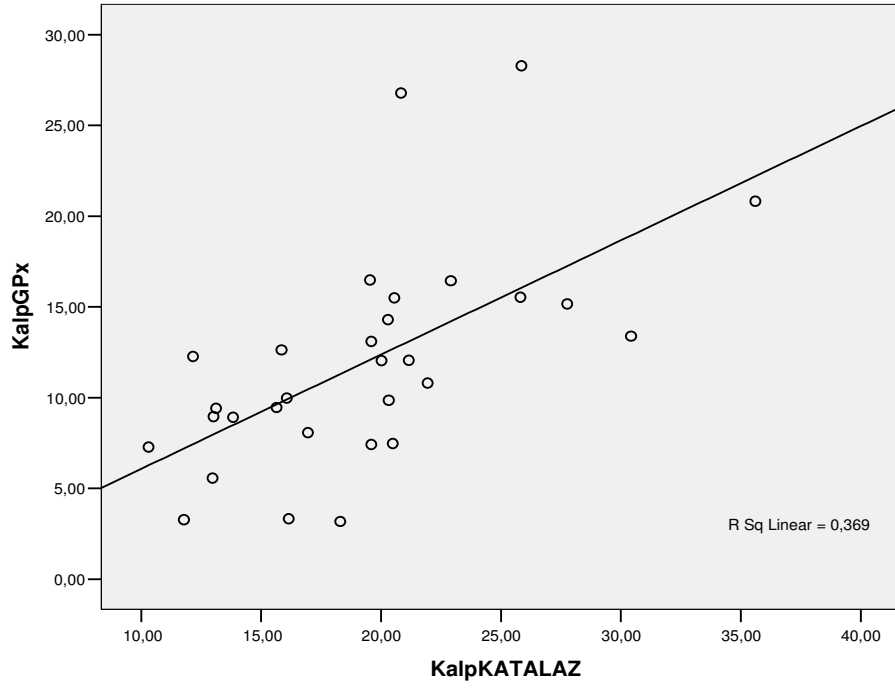
Grafik 11: Doku MDA düzeyleri ile doku GPx aktivitesi arasındaki korelasyon.

Doku MDA ile doku KATALAZ aktivitesi arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Doku MDA düzeyi azalırken KATALAZ aktivitesi artmıştır ($r = -0,454$; $p = 0,012^*$); (grafik 12).



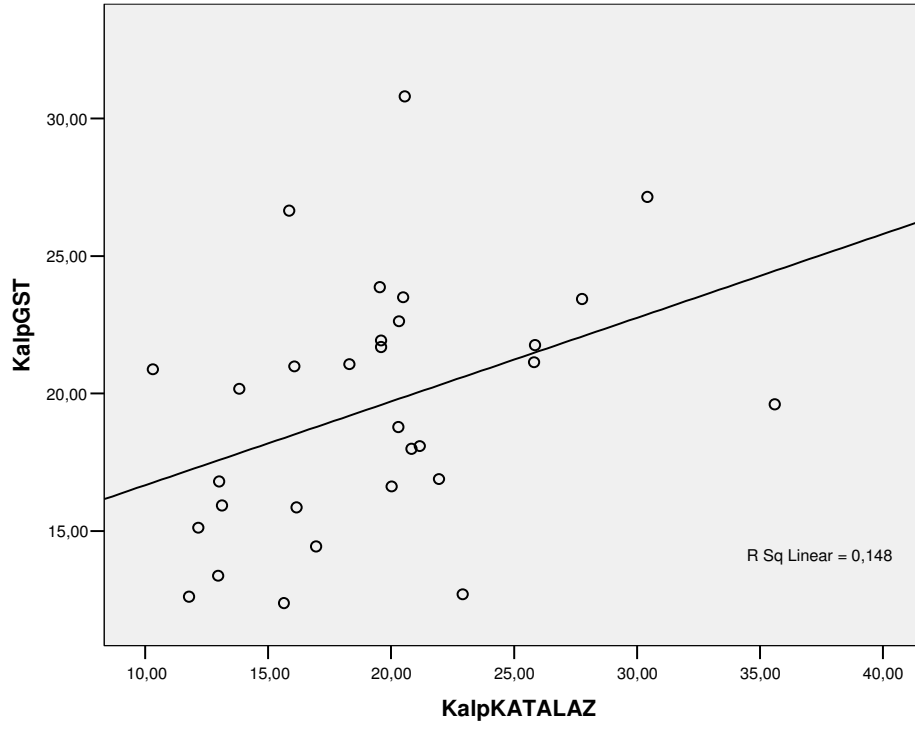
Grafik 12: Doku MDA düzeyleri ile doku KATALAZ aktivitesi arasındaki korelasyon.

Doku GPx ile doku KATALAZ aktivitesi arasında güçlü pozitif korelasyon bulunmuştur. Doku GPx düzeyi artarken KATALAZ aktivitesi de korele bir şekilde artmıştır ($r = 0,681$; $p = 0,000^{**}$), (grafik 13).



Grafik 13: Doku GPx aktivitesi ile doku KATALAZ aktivitesi arasındaki korelasyon.

Doku GST aktivitesi ile doku KATALAZ aktivitesi arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Doku GST düzeyi artarken KATALAZ aktivitesi de korele bir şekilde artmıştır ($r = 0,427$; $p = 0,019^*$), (grafik 14).



Grafik 14: Doku Katalaz aktivitesi ile doku GST aktivitesi arasındaki korelasyon.

5. TARTIŞMA

Kafein (1,3,7 trimetilksantin) bir pürin alkoloit olarak birçok yiyecek ve içeceklerin içeriğinde bulunur ¹. Kafein günümüzde her gün düzenli olarak tüketilen bir maddedir. Doğal olarak pek çok bitkinin meyvesinde, tohumunda ve yaprağında bulunur. Bununla beraber en bilinen kaynakları çay yaprakları, kahve ve kakao çekirdekleri ile kola tohumlarıdır. Ayrıca çeşitli durumlarda kullanılmak amacıyla tablet veya toz olarak da reçetesiz şekilde satılmaktadır ^{7,11,12}.

Kafeinin başlıca etkileri: Adenozin reseptörlerine antogonistik etki, psikostimülan etki, kalp atım hızı, atım hacmi, kardiyak output ve dinlenimdeki kan basıncında artış, lipolizisde artış, sitozolik Ca^{+2} seviyelerinin yükseltmesi, hücresel cAMP düzeylerini arttırması, mide asidi, pepsin ve ince bağırsak salgılarında artış ³¹⁻³³, ayrıca diüretik özellikli olduğu belirtilir ⁸.

Metilksantinler kan dolaşımı ile tüm hücre ve dokulara hızlı bir biçimde yayılır ²⁶. Kafein oral alımından 5 dakika sonra tüm dokularda görülmeye başlamaktadır ²⁷. Kafeinin % 5'den daha azı metabolize olmadan idrarla atılır. Kafein ağızdan alındıktan 15-120 dakika sonra plazmada en üst konsantrasyonlarına ulaşmaktadır ^{23,24}.

Sağlıklı yetişkin bireylerde (vücut ağırlığı 65 kg olan 1 kişinin) günde 6 mg/kg kafein alımı durumunda toksik, kardiyovasküler yan etki veya kemik yapısındaki kalsiyum dengesinde herhangi bir farklılık yapmayacağı gösterilmiştir ¹⁴.

Biz çalışmamızın temel hedefi olarak, kafeinin kalpte olası antioksidan etkilerini araştırmaya çalıştık. Çalışmamız fizyolojik olaylarda

oluşan serbest radikallere, kısa süreli (14 gün) oral kafein alımının, rat kalpteki etkilerini 30 mg/kg ve 100 mg/kg iki değişik dozda araştırmaktadır.

