

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**KÜLTERE EDİLMİŞ C6 GLİOMA HÜCRELERİNDE
EPİGALLOKATEŞİN GALLAT VE RESVERATROLÜN
BİYOKİMYASAL ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Genetik ve Bio Müh. Pınar SARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2011

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**KÜLTÜRE EDİLMİŞ C6 GLİOMA HÜCRELERİNDE
EPİGALLOKATEŞİN GALLAT VE RESVERATROLÜN
BİYOKİMYASAL ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Genetik ve Bio Müh. Pınar SARI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2011

BEYAN

Bu tez çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezimdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Pınar Sarı

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. ÖZET	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. BEYİN TÜMÖRLERİ	5
4.1.1. Piloitik Astrositoma (Evre 1)	5
4.1.2. Fibriller Astrositoma (Evre 2)	6
4.1.3. Glioblastoma Multiforme ve Anaplastik Astrositoma (Evre 3 ve 4)	6
4.2. ANTİOKSİDANLAR	7
4.2.1. Antioksidanlar ve Serbest Radikaller	9
4.2.1.1. Serbest Radikallerin Hücresel Hasarı	11
4.2.2. Resveratrol	13
4.2.3. Kateşinler.....	17
4.3. SİYALİK ASİT	20
4.4. PROTEİN KARBONİLLERİ	22
4.5. LİPİD PEROKSİDASYON VE MALONDİALDEHİT	25
5. MATERYAL VE YÖNTEM	27
5.1. KULLANILAN GEREÇLER	27
5.2. KULLANILAN KİMYASALLAR VE ÇÖZELTİLER	27
5.2.1. EGCG İçin Kimyasal Data	28
5.2.2. Resveratrol İçin Kimyasal Data	29
5.3. KULLANILAN YÖNTEMLER	29
5.3.1. Glioblastoma Multiforme Hücre Hattı (C6)	29
5.3.2. Hücre Kültürü	29
5.3.3. Siyalik Asit Tayini	30
5.3.3.1. Total SA Tayini	31
5.3.3.2. Lipid SA Tayini	31

5.3.4. Protein Karbonil Tayini	32
5.3.5. Protein Tayini	33
5.3.6. Malondialdehit Tayini	33
5.3.7. İstatistiksel Analiz	34
6. BULGULAR	35
7. TARTIŞMA	51
8. SONUÇ	57
9. TEŞEKKÜR	59
10. KAYNAKLAR	60

SİMGE VE KISALTMALAR

AA	: Anaplastik Astrositoma
AGEs	: İleri glikasyon ürünleri
ALEs	: İleri lipoksidasyon ürünleri
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EGK	: Epigallokateşin
EGKG	: Epigallokateşin gallat
EK	: Epikateşin
EKG	: Epikateşin gallat
GBM	: Glioblastoma Multiforme
GK	: Gallokateşin
GKG	: Gallokateşin gallat
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
HPLC	: Yüksek performans sıvı kromatografisi
K	: Kateşin
KG	: Kateşin gallat
KKH	: Koroner kalp hastalığı
LDL	: Lipoprotein
LPO	: Lipid peroksidasyon
LSA	: Lipid Siyalik Asit
MDA	: Malondialdehit
MAO-A	: Monoaminoksidaz
RCS	: Reaktif karbonil türleri
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RT	: Radyoterapi
SA	: Siyalik asit
SOD	: Süperoksit dismutaz

SOR : Serbest oksijen radikalleri
TBA : Tiyobarbitürük asit
WHO : Dünya Sağlık Örgütü

Araştırma Projesi No : TBG/0542010

1. ÖZET

Çalışmamızda, antioksidan özellikleri bilinen Epigallokateşin Gallat ve Resveratrol'un sıçan C6 glioma hücre soyunda ayrı ayrı ve birlikte kullanılarak biyokimyasal etkileri araştırıldı.

Epigallokateşin gallat 50, 100 µg, resveratrol 25, 50 µg dozlarda ve bunların kombinasyonları 24, 48, 72 saatlik sürelerle kültür ortamında hücrelere uygulandı. Bu uygulamaların sonunda total siyalik asit, lipid bağlı siyalik asit, protein karbonil ve malondialdehit düzeyleri tayin edildi ve sonuçlar Mann-Whitney U testine göre değerlendirildi.

Elde edilen değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; kateşin + resveratrol grubunun 100+50 µg'lık dozunun 72. saatteki total siyalik asit düzeyinin, kontrol grubuna göre düşük ($p<0.05$) olduğu tespit edildi. Kateşin 50 µg grubunun 24. saat lipid bağlı siyalik asit düzeyi, resveratrol 25 µg grubunun 24. saat, yine kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük ($p<0.05$) bulundular. Resveratrol grubunun 50 µg'lık dozlarının 72. saatlik protein karbonil tayini düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük ($p<0.05$) olduğu saptandı. Total siyalik asit, lipid bağlı siyalik asit ve protein karbonil parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı olan doz ve zamanlar, oksidatif strese karşı olumlu cevap alındığını gösterir. Lipid oksidasyonu göstergesi olan malondialdehit düzeyinde anlamlı bir düşüş bulunamadı bu da maddelerimizin uyguladığımız doz ve zaman dilimlerinde oksidatif strese karşı olumlu etkisi olmadığı şeklinde yorumlandı.

Sonuç olarak her biyokimyasal parametrenin en uygun doz ve zamanda C6 glioma hücrelerini etkilediğini ve bu konsantrasyonlarda kullanılabilirliği uygun olduğu sonucuna varıldı. Çalışmamıza farklı biyokimyasal parametreler ve hücresel yöntemler eklenerek devam edilecektir.

Anahtar Kelimeler: Epigallokateşin gallat, Resveratrol, C6 glioma, Total siyalik asit, Lipit bağlı siyalik asit, Protein karbonil, Malondialdehit, Antioksidan.

2. SUMMARY

In our study, the antioxidants epigallocatechin-gallate and resveratrol were investigated separately and together with respect to their biochemical effects on rat C6 glioma cell line.

Epigallocatechin-gallate and resveratrol were treated at cell culture in doses of 50, 100 µg and 25, 50 µg and these doses combination at 24, 48 and 72 hours. At the end of these applications, total sialic acid, lipid bound sialic acid, protein carbonyl, malondialdehyde levels were determined and results were evaluated according to the Mann-Whitney U test.

The obtained values were compared statistically, 100+50 µg dose of catechin plus resveratrol group at 72 hour, total sialic acid level was statistically significantly lower than the control group ($p<0.05$). 50 µg dose of catechin group at 24 hour, lipid bound sialic acid level and 25 µg dose of resveratrol group at 24 hour, lipid bound sialic acid level was statistically significantly lower than the control group ($p<0.05$). 50 µg dose of resveratrol group at 72 hour, protein carbonyl level was statistically significantly lower than the control group ($p<0.05$). A statistically significant doses and times show that a positive result against oxidative stress at total sialic acid, lipid bound sialic acid and protein carbonyl. A significant decrease in the level of malondialdehyde has not found so that dose and time periods at our materials were interpreted as the absence of a positive effect against oxidative stress.

In conclusion, C6 glioma cells are affected by biochemical parameters with optimal dose and time and also these concentrations are suitable for our results. The study will be continued by adding different biochemical and cellular methods.

Key Words: Epigallocatechin-gallate, Resveratrol, C6 glioma, Total sialic acid, Lipid bound sialic acid, Protein carbonyl, Malondialdehyde, Antioxidant.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, içerisinde bulunduğumuz modern çağın en ciddi hastalığı olup, insan ölümlerine yol açan nedenler arasında önemli bir yere sahiptir. Gelişmiş toplumlarda kanserden kaynaklanan ölümler ilk sırada yer alırken gelişmekte olan ülkelerde ise giderek artmaktadır. Günümüzde kanser ile mücadelede çok ciddi çabalar ve miktarlarda bütçeler harcanmaktadır. Buna rağmen kanser, insan sağlığını tehdit eden ilk faktör olma özelliğini korumaktadır (1).

Bütün kanser çalışmalarında olduğu gibi malign beyin tümörlerinin oluşumunun ve gelişmesinin anlaşılmasında ve buna dayalı tedavilerin saptanmasında, in vivo çalışmalarda hayvan tümörleri vazgeçilmez kaynaklardır. Hayvan beyin tümörlerinin, insan beyin tümör modelleri ile olan benzerlikleri, klinikte parametrelerin tanımlanması ve doğru tedavinin uygulanması açısından oldukça yol göstericidir. Primer beyin tümörlerinin %60 kadarını gliomalar oluştururlar (2).

Glioblastoma multiforme (GBM) neoplastik hücrelerin merkezi sinir sistemine infiltrasyonu sonucu nörolojik fonksiyon kaybına ve sonunda da ölüme yol açan bir kanserdir. Glioma hücresi olan, C6 glioma hücreleri yüksek mitotik aktivite, nükleer pleomorfizm, tümör nekroz odakları, tümör içi kanama gibi çeşitli malign glioblastoma karakteristik özelliklerine sahip hücreler olarak GBM'nin in vivo özelliklerinin araştırılmasında günümüze kadar başarı ile kullanılmıştır. Wistar Furth soyu sıçanların N-N' nitrozometilüre uygulanmasıyla oluşturulan C6 glioma tümör hattı ilaç etkileşimi çalışmaları için yaygın olarak kullanılmaktadır (3).

Vücudumuz, kanser ve kalp hastalıkları için savaş verir; kontrol edilmesi gereken önemli düşmanlardan biri de serbest radikallerdir. Serbest radikaller dış orbitallerde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren, kısa ömürlü reaktif atom veya moleküllerdir. Somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine saldıran serbest radikallerin zararlı etkileri antioksidanlar tarafından azaltılır veya tamamen ortadan kaldırılır. Antioksidanlar kanser, kalp hastalıkları ve erken yaşlanmaya neden olabilecek zincir reaksiyonlarını engelleyen moleküllerdir. Bu etkiye sahip moleküllerin bazıları bitki kaynaklı doğal ürünlerdir ve bunlar, antitümör ve antioksidan aktiviteleri içeren çeşitli farmakolojik özelliklerinden dolayı yıllardır ilgiyi üzerinde toplamaktadır (4, 5). Bitki kaynaklarından antikanser ajan aramada en iyi yaklaşımlardan biri; modern bilimin ışığında, etkinliği ve güvenilirliği test

edilmiş bitkilerin seçimidir (3).

Aromatik bitkilerin antioksidan aktivitesi yapılarındaki fenolik bileşiklerle ilişkilidir. Çay ve kırmızı şarap fenolik maddelerce zengin içeceklerdendir. Çay ve kırmızı şarapta bulunan kateşin ve resveratrol antioksidan özellik gösteren flavonid maddelerdir. Fenolik bileşiklerin antioksidan etkisi, serbest radikalleri temizleme, metal iyonlarla bileşik oluşturma (metal şelatlama) ve tekli oksijen oluşumunu engelleme veya azaltma gibi özelliklerinden kaynaklanmaktadır (6). Bu bileşikler, lipidlerin ve diğer biyomoleküllerin (protein, karbonhidrat, nükleik asitler) serbest radikallerce okside olmalarını engellemek için aromatik halkalarındaki hidroksil gruplarında yer alan hidrojeni verebilmektedir. Kateşin ve resveratrol'un düşük dansiteli lipoproteinleri oksidasyondan korumada vitamin E'ye oranla çok daha iyi bir antioksidan oldukları ve lipid peroksidasyon oluşumuna bağlı olarak artan malondialdehit düzeylerini önemli ölçüde engellediklerini gösteren çalışmalar vardır (7).

Aromatik bitkilerin kimyasal bileşimi birçok etmene bağlı olarak farklılık gösterdiğinden, antioksidan etkileri de değişebilmektedir (8). Tüm flavonoidlerin antioksidan etkileri, kimyasal yapılarında bulunan fenolik hidrojenleri ile ilgilidir. Fenolik hidrojenlerin kaybı bunların antioksidan etkilerini azaltır.

Çalışmamızda C6 glioma hücrelerinde birer bitkisel molekül olan resveratrol ve epigallokateşin gallat'ın ve farklı doz kombinasyonlarının, üç farklı zaman diliminde uygulanmasının ne kadar koruyucu etkisi olduğunu araştırmayı amaçladık. Bunu da hücre membranının önemli bileşeni olan siyalik asit, oksidatif stresin protein ve lipid molekülleri üzerindeki etkisini gösteren belirteçlerden protein karbonil ve malondialdehit düzeylerinden elde edilen sonuçlarla gerçekleştirmeyi hedefledik.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. BEYİN TÜMÖRLERİ

Beyin içinde büyüyen tümörler tüm hastalıklar içinde en dramatik prognozu olanlardandır. Beyin tümörleri, nöbet ve baş ağrısı dışında belirgin olmayan kognitif ve kişilik değişikliklerine yol açabilirler (9). Amerika’da her yıl yaklaşık 17.000 beyin tümörü ve sinir sistemi kanseri gözlenmektedir, ayrıca tüm kanserlere bağlı ölümlerin ise %2’si primer beyin tümörlerinden kaynaklanmaktadır (10). Beyin tümörlerinin bugünkü sınıflamasının temelini Virchow atmıştır. Virchow 1860’da beynin hücrelerarası matriksi olarak nörogliaı tarif etmiş, yine tümörlerin makroskobik ve mikroskobik özellikleri arasında bağlantı kurulmasını sağlamış ve “glioma” tarifini de ilk kez yapmıştır. Bailey ve Cushing 1926 yılında gliomaların bir sınıflamasını yaptılar, ancak bu sınıflama karmaşıklığı dolayısı ile geniş bir kabul görmedi. 1993’de WHO (*Dünya Sağlık Örgütü*) tümörlerin sınıflandırmasını yayımladı (11). Bugün için en sık kullanılan sistem ise 2000 yılında yeniden gözden geçirilerek düzenlemeler yapılan 1993’deki WHO sınıflandırmasıdır (11). En temel intra-axial beyin tümörleri olan gliomalar astrositleri, oligodendrogliomaları ve ependimal tümörleri içerir. Medulloblastomalar, diğer seyrek nöroektodermal tümörler ve lenfomalar daha az yaygın olanlardır (10). Tüm bu tümörler beyin dokusunu istila etmeye eğilimlidirler ve hiç biri cerrahi yolla tam olarak çıkarılmaz. Gliomaların en yaygını olan Astrositik tümörler benign’den malign’e doğru IV evrede sınıflandırılmaktadır (11).

4.1.1. Piloitik Astrositoma (Evre I)

Genellikle çocuk ve genç yaştaki erişkinlerde görülen düşük evre glial tümörlerin bir varyantıdır. Çocuklarda çok yaygın olan, son derece düşük dereceli fokal tümörlerdir ve bunlar cerrahi yöntemle tedavi edilebilir. Çocukluk çağı beyin tümörlerinin ise %15’ini teşkil eder. Piloitik astrositomalarda malign dejenerasyon beklenmez ve rekürrens olduğunda histolojik tip her zaman aynıdır.

4.1.2. Fibriller Astrositoma (Evre II)

Evre II tümörler astrositomaların %10-15'ini oluştururlar. Genellikle, ortalama etkilenen hastaların yaşları 35 dolayındadır. Evre II tümörlerin gelişmesinde fazla zamana ihtiyaç duyulur, yıllar ile ölçülebilen bir periyot içinde gelişir ve çoğunlukla histolojik çehre oluştururlar.

4.1.3. Glioblastoma Multiforme ve Anaplastik Astrositoma (AA) (Evre III ve IV)

Glioblastoma Multiforme erişkin yaş grubundaki en çok görülen primer beyin tümörüdür. Primer beyin tümörlerinin dağılımı yaşla ilintilidir. Glioblastoma ve anaplastik astrositoma çok geniş bir şekilde beyin içine sokulmaya eğilimli, hızla yayılan ve beyni yıkıma uğratan dağınık tümörlerdir ve insidansları 14 yaş altında 100.000'de 0.2–0.5 iken, 45 yaş üzerinde ise 100.000'de 4–5'e çıkmaktadır. Aynı şekilde anaplastik astrositomaların yaş ile yerleşim alanları da değişkenlik göstermektedir. Glioblastoma için ortalama yaş 60 dolayında iken, anaplastik astrositomada ortalama yaş 50 dolayındadır. GBM ve AA erkeklerde kadınlara göre, beyaz ırkta da siyah ırka göre bir miktar daha sık görülür. Yapılan çalışmalarda ortaya atılan hipotezlere göre düşük grade astrositomalardan basamak basamak GBM'e ilerleyiş kromozom 10 ve 17'de yerleşim gösteren supresör genlerin kademeli kayıplarından ileri gelmektedir. Bu kayıplar tümör büyümesini ve heterojenitesini artıran dominant onkojenlerin aktivasyonuna yol açmaktadır. GBM ve AA glial hücrelerden kaynaklanan malign astrositik tümörlerdir ve genellikle serebral hemisferlerin derin beyaz maddesinde yerleşirler. Tüm gliomaların tedavisi sık sık cerrahi işlem, radyoterapi (RT) ve kemoterapi gerektirir. GBM ve AA tedavisinde tek başına cerrahi ile semptom kontrolü ve sağkalım mümkün olmamaktadır. Prospektif çalışmalar göstermiştir ki radyoterapi sağkalım üzerine önemli derecede katkı sağlar. Adjuvan kemoterapinin RT ile uygulandığında, yaşam süresi üzerine katkılarını gösteren çalışmalar vardır (12).

C6 glioma hücreleriyle oluşturulan tümörler insan malign gliomaları ile aynı heterojeniteyi ve immünohistokimyasal özellikleri taşımamaktadır. Bu sınırlamalara rağmen C6 glioma beyin tümör modeli GBM'nin büyüme, yayılım, yüksek mitotik aktivite, tümör nekroz odakları, tümör içi kanama ve damarlanması üzerinde yapılan GBM

araştırmalarında yardımcı bir model olarak kullanılmaktadır. C6 glioma tümör hattı metil nitrozüreye ardışık şekilde maruz kalmış Wistar-Furth sıçanlarında oluşan beyin tümörleri kültürlerinden elde edilmektedir (13).

4.2. ANTIOKSİDANLAR

Aerobik canlılarda serbest oksijen radikalleri (*SOR*), normal metabolik olaylar esnasında oluşmaktadır. Serbest radikaller, aşırı miktarlarda üretildikleri zaman bu moleküllere bağlı olarak hasarlar ortaya çıkmaktadır. Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir.

Antioksidanlar çeşitli kriterlere göre sınıflandırılabilirler

1. Yapılarına göre

A) Enzimler

➤ Primer:

- Süperoksit Dismutaz (SOD)
- Katalaz
- Selenyum bağımlı Glutasyon Peroksidaz (GPx)
- Glutasyon-S-Transferaz (GST)
- Glutasyon Redüktaz (GR)

➤ İlişkili olanlar:

- NADPH-Kinon Oksidoredüktaz
- Epoksit Hidrolaz
- UDP-Glukronil Transferaz
- Sulfonil Transferaz
- Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz (G-6-PD)
- Fosfoglukonat Dehidrojenaz

B) Enzim olmayan proteinler, küçük moleküller

- Vitamin C
- Vitamin E
- Vitamin A
- Flavinoidler

- Melatonin
- Ürik Asit
- Albümin
- Haptoglobulin
- Sistein
- Seruloplazmin
- Transferrin ve Laktoferrin
- Ferritin
- Oksipurinol
- Ubikinon
- Bilirubin
- Mannitol
- Lipoik asit
- Hemopeksin

Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayan antioksidanlar ise hücre dışında daha fazla etkilidir.

2. Kaynaklarına göre

- A) Organizmaya ait olanlar (Endojen)
- B) Dışarıdan alınanlar (Eksojen)

3. Çözünürlüklerine göre

- A) Suda çözünenler
- B) Yağda çözünenler

4. Buldukları yere göre

- A) Hücre içinde bulunanlar
- B) Plazma ve vücut sıvılarında bulunanlar

Antioksidanlar, iki farklı yöntem ile serbest radikal hasarını engellerler

1) Serbest radikal oluşumunun önlenmesi

- Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki,
- Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etki,
- Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki.

2) Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi

-Toplayıcı (scavenging) etki: SOR'lerini etkileyerek onları tutma veya çok daha az reaktif başka bir moleküle çevirme (Ör: Enzimler).

-Bastırıcı (quencher) etki: Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.

-Onarıcı (repair) etki: Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesi.

-Zincir kırıcı (chain breaking) etki: Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi. (Ör: Hemoglobin, seruloplazmin, mineraller) (14).

4.2.1. Antioksidanlar ve Serbest Radikaller

Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin aktif yerinde ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluştuğunu biliyoruz. Bazen bu serbest radikal ara ürünler enzimlerin aktif yerinden sızmakta, moleküler oksijenle kazara etkileşerek serbest oksijen radikalleri oluşturmaktadırlar. Oluşan aktif oksijen formları engellenmediğinde DNA, protein, karbonhidrat ve lipitlerde yapısal bozulmalara yol açmaktadır. Dolayısıyla, aktif oksijen formları hücre membranının hem yapısını hem de fonksiyonunu bozarak birçok dejeneratif hastalıklara neden olmaktadır. Ancak bazen hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırıldan daha fazla reaktif oksijen türleri (ROS) oluşabilir. Organizmada hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırıldan daha fazla ROS meydana gelmesi *oksidatif stres* olarak tanımlanır (15).

