

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

**AKCİĞER EPİTEL HÜCRELERİ OKSİDATİF HASARI ÜZERİNE  
KAFEİK ASİT FENETİL ESTER (CAPE) ETKİNLİĞİNİN  
BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ TEKNİKLERİ  
İLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ  
Altuğ KÜÇÜKGÜL

**Danışman**  
Prof. Dr. Suat ERDOĞAN

**HATAY/2010**

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

**AKCİĞER EPİTEL HÜCRELERİ OKSİDATİF HASARI ÜZERİNE  
KAFEİK ASİT FENETİL ESTER (CAPE) ETKİNLİĞİNİN  
BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ TEKNİKLERİ İLE  
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ  
Altuğ KÜÇÜKGÜL

**Danışman**  
Prof. Dr. Suat ERDOĞAN

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 08L0202  
nolu proje olarak desteklenmiştir.

**HATAY/2010**

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

**AKCİĞER EPİTEL HÜCRELERİ OKSİDATİF HASARI ÜZERİNE  
KAFEİK ASİT FENETİL ESTER (CAPE) ETKİNLİĞİNİN  
BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ TEKNİKLERİ İLE  
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

**Altuğ KÜÇÜKGÜL**

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 09/07/2010 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oy birliğiyle kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi:** Jüri Başkanı: Prof. Dr. Suat ERDOĞAN  
Üye: Prof. Dr. Vahdettin Altunok  
Üye: Doç. Dr. Deniz YILDIZ  
Üye: Yrd. Doç. Dr. O. Hasan ÖZTÜRK  
Üye: Yrd. Doç. Dr. Zafer YÖNDEN

Bu tez enstitümüz Biyokimya (VET) Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Prof. Dr. Oğuz YENİDÜNYA  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Doktora tezım süresince bilgilerini ve deneyimini benden esirgemeyen danıőmanım Prof.Dr. Suat ERDOĞAN'a, tezime yapmış olduğu katkılardan dolayı Biyokimya kürsü arkadaşlarım biyolog Fırat Barıő BARLAS'a, Dr. Vesile DÜZGÜNER'e, biyolog Ayőe KÜÇÜK'e, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sekreteri Zeynep MELEK'e ve saĐlamıő olduğu burstan dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim. Ayrıca gösterdikleri maddi ve manevi destek ile anlayıőtan dolayı ailem: Alaaddin GÜLEÇ, Yrd. Doç. Dr. Azime KÜÇÜKGÜL GÜLEÇ ve Gülhan-Erdoğan KÜÇÜKGÜL'e teőekkürlerimi borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ÖZET.....	IX
ABSTRACT.....	X
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	4
2.1 Fenolik Bileşikler, Propolis ve CAPE.....	4
2.2 Oksidatif Stres, Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi.....	6
2.3 Oksidatif Stres ve Yangı.....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1 Hücre Hattı.....	18
3.2 Hücre Pasajı.....	18
3.3 Denemede kullanılan kimyasallar.....	19
3.3.1 Kafeik asit fenetil ester (CAPE).....	19
3.3.2 Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	19
3.4 Homojenat hazırlama.....	19
3.5 Tripan mavisi boyasıyla canlı-ölu hücre değerlendirilmesi ve hücre sayımı.....	20
3.6 Biyokimyasal Analizler.....	20
3.6.1 Bradford Yöntemi ile Protein Analizi.....	20
3.6.2 Nitrik oksit (NO) Düzeylerinin Belirlenmesi .....	20
3.6.3 Glutatyon (GSH) Analizi.....	21
3.6.4 Katalaz (CAT) Aktivitesi Analizi.....	22
3.6.5 Total Antioksidan Kapasite (TAS) Analizi.....	22
3.6.6 Total Oksidan Kapasite (TOS) Analizi.....	23
3.6.7 Tiazol Mavisi Tetrazolyum Bromid (MTT) Viabilite Testi.....	24
3.7 RNA İzolasyonu .....	24
3.8 cDNA Sentezi ve Reverz Transkripsiyon (RT-PCR).....	25
3.9 Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	25
3.10 İstatistiksel Metod.....	26
4. BULGULAR.....	28
4.1. Spektrofotometrik analiz ve hücre sayımı sonuçları.....	28
4.1.1. Farklı konsantrasyonlardaki H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'in hücre viabilitesi üzerine etkisi.....	28
4.1.2. Farklı konsantrasyonlardaki CAPE'in hücre viabilitesi üzerine etkisi.....	29
4.1.3. Hidrojen peroksitin neden olduğu hücre ölümleri üzerine CAPE'in etkisi.....	31
4.1.4. Hidrojen peroksite maruz bırakılan hücrelerde CAPE'in katalaz aktivitesi üzerine etkisi.....	32