Kafein verilen ratların kalp dokularında lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeylerini ölçtük. Bunun yanında enzimatik ve non enzimatik antioksidan sistem üzerinde; rat kalp dokusunda SOD, katalaz, GPx, GST aktivitelerini ve GSH düzeylerini araştırdık.

Farelerde, oral alınan kafeinin tümör baskılayıcı genleri (p53 dahil) düzenlediği gösterilmiştir. Ayrıca kafeinin, mutasyonu hem baskılayıcı hem de arttırıcı etkisi olduğu belirtilmiştir. Kafein ve katabolik ürünleri olan teobromin ve ksantin yüksek bakır konsantrasyonlarında, bakır iyonlarına bağlanıp, Cu(II) 'nin Cu(I)'e dönüşmesini azaltarak, prooksidan özellik gösterdiği ve oksijen radikallerine öncülük ettiği düşünülmektedir. Ayrıca antioksidan olarak, DNA kırıklarını ve hidroksil radikallerini inhibe ettiği bildirilmiştir ¹⁶.

Düşük doz etanol ve kafein (10mg/kg) bileşiminin (kafeinol), ratlarda distal fokal iskemiden sonra oluşan hasara karşı, beynin kortikal bölgelerini koruduğu belirtilmiştir. Etanolün tek başına felci daha kötü etkilemesine karşın, kafein ile birlikte kortikal nöronlara koruma sağladığı bildirilmiştir ^{159,160}.

Kronik düşük doz (10 mg/kg) kafein tedavisinin ratlarda iskemik beyin hasarını ve global iskemiye azalttığı belirtilmiştir. Kronik kafeinin bu nöroprotektif etkisinin nedeni; onun adenosin reseptör yolundaki inhibitör etkisi ve adapte etme yeteneği olduğu düşünülmektedir. Akut düşük doz teofilin ratlarda, serebral hipoksi-iskemiden sonraki beyin hasarını azaltır. Kafein ve onun metabolitlerinin iskemi tedavisinde doza ve uygulamaya, iskeminin modeline bağlı olarak farklı etkileri olabileceği gösterilmiştir ¹⁶¹.

Kahvenin yüksek miktarlarda tanen de (kateşin analogu) içerdüği, tanenin antioksidan, anti-mutajenik, anjiogenetik, antibiyotik, anti-hiperkolesterolemik, antihipertansif ve anti-inflamatuvar etkisi olduğu açıklanmaktadır⁸.

Lee ve ark.¹⁹ farelerin içme suyuna (5-15 mg/kg) kafein eklenmesinin, kemik iliğinde gama ışınlarıyla indüklenen kromozomal hasarı önemli derecede düşürdüğünü rapor etmişlerdir. Kafein, ROS (Reaktif oksijen türleri) ve peroksil radikallerini temizlediği görüşü desteklenmektedir. Günde iki kupa kahve içmenin bazı kanserli vakalarda ciddi gecikmiş radyasyonla indüklenen toksisiteyi azalttığı belirtilmiştir. Ayrıca kafeinin biyokimyasal etkilerinden, kimyasal ve UVB indüklü karsinogenezden korumasının altı çizilmiştir.

Verma ve ark.¹⁶² 120 erkek fare ile yaptıkları bir çalışmada, farelere çekal ligasyon ve ponksiyon operasyonu yapmışlar ve bu farelerde myokardial sitokrom oksidaz aktivitesi, oksijen tüketimi, sol ventrikül basıncı, izovolumetrik kasılma ve gevşeme süresince geşilen basıncın belirgin olarak azaldığı tespit edilmiştir. Bu farelere 24 ve 48. saatte intraperitoneal olarak kafein (7,5 mg/kg i/p) enjekte etmişler ve kafeinin sitokrom oksidaz aktivitesini düzenlediğini, sol ventrikül basıncını arttırdığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak kafeinin sepsis ilişkili myokardial depresyonda yeni bir tedavi yöntemi olabileceğini belirtmişlerdir.

Teobromin (3,7 dimetilksantin) ve ksantin, kafeinin katabolik ürünleridir. Bu ürünlerin antioksidan ve prooksidan özellikte oldukları, antioksidan olan ürik asit ile yapısal benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir

Asadifer ve ark.¹⁶³ yeni doğan fareleri dört gruba ayırarak 10 gün boyunca 1. gruba %20 protein diyeti, 2. gruba kafein (4 mg/100g vücut ağırlığı) ile desteklenmiş %20 protein diyeti, 3. gruba %6 protein diyeti ve 4. gruba kafein (4 mg/100g vücut ağırlığı) ile desteklenmiş %6 protein diyeti vermişlerdir. Gruplar arasında rat kalp kütleleri karşılaştırıldığında grup 1' den grup 4' e doğru, kalp kütlelerinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşme olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, grup 2 ile grup 4 arasında kalp dokusu kafein düzeyleri karşılaştırıldığında grup 4' de kalp dokusu kafein düzeylerini grup 2' den istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulmuşlardır(p<0,05).

Brezova ve ark.¹⁶⁴ yaptıkları bir çalışmada kafein ve kafeik asitin antioksidan özelliklerini incelemek üzere; 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), 5,5-dimetil-1-pirolin N-oksit (DMPO) ve 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS) olmak üzere üç maddeyi oksidan ajan olarak kullanmışlar ve Kafein uygulanan gruplarda DPPH ve ABTS düzeylerinde hafif düşüş gözlemlemişler ancak DMPO' nun özellikle hidroksil radikali düzeyini anlamlı şekilde düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Sonuç olarak kafeinin antioksidan etkisinin olduğunu belirtmişlerdir.

Kafeinin hidroksil radikallerini ve singlet oksijeni temizlediği, lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği, LDL oksidasyonunu düşürdüğü, ayrıca protein oksidasyonu ile oluşan protein karbonillerinin seviyelerini de azaltabildiği belirtilir. Bu etkileriyle kafein, kardiyoprotektif olarak düşünülmektedir^{43,44}.

Adebayo ve ark.¹⁶⁵ toplam 21 adet fareyi dahil ettikleri bir çalışmada; fareleri kontrol grubu (Grup1), 14 gün süresince oral yolla 10mg/kg kafein verilen grup (Grup2) ve yine 14 gün süresince oral yolla 20mg/kg kafein verilen grup (Grup3) olmak üzere üç gruba ayırmışlar ve

gruplar arasında serum triaçilgliserol, LDL ve HDL düzeylerini karşılaştırmışlardır. Grup2 ve Grup3 serum triaçilgliserol düzeylerini Grup1' den istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulmuşlardır($p<0,05$). Grup2 serum LDL düzeylerini Grup1' e göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulmuşlardır. Ayrıca, Grup3 ile Grup 1 arasında serum HDL kolesterol düzeyleri karşılaştırıldığında Grup3' te Grup1' e göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğunu belirlemişlerdir($p<0,05$). Sonuç olarak kafeinin koroner kalp hastalığı riskini arttırdığını belirtmişlerdir ($p<0,05$).