Hücrede oluşan ROS, "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinen mekanizmalarla ortadan kaldırılırlar. Antioksidan özelliği keşfedilen birçok farklı madde vardır. Bu maddelerin bir kısmını diyetle alırken bir kısmını vücut kendisi, serbest radikallere karşı bir savunma sistemi olarak üretir. Vücudun serbest radikallere karşı savunma olarak ürettiği bazı önemli antioksidanlar, katalaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi enzimlerdir.

İnsan sağlığı bakımından antioksidan fonksiyonları ile ön plana çıkan maddeler vitamin E ve C, karotenoidler ve fenolik maddelerdir. Fenolik maddeler sebze, meyve, tahıl ve baharat gibi bitkisel gıdalarda ve içeceklerde yaygın olarak bulunmaktadır. Çay ve kırmızı şarap bu fenolik maddelerce zengin içeceklerdendir. Flavonoidleri de içeren bu fenolik maddelerin güçlü antioksidan özelliğe sahip olmalarının yanında, serbest

radikalleri temizleme, hidrolitik ve oksidatif enzimleri (sitokrom oksijenaz, fosfolipaz A2, lipoksijenaz) inhibe etme ve iltihap önleyici aktiviteleri de bilinmektedir (15).

Serbest radikaller paylaşılmamış elektron içeren reaktif ve kısa ömürlü moleküllerdir. Bu moleküller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de ilaçların ve diğer zararlı kimyasal maddelerin etkisi ile oluşabilmektedir. Serbest radikallerin oluşum hızı, bunları etkisiz hale getiren veya etkilerini azaltan bazı endojen antioksidan enzimlerden oluşan savunma sistemlerinin hızı ile dengede olduğu süreçte organizma etkilenmez. Ancak bu denge bozulursa serbest radikaller zararlı olmaya başlar ve oksidatif stres olarak etkilerini gösterirler.



Şekil 1: Oksidatif Stres Dengesi (15)

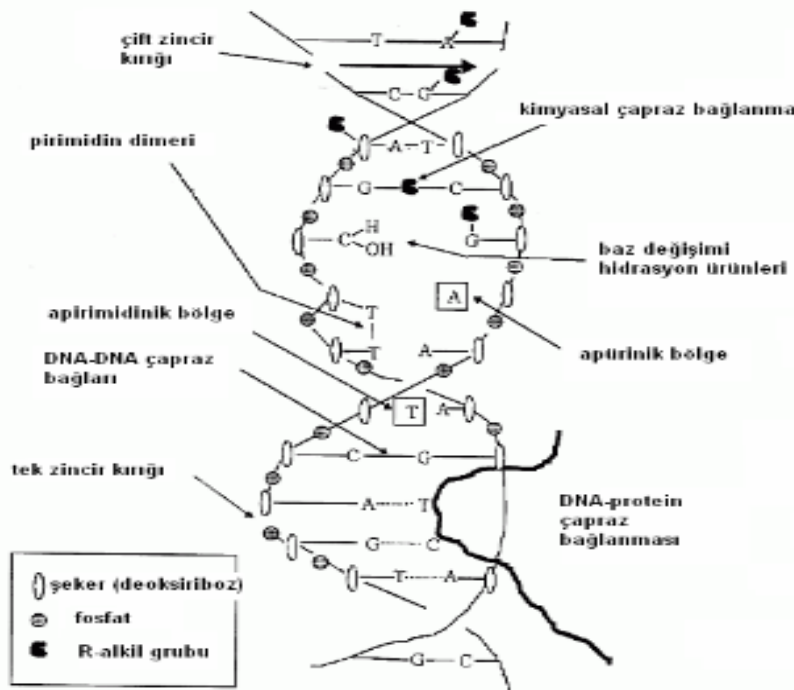
Oksidatif stresin, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarıyla birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Aterogenez, amfizem/bronşit, Parkinson hastalığı, Duchenne tipi musküler distrofi, gebelik preeklampsi, serviks kanseri, alkolik karaciğer hastalığı, hemodiyaliz hastaları, diabetes mellitus, akut renal yetmezlik, yaşlanma, retrolental fibroplazi, serebrovasküler bozukluklar, iskemi/reperfüzyon injürisi gibi durumların patogenezinde oksidatif stresin rolünden söz edilmektedir.

Serbest radikallerin zararlı etkileri bazı maddeler tarafından azaltılır veya tamamen ortadan kaldırılabilir. Bu maddelerden biri de kateşinlerdir. Bitkilerde yaygın olarak bulunan kateşinler, antioksidan özellikleri olan flavanoid ailesinin alt sınıfından, flavan grubuna dahil polifenolik bileşiklerdir. Yapılan bazı çalışmalarda kateşinin lipit peroksidasyon oluşumuna bağlı olarak artan malondialdehit düzeyini önemli ölçüde engellediği gösterilmiştir (8). Antioksidan moleküllerden resveratrol, kateşin ve epikateşin özellikle yeşil çay, üzüm çekirdeği ve kakaoda bulunur.

4.2.1.1. Serbest Radikallerin Hücresel Hasarı

A. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri

Reaktif oksijen radikallerinin aşırı üretimi deoksiribonükleik asit (DNA) molekülünün tüm bileşenleri üzerinde modifikasyonlara neden olur. Hidroksil radikal ($\cdot\text{OH}$), (Şekil 2) hem purin hem de pirimidin bazlarında hasar oluşturur ve deoksiriboz halkasında yarıлма ve zincir kırılmaları meydana gelir. Genetik materyallerin sürekli modifiye edilmesi karsinogenezis, yaşlanma ve mutajenezisin ilk adımı oluşur (16, 17).



Şekil 2: DNA 'da meydana gelen oksidatif hasarlar (16)

B. Proteinler Üzerine Etkileri

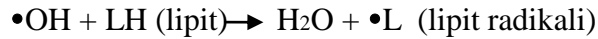
Protein oksidasyonu, proteinlerin hidroksil ve diğer radikallerle kovalent değişikliklere uğraması sonucunda meydana gelir. Pek çok sayıda mekanizmanın protein oksidasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Reaktif oksijen radikalleri protein içi ve proteinler arası çapraz bağlar oluşturarak oksidasyona neden olurlar. Bunlar kısaca; ditirozin oluşumu, sülfidril gruplarının oksidasyonu ile disistein çapraz bağının oluşumu,

radikal aracılığıyla proteinden hidrojenin çıkarılması sonucu oluşan karbon merkezli protein radikallerinin etkileşimi ve okside proteinin karbonil grubuna lizinin amino grubunun eklenmesi şeklinde düşünülmektedir. Geçiş metalleri, hem serbest aminoasitlerin hem de proteindeki aminoasit dizilerinin oksidatif modifikasyonlarını artırarak protein oksidasyonuna neden olur. Peroksinitrit radikali de proteinlerin oksidasyonuna neden olur. Proteinlerin ve enzimlerin oksidasyonunun, yaşlanma, iskemi-reperfüzyon hasarı, Alzheimer hastalığı, Parkinson, ateroskleroz, karaciğer sirozu, kanser ve diğer patolojik durumlarla yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir (17, 18).

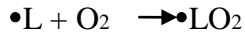
C. Lipitler Üzerine Etkileri

Doymamış çoklu yağ asitlerinin yan zinciri ya da metilen karbonu üzerinden radikal aracılığıyla bir hidrojen atomunun çıkarılması lipit peroksidasyonu, olarak tanımlanmaktadır. Lipit peroksidasyonunun zincirleme reaksiyonu üç aşamada gerçekleşir (18).

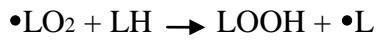
1. Başlangıç aşamasında, hidroksil radikali, doymamış yağ asidinden bir hidrojen çıkararak lipit peroksidasyonu başlatır.



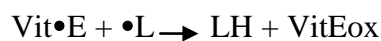
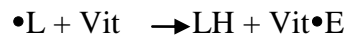
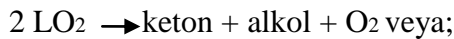
2. İlerleme aşamasında, lipit radikali oksijen molekülüyle hızlıca reaksiyona girerek lipit peroksil radikalini oluşturur.



Oluşan peroksil radikali diğer lipit moleküllerine saldırır ve onların hidrojen atomunu çıkartarak, lipit hidroperoksitleri oluştururken aynı zamanda birbiri ardına ikincil oksidasyonları oksijenle birleşerek reaksiyonu devam ettirecek lipit radikali de oluşur.

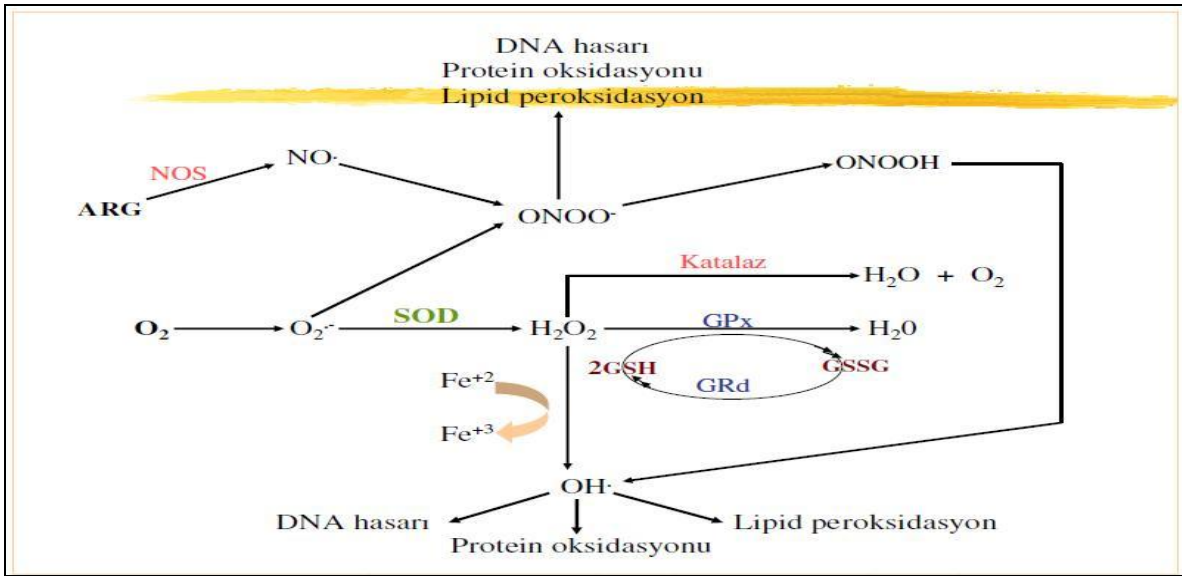


3. Reaksiyon, lipit peroksil radikalinin antioksidanlar tarafından temizlenmesiyle ya da iki lipit peroksil radikalinin kombinasyonu ile keton ve alkol gibi radikal olmayan ürünlere dönüşmesiyle sonlanır.



Lipitler siklooksijenazlar ve lipoksijenazlar tarafından da okside edilir. Son zamanlardaki çalışmalar, lipoksijenazın lipoproteinleri, biyomembranlardaki fosfolipit ve

kolesterol esterlerini spesifik olarak okside edebildiğini göstermiştir. 15-lipoksijenazların, aterojenezin ilk safhasındaki lipit peroksidasyona katkıda bulunduğu da düşünülmektedir. Lipit peroksidasyonu, membran yapısının bozulması ve iyon geçirgenliğinin artmasıyla birlikte membran akışkanlığının kaybında artışa neden olur. Bu olaylar hücrenin ölümüyle sonuçlanır. Hücrede oluşan oksidatif ve nitrozatif hasar, daha sonra doku ve organ sistemlerinde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olarak çeşitli patolojik durumlara yol açar. Bunlar; kardiyovasküler hastalıklar, kanser, nörolojik hastalıklar, diyabet, iskemi-reperfüzyon, yaşlanma, otoimmün hastalıklar, enfeksiyonlar, allerji, oftalmik patolojiler ve solunum yolu hastalıklarıdır (16).

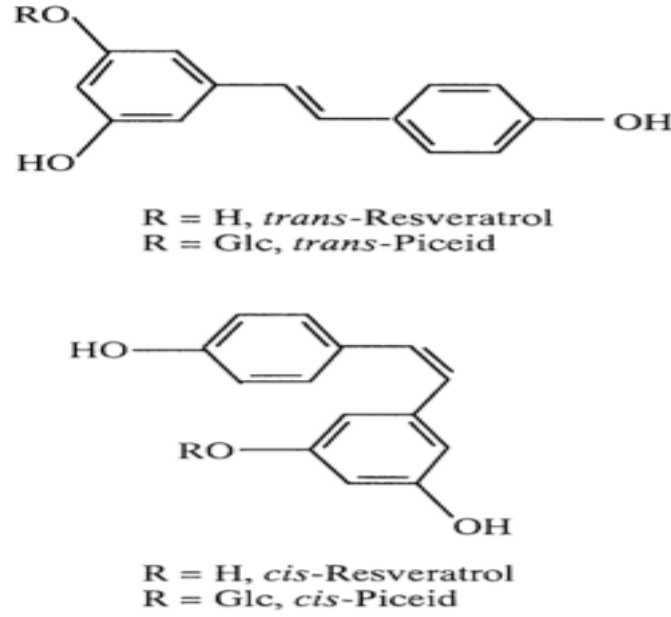


Şekil 3: Serbest radikallerin hücresel kaynakları ve şematik olarak hasarı (18).

4.2.2. Resveratrol

Kapalı formülü C₁₄H₁₂O₃'tür olan resveratrolün molekül ağırlığı 228,25 Dalton'dur. Özellikle siyah üzümün kabuğunda yüksek miktarda bulunan resveratrol. Çayda, kırmızı şarapta, üzümde, "Polygonum cuspidatum" bitkisinin kök ve gövdesinde, yer fıstığında, yaban mersininde ve diğer bazı meyvelerde de bulunur. Biyolojik olarak aktivite gösteren formu trans resveratrol'dür. Trans resveratrolün antiaterosklerotik, antiinflamatuvar etkiler yanında kansere karşı koruyucu olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Resveratrolün trans izomerlerinin yanı sıra cis ve glikozit formu (şekil 4) olan piceid formu da vardır (19, 20, 21, 22).



Şekil 4: Trans, cis-Resveratrol ve piceid Resveratrol (22)

Piceid ve resveratrol birçok bitkide organizmanın strese yanıtının bir parçası olarak bulunur. Resveratrol bitkilerde antifungal aktivitenin düzenlenmesine katkıda bulunur. Üzüm ürünlerinde, piceid ve resveratrol birlikte bulunur fakat glikozillenmiş form olan piceid derişimi daha fazladır. Şaraptaki glikozillenmiş ve aglikan formların dağılımı da, fermentasyon ve kullanılan ekolojik tekniğe göre değişmektedir. Resveratrolün tüm formları kırmızı üzümde, yeşil üzüme oranla daha fazla miktarda bulunmaktadır (21).

Biyolojik olarak pozitif etkileriyle tanınan resveratrolün (3,4,5- trihidroksistilben) vücuttaki taşınma ve dağılım mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Molekülün antikarsinojenik, antiaterosklerotik, antiinflamatuvar ve nöroprotektif etkilerinin moleküler düzeydeki etki mekanizmalarını gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Resveratrolün sıçanların karaciğerindeki lipit sentezini azalttığı, lökositlerdeki eikozanoid sentezini inhibe ettiği, araşidonat metabolizmasını engellediği, trombosit agregasyonunu ve bazı protein kinazların aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca düşük dansiteli lipoproteinler (LDL)'i oksidasyondan korumada vitamin E'ye oranla çok daha iyi bir antioksidan olduğunu gösteren çalışmalar vardır (23, 24, 25).

Son yıllarda diyetin içerdiği antioksidan miktarındaki artışın koroner kalp hastalığı (KKH) riskini azalttığını gösteren epidemiolojik, klinik ve in vitro çalışmalar yapılmıştır. Resveratrol, yüksek oranda doymuş yağ alımıyla ilgili olan KKH azaltan bir maddedir. Resveratrolün, KKH'deki pozitif etkisini trombosit agregasyonunu inhibe ederek ve LDL'yi oksidasyondan koruyarak gerçekleştirdiği gösterilmiştir (21).

Düzenli ve ölçülü bir şekilde özellikle kırmızı şarap içilmesinin, trans-resveratrol içeriğinden dolayı, bu hastalığa yakalanma riskini azalttığı gösterilmiştir (24). Üzüm çekirdeği ve kabuğu, kırmızı şarap yapımı sırasında üzüm suyu içinde mayalandığından ürün şarap haline geldiğinde resveratrol seviyesi ciddi biçimde artmış olur. Resveratrol beyaz şarapta da bulunmasına rağmen, beyaz şarap yapımında çekirdek ve kabuklar çok daha önce ayıklandığından, resveratrol seviyesi çok daha düşük seviyededir. Fransa'nın güneyinde diyetle yüksek oranda doymuş yağ alımı ve sigara alışkanlığı olmasına rağmen KKH'den ölümlerin oranı düşük bulunmaktadır. Fransız Paradoksu adı verilen bu durum ilk tanımlandığında Fransızlarda görülen sağlıklı kalp halinin bol miktarda tüketilen kırmızı şaraba bağlı olduğu düşünülmüştür. Her ne kadar tek nedenin şarap olmadığı anlaşıldıysa da bunun önemli bir faktör olduğu ileri sürülmüştür. Yemeklerde içilen az miktarda (günde 1-2 kadeh) kırmızı şarabın yemeklerle alınan yağların emilimini ve oksidasyonunu azalttığı, kan sulandırıcı ve damar genişletici etki yaptığı gösterilmiştir (21, 24).

İn-vivo ve in-vitro deneylerde, resveratrol izomerlerinin, bazı antidepresan ilaçlar gibi trombositlerde 5-hidroksitriptofan (5-HT) geri alınımını inhibe ettiği gösterilmiştir. Resveratrol izomerlerinin 5-HT geri alınımı üzerine olan etkilerinin incelendiği bir çalışmada, cis resveratrolün 5-HT geri alınımını inhibe etmede trans izomerine göre daha az etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca major depresyon tedavisinde kullanılan monoaminoksidaz-A (MAO-A) inhibitörleri gibi trans resveratrolün de monoaminoksidaza seçici bir inhibisyon etkisi olduğu gösterilmiştir. Resveratrol bu biyokimyasal etkisini in vivoda da gösterirse, doğal bileşenlerin depresyonun tedavisinde kullanılabileceği ileri sürülmektedir (20). Hücre kültür çalışmalarında resveratrolün birçok tümör hücre serisinde apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca düşük derişimlerde resveratrol, antiapoptozisi ve proliferasyonu uyarıcı etkiye sahip olduğu savunulmuştur (26). Serbest radikaller yüksek derişimde bulduklarında yok edici bir etkiye sahipken, düşük

derişimlerdeki radikaller sitokinlerin sinyal mekanizmasını aktive ederek proliferatif yanıt oluştururlar.

Resveratrolün kanseri önleyici özellikleri üzerinde yeterince araştırma yapılmamış olmasına rağmen, ilk araştırmaların sonuçları umut vericidir. Deneysel çalışmalarda kanser oluşumunu engellediği, oluşmuş kanserleri duraklattığı ve tümörün vücudun diğer taraflarına yayılmasını önlediği gösterilmiştir. Antikarsinojen etkisini, bazı enzim sistemlerini ve bağışıklık sistemini uyararak oluşturduğu anlaşılmaktadır (27). Yapılan bir araştırmada, resveratrolün kanserli hücrelerin kendi kendilerini imha etmelerini sağladığı gözlemlenmiştir. Kanserli hücreler parçalara ayrıldıktan sonra, diğer hücreler tarafından temizlenmiştir. Bu etki, meme, deri ve kan kanserleri üzerinde yapılan deneylerde tespit edilmiştir. Diğer bazı araştırmalarda da prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasının durdurulduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca resveratrolün antikarsinojenik etkisini tirozin kinaz aktivitesini inhibe ederek gösterdiği düşünölmektedir (21). Resveratrol trombosit agregasyonunun; agregasyon, kollajene bağlanma, sekresyon ve eikozanoid sentezi gibi farklı aşamalarında etki göstermektedir (25).

Resveratrolün sudaki düşük çözünörlüğü göz önüne alındığında proteine bağlı taşındığı düşünölebilir. Hepatoblastoma hücrelerinde resveratrolün taşınma kinetiği incelenmiştir. Buna göre basit difüzyon ve taşıyıcı aracılı taşınmalar belirlenmiştir. Serum içeren hücre kültüründe resveratrolün pasif taşınmasının, serumsuz kültüre göre iki kat daha yavaş olduğu gösterilmiştir (23).