4.1.5. Hidrojen peroksitin neden olduğu NO üretimi üzerine CAPE'in etkisi.....	33
4.1.6. Kafeik asit fenetil ester ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'in glutatyon (GSH) düzeyi üzerine etkileri..	34
4.1.7. Total oksidan kapasite (TOS) üzerine CAPE ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'in etkileri.....	35
4.1.8. Total anti-oksidan kapasite (TAS) üzerine CAPE ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'in etkileri.....	36
4.2. Hidrojen peroksit ile muamele edilen akciğer epitel hücrelerinin morfolojisine CAPE'in etkisi.....	37
4.3. RT-PCR sonuçları.....	40
4.3.1 TNF- $\alpha$ mRNA transkripsiyonu.....	41
4.3.2 iNOS mRNA transkripsiyonu.....	42
4.3.3 IL-18 mRNA transkripsiyonu.....	43
4.3.4 IFN- $\gamma$ mRNA transkripsiyonu.....	44
4.3.5 IL-12 mRNA transkripsiyonu.....	45
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	47
<b>6. SONUÇ</b> .....	52
<b>7. KAYNAKLAR</b> .....	53
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	61

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Kafeik asit fenetil esterinin kimyasal yapısı.....	5
Şekil 2.2. Reaktif oksijen ve azot türlerinin oluşumu.....	6
Şekil 2.3. Serbest radikallerin oluşum reaksiyonları .....	7
Şekil 2.4. Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama.....	7
Şekil 2.5. Serbest radikallerin hücre yapısında meydana getirdiği hasarlar ve sonuçları.....	8
Şekil 2.6. Fenton veya Haber Weiss reaksiyonu sonucu oluşan hidroksil radikalının neden olduğu lipid peroksidasyonu.....	9
Şekil 2.7. Yangı başlatıcı sitokinlerin uyarımıyla NO üretimi ve hücre etkileri.....	10
Şekil 2.8. Reaktif oksijen türleri ve antioksidanlar arasındaki ilişki.....	11
Şekil 2.9. Ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyon.....	12
Şekil 2.10. Hücre içi nükleer faktör kapa B sinyal iletim yolağı ve hücre etkileri.....	15
Şekil 2.11. CAPE'in yangı başlatıcı sitokinleri uyarımıyla NF-kB aktivasyonunu önlemesi...17	17
Şekil 4.1. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'in farklı konsantrasyonlarının hücre viabilitesi üzerine etkisi.....	28
Şekil 4.2. Farklı CAPE konsantrasyonlarının hücre viabilitesi üzerine etkisi.....	29
Şekil 4.3. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100 µM) ile birlikte farklı CAPE konsantrasyonlarının hücre viabilitesi üzerine etkileri.....	30
Şekil 4.4. A549 hücrelerinde CAPE ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'in canlı hücre sayısı üzerine etkisi.....	31
Şekil 4.5. CAPE ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'in akciğer epitel hücrelerinde katalaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	32
Şekil 4.6. A549 hücrelerinde CAPE ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ' in NO üretimi üzerine etkisi.....	33
Şekil 4.7. Akciğer epitel hücrelerinde CAPE ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'in GSH üretimi üzerine etkisi.....	34
Şekil 4.8. A549 hücrelerine CAPE ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulanmasının total oksidan kapasite (TOS) üzerine etkisi.....	35
Şekil 4.9. A549 hücrelerine CAPE ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulanmasının total anti-oksidan kapasite (TAS) üzerine etkisi.....	36
Şekil 4.10. A549 hücreleri kontrol grubu 24. saat mikroskop görüntüleri.....	37
Şekil 4.11. A549 hücreleri H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100 µM) eklenen grupta 24. saat mikroskop görüntüleri...38	38
Şekil 4.12. Akciğer alveoler epitel hücrelerine CAPE (5 µM) eklenen grupta 24. saat mikroskop görüntüleri.....	38
Şekil 4.13. A549 hücrelerine CAPE ön muamalesi sonrası H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> eklenen grupta 24. saat mikroskop görüntüleri.....	39
Şekil 4.14. TNF-α mRNA transkripsiyon seviyeleri.....	41
Şekil 4.15. Gerçek zamanlı PCR'da TNF-α ve β-aktin genleri mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrileri.....	42
Şekil 4.16. iNOS mRNA transkripsiyon seviyeleri.....	42
Şekil 4.17. Gerçek zamanlı PCR'da iNOS ve β-aktin genleri mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrileri.....	43
Şekil 4.18. IL-18 mRNA transkripsiyon seviyeleri.....	43
Şekil 4.19. Gerçek zamanlı PCR'da IL-18 geni mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrileri..44	44
Şekil 4.20. IFN-γ mRNA transkripsiyon seviyeleri.....	44
Şekil 4.21. Gerçek zamanlı PCR'da IFN-γ geni mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrileri...45	45
Şekil 4.22. IL-12 mRNA transkripsiyon seviyeleri.....	46