Davies ve ark.¹⁶⁶ hafif hiperkolesterolemik yetişkinlerde siyah çayın etkisini araştırmak amacıyla lipit ve lipoprotein düzeylerini inceledikleri bir çalışmada; toplam 15 katılımcıyı, 1. grup siyah çay 2. grup placebo(çaya benzeyen aynı koku ve tat olarak hazırlanmış), 3. grup ise siyah çayda bulunan kafeinin miktarına eşit olarak kafein(kafeinli placebo) verilen grup olmak üzere 3 gruba ayırmışlar ve 21 gün boyunca günde 5 kez her grup kendi içeceğini 5 kez oral yolla almıştır. 1. Grup ile 3. Grup karşılaştırıldığında, Grup 1' de total kolesterol düzeyi %6.5, LDL kolesterol düzeyi %11.1, apolipoprotein B düzeyi %5 ve lipoprotein(a) düzeyinin %16.4 oranında azaldığını bulmuşlardır. Grup 1 ile Grup 2 karşılaştırıldığında, Grup 1' de total kolesterol düzeyinin %3.8 ve LDL kolesterol düzeyinin % 7.5 oranında azaldığını oysa apolipoprotein B, lipoprotein(a), HDL kolesterol, apolipoprotein A-1 ve trigliserid düzeylerinin değişmediğini gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak diyetle çayın verilmesinin total ve LDL kolesterol düzeylerini düzenleyerek koroner kalp hastalığı riskini azaltabileceğini belirtmişlerdir.

Araştırmamızda kalp dokusu MDA düzeyleri için kontrol grubu (grup 1) ile 30 mg/kg doz kafein grubu (grup 2) karşılaştırıldığında kontrole göre grup 2 MDA düzeylerinde düşme görülmekle birlikte aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,012$; $p<0,05$).

Kontrol grubunu 100 mg/kg doz kafein grubu (grup 3) ile karşılaştırdığımızda aralarında (**p=0,002**; $p<0,05$) istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur. Kafein verilen grupları da kendi aralarında karşılaştırdığımızda ise grup III'ün (100mg/kg doz kafein grubu) değerleri, grup II'den (30mg/kg doz kafein grubu) daha düşük bulunmasına rağmen, grup II ile grup III arasında(**p=0,095**) anlamlı istatistiksel fark bulunamadı.

Kafein ve lipid peroksidasyonu arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların bir kısmında, kafein uygulamasıyla serum, kalp, karaciğer, beyin, böbrek gibi değişik dokularda MDA'nın önemli derecede düştüğü, fakat yapılan çalışmaların bir kısmında ise özellikle beyin dokusu ve karaciğerde yükseldiği belirtilmiştir ^{6,43,167,168}.

Nikolic ve ark. ³⁷ kafeinin beyinde L-arginin metabolizmasını etkilediğini açıklamışlardır. Çalışmada ratlara içme suyuna (3 gün, 2mg/ml) kafein eklenmiş ve sonrasında ise doz artırılarak (7 gün, 4mg/ml) içme suyuna kafein eklenmiştir. Kafeinin, beyinde arginaz aktivitesini ve MDA seviyelerini düşürdüğünü belirtmişlerdir.

Yukawa ve ark. ⁴³ insanda, 7 gün boyunca günde 3 kez ve 150 ml (8 g Arabik kahve) kahve tüketiminin, serum total kolesterol, LDL kolesterol, MDA seviyelerini düşürdüğünü, Lp(a), HDL kolesterol ve trigliserid seviyelerini ise değiştirmedeğini açıklamışlardır.

Babu ve ark. ¹⁶⁹ deneysel diyabet oluşturulan ratların(6 hafta boyunca streptozosin verilerek) bir kısmına oral yolla (28 gün, 300 mg/kg) yeşil çay vermişler, ve her iki grupta kalp dokusu ve aortta lipit peroksit düzeylerini, SOD aktivitesini, katalaz aktivitesini, GPx aktivitesini ölçmüşler ve yeşil çay verilen gruptaki ratlarda yeşilçay verilmeyen gruptaki ratlara göre bu parametrelerin düzeylerini istatistiksel olarak belirgin şekilde düşük tespit etmişlerdir. Ayrıca, yeşil çay verilen grupta kalp dokusunda

Glutasyon düzeylerini diğer gruba göre belirgin olarak yüksek bulmuşlardır($p<0,05$).

Moutaery ve ark.¹⁶⁷ deneysel kafa travması oluşturulan ratlara intraperitoneal yüksek doz (100-150 mg/kg) kafein uygulamasının, kortekste doza bağımlı olarak, lipid peroksidasyonunu arttırdığını ve oksidatif strese neden olduğunu açıklamışlardır.

Noori ve ark.¹⁷⁰ farelere (21 gün, 1g/kg) oral yolla kakao tozu uygulanması sonrasında farelerin kalp ve karaciğer dokusunda katalaz aktivitesi ve glutasyon düzeylerini incelemişler ve kontrol grubuna göre kakao tozu alan grupta bu parametreleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek ölçmüşlerdir. Ayrıca, karaciğer SOD aktivitesini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak belirgin şekilde yüksek tespit etmelerine rağmen kalp dokusunda ise SOD aktivitesinde minimal düşme tespit etmişlerdir. MDA düzeylerinde, kalp dokusunda kontrol grubuna göre hafif artış, karaciğerde ise istatistiksel olarak anlamlı artış olduğunu gözlemlemişlerdir ($p<0,01$).

Çalışmamızdan gruplar arasından kalp dokusu SOD aktivitesi karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre kafeinli gruplarda hafif artış tespit edilmiş, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Kalp dokusu katalaz aktivitesi için kontrol grubu (grup 1) ile 30mg/kg doz kafein grubu (grup 2) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,151$). Kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup 3) ile karşılaştırdığımızda aralarında ($p=0,001$; $p<0,05$) anlamlı istatistiksel olarak fark bulundu. Grup 2 ile grup 3 arasında da anlamlı istatistiksel fark tespit edildi ($p=0,005$; $p<0,05$).

Mukhopadhyay ve ark. ¹⁷¹ farelerde (30 gün, 20 mg/kg,) kafein uygulaması sonrasında hepatik katalaz ve SOD aktivitelerinin yükseldiğini, MDA seviyelerinin ise azaldığını açıklamışlardır

Rossowska ve ark. ¹⁷² diyetlerine kafein (20mg/kg) eklenen iki grup ratın (22 gün ve 30 gün), kalp ve karaciğer dokularında total SOD, GPx ve katalaz aktivitelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel fark bulunmadığını belirtmişlerdir.

Birkner ve ark. ¹⁷³ içme suyuna NaF ile birlikte kafein (50 gün,3mg/kg/gün) eklenen ratların böbrek dokusunda, kontrol grubuna göre ve içme sularına yalnız NaF eklenen ratlara göre total SOD aktivitesinde istatistiksel fark bulunmadığını, katalaz aktivitesinin düştüğünü, GPx aktivitesinin ise yükseldiğini belirtmişlerdir.

Kalp dokusu GPx aktivitesi için kontrol grubu (grup 1) ile 30mg/kg doz kafein grubu (grup 2) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (**p=0,005**; p<0,05). Kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup 3) ile karşılaştırdığımızda aralarında (**p=0,000**; p<0,05) istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görülmüştür. Grup 2 ile grup 3 arasında da grup 3'te artma eğilimi olmakla birlikte önemli istatistiksel fark tespit edilmemiştir (**p=0,070**; p>0,05).

SOD süperoksit radikallerinin en önemli temizleyicisidir. Ancak bunun sonucunda hidrojen peroksit (H₂O₂) oluştuğu bilinmektedir. H₂O₂ bir radikal olarak kabul edilmese de organizmada hidroksil radikalının en önemli kaynağıdır. GPx ve katalaz H₂O₂'nin katalizinde önemli olan iki enzimdir. Bizim çalışmamızda kontrol grubuna göre kafeinli gruplarda GPx ve katalaz aktivitesinde artış saptanmıştır.

Kalp dokusu glutatyon düzeyleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre kafeinli gruplarda hafif düşüş tespit edilmiş, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ancak GPx aktivitesinin artışının neden olduğu düşünülebilir.