Sonucda resveratrolün temel biyolojik aktiviteleri aşağdakiler gibi sıralanabilir ;

1. Lipid peroksidasyonunun inhibisyonu (LDL, membranlar)
2. Bakır şelasyonu
3. Serbest radikal süpürücü etki
4. Trombosit agregasyonunun inhibisyonu
5. Anti-inflamatuar aktivite
6. Vazorelaksan aktivite
7. Lipid metabolizmasının düzenlenmesi
8. Anti-kanser aktivite
9. Östrojenik aktivite

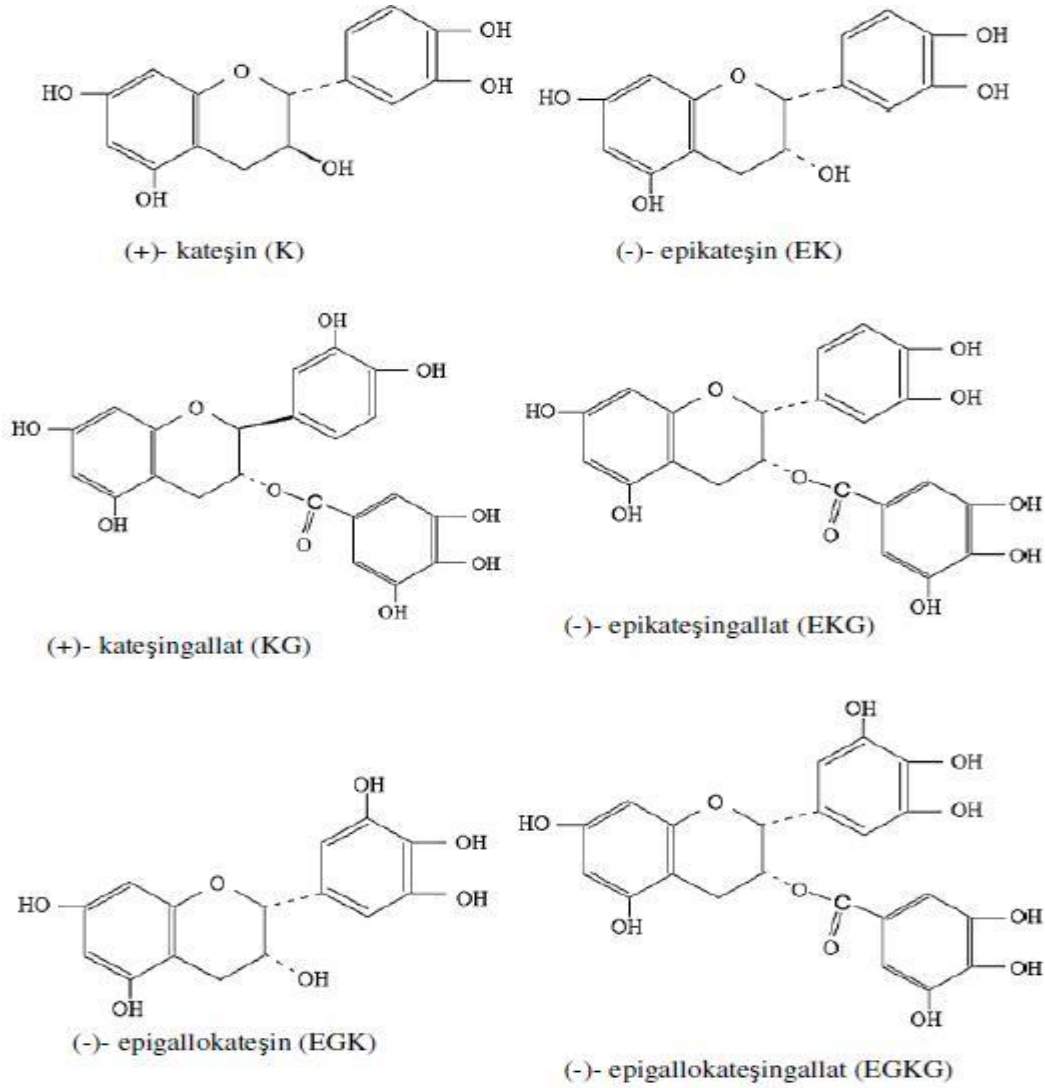
4.2.3. Kateşinler

Kateşinler polifenoller grubundan, şarap, çay, meyve ve çikolatada bulunan flavanollerdir. Polifenolik kateşinler ayrıca meyvelerde ve meyve suyun da bulunmaktadır. Bu grup flavanoller majör olarak kateşin, epikateşin, epigallokateşin alt gruplarını içermektedir. Epigallokateşinin kimyasal yapısı $C_{22}H_{18}O_{11}$ olup moleküler ağırlığı 458,4 Dalton'dur. Kateşinler, doğal antioksidan aktiviteleriyle bilinirler ve bitkilerdeki bu polifenoller vasküler, viral, gastrointestinal ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılırlar (28, 29).

Kateşinler yeşil çay yapraklarındaki ana biyoaktif bileşenleri oluşturur (kuru ağırlığın % 25-35'lik kısmı). Bir bardak yeşil çay 100-200 mg kateşin içerir (30, 31). Siyah çay daha az kateşin içerir, ancak fermentasyon işlemleri sırasında siyah çayın birincil antioksidanı theaflavinler haline gelir. Kateşinlerin sağlığa yararlı birçok etkisi in vitro, in vivo ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir (32). Kırmızı şarap, siyah ve yeşil çay, elma, seftali, çilek, kiraz, fasulye, mercimek ve kakao bilinen kateşinden zengin besinlerdir. Çaydaki kateşin oranları siyah çayda 250 mg/L, yeşil çayda 420 mg/L dir (33).

Flavanoidlerin içerdikleri 2,3 çift bağ nedeniyle 8 stereoisomeri bulunmaktadır (32, 34, 35, 36, 37):

1. (+) kateşin (K),
2. (-) epikateşin (EK),
3. (+) gallokateşin (GK),
4. (-) epigallokateşin (EGK),
5. (+) kateşingallat (KG),
6. (-) epikateşingallat (EKG),
7. (+) gallokateşingallat (GKG),
8. (-) epigallokateşingallat (EGKG).



Şekil 5: Kateşinlerin Kimyasal Yapıları (34).

Bunların en önemlileri kateşin ve epikateşindir. EGKG, çayda en çok bulunan flavanoiddir ve yeşil çay aktivitesinden asıl sorumlu olan bileşendir (33, 34, 38, 39, 40).

Canlı sistemlerde yüksek antioksidan aktivite gösteren (+) kateşin ve (-) epikateşin, sebzelerde bol miktarda bulunan iki flavanoid stereoizomerdir.

Flavanoidlerin antioksidan aktivitelerini fenolik hidrojen atomlarını vermek suretiyle serbest radikalleri yakalayarak yaptıkları bilinmektedir. Ancak antioksidan aktivitenin moleküler etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (36).

Oksidasyon reaksiyonları, yiyeceklerde olduğu gibi canlı organizmalarda da oluşmaktadır. İnsan için oksidasyon, hücelere enerji sağlayan bir süreçtir. Ancak oksidasyon esnasında farklı hastalıklara neden olan serbest radikaller de oluşmaktadır.

Lipitlerin oksidasyonu bir serbest radikal zincir reaksiyonudur ve reaktif radikal ile hidroksitlerin artışına neden olur. Bu radikaller membran fonksiyonunu, LDL'nin oksidasyonunu, trombosit fonksiyonunu etkiler ve DNA'da mutasyonlara da neden olabilirler. Çay kateşinleri antioksidan etkilerini, hidrojen atomundan serbest radikal alıcısı gibi davranarak zincir oksidasyon reaksiyonu keserek gösterirler (34).

Özellikle çayda bulunan kateşinler kimyasal olarak suda çözünebilen, renksiz moleküllerdir (34, 35). Moleküllerin kimyasal farklılıkları heterosiklik oksijen halkasının moleküldeki konformasyonuna dayanmaktadır (Şekil 5). Kateşinler fermentasyon sırasında siyah çayın özel renk, aroma ve tadını veren formuna okside olurlar. Kateşinlerin antioksidan potansiyelleri EGKG>EKG>EGK>EK olarak sıralanmaktadır. Bilgilerin analizi sonrasında ortho konfigürasyona sahip olmanın ve içerdikleri hidroksil grubunun sayısının antioksidanların aktivitesini önemli ölçüde etkilediği hipotezi sürülmüştür (34).

Kateşin, epikateşin ve epikateşin gallat insan sağlığı açısından önemlidir. Flavanoidler kimyasal yapıları nedeniyle fenolikler veya polifenoller olarak kategorize edilirler. Dört binden fazla flavanoid tanımlanmıştır (41), ancak gıdasal olanlar 6 grupta toplanır. Kateşinler de flavanoidlerin flavan-3-ols grubunda bulunmaktadır. Bazı fenolikler antioksidan etkiye sahiptir ve bu etkileri nedeniyle birçok bitkisel ilaç; vasküler, gastrointestinal ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (33, 42). Kateşinler, serbest oksijen türlerinin neden olduğu kardiyovasküler, nörodejeneratif ve kanser gibi hastalıklara antioksidan aktiviteleri üzerinden etki eden moleküller olarak gösterilmektedir (31).

İngiltere'deki günlük flavonoid alımını 100 mg civarındayken, bu oran Hollanda'da çayla alınan miktarın yarısı kadardır. Alman popülasyonu ise kateşin alımının % 20'sini çikolatadan, % 55'ini ise çaydan sağlamaktadır (33).

Bugüne kadar klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda kateşinlerin yiyeceklerdeki oranları, kanser ve vasküler hastalıklardaki koruyucu etkileri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Arts ve ark. 34.492 kişiyle yaptığı, 12 yıl süren, KKH sıklığını inceledikleri çalışmasında, kateşin ve epikateşin alımının KKH ile ters ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Elma ve şarabın ise KKH sıklığını düşürdüğü bulunmuş ancak çay kateşinleri ile KKH arasında ilişki olmadığı bildirilmiştir (43).

Deneysel araştırmalarda günde 50 mg/kg i.p. olarak kateşin uygulanan farelerde hepatik nekroza ve % 67 oranında mortaliteye rastlanmıştır. Aslında çay ekstraktlarının

klirikte kullanımında da bir çok hepatik atağa rastlanmıştır. Ancak, bunların tersine saf yeşil çay ekstresinin in vivo çalışmada hepatoprotektif etkisi gösterilmiştir. Bu sonuçlar da uygulama yolu ve uygulanan metodunun, kateşinlerin etkisinin hepatotoksik veya hepatoprotektif olarak değiştirdiğini göstermektedir (33).

Kateşinlerin yiyeceklerde çokça bulunması (Tablo 1), geniş terapötik potansiyelleri ve ucuz maliyeti birlikte düşünülünce, bu grup polifenoller kanser, vasküler hastalıklar ve obezite gibi birçok hastalığın tedavisi sırasında kullanılmaları cazip hale gelmektedir.

Her bir kateşinin deneysel bulguları klinikte de uygulanmıştır ve etkin dozlarda kullanımının toksik bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (33).

Tablo 1: Yiyeceklerin içerdiği kateşin miktarları (33).

<i>Yiyecek</i>	<i>Kateşin İçeriği</i>
Elma	17 mg/kg K+ 129 mg/kg EK
Çikolata (siyah)	610 mg/kg K+ EK
Çikolata (sütlü)	159 mg/kg K+ EK
Kakao	78 mg/L K+ 132 mg/L EK
zm	1892 mg/kg K+ 988 mg/kg EK+353 mg/kg EKG
Kivi	4,5 mg/kg K+ EK
ilek	10-70 mg/kg K+ 1 mg/kg EK
ay (siyah)	20 mg/L K+ 37 mg/L EK+ 73 mg/L EKG+ 42 mg/L EGK+ 128 mg/L EGKG
ay (yeşil)	21 mg/L K+ 98 mg/L EK+ 90 mg/L EKG+ 411 mg/L EGK+ 444 mg/L EGKG

4.3. SİYALİK ASİT

Dokuz karbonlu bir şeker olan nöraminik asitten (N-acetylneuraminic acid) türeyen siyalik asit (SA) glikoproteinlerin ve glikolipidlerin oligasakkarit zincirlerinin terminal şeker komponentini oluşturur, doğada yaygın olarak memelilerde bulunmakla birlikte, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis* gibi patojen bakterilerde ve virüslerde de bulunur. Molekülün fizyolojik pH'da negatif yük taşıması, hücrenin patojenler tarafından tanınmasında, hücreler arası etkileşimlerde, hormon reseptör ilişkilerinde ve membranın

proteolizden korunmasında önemli rol oynamasını sağlar. SA bu nedenle hücre bütünlüğü, hayatiyeti ve fonksiyonları ile ilişkili bir membran komponentidir (40, 43).

Organizmada beyin çoğu gangliozitlerde olmak üzere en büyük oranda SA içeren organdır. Polisialik asid nöronal tomurcuklanma ve plastisiteyi sağlar. Hasardan sonra nöral sproutingin inhibisyonunda ve miyelin stabilitesin de kritik rol oynar (44). Siyalidaz verilmesi Siglec-4 gangliozid ligant'ı yıkarak spinal akson büyümesini artırır.

SA'lerin farmakolojik olarak bazı özellikleri vardır. SA'ler glikoproteinlerin yarı ömürleri için kritik faktördür, SA kaybedildiğinde altındaki galaktoz karaciğer ve diğer organlarda reseptörler tarafından tanınır ve hızla temizlenir (45). Bu mekanizmanın glikoproteinlerin intrinsik yarı ömürlerini düzenleyip düzenlemedikleri henüz tam açık değildir, birçok biyoterapötik ürün (antikorlar, sitokinler, hormonlar) de glikoprotein olduğundan konu pratikte önemlidir (46). Terapötik glikoproteinler üzerindeki SA düzeyi kültüre ve üretime bağlıdır, az ise (uncapping) kolaylıkla temizlenir. Farmakoloji açısından SA'ler ile ilgili diğer bir önemli nokta insanlarda bulunmayan Neu5Gc ile kontaminasyondur (47, 48). Sağlıklı insanlarda Neu5Gc'e karşı az miktarda antikor vardır. Kontamine olmuş kişiler, anti-Neu5Gc antikorları oluşturacaklardır, patolojik durumda da ayırt edilemeyecektir. Bu durumda insanlarda bulunmayan potansiyel immunojenik maddelerin injeksiyonundan kaçınılması gerekliliği ortaya çıkar.

Bazı neoplastik değişikliklerde total ve lipide bağlı SA seviyelerinin doku ve serum seviyelerinde farklılıklar olduğu değişiklik klinik ve laboratuvar çalışmalarında gözlenmiştir (49). Katopodis ve Stock'un tanımladığı metoda göre yapılan çalışmalarda meme kanserlerinde % 50-100, akciğer kanserlerinde % 70-92 ve kolorektal kanserlerde % 44-93 sensitivite belirtilmiştir (50, 51, 52). Melanoma, sarkoma ve Hodgkin hastalığı için de % 90-97 gibi yüksek sensitivite düzeyleri saptanmıştır (49, 50, 51). Kanser hastalığının evresi ve özellikle metastatik kanser hastalığı ile serum SA seviyeleri ileri derecede korelasyon göstermektedir (53). İnsan tiroit kanseri ve kolorektal kanserinde yükselen SA seviyeleri tedaviden sonra normal seviyelerine inmektedir. Bu nedenle SA seviyesinin tedaviye cevabın izlenmesinde iyi bir parametre olduğu öne sürülmektedir (54, 55). İleri evrelerde baş-boyun kanserli hastalarda hastalığının ilerlemesi ya da tedaviye yanıtı ile serum proteine bağlı SA değişiklikleri arasındanda belirgin bir korelasyon vardır (56).

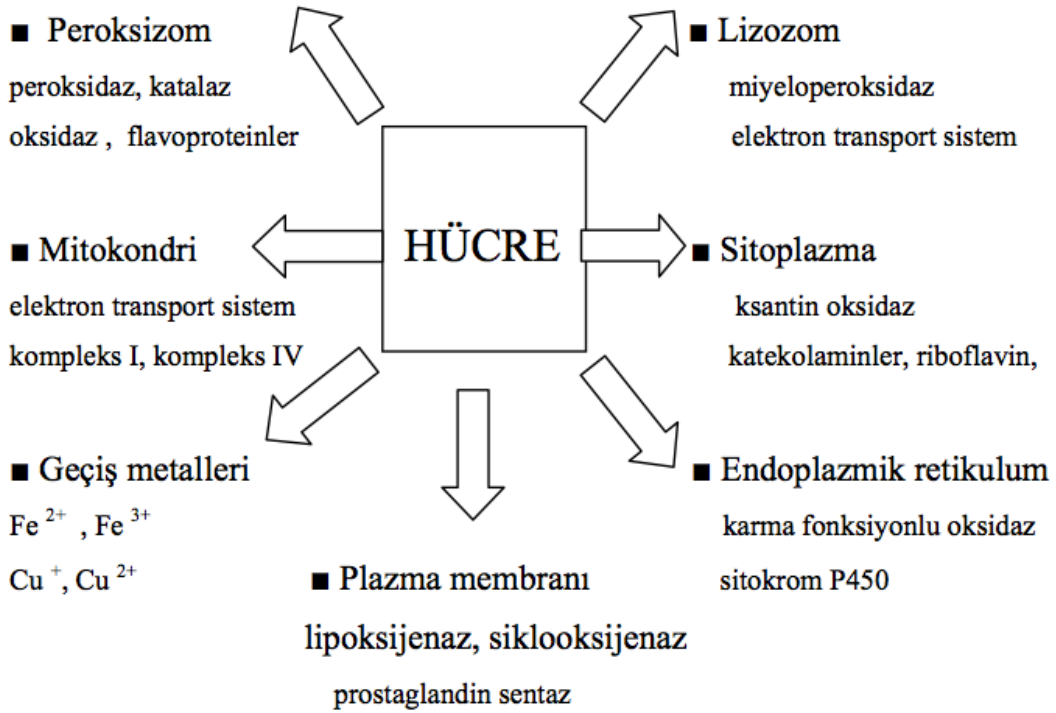
4.4. PROTEİN KARBONİLLERİ

Oksidatif stresin proteinlerde neden olduğu oksidasyon sonrası peroksit ve protein karbonilleri meydana gelir. Proteinlerde serbest radikal hasarından etkilenme dereceleri amino asit içerikleri ile ilişkilidir. Doymamış bağlar ve –SH içeren moleküller ile triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi amino asitleri ihtiva eden proteinler serbest radikallerden daha kolay etkilenirler. İmmünoglobulinler gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerde oksidasyon sonucu kükürt merkezli radikaller meydana gelir ve proteinin üç boyutlu yapısı bozularak normal foksiyonunu yerine getiremez. Polipeptit yapısında yer alan bazı amino asitlerin α -karbon atomlarından, reaktif oksijen molekülleri, özellikle de hidroksil radikali etkisiyle hidrojen atomunun koparılması sonucu karbon merkezli radikaller oluşur.

İlerleyen reaksiyonlarda şu yapısal değişiklikler meydana gelir :

- Aromatik amino asitlerin nitratlaşması
- Tiyol grubunun oksidasyonu
- Karbonil türevlerine dönüşüm
- Proteinlerde ikincil ve üçüncül yapının bozulması, proteolize yatkınlık, agregasyon ve fonksiyonlarda azalma

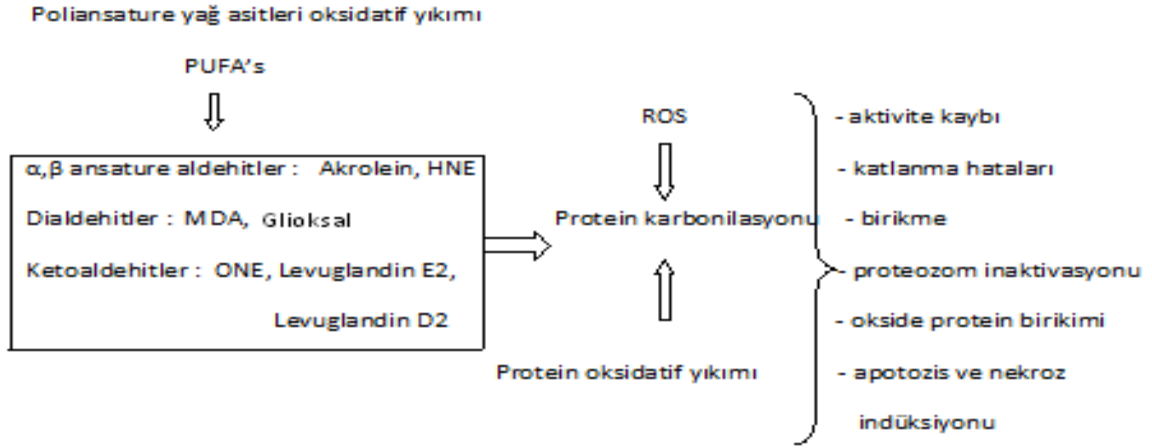
Protein oksidasyonu, proteinlerin, reaktif oksijen radikalleri, reaktif oksijen türleri, azot türevleri veya oksidatif stres ürünleriyle indüklenmesiyle meydana gelen kovalent bir modifikasyondur (57). ROS'un ve reaktif nitrojen türleri (RNS)'nin, yaşlanma, oksidatif stres ve bazı patolojik koşullar altında fizyolojik ve non-fizyolojik etkilerle meydana geldiği ve biyolojik moleküllerin modifikasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (58). Akut hücre stresine bağlı oluşan ROS üretimi apoptoz veya nekroz yoluyla hücre ölümü ile sonuçlanabilir (59).