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Çizelge 1.</b> RT-PCR analizlerinde kullanılan primer baz dizgeleri ve PCR koşulları.....	27
<b>Çizelge 2.</b> IL-12 mRNA transkripsiyon seviyeleri.....	45



## KISALTMALAR DİZİNİ

CAPE	: Kafeik asit fenetil ester
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
O <sup>-2</sup>	: Süperoksit
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
OH <sup>-</sup>	: Hidroksil
SOD	: Süperoksit dismutaz
CAT	: Katalaz
GSH	: Glutasyon
NO	: Nitrik oksit:
TNF	: Tümör nekroz faktör
NF-k $\beta$	: Nükleer faktör kapa B
İk $\beta$	: İnhibitör faktör kappa B
IL	: Interlökin
XO	: Ksantin oksidaz
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
ADP	: Adenozin monofosfat
ATP	: Adenozin tri-fosfat
MPO	: Myeloperoksidaz
HOCL	: Hipokloröz asit
ROO <sup>-</sup>	: Peroksil radikali
LOO <sup>-</sup>	: Lipid peroksitleri
MDA	: Malondialdehit
IFN	: İnterferon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
EC-SOD	: Ekstraselüler SOD
GST	: Glutasyon-S-transferaz
TAS	: Total antioksidan kapasite
TOS	: Total oksidan kapasite
iNOS	: Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
H <sup>+</sup>	: Proton
EDRF	: Endotel kökenli gevşetici faktör
FCS	: Fötal buzağı serumu
MMP	: Mitokondriyal membran potansiyeli
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DEPC	: Dietilpirokarbonat
NAC	: N asetil sistein
DTNB	: 2-Nitrobenzoik asit
TCA	: Triklor asetik asit
TGF	: Tümör büyüme faktörü
Ox-LDL	: Okside düşük dansiteli lipoprotein
PGE	: Prostaglandin
COX	: Siklooksijenaz
IRF	: İnterferon düzenleyici faktör
MTT	: Thiazolil blue tetrazolyum bromid
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium

## ÖZET

### **Akciğer Epitel Hücreleri Oksidatif Hasarı Üzerine Kafeik Asit Fenetil Ester Etkinliğinin Biyokimyasal ve Moleküler Biyoloji Teknikleri ile Araştırılması**