Kalp dokusu GST aktivitesi karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre kafeinli gruplarda hafif artış tespit edilmiş, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Abraham ve ark.¹⁷⁴ gavaj ile 10 gün, 10ml/kg olacak şekilde kafein verilen (2,25 mg/kg, 4,5 mg/kg, 9 mg/kg) 3 grup farenin karaciğer dokularında GST aktivitesinde, kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunmadığını tespit etmişler, aynı çalışmada içme sularına da kafein eklenen (2 hafta,70mg/100ml) farelerin karaciğer dokularında GST aktivitesinde ve sülfidril (-SH) seviyelerinde kontrol grubuna göre yine istatistiksel fark bulunmadığını belirtmişlerdir.

Kafeinle yapılan çalışmalarda deney modellerindeki çeşitlilik, kafeinin uygulanış tarzı, doz ve süresinin farklı oluşu ve antioksidan sistemin dokuya spesifik olması nedeniyle araştırmaların farklı sonuçlandığını düşünmekteyiz.

Fizyolojik şartlarda da organizmada radikaller oluştuğu bilinmektedir. Oksijen türevi radikaller; süperoksit radikali ve hidroksil radikale kaynak sağlayan hidrojen peroksidin artışına neden olmaktadır. Bunlara bağlı lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA da artış beklenir. Çalışmamızda kontrol grubuna göre kafeinli gruplardaki MDA seviyelerinin azalması ve GPx ve katalaz enzim aktivitelerinin anlamlı derecede artması; kafeinin ratlarda bu dozlarda radikal üretimini azalttığını ve antioksidan enzimler üzerinde olumlu etkisinin olduğu görüşünü desteklemektedir.

6. SONUÇ

Bu Çalışmanın sonuçları, kısa süreli (14 gün) düşük doz (30mg/kg) ve toksik olmayan yüksek doz (100mg/kg) oral kafein uygulamasının kalpte lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA'yı azalttığını göstermektedir. Kafein alımıyla rat kalp dokusunda katalaz ve GPx gibi antioksidan enzim aktivitelerinde önemli artış saptanmıştır. Ancak Kalp dokusu SOD, GST aktivitesi ve glutatyon düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Kafeinin yukarıda belirtilen dozlarda kullanımı sonrasında, lipid peroksidasyonunun azaltması, antioksidan enzim aktivitelerinin artması ile bağlantılı olarak oksidatif stres seviyesinin düşmesi, yapılan araştırmalarında desteklediği gibi kafeinin antioksidan olabileceği görüşünü kuvvetlendirmektedir. Kafeinin uygulanış tarzı, dozu, süresi ve deney modellerindeki çeşitlilikle beraber antioksidan sistemin dokuya özel olması, önceki araştırmalarda farklı sonuçlar elde edilmesine neden olmuştur. Kafeinin antioksidan olarak uygun dozunun belirlenmesinde ve etki mekanizmalarının açığa kavuşturulmasında ileri hayvan ve insan çalışmalarının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

7. ÖZET

RATLARDA KALP ÜZERİNE KAFEİNİN ANTIOKSİDAN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Metilksantin (1,3,7 trimetilksantin) olarak bilinen, insanlar tarafından geniş çapta çeşitli yiyecek ve içeceklerin (kahve, çay, çikolata gibi) bileşiminde tüketilen kafeinin, lokomotor aktiviteyi ve kalp hızını artırıcı (pozitif inotropik) etkisi ve hafif diüretik etkisi en önde gelen özellikleridir. Bu gibi etkilerinden dolayı günümüzde medikal tedavilerde ilaç olarak yerini almıştır. Oral yolla alınımından sonra kafein, hızla ve hemen hemen tamamen (%99) gastrointestinal sistem tarafından emilir ve kafeinin hidrofobik özelliği, onun bütün biyolojik zarlardan hücrelere geçmesine imkan verir.

Biz çalışmamızın temel hedefi olarak, kısa süreli oral kafein alımının rat kalbinde olası antioksidan etkilerini iki farklı dozda araştırmaya çalıştık. Kafein verilen ratların kalp dokularında lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeylerini ölçtük. Bunun yanında kafeinin antioksidan özelliğini incelemek için, enzimatik ve non enzimatik antioksidan sistem üzerinde araştırmalar yaptık. Kalp dokularında süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S transferaz (GST), katalaz aktivitelerini ve glutatyon (GSH) düzeylerini ölçtük.

Çalışmamızda 30 adet (ortalama 250 gr ağırlığında) Wistar cinsi dişi rat kullanıldı. Ratlar üç eşit gruba ayrıldı. GrupI: Kontrol grubuydu. GrupII 'ye 30mg/kg, grupIII 'e 100mg/kg (nontoksik yüksek doz) kafein 14 gün boyunca (kısa süreli) oral yolla verildi. Çalışmamızın sonuçları, 14 gün düşük doz (30mg/kg) ve toksik olmayan yüksek doz

(100mg/kg) kafein uygulamasının, kalpta lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermektedir. Kafein alımıyla rat kalp dokusunda katalaz ve GPx gibi antioksidan enzim aktivitelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır. Kalp dokusu GST aktivitesi karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kalp dokusu glutatyon düzeylerinde hafif düşüş, SOD aktivitesi ise hafif artış tespit edilmiş, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda Spearman korelasyon analizi sonuçlarına göre doku MDA düzeyi azalırken, GPx, katalaz aktivitesi artmış ve güçlü negatif korelasyon görülmüştür. Doku GPx aktivitesi ile doku katalaz aktivitesi arasında güçlü pozitif korelasyon bulunmuştur. Ayrıca doku GST aktivitesi ile doku katalaz arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Kafeinin bu dozlarda; lipid peroksidasyonunu azaltması, antioksidan enzim aktivitelerini artırması ile oksidatif stresi iyileştirmesi, yapılan araştırmalarında ışığında antioksidan olabileceği görüşünü desteklemektedir. Kafeinin antioksidan olarak uygun dozunun belirlenmesinde, etki mekanizmalarının açığa kavuşturulmasında ileri hayvan ve insan çalışmalarının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Kafein, MDA, Antioksidan

8. SUMMARY

ANALYZING THE ANTIOXIDANT EFFECTS OF CAFFEINE ON RAT HEART

Caffeine, known as methylxanthines (1,3,7 trimethylxanthine), is widely consumed by people as a component of many beverages and food (such as coffee, tea, chocolate), increasing effects on psychomotor activity, heart rates (positive inotropic) and mild diuretic effects are caffeine's prominent specialities. Nowadays, because of its above effects, in medical treatment it takes role as drug. After oral administration caffeine is quickly and almost completely (99 %) absorbed by the gastrointestinal system and the hydrophobic properties of caffeine allow its passage through all biological membranes into cells.

The main aim of our study was to compare potential antioxidant effects in rat heart at 2 different doses of short time period oral caffeine intake. We measured MDA levels, which is a product of lipid peroxidation in rats hearts that caffeine is given. In addition, to evaluate antioxidant properties of caffeine we investigated enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems. We measured SOD, catalase, GPx and GST activities and GSH levels in heart.

In our study we used 30 female Wister rats with a mean weight of 250 grams. Rats are equally divided into 3 groups. Group 1 was control. Group 2 received 30mg/kg of caffeine and group 3 received 100mg/kg caffeine (non-toxic high dose) for 14 days (short time period) orally. Our results show that 14-day low dose (30mg/kg) and non-toxic dose (100mg/kg) caffeine usage decreased lipid peroxidation in heart. Antioxidant enzyme activities in rat heart like catalase and GPx showed statistically significant increase with caffeine intake. Heart GST level

comparison to control group and between groups showed not statistically significant. Heart tissue glutathione level comparison to control group showed a slight decrease but this was not statistically significant. Heart tissue SOD level comparison to control group showed a slight increase but this was not statistically significant.