Şekil 6: Hücrede ROS Kaynakları

Hücre hasarı ROS oluşturan ve yakalayan sistem arasındaki dengeye bağlıdır. Oksidatif stresin primer hedefi hücre tipine, oksidasyon ürünlerinin mutlak düzeyine ve süresine, üretilen ROS türüne, üretildiği bölgeye (hücre içi veya dışı), oksidanın spesifik hücresel substrata yakınlığına bağlıdır. Belirli bir hedefe olan zararın boyutu da birçok faktöre bağlıdır. Proteinler ROS için majör, ROS yan ürünleri için ise ikincil hücre hedefidir. ROS'in indüklediği protein modifikasyonları protein yapısındaki değişiklikleri gösterir, bazıları da zararsızdır. Örneğin S-glutatyonylasyon, S-nitrozilasyon ve metiyonin sulfoksidasyon değişimleri geri dönüşlüdür ve geri dönüşümsüz olan oksidasyonlardan korunmada ve redoks regülasyonda çift role sahiptir (60, 61). Oksidatif protein değişiklikleri biyolojisi karmaşıktır ve iyi anlaşılammış olmasına rağmen protein karbonilasyonu oldukça iyi bilinmektedir.

Protein karbonilasyonu irreversible ve non-enzimatik bir işlemdir, sonuçta karbonil grupları oluşur (62, 63).



Şekil 7: Karbonil Gruplarının Proteinlere Giriş Yolları (64).

Karbonil grupları proteinlere çeşitli oksidatif yollardan girer (Şekil 7). ROS ya doğrudan protein ile reaksiyon verir veya şeker ve lipitler gibi moleküllerle reaksiyona girerek daha sonra proteinlerle reaksiyon veren reaktif karbonil türleri (RCS) oluşturur. ROS ile direkt reaksiyonda ya metal katalizli oksidasyonla yan dallarda yer alan lizin, arjinin, prolin ve treoninin oksidasyonu ile ya da α -amidasyon veya glutamil kalıntılarının oksidasyonu ile peptid bağlarının kırılması sonucunda reaktif karbonil ürünleri oluşur. Arjinin ve prolinin oksidasyon ürünü glutamik semialdehid ve lizinin oksidasyon ürünü aminoadipik semialdehid, Thr'den 2-amino-3-ketobütirik asid metal katalizli protein oksidasyonun başlıca karbonil ürünleridir. Bu reaksiyon biyolojik örneklerde protein karbonilasyonuna götüren majör yoldur (59, 64). Sekonder yolda reaktif karbonil grupları, reaktif karbonil türleri (ketoaminler, ketoaldehitler, deoksosonlar) ile lizinin primer amino grubu arasındaki reaksiyonla oluşur (64, 65).

Lipid ve karbohidratlardan gelen RCS ile protein karbonilasyonu ilk kez Miyata tarafından "karbonil stres" olarak adlandırılmıştır (66). Reaktif karbonil türleri indirgen şekerlerin veya onların oksidasyon ürünlerinin proteinlerin lizin kalıntıları ile reaksiyonunda (glikasyon/glikoksidasyon reaksiyonları) oluşur. İleri glikasyon ürünleri ortaya çıkar (AGEs). Diğer protein karbonilasyonu yolu poliansature yağ asitlerinin metal katalizli oksidasyon ürünü olan karbonil içeren okside lipitlerin proteinler içine girmesidir. Malondialdehid lizin kalıntısı ile reaksiyona girer, α,β -ansature aldehidler (4-hidroksi-2-nonenal, HNE, akrolein) oluşur. Reaksiyon C=C çift bağı ile sisteinin SH grubu, lizinin ϵ -amino grubu veya histidinin imidazol grubu arasında oluşur, sonuçta ileri lipoksidasyon

ürünleri (ALEs) meydana gelir. Protein karbonilasyonu ROS tarafından oluşturulan hücrel hasarı gösteren belirteçtir (64, 65, 67).

4.5. LİPİD PEROKSİDASYON VE MALONDİALDEHİT

Oksidatif stres ve serbest radikaller özellikle lipitlerde hasara neden olur. Yağ asitlerinin oksidasyonu radikal tarafından yağ asitlerinin metilen gruplarından bir hidrojen atomunun koparılması ile başlar. Karbon merkezli radikal oluşması ve daha sonra moleküler oksijenin bağlanması ile lipid hidroperoksitleri meydana gelir. Lipid hidroperoksitleri, lipid peroksidasyonunun (LPO) erken aşamasını oluşturur. Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile biyoaktif aldehitler oluşur. Bunlardan başlıcaları malondialdehit (MDA) ve hidroksialkenaller (örn. 4-OH-nonenal)'dir.

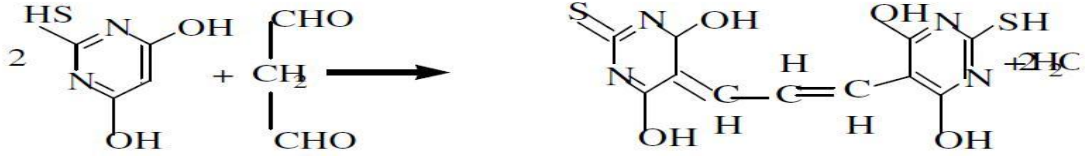
Lipid peroksidasyon serbest radikaller tarafından indüklenen en önemli oksidasyon reaksiyonudur. LPO, membran lipitlerinin oksidatif hasarla bozulması olayıdır. LPO, serbest radikaller tarafından başlatılır ve membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olur (68).

Malondialdehit ölçümü lipid peroksidasyonunun derecesinin belirlenmesi için en sık başvurulan testtir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği sebebiyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (69).

MDA ölçümü en yaygın olarak tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemiyle yapılır. Bazı deneysel sistemlerde TBA yönteminin esas olarak MDA'nın kendisini ölçtüğü gösterilmiştir. Ancak çoğu sistemde bu test MDA için spesifik olmadığından tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddelerin (TBARS) ölçümü şeklinde ifade edilir. Saf lipidlerle yapılan çalışmalar ve hayvanlar üzerinde yapılan denemeler, TBARS ölçümü ile lipid peroksidasyonunu ölçen diğer metotlar arasında iyi bir korelasyon olduğunu göstermiştir.

TBARS ölçümü çok basit ve hızlı olmakla birlikte biyolojik materyallere uygulanmasında çeşitli problemler vardır. Numunede mevcut ya da reaksiyon sırasında açığa çıkan pigmentler kolorimetrik ölçümü interfere edebilirler. Ayrıca MDA dışındaki

aldehitler de tiyobarbitürük asitle renkli kompleks oluşturmak üzere reaksiyona girebilirler. MDA iki molekül TBA ile reaksiyona girerek UV spektrofotometrede 535 nm'de pembe renkli bir kompleks oluşturur (şekil 8).



Şekil 8: MDA ile Tiyobarbitürük Asitin Reaksiyonu (69).

Serbest MDA'nın direkt tayini en güvenilir şekilde yüksek performans likit kromatografisi (HPLC) yöntemiyle yapılır. HPLC çok hassas ve hızlı bir metottur ve az numune gerektirir. Fakat teknik çok dikkatli numune hazırlığı gerektirir.

5. MATERİYAL VE YÖNTEM

5.1. KULLANILAN GEREÇLER

- 1) Derin Dondurucu (-30°C) Sanyo
- 2) Derin Dondurucu (-80°C) Rua Instruments
- 3) Soğutmalı Santrifüj Hettich UNV 320 R
- 4) Soğutmalı Santrifüj Hettich MICRO 200 R
- 5) Çalkalamalı Su Banyosu Memmert WNB 14 L 4
- 6) Spektrofotometre Hitachi U- 1900
- 7) Distile su cihazı Kottermann
- 8) Etüv Heraeus
- 9) Hassas terazi Shimadzu
- 10) Otomatik pipetler Gilson , Socorex
- 11) El tipi Seri Pipetör Ependorf Multipette Plus
- 12) PH metre CG840 Schott
- 13) Vortex Elektro-mag
- 14) Sonikasyon EVA

5.2. KULLANILAN KİMYASALLAR VE ÇÖZELTİLER

- 1) NaCl, Atabay AT091-950
- 2) Na₂HPO₄, Riedel-de Häen 81890
- 3) Dulbeccos modified eagle medium (DMEM), Sigma D5546
- 4) Nutrient mixture F-12, Sigma N6658
- 5) L-Glutamin, Biological Industries 03-020-IC
- 6) Penisilin+Streptomisin, Biological Industries 03-031-1C
- 7) Fetal Sığır Serumı, Seromed S0115
- 8) Metanol, Riedel-DC-Haen 24229
- 9) Tripsin EDTA, Biological Industries 243338

- 10) Dimetil sulfoksid (DMSO), Sigma D 2650
- 11) Epigallocatechin gallate, %95, 50 mg, Sigma aldrich E4143
- 12) Resveratrol Sigma Rv 5010-100 mg
- 13) Periyodik asid Sigma 375810
- 14) Sulfat asidi (H₂SO₄) Azür Kimya
- 15) Sodyum arsenit Sigma S 7400
- 16) Hidroklorik asid (HCl) Carlo Erba Reagenti 302626
- 17) Tiyobarbitürük asid (TBA) Sigma T 5500
- 18) Sodyum hidroksid (NaOH) Merck 323 C 401782
- 19) 2.4 dinitrofenilhidrazin (DNPH) Merck 37551
- 20) Triklor asetik asid (TCA) Merck 927 K 11542010
- 21) Etanol Sasma B.V.
- 22) Etilasetat Proses
- 23) Guanidin hidroklorür Sigma G4505
- 24) Bakır II sulfat (CuSO₄. 5H₂O) Merck 844 A339787
- 25) Potasyum sodium tartrat Merck 9628817
- 26) Asetik asid Merck 5237402
- 27) N-asetil nöraminik asit Sigma A0812
- 28) Albumin Bovin (Standart) Sigma A-7638

5.2.1. EGCG İçin Kimyasal Data

Sinonim: (2R, 3R)-2-(3,4,5-Trihydroxy-phenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol
3-(3,4,5-trihydroxybenzoate),(-)-Epigallocatechin gallate,
(-)-Epigallocatechin gallate 3-O-gallate

Moleküler Formül: C₂₂H₁₈O₁₁

Moleküler Ağırlık: 458,4 g/mol

Katalog No (CAS Registry Number): 989-51-5 (64).Sigma

5.2.2. Resveratrol İçin Kimyasal Data

Moleküler Formül: C₁₄H₁₂O₃

Moleküler Ağırlık: 228,24 g/mol

Katalog No (CAS Registry Number): 03845202 Sigma

5.3. KULLANILAN YÖNTEMLER

5.3.1. Glioblastoma Multiforme Hücre Hattı (C6)

İstanbul Bilim Üniversitesi Hücre Kültürü Laboratuvarında ve İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında deneylerimizde, Resveratrol ve EGCG'nin zamana ve doza bağlı etkisini ölçmek için kullandığımız CCL-107 kodlu C6 hücre soyunu, Amerikan Hayvan Hücre Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, Maryland, USA) hücre bankasından temin ettik. Sıçan kökenli olan C6 glioma hücreleri radyo dalgalarına duyarlı olup, 200 cGY radyasyon dozunda ve 24 saatte etkilenirler (13).

5.3.2. Hücre Kültürü

Hücre kültür deneyleri İstanbul Bilim Üniversitesi Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirildi. C6 glioblastoma multiforme hücreleri flask içinde, ısı ile inaktive edilmiş %10 fetal sığır serumu (FBS) ve antibiyotikler (100 unite/ml penisilin G, 100 µg/ml streptomisin) içeren Dulbecco's modified Eagle's medium (F12 medium) içinde 37 °C'de %5 CO₂ ve %95 hava içeren nemli inkübatörde büyütüldü. Hücreler dishlere ekildikten sonra gece boyunca 37°C'lik %5 CO₂'li inkübatörde bekletildi. Resveratrol 1:1 oranında DMSO ve distile su içinde hazırlandı. EGCG distile su içerisinde hazırlandı. Resveratrol ve EGCG'nin etkilerini belirlemek için oluşturulan deney grupları şu şekildedir ;

- 1) EGCG'nin etkilerini belirlemek için oluşturulan deney grubuna medyum içerisine 50 µg /ml ve 100 µg /ml konsantrasyonlarında EGCG eklendi.
- 2) Resveratrol'un etkilerini belirlemek için oluşturulan deney grubuna 25 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında resveratrol eklendi.

- 3) Resveratrol ve EGCG'nin etkilerinin birlikte inceleneceği alt deney grupları ise;
- 50 µg/ml EGCG ve 25 µg/ml resveratrol,
 - 50 µg/ml EGCG ve 50 µg/ml resveratrol,
 - 100 µg/ml EGCG ve 25 µg/ml resveratrol,
 - 100 µg/ml EGCG ve 50 µg/ml resveratrol birlikte uygulandı.

Tüm çalışma gruplarında 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrasında hücreler tripsinle kaldırıldı ve süspansiyon etkisi olan DMEM koyularak santrifüj sonucu deney sonlandırıldı.

5.3.3. Siyalik Asit Tayini

Biyokimyasal tayinler, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Hücreler sonikasyon yöntemiyle fiziksel olarak parçalandı. Siyalik asit tayini için Aminoff'un tiyobarbitürik asid metodu ile Skoza ve Mohos'un dimetil sulfoksid metodunun birlikte modifiye edildiği Tram metodu kullanıldı (70, 71, 72), siyalik asit için (LSA) Katapodis metodu kullanıldı (73).

Hücreler önce 0.1 N H₂SO₄'de 80°C'de 1 saat hidroliz edilerek bağlı SA serbestleştirildi. Dokuz karbonlu serbest siyalik asit kuvvetli asidik ortamda Na-periyodat ile 6 karbonlu aldehid, daha sonra aldol C₄-C₅ bağı kırılmasıyla kromojen β-formil pirüvik asid oluşturur. Bu madde tiyobarbitürik asit ile pembe renkli bileşik verir. Renkli bileşiğin absorbanansı 549 nm'de ölçülür.

Çözeltiler:

Periyodat çözeltisi: 25 mM, 0.125 N sulfat asidi içerisinde

Sodyum arsenit çözeltisi : %2, 0.22 M HCl içerisinde

Tiyobarbitürik asit çözeltisi : 0.1 M, pH=9.0

DMSO

SA standartı: 1 mg/dL

5.3.3.1. Total SA Tayini:

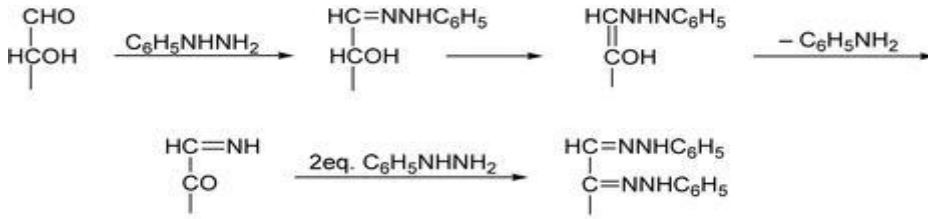
- 1) Hücre kültüründen 16 µL hücre ve 128 µL 0.1 N H₂SO₄ ile birlikte 80°C su banyosunda 1 saat hidroliz edildi.
- 2) Test ve standart tüplerine sırası ile 140 µL hidrolizat ve SA standardı koyuldu.
- 3) Tüm örnekler 70 µL periyodat çözeltisi koyuldu.
- 4) 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 5) Reaksiyon 70 µL sodyum arsenit çözeltisi ilavesi ile durduruldu.
- 6) Tüplere 140 µL tiyobarbitürik asit çözeltisi eklendi.
- 7) 7.5 dakika kaynayan su banyosunda tutuldu.
- 8) Tüpler soğutulduktan sonra 560 µL dimetilsulfoksit eklendi.
- 9) Renkli çözeltinin absorbanansı 549 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü.

5.3.3.2. Lipit Bağlı SA Tayini :

- 1) Hücre kültüründen 20 µL hücre ve 3 ml kloroform / metanol (2/1) ile birlikte 4 °C de ekstrakte edildi ve karışıma 30 saniye vortex uygulandı.
- 2) 0,5 ml soğuk su katıldı ve 30 saniye karıştırıldıktan sonra 2500 rpm` de 5 dakika santrifüj edildi.
- 3) Üst fazdan 1 ml alındı ve 50 µL fosfotungstik asit (1g/ml) ile çöktürüldü.
- 4) Oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edildi.
- 5) Çökelti 0.1 N H₂SO₄ ile birlikte 80 °C su banyosunda 1 saat hidroliz edildi.
- 6) Hidrolizattan 140 µL alınarak siyalik asit tayini yapımına başlandı.
- 7) Örneklere 70 µL periyodat çözeltisi koyuldu, 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 8) Reaksiyon 70 µL sodyum arsenit çözeltisi ilavesi ile durduruldu.
- 9) Tüplere 140 µL tiyobarbitürik asit çözeltisi eklendi, 7.5 dakika kaynayan su banyosunda tutuldu.
- 10) Tüpler soğutulduktan sonra 560 µL dimetilsulfoksit eklendi.
- 11) Renkli çözeltinin absorbanansı 549 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü.

5.3.4. Protein Karbonil Tayini

Protein karbonilasyonu Levin'in 2,4-dinitrofenil hidrazin (DNPH) metodu ile tayin edildi (74). Keto veya aldehid grupları 1 molekül fenil hidrazin ile reaksiyon verir. Molekül yeniden düzenlenerek keto grubu oluşur ve ikinci fenilhidrazin moleküle girer. Sarı-portakal renkli yeni ürün spektrofotometrik olarak tayin edilir.



Şekil 9: Fenilhidrazin reaksiyonu

Çözeltiler:

DNPH çözeltisi: 10 mM, 2M HCl içerisinde

Triklor asetik asid (TCA): %20

Etanol/etilasetat: 1/1, v/v

Guanidin-HCl: 6 M

- 1) 0.1 mL hücre, 0.5 mL DNPH çözeltisi ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi ve bu süre içerisinde 15 dakika aralıklarla vortex yapıldı.
- 2) İnkübasyon sonrası proteinler 0,5 ml TCA ile çöktürüldü
- 3) 15 dakika soğukta bekletildi.
- 4) 11.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 5) Çökelti 3 kez 1 mL etanol/etilasetat ile yıkandı.
- 6) 1 mL 6 M guanidin hidroklorürde çözüldü ve 37 °C de 10 dakika bekletildi .
- 7) 2 M HCl blank olarak kullanıldı ve 360 nm'de absorbans okundu.
- 8) Ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon=22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplar yapıldı.

5.3.5. Protein Tayini

Total protein tayini Lowry metodu ile gerçekleştirildi (75). Proteinlerin yapısındaki aromatik halka ihtiva eden amino asitler Folin reaktifi (fosfomolibdo tungustik asid) ile mavi renk verirler. Bu reaksiyon aminoasitlerin fosfomolibdo tungustik asidi indirgemeleri esasına dayanır.

Çözeltiler:

Alkali tartarat çözeltisi: 5 g sodyum potasyum tartarat, 0.1 N NaOH içerisinde.

Bakır stok: %0.1'lik $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi suda hazırlanır.

Folin-Ciocalteu çözeltisi: 1500 ml'lik Florence balonuna 100 g Na-tungstat, 25 g Na-molibdat, 700 ml bidestile su, 50 ml %85'lik fosfat aside ve 100 ml derişik HCl konuldu. Geri soğutucu altında 10 saat kaynatıldı. 150 g LiSO_4 , 50 ml bidestile su ve birkaç damla brom ilave edildi. Bromun fazlasını uzaklaştırmak için 15 dakika kaynatıldı, soğutuldu ve bidestile su ile son hacim 1 litreye tamamlandı. Deneylerde 1:2 oranında bidestile ile seyreltilerek kullanıldı.

Protein standardı: %100 mg'luk BSA standart çözelti.

- 1) Örnek, standart ve blank tüplerine sırası ile 5 μL hücre + 45 μL dH_2O , 50 μL protein standartı, 50 μL dH_2O konuldu.
- 2) 2.5 mL alkali tartarat çözeltisi eklendi.
- 3) 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- 4) $\frac{1}{2}$ dilue 250 μL folin konup hızlıca karıştırıldı.
- 5) 30 dakika inkübasyon dan sonra absorbanslar 750 nm'de okundu.
- 6) Sonuçlar; mg protein = (örnek O.D/ standart O.D) X 0.1 formülünden hesaplandı.

5.3.6. Malondialdehit Tayini

- 1) Hücre kültüründen 100 μL hücre, 750 μL %0.75 TBA, 500 μL %30 TCA ve 50 μL 5M HCl karıştırılarak kaynayan su banyosunda 15 dakika bekletildi ve renk değişimi gözlemlendi.
- 2) 11.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 3) Çözeltinin absorbansı 535 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü.
- 4) Ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon=156.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplar yapıldı.

5.3.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için NCSS 2007&PASS 2008 Statistical Software (Utah, USA) programı kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin iki grup arası karşılaştırmalarında Mann Whitney U test kullanıldı, $p < 0.05$ istatistik olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

Çalışmamızda, C6 glioma hücre kültüründen oluşturulan gruplarda (n=3), Resveratrol (R) ve EGCG (E) 'nin farklı dozlarının, üç farklı zaman diliminde, total SA, lipid bağlı SA, protein karbonil ve MDA düzeyleri araştırılarak çalışma sonucunda elde edilen bulgular aşağıda sırayla belirtildi.