Stres faktörleri organizmada yol açtığı oksidatif ve yangısal hasarlar ile canlılarda yaşlanmadan kansere kadar çeşitli bozukluklara yol açar. Kafeik asit fenetil ester (CAPE), propolisin bileşiminde yer alan antioksidan, anti-inflamatuar ve immünstimulan etkilere sahip fenolik bir bileşiktir. Bu çalışmada hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )'in insan akciğer epitel hücrelerinde (A549) neden olduğu hasara karşı CAPE'in muhtemel antioksidan ve anti-inflamatuar etkileri *in vitro* hücre kültürü ortamında çeşitli spektrofotometrik ve gerçek zamanlı ters transkripsiyon polimeraz zincir (RT-PCR) yöntemleri ile araştırıldı. Yirmi dört saat süresince hidrojen peroksit (100  $\mu M$ ) ile inkübasyonu hücre viyabilitesinde % 41 azalmaya neden olurken, CAPE (5  $\mu M$ ) uygulaması bu kaybı %37 oranında azaltarak koruyucu etki gösterdiği saptandı ( $p < 0.001$ ). Hidrojen peroksidin hücrelere yapmış olduğu hasarda nitrik oksit sentaz (iNOS) tarafından üretilen nitrik oksitin ( $p < 0.001$ ) ve total oksidan kapasite ( $p < 0.001$ ) artışının varlığı saptandı. CAPE uygulaması bu artışları anlamlı derecede azalttığı saptandı ( $p < 0.001$ ). Hidrojen peroksit tarafından düşürülen ( $p < 0.001$ ) antioksidan glutatyon seviyesinin CAPE tedavisi ile anlamlı derecede iyileştirildiği tespit edildi ( $p < 0.001$ ). Total antioksidan kapasite,  $H_2O_2$ 'e maruz bırakılan hücrelerde değişmezken ( $p > 0.5$ ), CAPE tarafından güçlendirildiği saptandı ( $p < 0.001$ ).  $H_2O_2$ 'in inhibe ettiği antioksidan katalaz aktivitesinin ( $p < 0.05$ ) CAPE tarafından önemli düzeyde geri kazandırıldığı tespit edildi ( $p < 0.001$ ). Yangının başlaması ve devamından sorumlu sitokinlerden tümör nekroz faktör alfa, interlökin-18, IL-12 ve interferon gama genleri mRNA transkripsiyonlarında,  $H_2O_2$ 'e maruz bırakılan hücrelerde sırasıyla yaklaşık 65, 4, 8 ve 127 kat artışlar gözlenirken, CAPE uygulamalarının bu artışları önemli düzeylerde giderildiği tespit edildi. Bu çalışmadan elde edilen verilere göre CAPE'in oksidatif strese maruz bırakılan akciğer epitel hücrelerinde oksidatif stres ve yangıya bağlı gelişen hasarları etkin bir şekilde önleyebildiği kanısına varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** CAPE, hidrojen peroksit, A549, epitel hücre, oksidatif stres, yangı.

## ABSTRACT

### **The Investigation of the Action of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Oxidative Damage of Pulmonary Epithelial Cells by Using Biochemical and Molecular Biology Techniques**