Results from the Spearman analysis showed a strong negative correlation and while tissue MDA levels decreased; GPx and katalaz activities increased. Tissue GPx activity and tissue catalase activity showed a strong positive correlation. Additionally tissue GST activity and tissue catalase activity showed a positive correlation. Decreased lipid peroxidation and increased antioxidant enzyme activities which improve oxidative stress show that these doses of caffeine may be an antioxidant under the influence of these studies. In our opinion, determining mechanism and antioxidant effect of caffeine at suitable dose requires advanced animal and human studies.

Keywords: Caffeine, MDA, Antioxidant

9.KAYNAKLAR

1. Kolaylı S, Ocak M, Kucuk M, Abbasoglu R. Does caffeine bind to metal ions? *Food Chem* 2004; 84: 383–8.
2. Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehling A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Rev* 1999; 51(1) : 84-125.
3. Ferrer I, Costell M, Grisolia S. Lesch-Nyhan Syndrome-Like Behavior in rats from caffeine ingestion, changes in HGPRTase activity, urea and some nitrogen metabolism enzymes. *FEBS Letters* 1982; 141(2) : 275-8.
4. Cauli O, Morelli M. Caffeine and the dopaminergic system. *Behavioural Pharmacol* 2005; 16(2) : 63-77.
5. Deeb SA, Moutaery KA, Arshaduddin M, Biary N, Tariq M. Effect of acute caffeine on severity of harmaline induced tremor in rats. *Neurosci Lett* 2002; 325: 216–8.
6. Devasagayam TP, Kamat JP, Mohan H, Kesavan PC. Caffeine as an antioxidant; inhibition of lipid peroxidation induced by ROS. *Biochim et Biophys Acta* 1996; 1282(1) : 63-70.
7. Concas A, Porcu P, Sogliano C, Serra M, Purdy PH, Biggio G. Caffeine-induced increases in the brain and plasma concentrations of neuroactive steroids in the rat. *Pharmacol Biochem Behavior* 2000; 66(1) : 39–45.
8. Sakamoto W, Nishihira J, Fujie K, Iizuka T, Handa H, Ozaki M, et al. Effect of coffee consumption on bone metabolism. *Bone* 2001; 28(3) : 332–6.
9. The Merck Index. 12 th ed. Whitehouse Station (NJ): Merck Research Laboratories; 1996.
10. Spiller GA. Overview of the methylxanthine beverages and foods and their effect on health. *Prog Clin Biol Res* 1984; 158: 1-7.
11. Garipağaoğlu M, Kuyrukçu N. Çocuk sağlığı ve kafein. *Çocuk Derg* 2009; 9(3): 110-5.

12. Son HY, Nishikawa A, Kanki K, Okazaki K, Kitamura Y, Lee KY, et al. Synergistic interaction between excess caffeine and deficient iodine on the promotion of thyroid carcinogenesis in rats pretreated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Cancer Sci* 2003; 94(4) : 334–7.
13. Strong R, Grotta JC, Aronowski J. Combination of low dose ethanol and caffeine protects brain from damage produced by focal ischemia in rats. *Neuropharmacol* 2000; 39: 515-22.
14. Çelik F. Tea (*camellia sinensis*); composition, the preventive effects on health and consumption. *Turkiye Klinikleri J Med Sci Review* 2006; 26: 642-48.
15. Nehlig A, Boyet S. Dose–response study of caffeine effects on cerebral functional activity with a specific focus on dependence. *Brain Research* 2000; 858: 71–77.
16. Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monit* 2003; 9(9): 335-30.
17. Cornish H.H, Christman A.H. A study of the metabolism of theobromine, theophylline and caffeine in man. *J. Biol. Chem* 1957; 228: 315-23.
18. Tang-Liu D.D.S, Williams R.L, Riegelman S. Disposition of caffeine and its metabolites in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 1983; 224(1): 180-85.
19. Lee C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clinica Chimica Acta* 2000; 295: 141–54.
20. Benowitz NL, Peng M, Jacob P. Effects of cigarette smoking and carbon monoxide on chlorzoxazone and caffeine metabolism. *Clin Pharmacol & Therapeutics* 2003; 74(5): 468-74.
21. Grant DM, Tang B.K, Kalow W. Variability in caffeine metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther* 1983; 33(5): 591-602.
22. Garattini S. Caffeine, Coffee and Health. New York(NY): Raven Pres; 1993.

23. Sawynok J. Pharmacological rationale for the clinical use of caffeine. *Drugs* 1995; 49(1): 38-50.
24. Dews PB. Caffeine. Perspective form recent research. Berlin: Springer-Verlag; 1984.
25. Marks V, Kelly JF. Absorbtion of caffeine form tea, coffee, and coca-cola, *Lancet*. 1973; 14: 827.
26. Leonard TK, Watson RR, Mohs ME. The effects of caffeine on various body systems: A Review. *J Am Diet Assoc*. 1987; 87(8): 1048-53.
27. Burg AW, Werner E. Tissue Distribution caffeine and its metabolites the Mouse. *Biochem Pharmacol* 1972; 21: 923-36.
28. Dager SR, Layton ME, Strauss W, Richards TL, Heide A, Friedman SD, et al. Human brain metabolic response to caffeine and the effects of tolerance. *Am J Psychiatry* 1999; 156: 229–37.
29. Tanda G, Goldberg SR. Alteration of the behavioral effects of nicotine by chronic caffeine exposure. *Pharmacol Biochem Behavior* 2000; 66(1): 47–64.
30. Bayar C. Kafein ve dimetilksantin metabolizmaları arasında etkileşim. Doktora. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 1996.
31. Lombardo JA. Stimulants. İn: *Drugs and performance in sports*. İn: Strauss RHWB editor. Philadelphia: Saunders company; 1987.
32. Lombardo JA. Stimulants and athletic performance (part 1): Amphetamines and caffeine. *Physician and Sportsmed* 1986; 14(11): 128-140.
33. Foukas LC, Daniele N, Ktori C, Anderson KE, Jensen J, Shepherd PR. Direct effects of caffeine and theophylline on p110 and other phosphoinositide 3-Kinases. differential effects on lipid kinase and protein kinase activities. *J Biol Chem* 2002; 277(40) : 37124–30.
34. Brunye T, Mahoney C, Lieberman H, Taylor H. Caffeine modulates attention network function. *Brain and Cognition*, 2010; 72: 181– 88.
35. Dodd SL, Herb RA, Powers SK. Caffeine and exercise performance. An update. *Sports medicine* 1993; 15(1): 14-23.