C6 glioma hücrelerine ait total siyalik asid düzeyleri (mg SA/g protein) ile ilgili sonuçlar ve istatistiksel veriler Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2: Total Siyalik Asit (mg SA/g protein) Değerlendirilmesi

Gruplar	Doz (µg)	Total Siyalik Asit (mg SA/g protein)		
		24. saat	48. saat	72. saat
		Ort±SS (Medyan)	Ort±SS (Medyan)	Ort±SS (Medyan)
Kontrol	0	13,00±5,38	9,53±1,09	17,50±9,18
E	50	13,87±4,70	10,97±1,10	10,13±2,48
	100	22,03±7,39	14,23±7,14	13,73±3,98
R	25	14,17±6,86	12,90±6,95	16,87±6,12
	50	15,83±7,19	18,53±8,76	11,90±1,56
E+R	50+25	12,73±5,50	19,56±6,46	14,76±2,54
	50+50	15,03±6,19	10,17±3,56	13,00±6,65
	100+25	12,83±3,96	9,83±1,76	18,53±7,74
	100+50	13,63±4,04	9,77±4,60	7,53±1,38
<i>K-E (50) p</i>		<i>0,827</i>	<i>0,275</i>	<i>0,275</i>
<i>K-E (100) p</i>		<i>0,127</i>	<i>0,275</i>	<i>0,827</i>
<i>K-R (25) p</i>		<i>0,827</i>	<i>0,827</i>	<i>0,827</i>
<i>K-R (50) p</i>		<i>0,513</i>	<i>0,127</i>	<i>0,513</i>
<i>K-E+R (50+25) p</i>		<i>0,827</i>	<i>0,050*</i>	<i>0,827</i>
<i>K-E+R (50+50) p</i>		<i>0,827</i>	<i>0,827</i>	<i>0,513</i>
<i>K-E+R (100+25) p</i>		<i>0,827</i>	<i>0,827</i>	<i>0,827</i>
<i>K-E+R (100+50) p</i>		<i>0,825</i>	<i>0,513</i>	<i>0,050*</i>

Mann Whitney U test

** p≤0.05*

Kontrol grubunun 24. saat total siyalik asit düzeyine göre, Epigallo-Catechin Gallate (E) grubunun 50 µg ve 100 µg'lık dozlarının 24. saat total siyalik asit düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.827).

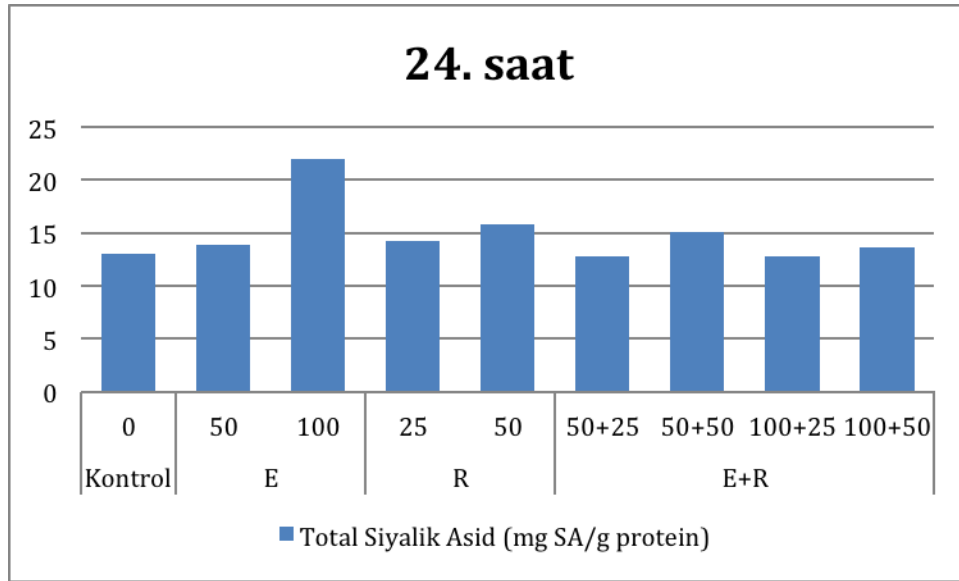
Kontrol grubunun 24. saat total siyalik asit düzeyine göre, Resveratrol (R) grubunun 25 µg ve 50 µg'lık dozlarının 24. saat total siyalik asit düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$).

Kontrol grubunun 24. saat total siyalik asit düzeyine göre, E+R grubunun 50+25 µg'lık dozlarının 24. saat total siyalik asit düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0.827$).

Kontrol grubunun 24. saat total siyalik asit düzeyine göre, E+R grubunun 50+50 µg'lık dozlarının 24. saat total siyalik asit düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p=0.827$).

Kontrol grubunun 24. saat total siyalik asit düzeyine göre, E+R grubunun 100+25 µg'lık dozlarının 24. saat total siyalik asit düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p=0.827$).

Kontrol grubunun 24. saat total siyalik asit düzeyine göre, E+R grubunun 100+50 µg'lık dozlarının 24. saat total siyalik asit düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0.825$).



Grafik 1: 24.saatte ki TSA değerleri

Kontrol grubunun 48. saat total siyalik asit düzeyine göre, Epigallo-Catechin Gallate (E) grubunun 50 µg ve 100 µg'lık dozlarının 48. saat total siyalik asit düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$).

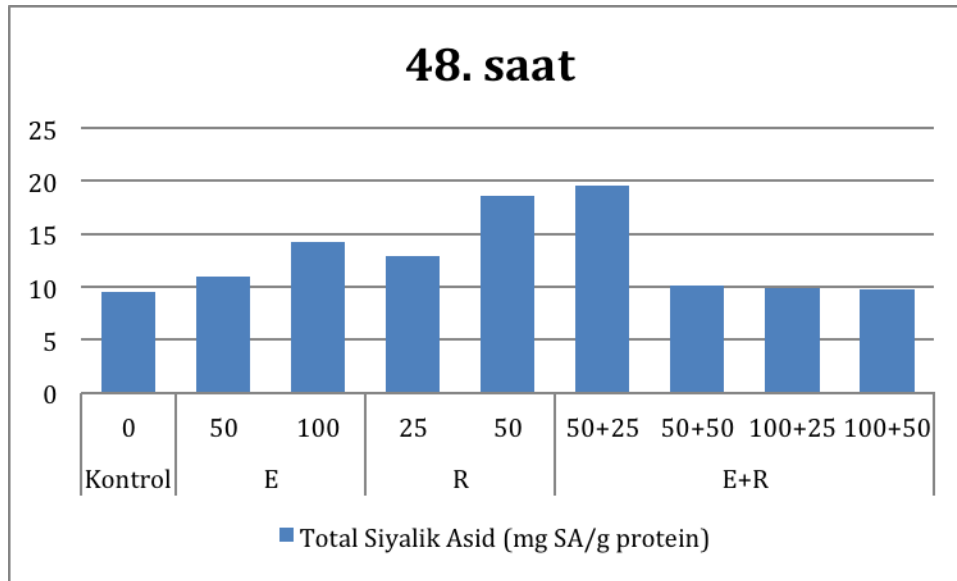
Kontrol grubunun 48. saat total siyalik asit düzeyine göre, Resveratrol (R) grubunun 25 µg ve 50 µg'lık dozlarının 48. saat total siyalik asit düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$).

E+R grubunun 50+25 µg'lık dozunun 48. saatteki total siyalik asit düzeyi, kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p=0.05$).

Kontrol grubunun 48. saat total siyalik asit düzeyine göre, E+R grubunun 50+50 µg'lık dozlarının 48. saat total siyalik asit düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0.827$).

Kontrol grubunun 48. saat total siyalik asit düzeyine göre, E+R grubunun 100+25 µg'lık dozlarının 48. saat total siyalik asit düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=0.827$).

Kontrol grubunun 48. Saat total siyalik asit düzeyine göre, E+R grubunun 100+50 µg'lık dozlarının 48. Saat total siyalik asit düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0.513$).



Grafik 2: 48.saatte ki TSA değerleri

Kontrol grubunun 72. saat total siyalik asit düzeyine göre, Epigallo-Catechin Gallate (E) grubunun 50 µg ve 100 µg'lık dozlarının 72. saat total siyalik asit düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$).

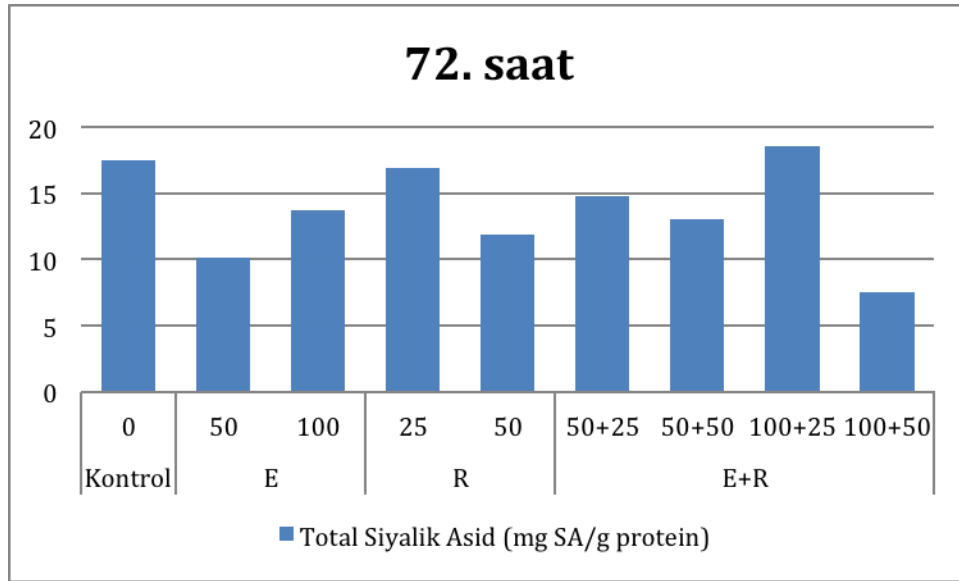
Kontrol grubunun 72. saat total siyalik asit düzeyine göre, Resveratrol (R) grubunun 25 µg ve 50 µg'lık dozlarının 72. saat total siyalik asit düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$).

Kontrol grubunun 72. saat total siyalik asit düzeyine göre, E+R grubunun 50+25 µg'lık dozlarının 72. saat total siyalik asit düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0.827$).

Kontrol grubunun 72. saat total siyalik asit düzeyine göre, E+R grubunun 50+50 µg'lık dozlarının 72. saat total siyalik asit düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=0.513$).

Kontrol grubunun 72. saat total siyalik asit düzeyine göre, E+R grubunun 100+25 µg'lık dozlarının 72. saat total siyalik asit düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0.827$).

E+R grubunun 100+50 µg'lık dozunun 72. Saatteki total siyalik asit düzeyi, Kontrol grubunun 72. saatteki total siyalik asit düzeyinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktür ($p=0.05$).



Grafik 3: 72.saatte ki TSA değerleri

C6 glioma hücrelerine ait lipid bağlı siyalik asit (LSA)düzeyleri (mg LSA/g protein) ile ilgili sonuçlar ve istatistiksel veriler Tablo 3’de özetlenmiştir.

Tablo 3: Lipid Bağlı Siyalik Asit (mg LSA/g protein) Değerlendirilmesi

Gruplar	Doz (µg)	Lipid Siyalik Asit (mg LSA/g protein)		
		24. saat	48. saat	72. saat
		Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS
Kontrol	0	5,43±0,55	3,29±0,35	4,13±0,91
E	50	3,23±0,86	4,40±0,36	3,36±1,05
	100	4,33±3,32	4,13±1,24	3,67±1,42
R	25	3,43±0,97	5,83±3,92	5,23±0,4
	50	3,87±2,09	5,23±2,64	4,33±3,61
E+R	50+25	4,76±2,34	5,90±4,85	5,56±3,45
	50+50	5,67±3,46	3,90±2,59	3,63±1,42
	100+25	3,87±2,49	3,93±3,49	5,40±1,21
	100+50	5,00±2,64	3,01±1,91	3,77±2,15
<i>K-E (50) p</i>		<i>0,050*</i>	<i>0,050*</i>	<i>0,275</i>
<i>K-E (100) p</i>		<i>0,513</i>	<i>0,513</i>	<i>0,513</i>
<i>K-R (25) p</i>		<i>0,050*</i>	<i>0,507</i>	<i>0,077</i>
<i>K-R (50) p</i>		<i>0,275</i>	<i>0,513</i>	<i>0,513</i>
<i>K-E+R (50+25) p</i>		<i>0,513</i>	<i>0,487</i>	<i>0,513</i>
<i>K-E+R (50+50) p</i>		<i>0,513</i>	<i>0,507</i>	<i>0,513</i>
<i>K-E+R (100+25) p</i>		<i>0,513</i>	<i>0,513</i>	<i>0,275</i>
<i>K-E+R (100+50) p</i>		<i>0,658</i>	<i>0,513</i>	<i>0,827</i>

Mann Whitney U test

** p≤0.05*

Epigallo-Catechin Gallate (E) 50 µg grubunun 24. saat LSA düzeyi, Kontrol grubunun 24. saat LSA düzeyinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktür (p<0.05). Epigallo-Catechin Gallate (E) 100 µg grubunun 24. saat LSA düzeyi ile Kontrol grubunun 24. saat lipid siyalik düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0.05).

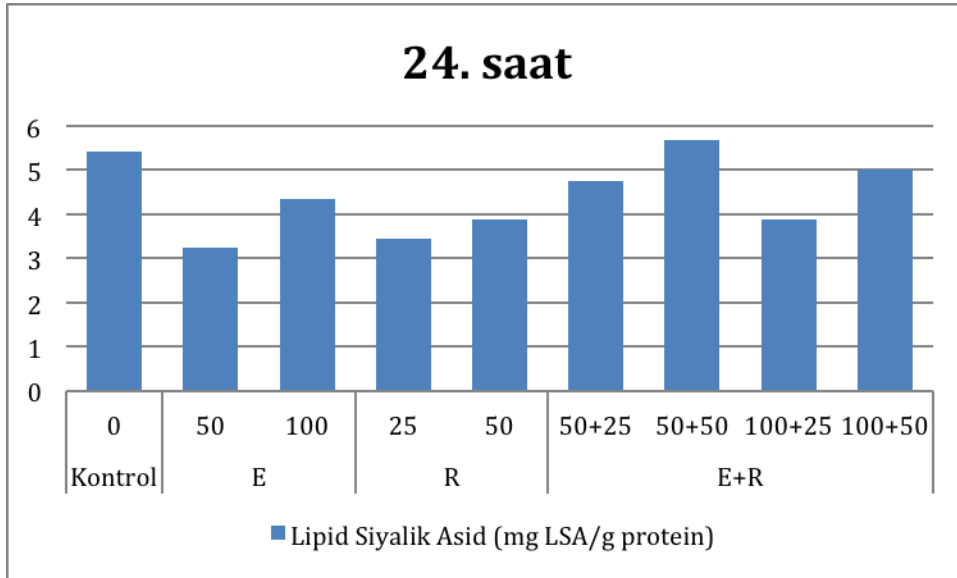
Resveratrol (R) 25 µg grubunun 24. saat LSA düzeyi, Kontrol grubunun 24. saat LSA düzeyinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktür (p=0.05). Resveratrol (R) 50 µg grubunun 24. saat LSA düzeyi ile kontrol grubunun 24. saat LSA düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.275).

Kontrol grubunun 24. saat LSA düzeyine göre, E+R grubunun 50+25 µg'lık dozlarının 24. saat LSA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.513).

Kontrol grubunun 24. saat LSA düzeyine göre, E+R grubunun 50+50 µg'lık dozlarının 24. saat LSA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.513).

Kontrol grubunun 24. saat LSA düzeyine göre, E+R grubunun 100+25 µg'lık dozlarının 24. saat LSA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p=0.513).

Kontrol grubunun 24. Saat LSA düzeyine göre, E+R grubunun 100+50 µg'lık dozlarının 24. Saat LSA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.658).



Grafik 4: 24.saatte ki LSA değerleri

Epigallo-Catechin Gallate (E) 50 µg grubunun 48. saat LSA düzeyi, kontrol grubunun 48. saat LSA düzeyinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir (p=0.05). Epigallo-Catechin Gallate (E) 100 µg grubunun 48. saat LSA düzeyi ile Kontrol grubunun 48. saat LSA düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0.05).

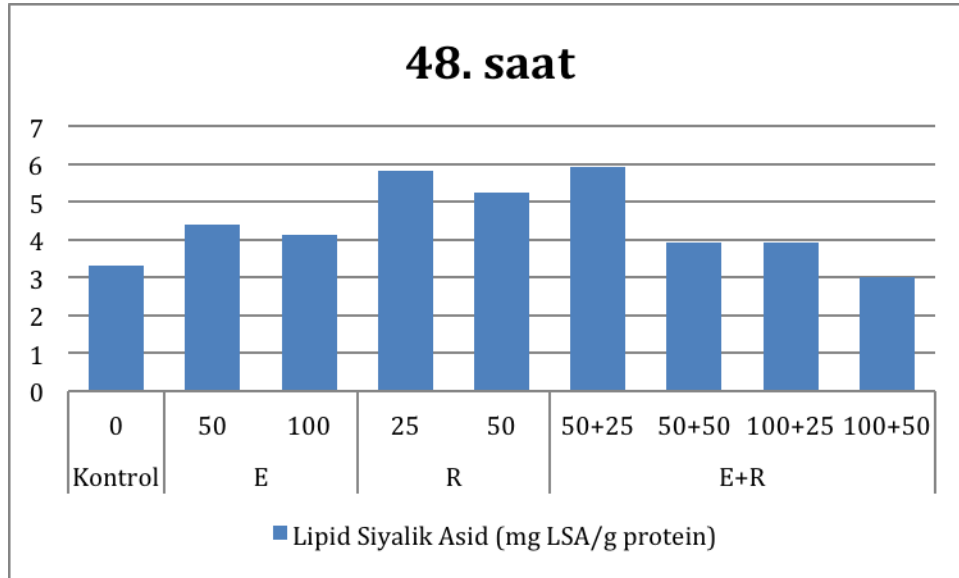
Resveratrol (R) 25 µg ve 50 µg grubunun 48. saat LSA düzeyi ile Kontrol grubunun 48. saat LSA düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0.05).

Kontrol grubunun 48. saat LSA düzeyine göre, E+R grubunun 50+25 µg'lık dozlarının 48. saat LSA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p=0.487).

Kontrol grubunun 48. saat LSA düzeyine göre, E+R grubunun 50+50 µg'lık dozlarının 48. saat LSA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.507).

Kontrol grubunun 48. Saat LSA düzeyine göre, E+R grubunun 100+25 µg'lık dozlarının 48. Saat LSA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.513).

Kontrol grubunun 48. Saat LSA düzeyine göre, E+R grubunun 100+50 µg'lık dozlarının 48. Saat LSA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.513).



Grafik 5: 48.saatte ki LSA değerleri

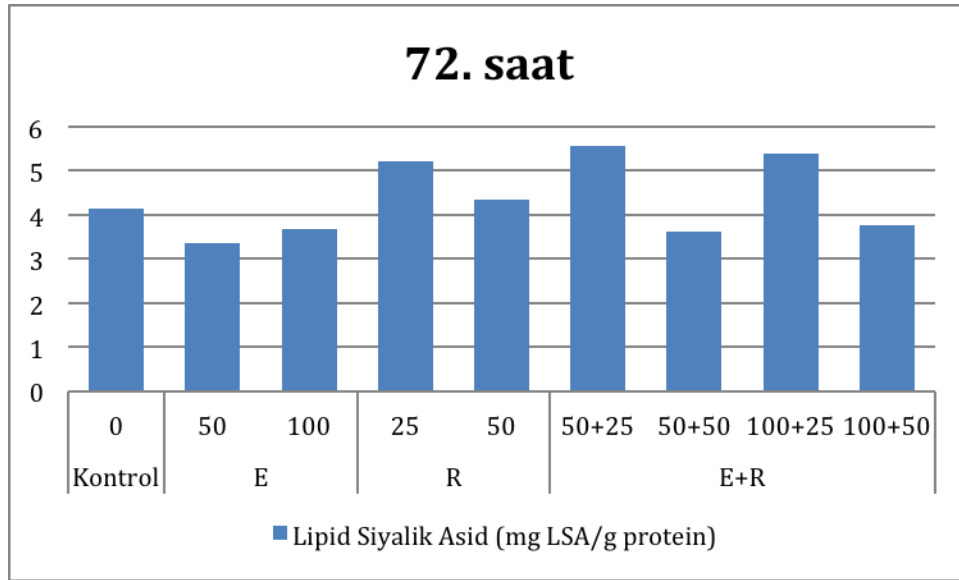
Epigallo-Catechin Gallate (E) 50 µg ve 100 µg grubunun 72. saat LSA düzeyi ile Kontrol grubunun 72. saat LSA düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p>0.05).

Resveratrol (R) 25 µg ve 50 µg grubunun 72. saat LSA düzeyi ile Kontrol grubunun 72. saat LSA düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

Kontrol grubunun 72. saat LSA düzeyine göre, E+R grubunun 50+25 µg'lık dozlarının 72. saat LSA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.513).