36. Jafari M, Rabbani A. Dose and time dependent effects of caffeine on superoxide release, cell survival and DNA fragmentation of alveolar macrophages from rat lung. *Toxicology* 2000; 149: 101–08.
37. Nikolic J, Bjelakovic G, Stojanovic I. Effect of caffeine on metabolism of L-arginine in the brain. *Mol Cell Biochem* 2003; 244: 125–8.
38. George KC, Hebbar SA, Kale SP, Kesavan PC. Caffeine protects mice against whole-body lethal dose of γ –irradiation. *J. Radiol. Prot* 1999; 19(2): 171–176.
39. Ilgaz Ş. Kafein ve sağlık üzerine etkileri (internette). 2009(15 kasım 2009) http://saglik.tr.net/beslenme_sagligi_kafein.shtml .
40. Eichner EW. The caffeine controversy: Effects on endurance and cholesterol. *Physician sportsmed.* 1986; 14: 124-32.
41. Dews PB. Caffeine. *Ann rev Nutr* 1982; 2: 323 -41.
42. Reid M. Caffeine. Its use and misuse in sport. *Sports coach* 1988; 33-36.
43. Yukawa GS, Mune M, Otani H, Tone Y, Liang M, Iwahashi H, et al. Effects of Coffee Consumption on Oxidative Susceptibility of Low-Density Lipoproteins and Serum Lipid Levels in Humans. *Biochem* 2004; 69(1): 70-74.
44. Kamat JP, Bloor KK, Devasagayam TPA, Jayashree B, Kesavan PC. Differential modification by caffeine of oxygen-dependent and independent effects of γ -irradiation on rat liver mitochondria. *Int. J. Radiat. Biol* 2000; 76(9): 1281-88.
45. Tofovic SP, Kusaka H, Rominski B, Jackson EK. Caffeine increases renal renin secretion in a rat model of genetic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33 (3): 440-50.
46. Tofovic SP, Kusaka H, Jackson EK, Bastacky SI. Renal and metabolic effects of caffeine in obese (fa/fa(cp), diabetic, hypertensive ZSF1 rats. *Ren Fail* 2001; 23(2): 159-73.

47. Berry NM, Rickards CA, Newman DG. The effect of caffeine on the cardiovascular responses to head-up tilt. *Aviat Space Environ Med* 2003; 74(7): 725-30.
48. Bandyopadhyay BC, Poddar MK. Caffeine-induced increase of adenosine deaminase activity in mammalian lymphoid organs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1994; 16(10): 731-3.
49. Tofovic SP, Kost CK, Jackson EK, Bastacky SI. Long-term caffeine consumption exacerbates renal failure in obese, diabetic, ZSF1 (fa-fa^{OP}) rats. *Kidney Int* 2000; 61(4): 1433–44.
50. Van Dam RM, Feskens EJM. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2002; 360: 1477–78.
51. Shin HY, Lee CS, Chae HJ, Kim HR, Baek SH, An NH, et al. Inhibitory effect of anaphylactic shock by caffeine in rats. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22(6): 411-8.
52. Ganapathi MK, Mackiewicz A, Samols D, Brabenec A, Kushner I, Schultz D, et al. Induction of C-reactive protein by cytokines in human hepatoma cell lines is potentiated by caffeine. *Biochem J* 1990; 269(1): 41-6.
53. Massey LK, Sutton RA. Acute caffeine effects on urine composition and calcium kidney stone risk in calcium stone formers. *J Urol* 2004; 172(2): 555-8.
54. Khalil RH, Soliman MRI. Diazepam Alters caffeine-induced effects on β -endorphin levels in specific rat brain regions. *Life Sci* 1997; 61: 2485-90.
55. Lane JD, Pieper CF, Phillips-Bute BG, Bryant JE, Kuhn CM. Caffeine affects cardiovascular and neuroendocrine activation at work and home. *Psychosom Med* 2002; 64(4): 595-603.
56. Sondermeijer HP, Van Marle AGJ, Kamen P, Krum H. Acute Effects of Caffeine on Heart Rate Variability. *Am J Cardiol* 2002; 90: 906-7.
57. Han LK, Kai F, Okuda H. Effects of long-term administration of caffeine on fat storage in ovariectomized rats. *Yakugaku Zasshi* 2004; 124(11): 841-6.

58. Sullivan GW, Luong LS, Carper HT, Barnes RC, Mandell GL. Methylxanthines with adenosine alter TNF alpha-primed PMN activation. *Immunopharmacol* 1995; 31(1): 19-29.
59. Başağa HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1990; 68: 989-98.
60. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)* 2003; 91: 179-94.
61. Haddad JJ. Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 969-77.
62. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1.Baskı. Konya: Mimoza Yayınları; 1995; 13-9.
63. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 1996; 16: 33-50.
64. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *Faseb. J* 1992; 6: 2675-83.
65. Urso ML, Clarkson MP. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003; 189: 41-54.
66. Yao T, Esposti SD, Huang L, Amon R, Spangenberg A, Zern MA. Inhibition of carbon tetrachloride induced liver injury by liposomes containing Vitamin E. *Am J Physiol* 1994; 30: 476-84.
67. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease, An overview. *Methods Enzymol* 1990; 186: 1-85.
68. Fang Y.Z, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 872-9.
69. Kaneda H, Taguchi J, Ogasawara K, Aizawa T, Ohno M. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2002; 162: 221-5.
70. Seven A, Candan G. Serbest Radikaller ve Lipid Peroksidasyon. *Klinik Gelişim* 1995; 8: 3906-11.

71. Moslen MT. Reactive Oxygen Species in Normal Physiology Cell Injury and Phagocytosis: Armstrong D, editor. Free Radicals in Diagnostic Medicine. New York: Plenum Pres; 1994.p.1-15.
72. McCormick M, Denning GM, Reszka GM, Bilski P, Buettner GR, Rasmussen GT, et al. Biological effects of menadione photochemistry: effects of menadione on biological systems may not involve classical oxidant production. *Biochem J* 2000; 350: 797-804.
73. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen MT. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 7915-22.
74. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Graham LB, Parker CE, Ames BN, et al. Biomarkers of oxidative stress study III. Effects of the nonsteroidal antiinflammatory agents indomethacin and meclofenamic acid on measurements of oxidative products of lipids in CCl₄ poisoning. *Free Rad Bio Med* 2005; 38: 711-8.
75. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41(12): 1819-28.
76. Sodergen E. Lipid peroxidation in vivo, Uppsala University, Uppsala: 2000.
77. Nishiyama Y, Ikeda H, Haramaki N. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J* 1998; 135:115.
78. Antmen ŞE. Beta Talasemide Oksidatif Stres. Yüksek Lisans. Adana: Çukurova üniversitesi; 2005.
79. Papas AM. Antioksidant status, diet,nutrition and health.CRC Pres United States of America 1999.
80. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Derg* 2002; 33(2): 110-18.
81. Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med*. 1990;8(1): 95-108.

82. Evans CE. Erythrocytes, Oxygen Radicals and Cellular Pathology "Systemic Events and Disease Processes" Introduction. Switzerland: Karger; 1990.
83. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd ed. Oxford: Clarendon Pres;1996.
84. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species; antioxidants and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med 2001; Dec 1, 31 (11): 1287-312.
85. Radak Z. Free radicals in exercise and aging, human kinetics; United States of America reactions. Mayo Clin Proc 1998; 63(4): 381-9.
86. Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. Düzce Tıp Fakültesi Derg 2005; 3: 30-39.
87. Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants in nutrition, health and disease. New York: Oxford University Pres; 1994; 81: 7-14.
88. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci C. Potential markers of oxidative stress in stroke. Free Radic Biol Med 2005; 39: 841-52.
89. Memisogullari R, Taysi S, Bakan E, Capoglu I. Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Type II Diabetes Mellitus. Cell Biochem Func. 2003; 21: 291-96.
90. Sözmen EY. Yaşlanma Biyokimyası. In: Onat T, Emerk K, Sözmen EY editörler. İnsan Biyokimyası. Ankara: Palme Yayıncılık; 2002.s.665-74.
91. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative Stres in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. Endocrine Reviews. 2004; 25: 612–28.
92. Kovacic P, Pozos RS, Somanathan R, Shangari N, O'Brien PJ. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. Curr Med Chem. 2005; 22(12)pp. 2601-2623(23).
93. Muller FL, Liu Y and Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. J Biol Chem. 2004; 279: 49064-73.

94. Gilbert DL. Fifty years of radical ideas. *Ann NY Acad Sci* 2000; 899: 1.
95. Freidovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species or what's the matter with oxygen? *Ann NY Acad Sci* 1999; 893:13.
96. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radical in Biology and Medicine*. Third ed. Oxford: Oxford University Pres; 2000; 160-5.
97. Pieper GM, Siebeneich W, More-Hilton M, Roza AM. Reversal by L-Arginin of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in the endothelium of the genetic diabetic rat. *Diabetologia* 1997; 40: 910-5.
98. Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol*. 2000 Nov 17; 304(1): 55-68.
99. Agarwal R, Chase SD. Rapid fluorimetric-liquid chromatographic determination of malonaldehyde in biological samples. *J Chromatogr B* 2002; 775: 121-6.
100. Valko M, İzakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Ceel Biochem*. 2004; 266(1-2): 37-56.
101. Liochev SI, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle –70 years later: an alternative view. *Redox Rep*. 2002; 7(1): 55-7; author reply 9-60.
102. Nishiyama Y, Ikeda H, Haramaki N. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J* 1998; 135: 115.
103. Tamer L, Polat G, Eskandari G, Ercan B, Atik U. Serbest Radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2000; 1: 52-58.
104. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Brit Med Bulletin* 1993; 149: 481-93.
105. Evans P, Halliwell B. Micronutrients: Oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 2001; 85: 67.
106. Hawkins CL, Pattison DI, Davies MJ. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids* 2003; 25: 259-74.

107. Stahl W, Sies H. Introduction: Reactive oxygen species. Research Monographs 2002:1-2.
108. Halliwell B. Drug antioxidant effects. Drugs 1991; 42(4): 569-605.
109. Radak Z. Free radicals in exercise and aging, Human kinetics. United states of america 2000.
110. De Grey AD. HO₂*: the forgotten radical. DNA Cell Biol. 2002; 21(4): 251-7.
111. Sies H. Oxidative stress: form basic research to clinical application. Am. J. Med 1991; 91 (3C): 31S-38S.
112. Cheeseman KH, Slater TF. An Introduction to Free Radical Biochemistry. Brit Med Bulletin 1993; 149: 481-93.
113. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd ed. New york: Oxford University press; 1999.
114. Kuyumcu A, Düzgün AP, Özmen MM, Besler HT. Travma ve enfeksiyonda nitrik oksitin rolü. Ulus Travma Derg 2004; 10(3): 149-59.
115. Burgner D, Rockett K, Kwiatkowski D. Nitric oxide and infectious diseases. Arch Dis Child 1999; 81:185-8.
116. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redoks-activated forms. Science 1992; 258(5090): 1898-902.
117. Garvey EP, Furfine ES, Shernian PA. Purification and inhibitor screening of human nitric oxide synthase isoenzymes. Methods Enzymol 1996; 268: 339-49.
118. Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. Life Sci. 1999; 65(18-19): 1865-74.
119. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stres. J Biol Chem 1997; 272: 213-6.
120. Hausladen A, Stamler JS. Nitrosative stress, Methods in Enzymology, 1999; 300: 389-95.

121. Jong MK, Adham NF, Heng MCY, Costea NV, Heng MK. Trace element metabolic alterations of zinc and prostoglandins in both human and animal colonic tumor cells, *J. Am. Coll. Nutr* 1995; 14: 473-9.
122. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, *Journal of Lipid Research* 1998; 39: 1529-42.
123. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in Biological systems. *Trends Biochem. Sci* 1989; 15: 129-35.
124. Hochstein p, Jain SK, Evans C. The physiological significance of oxidative perturbations in erythrocyte membrane lipids and proteins in "The red cell: Fifth Ann Arbor Conference". New York: AR Liss Ins; 1981.p.449.
125. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2 nd ed. Oxford: Clarendon Pres; 1983; 19-234.
126. Powell SR. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr* 2000; 130:1447-54.
127. Ulusu NN, Sahilli M, Avci A, Canbolat O, Ozansoy G, Ari N, et al. Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E. *Neurochem Res* Jun 2003; 28(6): 815-23.
128. Uchida K. 4-Hydroxy-2-Nonenal. A product and mediator of oxidative stres. *Progr Lip Res* 2003; 569:1-26.
129. Donato, H. Lipid peroxidation Cross Linking Reaction and Aging. In *Age Pigments*. Sohal R W, editor. Elsevier. Amsterdam: North Holland Biomedical press; 1981.p.63-81.
130. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the Art, *Am. J. Med.* 1991; 91(3C): 2-13.
131. Cui K, Luo X, Xu K, Ven murthy MR. Role of oxidative stress in neurodegeneration: Recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants, *Prog. Neuro-Psycho. Biol. Psych* 2004; 28(5): 771-99.

132. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future, *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 136-147.
133. Hensley K, Maitt ML, Stewart CA, Pye QN, Robinson KA, Floyd RA, et al. Mitochondrial alteration in aging and inflammation: a possible site of action of nitro-based free radical traps in "Understanding the process of aging the roles of mitochondria, free radicals, and antioxidants". In: Cadenas E, Packer L, editors. New York: Marcel Dekker; 1999. p.311-25.
134. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidant of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280: 1-8.
135. Wang X, Quinn PJ. Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res* 1999; 38: 309-36.
136. Boyunağa H, Çelik C. Serbest radikaller ve hücre sel denge. *Bilim Teknik Derg* 1996; 347: 98-100.
137. Kim YG, Kim SK, Kwon JW, Park OJ, Kim SG, Kim YC, et al. Effects of cysteine on amino acid concentration and transsulfuration enzyme activities in rat liver with protein-calorie malnutrition. *Life Sci* 2003; 72: 1171-81.
138. Parcell S. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern Med. Rev* 2002; 7: 22-44.
139. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *Am J Med* 1991; 23-30.
140. Altıntaş S. Kahramanmaraş'ta Bazı İş Kollarında Çalışan Boya İşçilerinde Plazma ve Eritrosit Membranı Sialik Asit, Glutasyon, Plazma Nitrik Oksit ve Lipid Peroksidasyonu Düzeylerinin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans. Kahramanmaraş: Sütçü İmam Üniversitesi; 2006.
141. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* 1999; 13: 1169-83.
142. Esteve JM, Mompo J, Asuncion JG, Sastre J, Asensi M, Boix J, et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis studies in vivo and in vitro. *FASEB J* 1999; 13: 1055-64.

143. Chavan S, Sava L, Saxena V, Pillai S, Sontakke A, Ingole D. Reduced glutathione: Importance of specimen collection. *Indian J Clin Biochem* 2005; 20(1): 150-52.
144. Lai CC, Huang W, Askari A, Wang Y. Differential regulation of superoxide dismutase in copper deficient rat organs. *Free Radic Biol Med* 1994; 16(5): 613-20.
145. Freeman BA, Crapo JD. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47(5): 412-25.
146. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of S-glutathione peroxidase, catalase, Cu-Zn superoxide dismutase for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 235-48.
147. Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res* 2005; 79: 157-65.
148. Adachi Y, Honi K, Takahashi Y. Serum GST activity in liver disease. *Clin. Chim. Acta.* 1990; 106: 243-55.
149. Sacks DB. Tietz Textbook of Clinical Chemistry: Carbohydrates. In: Burtis CA, Ashwood ER, Saunders WB, editors. 2 nd ed. Philadelphia. 1994.p.928-1001.
150. Canuto RA, Muzio G, Maggiora M, Biocca ME, Dianzani MU. Glutathione S-Transferase, alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase activities during diethylnitrosamine-carcinogenesis in rat liver. *Cancer Letters* 1993; 68: 177-83.
151. Listowsky I, Abramovitz M, Hama H, Niitsu Y. Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by GST. *Drug Metab. Rev.* 1988; 19: 305-318.
152. Onat T, Emerk K. Karbohidratlar: Temel Biyokimya. In: Emerk K, editor. 1. baskı. İzmir: 1996.p.289-409.
153. Thomas H, Schladt L, Knehr M, Oesch F. Effect of diabetes and starvation on the activity of rat liver epoxide hydrolases glutathione-S-Transferases and peroxisomal β -oxidation. *Biochem. Pharmacol.* 1989; 38: 4291-97.