Kontrol grubunun 72. saat LSA düzeyine göre, E+R grubunun 50+50 µg'lık dozlarının 72. saat LSA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.513).

Kontrol grubunun 72. saat LSA düzeyine göre, E+R grubunun 100+25 µg'lık dozlarının 72. saat LSA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (p>0.05). Kontrol grubunun 72. saat LSA düzeyine göre, E+R grubunun 100+50 µg'lık dozlarının 72. saat LSA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.827).



Grafik 6: 72.saatte ki LSA değerleri

C6 glioma hücrelerine ait protein karbonil düzeyleri ($\mu\text{mol/g}$ protein) ile ilgili sonuçlar ve istatistiksel veriler Tablo 4’de özetlenmiştir.

Tablo 4: Protein Karbonil Tayini ($\mu\text{mol/g}$ protein) Değerlendirilmesi

Gruplar	Doz (μg)	Protein Karbonil Tayini ($\mu\text{mol/g}$ protein)		
		24. saat	48. saat	72. saat
		Ort \pm SS	Ort \pm SS	Ort \pm SS
Kontrol	0	4,73 \pm 3,26	3,57 \pm 0,61	6,77 \pm 3,45
E	50	4,60 \pm 0,95	7,27 \pm 2,51	6,47 \pm 3,32
	100	6,80 \pm 1,67	8,60 \pm 4,25	7,23 \pm 3,18
R	25	2,67 \pm 0,66	2,83 \pm 0,77	5,67 \pm 5,05
	50	3,20 \pm 1,21	7,10 \pm 6,59	3,10 \pm 0,55
E+R	50+25	2,90 \pm 1,25	8,43 \pm 2,57	5,13 \pm 2,05
	50+50	3,83 \pm 2,60	3,50 \pm 2,19	6,50 \pm 5,04
	100+25	4,20 \pm 2,61	6,00 \pm 3,81	11,73 \pm 7,94
	100+50	8,20 \pm 7,01	5,20 \pm 3,65	8,73 \pm 9,00
<i>K-E (50) p</i>		<i>0,658</i>	<i>0,050*</i>	<i>0,827</i>
<i>K-E (100) p</i>		<i>0,376</i>	<i>0,127</i>	<i>0,827</i>
<i>K-R (25) p</i>		<i>0,376</i>	<i>0,184</i>	<i>0,827</i>
<i>K-R (50) p</i>		<i>0,827</i>	<i>0,822</i>	<i>0,050*</i>
<i>K-E+R (50+25) p</i>		<i>0,275</i>	<i>0,050*</i>	<i>0,513</i>
<i>K-E+R (50+50) p</i>		<i>0,513</i>	<i>0,513</i>	<i>0,827</i>
<i>K-E+R (100+25) p</i>		<i>0,827</i>	<i>0,275</i>	<i>0,513</i>
<i>K-E+R (100+50) p</i>		<i>0,513</i>	<i>0,513</i>	<i>0,827</i>

Mann Whitney U test

** p \leq 0.05*

Kontrol grubunun 24. saat protein karbonil tayini düzeyi ile Epigallo-Catechin Gallate (E) grubunun 50 μg ve 100 μg ’lık dozlarının 24. saat protein karbonil tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

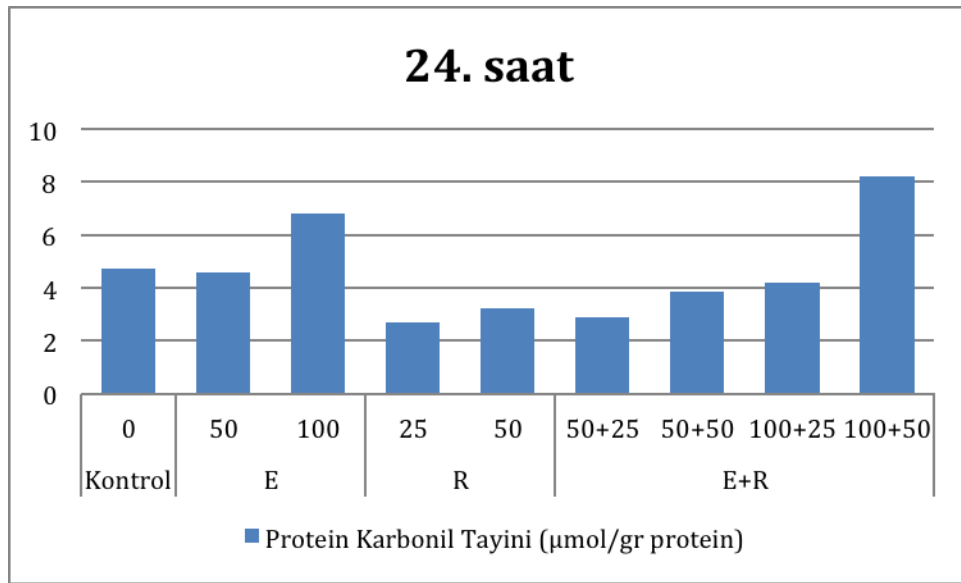
Kontrol grubunun 24. saat protein karbonil tayini düzeyi ile Resveratrol (R) grubunun 25 μg ve 50 μg ’lık dozlarının 24. saat protein karbonil tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Kontrol grubunun 24. saat protein karbonil tayini düzeyi ile E+R grubunun 50+25 μg ’lık dozlarının 24. saat protein karbonil tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.513$).

Kontrol grubunun 24. saat protein karbonil tayini düzeyi ile E+R grubunun 50+50 µg'lık dozlarının 24. saat protein karbonil tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.513).

Kontrol grubunun 24. saat protein karbonil tayini düzeyi ile E+R grubunun 100+25 µg'lık dozlarının 24. saat protein karbonil tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.827).

Kontrol grubunun 24. saat protein karbonil tayini düzeyi ile E+R grubunun 100+50 µg'lık dozlarının 24. saat protein karbonil tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.513).



Grafik 7: 24.saatte ki protein karbonil değerleri

Epigallo-Catechin Gallate (E) grubunun 50 µg'lık dozlarının 48. saat protein karbonil tayini düzeyleri, Kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekken (p<0.05); Kontrol grubunun 48. saat protein karbonil tayini düzeyi ile Epigallo-Catechin Gallate (E) grubunun 100 µg'lık dozlarının 48. saat protein karbonil tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

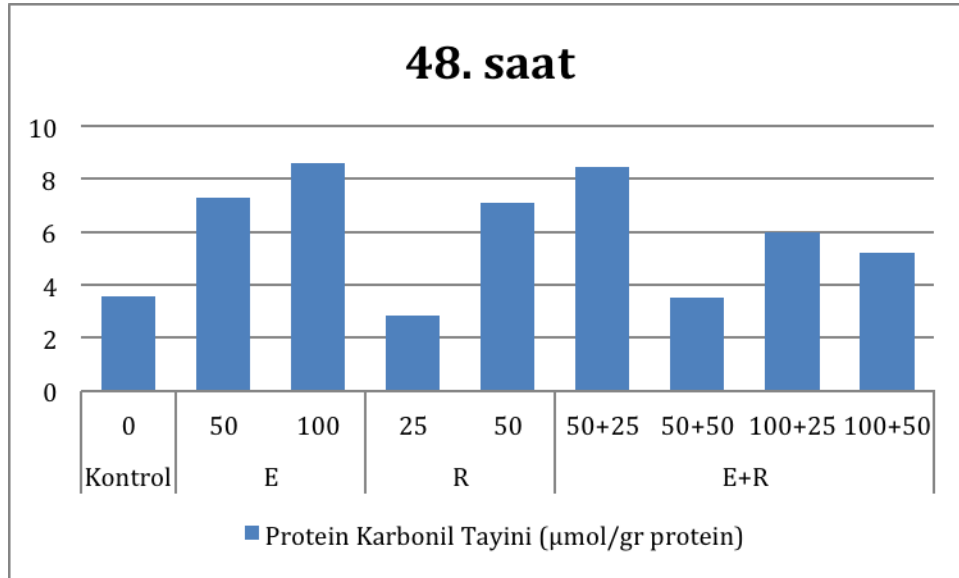
Kontrol grubunun 48. saat protein karbonil tayini düzeyi ile Resveratrol (R) grubunun 25 µg ve 50 µg'lık dozlarının 48. saat protein karbonil tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0.05).

E+R grubunun 50+25 µg'lık dozlarının 48. saat protein karbonil tayini düzeyleri, Kontrol grubunun 48. saat protein karbonil tayini düzeyinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir (p=0.05).

Kontrol grubunun 48. saat protein karbonil tayini düzeyi ile E+R grubunun 50+50 µg'lık dozlarının 48. saat protein karbonil tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.513).

Kontrol grubunun 48. saat protein karbonil tayini düzeyi ile E+R grubunun 100+25 µg'lık dozlarının 48. saat protein karbonil tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.513).

Kontrol grubunun 48. saat protein karbonil tayini düzeyi ile E+R grubunun 100+50 µg'lık dozlarının 48. saat protein karbonil tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.827).



Grafik 8: 48.saatte ki protein karbonil değerleri

Kontrol grubunun 72. saat protein karbonil tayini düzeyi ile Epigallo-Catechin Gallate (E) grubunun 50 µg ve 100 µg'lık dozlarının 72. saat protein karbonil tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

Kontrol grubunun 72. saat protein karbonil tayini düzeyi ile Resveratrol (R) grubunun 25 µg'lık dozlarının 72. saat protein karbonil tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmazken (p=0.827); Resveratrol (R) grubunun

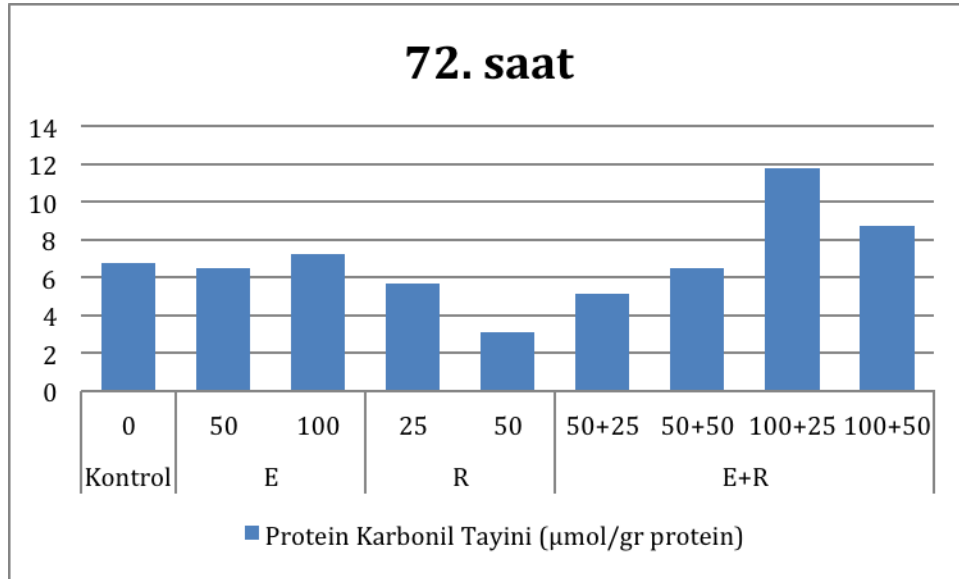
50 µg'lık dozlarının 72. saat protein karbonil tayini düzeyleri Kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktür (p=0.05).

Kontrol grubunun 72. saat protein karbonil tayini düzeyi ile E+R grubunun 50+25 µg'lık dozlarının 72. saat protein karbonil tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0.05).

Kontrol grubunun 72. saat protein karbonil tayini düzeyi ile E+R grubunun 50+50 µg'lık dozlarının 72. saat protein karbonil tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.827).

Kontrol grubunun 72. saat protein karbonil tayini düzeyi ile E+R grubunun 100+25 µg'lık dozlarının 72. saat protein karbonil tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.513).

E+R grubunun 100+50 µg'lık dozlarının 72. saat protein karbonil tayini düzeyleri, Kontrol grubunun 72. saat protein karbonil tayini düzeyinden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.827).



Grafik 9: 72.saatte ki protein karbonil değerleri

C6 glioma hücrelerine ait MDA düzeyleri ($\mu\text{mol/g}$ protein) ile ilgili sonuçlar ve istatistiksel veriler Tablo 5’de özetlenmiştir.

Tablo 5: Malondialdehit Tayini ($\mu\text{mol/g}$ protein) Değerlendirilmesi

Gruplar	Doz (μg)	Malondialdehit Tayini ($\mu\text{mol/g}$ protein)		
		24. saat	48. saat	72. saat
		Ort \pm SS	Ort \pm SS	Ort \pm SS
Kontrol	0	0,48 \pm 0,12	0,56 \pm 0,09	0,69 \pm 0,29
E	50	0,52 \pm 0,10	0,77 \pm 0,49	0,49 \pm 0,11
	100	0,78 \pm 0,03	0,64 \pm 0,22	0,43 \pm 0,03
R	25	0,45 \pm 0,08	0,60 \pm 0,32	0,83 \pm 0,39
	50	0,75 \pm 0,45	0,72 \pm 0,32	0,45 \pm 0,12
E+R	50+25	0,49 \pm 0,12	1,07 \pm 0,65	0,52 \pm 0,06
	50+50	0,79 \pm 0,35	0,48 \pm 0,26	0,54 \pm 0,15
	100+25	0,43 \pm 0,08	0,59 \pm 0,37	0,89 \pm 0,38
	100+50	0,71 \pm 0,12	0,44 \pm 0,19	0,48 \pm 0,25
<i>K-E (50) p</i>		<i>0,513</i>	<i>0,827</i>	<i>0,376</i>
<i>K-E (100) p</i>		<i>0,050*</i>	<i>0,827</i>	<i>0,127</i>
<i>K-R (25) p</i>		<i>0,827</i>	<i>0,827</i>	<i>0,513</i>
<i>K-R (50) p</i>		<i>0,513</i>	<i>0,513</i>	<i>0,127</i>
<i>K-E+R (50+25) p</i>		<i>0,827</i>	<i>0,046*</i>	<i>0,513</i>
<i>K-E+R (50+50) p</i>		<i>0,275</i>	<i>0,513</i>	<i>0,513</i>
<i>K-E+R (100+25) p</i>		<i>0,827</i>	<i>0,513</i>	<i>0,513</i>
<i>K-E+R (100+50) p</i>		<i>0,127</i>	<i>0,827</i>	<i>0,275</i>

Mann Whitney U test

** p \leq 0.05*

Kontrol grubunun 24. saat malondialdehit tayini düzeyi ile Epigallo-Catechin Gallate (E) grubunun 50 μg 24. saat malondialdehit tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmazken ($p>0.05$); Epigallo-Catechin Gallate (E) grubunun 100 μg ’lık dozunun 24. saat malondialdehit tayini düzeyi Kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir ($p<0.05$).

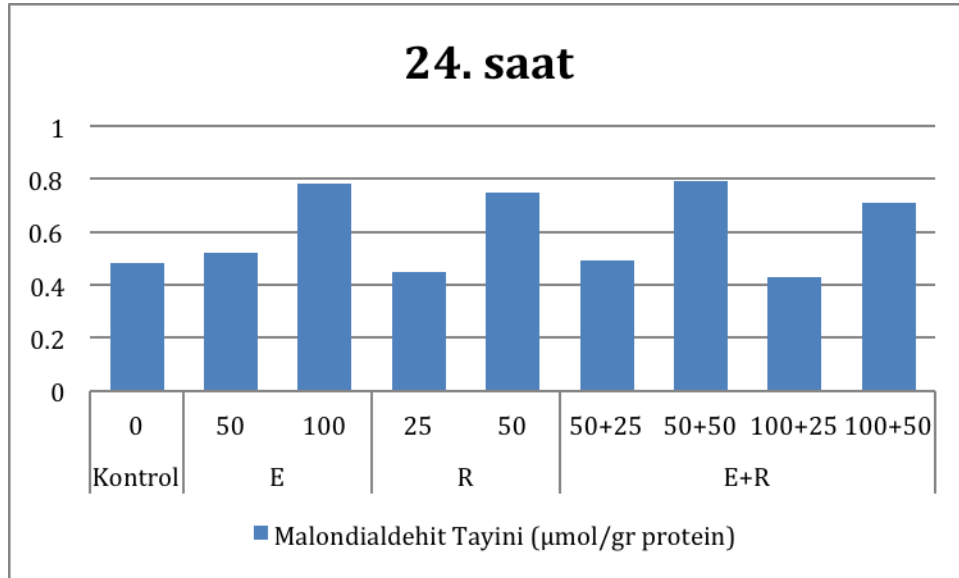
Kontrol grubunun 24. saat malondialdehit tayini düzeyi ile Resveratrol (R) grubunun 25 μg ve 50 μg ’lık dozlarının 24. saat malondialdehit tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Kontrol grubunun 24. saat malondialdehit tayini düzeyi ile E+R grubunun 50+25 µg'lık dozlarının 24. saat malondialdehit tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.827).

Kontrol grubunun 24. saat malondialdehit tayini düzeyi ile E+R grubunun 50+50 µg'lık dozlarının 24. saat malondialdehit tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.275).

Kontrol grubunun 24. saat malondialdehit tayini düzeyi ile E+R grubunun 100+25 µg'lık dozlarının 24. saat malondialdehit tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.827).

Kontrol grubunun 24. saat malondialdehit tayini düzeyi ile E+R grubunun 100+50 µg'lık dozlarının 24. saat malondialdehit tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.127).



Grafik 10: 24.saatte ki MDA değerleri

Kontrol grubunun 48. saat malondialdehit tayini düzeyi ile Epigallo-Catechin Gallate (E) grubunun 50 µg ve 100 µg'lık dozlarının 48. saat malondialdehit tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

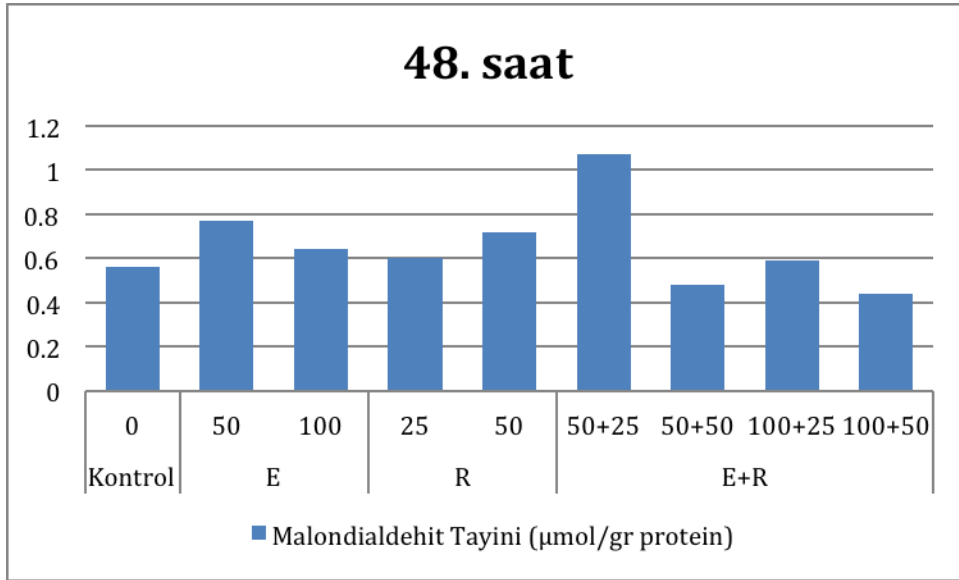
Kontrol grubunun 48. saat malondialdehit tayini düzeyi ile Resveratrol (R) grubunun 25 µg ve 50 µg'lık dozlarının 48. saat malondialdehit tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

E+R grubunun 50+25 µg'lık dozlarının 48. saat malondialdehit tayini düzeyleri Kontrol grubunun 48. saat malondialdehit tayini düzeyinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir (p=0.05).

Kontrol grubunun 48. saat malondialdehit tayini düzeyi ile E+R grubunun 50+50 µg'lık dozlarının 48. saat malondialdehit tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.513).

Kontrol grubunun 48. saat malondialdehit tayini düzeyi ile E+R grubunun 100+25 µg'lık dozlarının 48. saat malondialdehit tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p=0.513).

Kontrol grubunun 48. saat malondialdehit tayini düzeyi ile E+R grubunun 100+50 µg'lık dozlarının 48. saat malondialdehit tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.827).



Grafik 11: 48.saatte ki MDA değerleri

Kontrol grubunun 72. saat malondialdehit tayini düzeyi ile Epigallo-Catechin Gallate (E) grubunun 50 µg ve 100 µg'lık dozlarının 72. saat malondialdehit tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

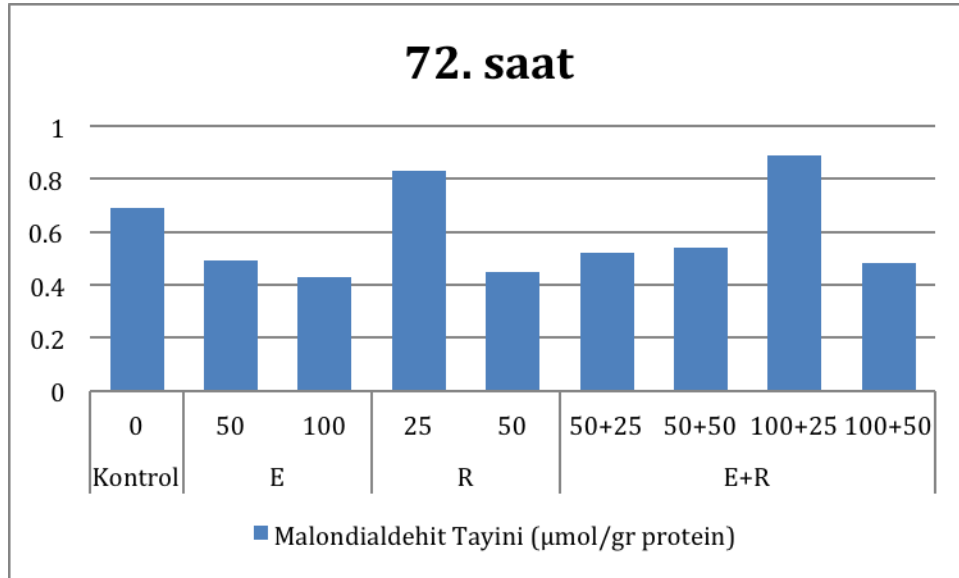
Kontrol grubunun 72. saat malondialdehit tayini düzeyi ile Resveratrol (R) grubunun 25 µg ve 50 µg'lık dozlarının 72. saat malondialdehit tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

Kontrol grubunun 72. saat malondialdehit tayini düzeyi ile E+R grubunun 50+25 µg'lık dozlarının 72. saat malondialdehit tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.513).

Kontrol grubunun 72. saat malondialdehit tayini düzeyi ile E+R grubunun 50+50 µg'lık dozlarının 72. saat malondialdehit tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.513).

Kontrol grubunun 72. saat malondialdehit tayini düzeyi ile E+R grubunun 100+25 µg'lık dozlarının 72. saat malondialdehit tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.513).

Kontrol grubunun 72. saat malondialdehit tayini düzeyi ile E+R grubunun 100+50 µg'lık dozlarının 72. saat malondialdehit tayini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.275).



Grafik 12: 72.saatte ki MDA değerleri

7. TARTIŞMA

Kanser sıklığının giderek artması ve tedavide kullanılan ilaçların büyük bir kısmının malign hücreler üzerinde sitotoksik etkilerini gerçekleştirirken normal hücrelerde de toksik etkiler gösterebilmesi bilim adamlarını farklı arayışlara yöneltmiştir. Klinikte kullanılan geleneksel kemoterapötik ajanlar seçici özellikte olmadıkları için tümör dokusunda gerilemeye yol açarken, hastalarda miyelosupresyon ve trombositopeni gibi istenmeyen etkiler gelişebilmektedir. Son yıllarda anti-kanser ilaçlar üzerine yapılan çalışmalar geleneksel tedavi yaklaşımlarının dışına çıkarak “hedefleme” tedavisi üzerinde yoğunlaşmaya başlamıştır. Bu şekilde seçili hedefleri bulunan yeni tedavi yaklaşımlarında tümör hücreleri ölürken normal hücreler sağlıklı bir şekilde yaşamaya devam etmektedir.

Bu temelde yapılan çalışmalarda doğal bitkiler ve bitkisel kaynaklı kimyasallar ilgi odağı haline gelmiştir (76, 77, 78). Yeni tedavi protokollerine olan ihtiyacın artmasının yanı sıra tedavi maliyeti ve ilaç yan etkilerinin düşük olması doğal etkili ilaçlara yönelik araştırmalara hız verilmesine neden olmuştur (79, 80). Bitkisel kaynaklı bu tedavi yöntemlerinde bitki özleri, çekirdek veya taneleri ve konjuge edilmiş kimyasal içerikleri kullanılmaktadır (81). Son dönemde yapılan çalışmalarda flavonoid ve polifenol yapısında biyoaktif bileşiklerin kanseri tedavi ettiğine dair raporlar bildirilmiştir (82). Bu doğrultuda yeşil çay, üzümü meyvelerin suyunda ve ekstresinde bulunan resveratrol ve kateşinin antioksidan, antiproliferatif ve sitotoksik etkileri ve klinik kullanımındaki yeri araştırılmalarda odak konusu olmuştur (83).

Oksidatif stres, vücuttaki antioksidan savunmanın reaktif oksijen türlerine karşı yetersiz kalması sonucu oluşan bir süreçtir. Antioksidan moleküller, bu oksidatif strese neden olan serbest radikalleri etkisiz hale dönüştürmelerinden dolayı önemli antioksidan moleküllerdir (84).

Oksidatif stresin hastalıkların patogenezinde rolü anlaşıldıkça bu alandaki çalışmalar da yoğunlaşmıştır. Oksidatif stres çalışmalarında serbest radikallerin artışı veya antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliği araştırılmaktadır. Bunun için plazma, serum, eritrosit, hücre, doku örnekleri gibi çeşitli materyallerde analiz yapmaya uygun yöntemler geliştirilmiştir.

Serbest radikal üretimi artışının belirlenmesi için bunların lipidlerle, proteinlerle ve DNA ile reaksiyonları sonucu oluşan çeşitli ürünlerin ölçümü için bazı yöntemler kullanılmaktadır.

Araştırmamızda, C6 glioma hücrelerinde resveratrol ve kateşin uygulanmasının oksidatif stres parametreleri üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

Resveratrol ve kateşinin başka hücre kültürlerinde de antioksidan etkileri araştırılmıştır. Schlacterman A. ve arkadaşları resveratrol ve kateşinin metastaz özelliği olan meme kanserinde antikanser ve antioksidan özelliklerini incelemişlerdir. İn vivo incelemeleri sonucu veri elde edememişlerdir. Resveratrol ve kateşinin 0.5 μM ve üstü kombinasyonlarında MDA-MB-231 insan meme kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu engellediği ve memeli tümör büyümesini in vivo da durdurduğu gözlemlenmiştir. Bu araştırma grubu deneylerinde 0.5, 5, 20 μM 'lık dozlar kullanmışlar ve tek tek yerine kombinasyonların daha etkili olduğunu saptamışlardır. Ayrıca resveratrolün kateşinden daha etkili olduğunu göstermişlerdir (85). Hsieh ve arkadaşları MCF-7 meme kanser hücrelerinde resveratrol, kateşin ve y-tocotrienolün gen ekspresyonunu ve antioksidan aktivitelerini incelemişlerdir, ≥ 50 μM kateşin, ≥ 25 μM resveratrol ve ≥ 10 μM y-tocotrienolün antioksidan aktivitelerinin arttığını gözlemlenmişler, ayrıca kombinasyonlarından daha iyi sonuç alacakları yönünde yorum yapmışlardır (86). Çalışmamızda da kateşin ve resveratrol kullanıldı doz olarak da resveratrol 25 ve 50 μg , kateşin 50 ve 100 μg ve bunların kombinasyonları kullanılmıştır. Genel olarak bakıldığında ≥ 50 μg kateşin ve ≥ 25 μg resveratrolün C6 glioma hücrelerinde antioksidan etkilerini olduğunu gözlemlendi, ama kateşin 100 μg ve resveratrol 50 μg birlikte kullanıldığında antioksidan aktivitenin en çok bu dozlarda arttığını saptandı. Nakagava ve ark.'ları yaptıkları bir çalışmada, resveratrolün düşük dozlarının (KPL-1, ≤ 22 μM ; MCF-7, ≤ 4 μM) ER-pozitif insan meme kanser hücre dizilerinde hücre proliferasyonuna sebep olduğunu, yüksek dozlarının ise (≥ 44 μM) hücre büyümesini baskıladığını bildirdiler. Büyümenin baskılanmasının, sub G1 faz fraksiyonu, Bak ve Bax proteinlerinin up-regülasyonu, Bcl-XL protein down regülasyonu ve kaspaz 3'ün aktivasyonunun görülmesi ile indüklenen apoptoz nedeniyle olduğunu gösterdiler (87). Ahmad ve arkadaşları EGCG'nin antioksidan etkisi ve apoptoza götürmesi sadece malignant tümör hücrelerinde bir etkisi olmadığını gözlemlenildi. EGCG'nin beyin tümör hücreleri ve diğer kanser hücrelerinde antioksidan etkisinin yüksek olduğunu ve apoptoza götürdüğü gözlemlenildi (88). Yokoma ve

arkadaşları EGCG'nin 50 µg/ml ve daha yüksek dozları C6 glioma hücrelerinde canlılığın azaldığını bildirmişlerdir (89). Bu araştırmalar bizim bulgularımızla paralellik göstermektedir.

Literatür taramaları sonucunda, kateşin ve resveratrolün C6 glioma hücre kültüründe biyokimyasal etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Buna benzer çalışmalar genellikle doku ve serum kullanılarak yapılmıştır. Yücey ve arkadaşları beyin tümörlü olgularda tümör belirleyici (marker) olarak beyin omurilik sıvısı (BOS) siyalik asit/total protein oranlarını incelediler. Beyin tümörlerinde, serumda ve BOS'da SA düzeylerinin artabileceği, ancak bu artışların beyin tümörlerinin gradelendirilmesinde her zaman yararlı olmayabileceği, buna karşılık BOS siyalik asit / total protein oranının kullanılmasının beyin tümörlerinin gradelerinin saptanmasında daha güvenilir bir marker olabileceğini bulmuşlardır. Total protein oranlayarak hesaplamalarının nedeni proteinlerdeki artışlar nedeniyle elde edilecek SA konsantrasyonundaki relatif artışların ortaya çıkmasını önleyerek, beyin tümörlerinin tanısında ve gradelendirilmesinde daha yararlı olabilecektir (90). Kakari ve arkadaşları, Oktar ve arkadaşları da beyin tümörlü olgularda siyalik asit konsantrasyonunda artış olduğunu bildirmişlerdir (91, 92).

Shamberger RJ. yaptığı çalışmada kanser hastalarında serum SA seviyelerinin normale göre yüksek olduğunu bulmuştur. Bu molekülün metastazlı hastalarda , metastazı olmayan kanserli hastalardan yine daha yüksek düzeylere ulaştığı saptanmıştır. Bu bulgularına dayanarak siyalik asidin nonspesifik marker olarak kanser taramalarında kullanılabilmesini öne sürmüştür (49). Uslu ve arkadaşlarının yaptığı başka bir araştırmada ise, serum siyalik asit düzeyleri larenks kanserli hastalarda yükselmekle birlikte hastalığın evresi ile korelasyon göstermemekteydi, bu nedenle larenks kanserinde prognozu belirtebilecek özelliğe sahip olmadığını bildirmiştir. Serum SA düzeyi tümör yerleşim yeri, tümör evresi ve hasta yaşı ile korelasyon göstermemektedir (93). Serum SA miktarı, oksidatif stres arttığı zaman ona paralel olarak artıyor, burdan SA miktarının artmasını oksidatif strese karşı bir korunma molekülü olarak algılayabiliriz. Literatür taramalarında hücre kültüründe de siyalik asit çalışmalarına raslanmamıştır, bizim çalışmamızın hücre kültüründe yapılmış olması orjinaldir. Çalışmamızda üç farklı zaman diliminde, farklı dozların etkisi araştırılmıştır sonuç olarak kateşin + resveratrol grubunun 100+50 µg'lık dozunun 72. saatteki total siyalik asit düzeyinin, kontrol grubunun 72. saatteki total siyalik asit düzeyinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük

($p<0.05$) olduğunu saptadık bu da zaman etkisi ve doz miktarı artışına bağlı olarak hücrelerde antioksidanların etkili olduğunu göstermiştir. Diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı sonuç saptanmadı. Fakat daha fazla sayıda hücre hattı ile deneyler tekrarlanır ise daha sağlıklı analiz yapılabileceğini öngörmekteyiz.

Organizmada beyin dokusu çoğu gangliozitlerde olmak üzere en büyük oranda SA içeren organdır. Beyin hücrelerinde lipid molekülleri yoğunluktadır. Çalışmamızda LSA değerleri incelemesi sonucunda; kateşin 50 µg grubunun 24. saat LSA düzeyinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük ($p=0.05$) olduğunu saptadık. Yine 24. saatte resveratrol 25 µg grubu, kontrol grubunun LSA düzeyinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük ($p=0.05$) olduğunu saptadık. Bu sonuçlar diğer SA çalışmalarla paralel olduğunu göstermekte fakat litaretür taraması sonucu başka LSA çalışması bulunamadığı için bununla ilgili olarak karşılaştırma yapılamıyor.

Antioksidan maddeler olarak polifenoller (kateşin ve resveratrol) hücre bileşenlerini oksidatif hasara karşı korurlar. Bu yüzden kanser ve Tip II diabet gibi çeşitli dejeneratif hastalıklar ile bağlantılı oksidatif stres riskini sınırlayabilirler. Düşük toksite ve çok az yan etki ile tedavi edici bir kimyasal ajan potansiyelindedir. EGCG'nin anti-oksidan etkisi, hücreleri lipid peroksidasyonundan ve DNA'nın reaktif olan serbest radikallerce hasara uğramasından koruması şeklindedir (94). Santoz A ve ark. ları C6 glioma hücrelerinde oksidatif stres etkeni olan hidrojen peroksida bağlı olarak oluşan DNA hasarının giderilmesinde ve tedavisinde resveratrolün önemli rol oynadığını jel elektroforez yöntemiyle tespit etmişlerdir (95).

Protein oksidasyonu, proteinlerin, reaktif oksijen radikalleri, reaktif oksijen türleri, azot türevleri veya oksidatif stres ürünleriyle indüklenmesiyle meydana gelen kovalent bir modifikasyondur (57). Akut hücre stresine bağlı oluşan ROS artışı apoptoz veya nekroz yoluyla hücre ölümü ile sonuçlanabilir (59). Ayrıca oksidatif protein hasarı sonucunda, agregasyon ile fragmantasyonda artış ve proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarının değişiklikleri sıralanabilir. Bu değişiklikler ile proteolize yatkınlık ve protein fonksiyonlarının kaybı söz konusu olabilmektedir (96, 97). Protein karbonilasyonu irreversible ve non-enzimatik bir işlemdir, sonuçta karbonil grupları oluşur (62, 63). Protein karbonilasyonu ROS tarafından oluşturulan hücresel hasarı gösteren belirteçdir (59). Bizim çalışmamızda 48.saat diliminde kontrol grubunun, kateşin 50 µg ve kateşin 50 µg + resveratrol 25 µg dozlarının protein karbonil seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde

yüksek bulundu, bunun da antioksidanların sözünü ettiğimiz süre ile uygulanmaları ve dozlarının etkili olmadığını göstermektedir. Fakat resveratrol grubunun 50 µg'lık dozlarının 72. saatlik uygulamaları protein karbonil tayini düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı olarak düşüktür ($p < 0.05$) ve elde ettiğimiz sonuç bu dozun etkili olduğunu göstermektedir. Protein karbonil parametrelerine bakarak resveratrolün, kateşinden daha etkili olduğunu söyleyebiliriz.

Lipid peroksidasyonu zarın ve hücrenin işlevini bozar. Beyin antioksidan enzim aktivitesinin düşük olması ve kolaylıkla peroksidede olabilen poliansatüre yağ asitlerinin fazla olması nedeniyle diğer dokulara göre oksidatif strese daha duyarlıdır (98, 99, 100).

Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü MDA'dır. MDA, hücre membranlarında iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesi değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur (69, 101). Böylece hücre içinde aşırı kalsiyum birikir ve hücre ölüm mekanizması başlar. Dorual ve arkadaşları, lipid peroksidasyonun hücrelerde oksidatif stresinde belirlenmesinde bir indikatör olup olmadığını araştırmışlardır (102). Değişik oksidatif stres oluşturucu ajanlara karşı, çay kateşinlerinin etkisi konulu çalışmalardan elde edilen sonuçlar kateşinlerin homejenat MDA düzeyini düşürdüğü ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (103, 104). Yapılan bazı çalışmalarda da kateşin ve resveratrolün SOD aktivitesini arttırdığı ve lipid peroksidasyona bağlı olarak artan MDA düzeyini önemli ölçüde engellediği gösterilmiştir (105, 106, 107). Uchiyama ve arkadaşları bir başka flavonoid antioksidan olan likopenle çalışmaları sonucu, sıçanlarda MNNG (N-metil-N-nitro-nitrosoquanidin)'nin neden olduğu gastrik karsinogenezinde oksidan-antioksidan denge üzerine likopenin etkisinin bakıldığı bir çalışmada kanda artan lipid peroksidasyonun likopen verilmesinden sonra önemli seviyede azalmadığı gözlemlenmiştir (108).

Nanjo ve ark., ratlara %1 oranında kateşin vererek yaptıkları çalışmada lipid peroksidasyon seviyelerini önemli derecede düşük bulmuşlardır (109). Kateşin maddesinin lipid peroksidasyon seviyelerini nasıl düşürdüğüne dair net bir açıklama olmamakla birlikte, şimdiye kadar birçok görüş ortaya konmuştur. Kateşinin lipid peroksidasyon seviyesini düşürücü etkisi, genelde kateşin maddesinin içerdiği hidroksil gruplarının fazlalığı nedeni ile doğrudan serbest radikal temizleyici aktivite göstermesine (110, 111), alfa-tokoferol ile sinerjistik çalışarak alfa-tokoferolün rejenere olabilmesi için hidrojen aktararak serbest radikal zincir reaksiyonunu kırma fonksiyonuna, düşük dansiteli

lipoproteinlerin oksidasyonunu önlemesine (112) ve demir ve bakırı bağlayarak serbest radikal oluşumunu önlemesine bağlanmaktadır (113).

Çalışmamızda, kateşin+resveratrol grubunun 50+25 µg'lık dozlarınının 48. saat deki malondialdehit düzeyleri kontrol grubunun aynı zaman diliminde malondialdehit düzeyinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir (p=0.05), diğer araştırmalarla paralellik göstermemektedir, beklediğimiz MDA değerlerinin önemli seviyede azalmasıdır, ayrıca grup sayısı (n) değerleri yeterli değildir, hücre kültürüyle yapılan bir çalışma bulunamadığı için karşılaştırma yapılamıyor. Ama flavonoidlerin kardiovasküler hastalıklar, kronik inflamatuvar hastalıkları ve kanserdeki oksidatif stresi ve inflamasyonu azaltan yararlı etkileri rapor edilmiştir (114).

Kateşin ve resveratrolün, C6 glioma hücre hattı üzerinde antioksidan etkileri ile ilgili olarak hücre kültürü çalışmasına rastlanmadı. Sonuçlarımızı doz artışı açısından ve süreye bağımlı olarak irdelediğimizde doğru orantılı sonuçlar elde edilemedi, her biyokimyasal parametrenin en uygun doz ve zamanda C6 glioma hücrelerini etkilediğini ve bu konsantrasyonlarda kullanılabilirliklerinin uygun olduğu sonucuna varıldı. Bu sonuçlardan, çalışmamızı genişletmek amaçlı benzeri biyokimyasal etkileri olduğu düşünülen diğer antioksidanlarla da kombine edilerek ayrıca tümörögenesis açısından önemli olacağı düşünülen daha başka parametreler eklenerek ve grup sayısını arttırarak çalışmaya devam edilecektir.

8. SONUÇ

Deneylemizde C6 glioma hücrelerinde resveratrol ve epigallokateşin gallat'ın farklı doz kombinasyonlarının, üç farklı zaman diliminde uygulanmasının biyokimyasal ve ne kadar koruyucu etkisi olduğunu inceledik. C6 glioma hücrelerinde total siyalik asit, lipid siyalik asit, protein karbonil ve malondialdehit düzeylerinden elde edilen bulgularla şu çıkarımlarda bulunduk:

- ≥ 50 μg kateşin ve ≥ 25 μg resveratrol uygulamalarının C6 glioma hücrelerinde antioksidan etkileri olduğunu gözlemledik ama kateşin 100 μg ve resveratrol 50 μg birlikte kullanıldığında antioksidan aktivitesinin en çok bu dozlarda arttığını ve hücre ölümlerinin meydana geldiğini gözlemledik.
- Kateşin + resveratrol grubunun 100+50 μg 'lık dozunun 72. saatteki total siyalik asit düzeyi, kontrol grubunun 72. saatteki total siyalik asit düzeyinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük ($p=0.05$) olduğunu saptadık bu da zaman etkisi ve doz miktarının artırılmasının hücrelerde maddelerimizin antioksidan etkilerinin artırdığını göstermiştir.
- Kateşin 50 μg grubunun 24. saat LSA düzeyi, kontrol grubunun 24. saat grubunun LSA düzeyinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktür ($p=0.05$). Kateşin 50 μg grubunun 48. saat LSA düzeyi ise, kontrol grubunun 48. saat LSA düzeyinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir ($p=0.05$). Bu iki değere bakarak zamanın aynı dozda farklı etki ettiğini, bu etkinin 24. saatte daha fazla olduğunu söylenebilir, 72. saatlik zaman diliminde anlamlı bir sonuç elde edilemedi. Resveratrol 25 μg grubunun 24. saat LSA düzeyi, kontrol grubunun 24. saat LSA düzeyinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktür ($p=0.05$). LSA değerlerine bakarak 24 saatlik zamanın ve en az dozun daha etkili olduğunu, belli bir süreden sonra etkilemediğini ortaya koyduk.
- Kateşin grubunun 50 μg 'lık dozlarının 48. saatlik protein karbonil düzeyleri, kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir ($p=0.05$). Kateşin+resveratrol grubunun 50+25 μg 'lık dozlarının 48. saatlik protein karbonil düzeyleri, kontrol grubunun 48. saatlik protein karbonil düzeyinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir ($p=0.05$), bununla kullandığımız antioksidanların bu saat dilimi ve dozların da etkili olmadığını saptadık. Resveratrol grubunun 50

μg 'lık dozlarının 72. saat protein karbonil düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktür ($p=0.05$) ve bu dozun etkili olduğunu göstermektedir. Yaptığımız ölçümler, protein karbonil parametrelerinde resveratrolün, kateşinden daha etkili olduğunu göstermiştir.