154. İlhan A, Akyol O, Gurel A, Armutcu F, Iraz M, Oztas E. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester against experimental allergic encephalomyelitis induced oxidative stress in rats. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(3): 386-94
155. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
156. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95, 351-8.
157. Yi-Sun S, Oberly LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
158. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione-S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249(22): 7130-39.
159. Belayev L, Khoutorova L, Zhang Y, Belayev A, Zhao W, Busto R, et al. Caffeinol confers cortical but not subcortical neuroprotection after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 2004; 1008: 278–83.
160. Aronowski J, Strong R, Shirzadi A, Grotta JC. Ethanol plus caffeine (caffeinol) for treatment of ischemic stroke. *Stroke* 2003; 34: 1246.
161. Strong R, Grotta JC, Aronowski J. Combination of low dose ethanol and caffeine protects brain from damage produced by focal ischemia in rats. *Neuropharmacology* 2000; 39, 515–22.
162. Verma R, Huang Z, Deutschman CS, Levy RJ. Caffeine restores myocardial cytochrome oxidase activity and improves cardiac function during sepsis. *Crit Care Med.* 2009; 37(4): 1517-8.
163. Asadifar M, Yazdani M, Sadeghpour R, Bruno C, Green J, Nakamoto AT, et al. Combined effects of caffeine and malnutrition on the newborn rat's myocardium. *Food Chem Toxicol.* 2005; 43: 451-56.
164. Brezova V, Sleboğova A, Stasko A. Coffee as a source of antioxidant: An EPR study. *Food Chem.* 2009; 114: 859-868.

165. Adebayo JO, Akinyinka AO, Odewole GA, Okwusidi JI. Effect of caffeine on the risk of coronary heart disease-a re-evaluation. *Indian J Clin Biochem.* 2007; 22(1): 29-32.
166. Davies MJ, Judd JT, Baer DJ, Clevidence BA, Paul DR, Edwards AJ, et al. Black tea consumption reduces total and LDL cholesterol in mildly hypercholesterolemic adults. *J Nutr.* 2003; 133(10): 3298S-3302S.
167. Al Moutaery K, Al Deeb S, Ahmad Khan H, Tariq M. Caffeine impairs short-term neurological outcome after concussive head injury in rats. *Neurosurgery* 2003; 53(3): 704-11.
168. Karas M, Chakrabarti SK. Influence of caffeine on allyl alcohol-induced hepatotoxicity in rats. In vivo study. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2001; 20(2): 141-54.
169. Babu PVA, Sabitha KE, Shyamaladevi CS. Therapeutic effect of green tea extract on oxidative stress in aorta and heart of streptozotocin diabetic rats. *Chem Biol Interactions.* 2006; 162: 114-20.
170. Norri S, Nasir K, Mahboob T. Effects of cocoa powder on oxidant/antioxidant status in liver, heart and kidney tissues of rats. *J Ani and Plant Sci.* 2009; 19(4): 174-78.
171. Mukhopadhyay S, Mondal A, Poddar MK. Chronic administration of caffeine: effect on the activities of hepatic antioxidant enzymes of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. *Indian J Exp Biol* 2003; 41(4): 283-9.
172. Rossowska MJ, Nakamoto T. Effects of chronic caffeine feeding on the activities of oxygen free radical defense enzymes in the growing rat heart and liver. *Experientia* 1994; 50(5): 465-8.
173. Birkner E, Grucka-Mamczar E, Zwirska-Korczala K, Zalejska-Fiolka J, Stawiarska-Pieta B, Kasperczyk S, et al. Influence of sodium fluoride and caffeine on the kidney function and free-radical processes in that organ in adult rats. *Biol Trace Elem Res* 2006; 109(1): 35-48.
174. Abraham SK, Singh SP. Anti-genotoxicity and glutathione S-transferase activity in mice pretreated with caffeinated and decaffeinated coffee. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 733-9.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgisi, tecrübesi, yönlendirici katkılarından faydalandığım ve ilerlemem yolunda yardımlarını esirgemeyen, kendisinden çok şey öğrendiğim tez danışmanım saygıdeğer hocam Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU' na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim boyunca teorik derslerimde değerli bilgi ve birikimlerini paylaşan tüm Tıbbi Biyokimya AD. Öğretim Üyesi Hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve deneyimini aktarmak konusunda çok hoşgörülle ve özverili davranan, emeğinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, tez çalışmamda sonsuz yardımları ve destekleri olan Uzm. Dr. Canan YILMAZ DEMİRTAŞ 'a ve Yard. Doç. Dr. Ebru OFLUOĞLU' na saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim sürem her aşamasında ilgi ve desteklerini hissettiğim, karşılaştığım her sorunda yardım alabileceğim, danışabileceğim ve beni her fırsatta eğitimle ilgili aktivitelerin içine katarak bilinçlenmemi sağlayan Dr. Uğur ERÇİN' e ve acı, tatlı birçok anı paylaştığım Dr. Mustafa Ulaş GÜRAKAN' a ve Dr. Mehmet Zahit ÇIRACI' ya teşekkürümü borç bilirim.

Laboratuvar çalışmaları sırasında desteklerini ve önerilerini esirgemeyen Uzm. Biyo. Duygu ŞAHİN' e ve Uzm. Biyo. Ahmet CUMAOĞLU' na, manevi desteği ile her zaman yanımda olan, tanışmaktan onur duyduğum değerli arkadaşım Uzm. Biyo. Hasan KARAGEÇİLİ' ye canı gönülden teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan sevgili aileme; teşekkür ederim.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı : : Ahmed.
Soyadı : : A. HUSSEİN
Doğum Yeri ve Tarihi : Musul, 03.10.1981

Eğitimi :

2006- : Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Tıbbi Biyokimya
Anabilim Dalı Doktora Eğitimi ANKARA

2005-2006: Gazi Üniversitesi Türkçe Öğrenim Merkezi(TÖMER) ANKARA

2000-2005: Musul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Musul/IRAK

1996-2000: Al-Şarkiya Lisesi Musul/IRAK

1993-1996: Şehit Adnan Hayrullah Ortaokulu Musul/IRAK

1987-1993: Al-Feyha İlkokulu Musul/IRAK

Yabancı Dili: İngilizce



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

GA.195/2007

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/ 49 - 7910
KONU:

Sayın

Prof.Dr.Hatice PAŞAOĞLU
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-07.031 kod numaralı ve “Kafeinin Karaciğer, Böbrek, Kalp, Akciğer Metabolizmasına Etkisi” başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-07.031 and entitled “The effect of caffeine in liver, kidney, heart, lung metabolism” is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.

With my best regards.

Prof.Dr.Gözhan ALPAŞLAN
Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı
Chairman
Gazi University Experimental Animals Ethical Council

Prof.Dr.Engin ÇALGÜNER

Prof.Dr.Nedret KILIÇ

Prof.Dr.Sevil PEHLİVAN

Prof.Dr.Deniz ERDOĞAN

Prof.Dr.Deniz ERBAŞ

Prof.Dr.Fatma AKAR

Prof.Dr.Altan DOĞAN

Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU

Uzman Dr.Şeyda DİKER