- Kateşin+resveratrol grubunun 50+25 μg 'lık dozlarının 48. saatlik malondialdehit düzeyleri kontrol grubunun 48. saatlik malondialdehit düzeyinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir ($p=0.046$), diğer uygulamalarımızın MDA değerlerinde anlamlı bir farklılık yoktur.

Bu çalışmamızda SA, LSA, protein karbonil, MDA parametrelerinin sıçan C6 glioma hücre kültüründe incelenmesi sonucunda etkin olan en uygun doz ve zaman aralığını saptamış olduk.

9. TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirdiğim Yüksek Lisans eğitimim süresince bana emek veren, yönlendiren, güvenen ve desteğini hiç esirgemeyen çok değerli danışman hocam, sayın Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ'a ve tez çalışmam ve diğer çalışmalarım süresince bana her türlü imkanı sağlayan, bilgilendiren, desteğini ve sevgisini esirgemeyen çok değerli hocam, sayın Prof. Dr. Ezel USLU`a çok teşekkür ederim.

Deneylerim sırasında laboratuvar da sonsuz yardımlarını esirgemeyen Öğretim Görevlisi Melike ERSÖZ'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Öğretim Görevlisi Zeynep Mine COŞKUN'a zamanı ve desteği için ve Enstitü Sekreterimiz İlkur KARAOSMANOĞLU'na destekleri için teşekkürü bir borç bilirim. Dostlukları ve yardımları için dostlarıma ve eğitimim boyunca her an yanımda olan, maddi-manevi desteğini hiç eksik etmeyen aileme çok teşekkür ederim.

10. KAYNAKLAR

1. Hulka BS, Stark AT. Breast cancer: cause and prevention. *Lancet*. 1995, 346:883-887.
2. Gazi C, Tapul L. The effects of aloe emodin and cisplatin on rat glioma cell line in two and three-dimensional cell culture models. *J Ist Faculty Med*. 2006, 69:110-116
3. Kirtikar KR, Basu BD. Indian medicinal plants. India, Dehradun, 1975.
4. Takeoka GR, Dao LT. Antioxidant constituent of almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb.] hulls. *J Agric Food Chem* 2003, 51:496-501.
5. DeFeudis FV, Papadopoulos V, Drieu K. *Ginkgo biloba* extracts and cancer: a research area in its infancy. *Fundam Clin Pharmacol* 2003, 17:405-417.
6. Pekkarinan SS, Heinonen IM, Hopia, AI. Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+) – catechin as antioxidants in methyl linoleate. *J. Sci. Food Agric*. 1999, 79:499-506.
7. Kurt H, Basaran A, Musmul A. Sıçanlarda karbon tetraklorit (CCl₄)'in oluşturduğu oksidatif stresin kateşin ile önlenmesi. *Kocatepe Tıp Dergisi*. 2004, 5:29-34.
8. Akgül A, Ayar A. Yerli baharatların antioksidan etkileri. *Doğa- TR. J. of Agriculture and Forestry*. 1993, 17:1061-1068.
9. Oguz N, Ilnem C, Yener F. Beyin tümörlerin neden olduğu psikiyatrik tablolarda ki olgu sunumu. *Klinik Psikiyatrik Bülteni*. 2005, 15:18-22.
10. Russell LF. Cecil Textbook of Medicine. Philadelphia, Saunders, 2004.
11. Kliehues P, Cavenee WK. WHO Classification of Tumors, Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2000.
12. Altınbas M, Özkan M, Cihan Y, Kaplan B. Yüksek grade'li Astrositom ve Glioblastoma Multiforme hastalarında adjuvan radyoterapi ve fotemustine uygulanması., XV Ulusal Kanser Kongresi, Program ve Bildiri Özet Kitabı, P487, Kemer, Antalya, 2003.
13. Grobber B, De Deyn PP, Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res*. 2002, 310:257-270.
14. Baek WK, Jang BC, Lim JH, Kwon TK, Lee HY, Cho CH. Inhibitory modulation of ATP-sensitive potassium channels by gallate-ester moiety of epigallocatechin-3-gallate. *Biochem Pharmacol*. 2005, 70:1560-1567.
15. Tosun Ş, Karadeniz B. Çay ve çay fenoliklerinin antioksidan aktivitesi. *OMÜ Zir Fak Dergisi*. 2005, 20:78-83.

16. Valko M, Leibfritz D, Moncol Jan, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The Int J of Biochem & Cell Biol.* 2007, 39:44-84.
17. Kasprzak K.S. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. *Free Radical Bio Med.* 2002, 32:958-967.
18. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Biol Interact.* 2006, 160:1-40.
19. Sinha K, Chaudhary G, Gupta YK. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci.* 2002, 71: 655-665.
20. Yanez M, Fraiz N, Cano E, Orallo F. Inhibitory effects of cis- and transresveratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and on monoamine oxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006, 344:688-695.
21. Gu X, Chu Q, O'Dwyer M, Zeece M. Analysis of resveratrol in wine by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A.* 2000, 881:471-481.
22. Sato M, Suzuki Y, Okuda T, Yokotsuka K. Contents of resveratrol, piceid and their isomers in commercially available wines made from grapes cultivated in Japan. *Biosci Biotech Biochem.* 1997, 61:1800-1805.
23. Jannin B, Menzel M, Berlot JP, Delmas D, Lanc A, Latruffe N. Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochem Pharmacol.* 2004, 68:1113-1118.
24. Hung LM, Chen JK, Huang SS, Lee RS, Su MJ. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res.* 2000, 47:549-555.
25. Olas B, Wachowicz B. Resveratrol and vitamin C as antioxidants in blood platelets. *Thromb Res.* 2002, 106:143-148.
26. Galfi P, Jakus J, Molnar T, Neogrady S, Csordas A. Divergent effects of resveratrol, a polyphenolic phytoestrogen, on free radical levels and type of cell death induced by the histone deacetylase inhibitors butyrate and trichostatin A. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005, 94:39-47.
27. Wadsworth TL, Koop DR. Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in raw 264.7 macrophages. *Biochem Pharmacol.* 1999, 57:941-949.

28. Shimizu M, Weinstein IB. Modulation of signal transduction by tea catechins and related phytochemicals. *Mutat Res.* 2005, 225:147-160.
29. Gerhauser C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur J Cancer.* 2005, 41:1941-1954.
30. Zaveri NT. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sci.* 2006, 78:2073-2080.
31. Xuczaj W, Skrzydlewska E. Antioxidative properties of black tea. *Prev Med.* 2005, 40:910-918.
32. Sutherland BA, Rahman RMA, Appleton I. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *J Nutr Biochem.* 2006, 17:291-306.
33. Yilmaz Y. Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Sci Technol.* 2006, 17:64-71.
34. Gramza A, Korczak J. Tea constituents (*Camellia sinensis L.*) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Sci Technol.* 2005, 16:351-358.
35. Nwaha V, Nakajima M, Tong J, Ichikawa S. Solubility study of green tea extracts in pure solvents and edible oils. *J Food Eng.* 1999, 40:161-165.
36. Mendoza-Wilson AM, Glossman-Mitnik D. Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (-)-epicatechin related to their antioxidant ability. *J Mol Struct: Theocem.* 2006, 761:97-106.
37. Dalluge JJ, Nelson BC. Determination of tea catechins. *J Chromatogr A.* 2000, 881:411-424.
38. Rahman RMA, Nair SM, Helps SC, Shaw OM, Sims NR, Rosengren RJ ve ark. Epigallocatechin gallate as an intervention for the acute treatment of cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 2005, 382:227-230.
39. Doss MX, Potta SP, Hescheler J, Sachinidis A. Trapping of growth factors by catechins: a possible therapeutic target for prevention of proliferative diseases. *J Nutr Biochem.* 2005, 16:259-266.
40. Schauer R. Chemistry, metabolism and biological functions of sialic acids. *Adv. Carbohyd. Chem Biochem.* 1992, 40:131-234.
41. Yilmaz Y, Toledo RT. Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Sci Technol.* 2004, 15:422-433.

42. Das M, Vedasiromoni JR, Chauhan SPS, Ganguly DK. Effect of green tea (*Camelia sinensis*) extract on the rat diaphragm. *J Ethnopharmacol.* 1997, 57:197-201.
43. Paulson J. Glycoproteins: what are the sugar chains for? *Trends Biochem Sci.* 1989, 14:272-276.
44. Pan B, Fromholt SE, Hess EJ, Crawford TO, Griffin JW, Sheikh KA, Schnaar RL. Myelin-associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS and PNS: neuropathology and behavioral deficits in single- and double-null mice. *Exp Neurol.* 2005, 195:208–217.
45. Weigel PH, Yik JH. Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2002, 1572:341-363.
46. Raju TS, Briggs JB, Chamow SM, Winkler ME, Jones AJ. Glycoengineering of therapeutic glycoproteins: In vitro galactosylation and sialylation of glycoproteins with terminal N-acetylglucosamine and galactose residues. *Biochem.* 2001, 40:8868-8876.
47. Betenbaugh MJ, Tomiya N, Narang S, Hsu JT, Lee YC. Biosynthesis of human-type N-glycans in heterologous systems. *Curr Opin Struct Biol.* 2004, 14:601-606.
48. Qian J, Liu T, Yang L, Daus A, Crowley R, Zhou Q. Structural characterization of N-linked oligosaccharides on monoclonal antibody cetuximab by the combination of orthogonal matrix-assisted laser desorption/ionization hybrid quadrupole-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and sequential enzymatic digestion. *Anal Biochem.* 2007, 364:8-18.
49. Shamberger R. Serum sialic acid in normals and cancer patients. *J. Clin Chem Clin.* 1984, 22:647-651.
50. Dnistrian A, Schwartz M. Lipid-bound sialic acid as a tumor marker. *Ann Clin Lab Sci.* 1983, 13:137-142.
51. Salvagno L, Ferrazzi E, Sileni V. Lipid bound sialic acid in cancer patients. *Tumori.* 1985, 71:127-133.
52. Erbil K, Jones J, Klee G. Use and limitation of serum total and lipid-bound sialic acid concentrations as markers for colorectal cancer. *Cancer.* 1985, 55:404-409.
53. Sillanaukee P, Pönniö M, Jääkeläinen IP. Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. *Eur J Clin Investing.* 1999, 29:413-425.

- 54.** K okoglu E, Uslu E, Uslu I, Hatemi H. Serum and tissue total sialic acid as a marker for human thyroid cancer. *Cancer Letters*. 1989, 46:1-5.
- 55.** Feijoo C, Paez de la Cadena M, Rodriguez-Berrocal FJ, Martinez-Zorzano VS. Sialic acid levels in serum and tissue from colorectal cancer patients. *Cancer Letters*. 1997, 112:155-160.
- 56.** Bhatavdekar JM, Patel DD, Vora HH. Squamous cell carcinoma antigen and protein-bound sialic acid in the management of head and neck cancer. *Int Biol Markers*. 1991, 6:237-240.
- 57.** Shacter E. Protein oxidative damage. New York, Academic Press, 2000.
- 58.** Schuessler H, Schilling K. Oxygen effect in radiolysis of proteins. Part 2. Bovine serum albumin. *Int. J Radiat. Biol*. 1984, 45:267-281.
- 59.** Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction and disease progression. *J Cell Mol Med*. 2006, 10:389-406.
- 60.** Levine RL, Moskowitz J, Stadtman ER. Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life*. 2000, 50:301–307.
- 61.** Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Milzani A, Rossi R. S-glutathionylation in human platelets by a thioldisulfide exchange-independent mechanism. *Free Radic Biol Med*. 2005, 38:1501–1510.
- 62.** Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med*. 1990, 9:315–325.
- 63.** Stadtman ER, Levine RL. Chemical modification of proteins by reactive oxygen species. New York, John Wiley & Sons, 2006.
- 64.** Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med*. 2003, 9:169–176.
- 65.** Levine RL, Stadtman ER. Carbonylated proteins and their implication in physiology and pathology. New York, John Wiley, 2006.
- 66.** Miyata T, Vanypersle SC, Kurokawa K, Baynes JW. Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia. Origin and significance of “carbonyl stress” in long-term uremic complications. *Kidney Int*. 1999, 55:389–399.

67. Aldini G, Dalle-Donne I, Facino RM, Milzani A, Carini M. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. *Inc. Med Res Rev.* 2007, 6:817–868.
68. Horton AA, Fairhust S. Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. *CRC Crit. Rev. Tox.* 1987, 18:27-69.
69. Niki E. Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phy. Lipids.* 1987, 44:227-253.
70. Aminoff D. Methods for the quantitative estimation of *N*-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem J.* 1961, 81:384-392.
71. Tram TH, Miller JCB, McNeil Y, McVeagh P. Sialic acid content of infant saliva: comparison of breast fed with Formula fed infants. *Archives of Disease in Childhood.* 1997, 77:315-318.
72. Skoza L, Mohos S. Stable thiobarbituric acid chromophore with dimethyl sulphoxide. Application to sialic acid assay in analytical de-O-actylation. *Biochem J.* 1976, 159:457-462.
73. Katapodis N, Hirshaut Y, Geller NC, Stock CC. Lipid-associated sialic acid test for detection of human cancer. *Cancer Research.* 1982, 42:5270-5275.
74. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn B, Shaltiel S, Stadtman E. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990, 186:464–478.
75. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol Reagent. *J Biol Chem.* 1951, 193:265-275.
76. Tsuda H, Ohshima T, Nomoto H, Fujita KI, Matsuda E, Ligo M. Cancer prevention by natural compounds. *Drug Metab Pharmacokinetic.* 2004, 19:245-263.
77. Singh RP, Dhanalakshmi S, Agarwal R. Phytochemicals as cell cycle modulators, *Cell Cycle.* 2002, 1:156-161.
78. Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanisms of action, *J Nutr Biochem.* 2004, 134:3480-3485.
79. Graham AC, Cloughesy TF. Brain tumor treatment: chemotherapy and other new developments, *Semin Oncol Nurs.* 2004, 20:260-272.
80. Avgeropoulos NG, Batchelor TT. New treatment strategies for malignant gliomas, *The Oncologist.* 1999, 4:209-224.

- 81.** Karakaya S. Bioavailability of phenolic compounds, *Cri Rev Food Sci Nutr.* 2004, 44: 453-464.
- 82.** Yang CS, Landau MT, Huang HL, Newmark. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, *Annu Rev Nutr.* 2001, 21:381-406.
- 83.** Navinda PS, Lynn S, Susanne MH, Yantao N, Yanjun Z, Muraleedharan G, David H. In vitro antiproliferative apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice, *J Nutr Biochem.* 2005, 6:360-363.
- 84.** Yılmaz I, Ates B, Ozdemir I, Talas Z, Gul M. Bazı sentetik organoselenyum bileşiklerinin DMBA ile indüklenmiş ratların karaciğer dokuları üzerine koruyucu etkisinin incelenmesi, XIX. Ulusal Kimya Kongresi, 2005, Kuşadası.
- 85.** Schlachterman A, Valle F, Wall K, Azios N, Castillo L, Morell L, Washington A, Cubano L, Dharmawardhane S. Combined Resveratrol, Quercetin, and Catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model. *Trans Onc.* 2008, 1:19-27.
- 86.** Hsieh TC, Wu JM. Suppression of a cell proliferation and gene expression by combinatorial synergy of EGCG, resveratrol and γ -tocotrienol in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. *Int J Onc.* 2008, 33:851-859.
- 87.** Nakagawa BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seram NP, Shishodia S and Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies, *Anticancer Research.* 2004, 24:3-60.
- 88.** Ahmad N, Feyes DN, Nieminen AL, Agarwal R, Muhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3 gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 1997, 89:1881-1886.
- 89.** Yokoyama S, Hirona H, Nakamura V, Kuratsu J. Inhibitory effect of Epigallocatechin on brain tumor cell lines in vitro. *Neuro-Onc.* 2001, 8:35-37.
- 90.** Yücey G, Tuncer R, Gümürlü S, Uçar T, Karasoy M. Beyin tümörlü olgularda tümör belirleyicisi (marker) olarak beyin-omurilik sıvısı siyalik asit/total protein oranı. *Türk Nöroşirürji Dergisi.* 1990, 1:169-172
- 91.** Kakari S, Avgoustatos G, Ferderigos AS. Total and lipid bound sialic acid in the cerebrospinal fluid of patients with brain tumors. *Anticancer Res.* 1984, 4:313-316.
- 92.** Oktar N, Çakır Y, Övüm İ. Total and lipid bound sialic acid in the serum and cerebrospinal fluid of patients with brain tumors. *Turkish Neurosurg.* 1989, 1:76-81.

- 93.** Uslu E, Gözey D, Yazıcılar O. Larenks kanseri ve prognostic faktör olarak sialik asit. *Türk Onkoloji Dergisi*. 2004,19:140-143.
- 94.** D'Archivo M, Santangelo C, Scazzochio B, Vari R, Filesi C, Masella R, Giovannini C. Modulatory effects of polyphenols on apoptosis induction. *Int J Mol Sci*. 2008, 9:213-228.
- 95.** Santoz A, Andrezza A, Nardin P, Funchal C, Gonçalves C, Gottfried C. Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 Glioma cells. *NeuroToxicology*. 2007, 28:886-891.
- 96.** Butterfiel DA, Kappal T, Howard B, Subramaniam R, Hall N, Hensley K, Yatin S, Allen K, Alsenov M, Aksenova M, Carney J. Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the anti-oxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitron and vitamin E. *Ann. New York, Acad. Sci*. 1998, 854:448-462.
- 97.** Tetik Ş, Kaya K, Ekşioğlu-Demiralp E, Yardımcı KT. Oxidized fibrinogen binds less effectively to GpIIb/IIIa and to human platelets than native fibrinogen. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis Proceeding and Abstracts, 19th Int Congress on Thrombosis*. 2006, Abst.: 1154.
- 98.** Uysal N, Gönenç S, Topçu A, Kayatekin BM, Açıköz O. Adölesan Sıçan Beyinde Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve Lipidperoksidasyon Düzeyleri. *Ege Tıp Dergisi*. 2005, 44:75-79.
- 99.** Akyol Ö. Increased lipid peroxidation in schizophrenia: a marker of membrane breakdown. *Eur Psychiatry*. 2002, 17:75-78.
- 100.** Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. 1992, 59:1609 -1623.
- 101.** Porter NA. Chemistry of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 1984, 105:273-283.
- 102.** Dorval J, Leblond VS, Hontela A. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adreno cortical cells of rainbow trout exposed in vitro to endesulfun, organochlorine pesticide. *Aquatic Toxicology*. 2003, 63:229-241.
- 103.** Komatsum M, Hiramatsu M. The efficacy of an antioxidant cocktail on lipid peroxide level and superoxide dismutase activity in aged rat brain and DNA damage in iron-induced epileptogenic foci. *Toxicology*. 2000, 148:143-148.
- 104.** Sudheesh S, Sandhya C, Koshy AS. Antioxidant activity of flavonoids from solanum

melongena. *Phytotherapy Research*. 1999, 13:393-396.

105. Chan P, Cheng JT, Jsaj JC, Cien GS, Chen FC, Chen YS, Hsieh MH. Effect of catechin on the activity and gene expression of superoxide dismutase in cultured rat brain astrocytes. *Neurosci Letters*. 2002, 327:281-284.

106. Goldberg DM, Yan J, Soleas GS. Absorption of three wine related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clinical Biochem*. 2003, 38:79-87.

107. Halder J, Bharduri AN. Protective role of black tea against oxidative damage of human red blood cells. *Biochem and Biophys Communications*. 1998, 244:903-907.

108. Uchiyama M, Miharam M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochem*. 1978, 86:279-286.

109. Najo F, Honda M, Okushio K, Matsumoto N, Ishigaki F, Ishigami T, Hara Y. Effects of dietary tea catechins on α -tocopherol levels, lipid peroxidation and erythrocyte deformability in rats fed on high palm oil and perilla diets. *Biol Pharm Bull*. 1993, 16:1156-1159.

110. Rafat Husain S, Cillard J, Cillard P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochem*. 1987, 26:2489-2491.

111. Kumari MVA, Yoneda T, Hiramatsu M. Effect of β -CATECHIN on the life span of senescence accelerated mice (Sam-P8 strain). *Biochem Mol Biol Int*. 1997, 41:1005-1011.

112. Rice-Evans C. Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochem Soc Symp*. 1995, 61:103-116.

113. Morel I, Lescoat G, Cillard P. Role of flavonoids and iron chelation in antioxidant action. *Method Enzymol*. 1994, 234:437-443.

114. Kowalski J, Samojedny A, Paul M, Pietsz G, Wilczok T. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha genes in J774.2 macrophages. *Pharmacological Reports*. 2005, 57:390-394.