Stress factors may lead various disorders in livings such as aging to cancer via oxidative stress and inflammation. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) is a phenolic compound, found in propolis, and has been shown to have antioxidant, anti-inflammatory and immunostimulant properties. In the present study, possible antioxidant and anti-inflammatory properties of CAPE was investigated *in vitro* in human alveolar basal epithelial cells (A549) against hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) caused stress by spectrophotometric and real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). While hydrogen peroxide (100 μM) caused to viability lost by 41% of the cells, CAPE (5μM) treatment reversed the cellular death about 37 % (p<0.001) at 24 h incubation. It was detected that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> caused to increase nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase and enhanced total oxidant capacity (p<0.001) were significantly decreased by CAPE treatment (p<0.001). It was demonstrated that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decreased intracellular antioxidant glutathione level was elevated by CAPE treatment (p<0.001). While total antioxidant capacity of the cells were not changed by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure(p>0.5), CAPE significantly supported (p<0.001). Additionally, CAPE activated catalase activity which was inhibited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p<0.001). Hydrogen peroxide exposure also stimulated the inflammatory response in the alveolar cells. mRNA expressional analyses of proinflammatory cytokines showed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> did elevate tumor necrosis factor alpha, interleukin-18, IL-12 and interferon gamma expressions about 65, 4, 8 and 127 folds, respectively. On the other hand, CAPE treatments significantly reversed elevated cytokine expressions. It was concluded that CAPE has significant protective effects against oxidative stress and inflammation in lung alveolar epithelial cells.

**Key Words:** CAPE, hydrogen peroxide, A549, lung epithelial cells, oxidative stress, Inflammation

## 1.GİRİŞ

İnsanlar birçok oksidatif etkene (sigara dumanı, çeşitli kimyasallar, asbest ve egzoz gazları gibi) inhalasyon yoluyla maruz kalmaktadırlar. Bu stres faktörleri ve zararlı maddeler öncelikle akciğerler olmak üzere (kanser, sistik fibroz v.b.) birçok sistemde kronik maruziyetlerde birçok sistemik olumsuz etki gösteren ciddi sağlık sorunlarını ortaya çıkarmaktadır. Özellikle ülkemizin de içinde bulunduğu gelişmekte olan ülkelerde; solunum yolları rahatsızlıklarına bağlı halk sağlığı ve ekonomik kayıplar oldukça ciddi boyutlardadır. Bu hastalıkların sağaltımlarında kullanılan ilaçların bazı olumsuz yan etkilerinin bulunması araştırmacıları tedavi amaçlı doğal kaynaklardan elde edilen etken maddelere yönlendirmiştir.

Propolis bal arılarının bitkilerden toplandığı reçineli bir maddedir. Bileşiminde, % 30-40 balmumu, % 10-15 esansiyel ve aromatik yağlar, % 5 polen ve % 5 oranında ise organik artıkları içerir (Monti ve ark. 1983, Cirasino ve ark. 1987). Kafeik asit fenetil ester propolisin bileşimde bulunan fenolik bir bileşiktir. CAPE'in yapılan birçok araştırma antioksidan, yangı giderici, antiviral, immun uyarıcı ve tümör oluşumunu önleyici etkilere sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Borelli ve ark. 2002, Son ve ark. 2002, Ahn ve ark. 2004).

Canlılar oksijeni suya kadar indirgeyerek enerji sağlarlar (Atlante ve ark. 2000). Oksijenin mitokondrial metabolizması sırasında reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan birçok ürün meydana gelir. Bunlar süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil ( $OH^-$ ) gibi radikallerdir. ROS'i ksantin oksidaz (XO), sitokrom P450 redüktaz ve glukoz oksidaz gibi mitokondriyal enzimlerin aktiviteleri sonucu elektron taşıma zincirinde açığa çıkarlar (Paramo ve ark. 2010). Reaktif oksijen türleri, hücrelerin protein, lipid ve nükleik asit gibi komponentlerde hasara neden olarak organların fonksiyonlarında bozukluklara yol açarlar. ROS'lerinin üretilmeleri yok edilişlerine üstünlük sağladığı durumlarda oksidatif stresin şiddeti de artar (Fenech ve Ferguson 2001).

Antioksidan savunma sistemi; oksidatif strese karşı enzimatik olan ve enzimatik olmayan moleküllerden oluşur. Enzimatik olmayan moleküller; glutatyon (GSH), askorbik asit, ürik asit ve tokoferollerdir. Enzimatik olanlardan süperoksit dismutaz (SOD),  $O_2^-$  anyonunu, katalaz (CAT) ise  $H_2O_2$ 'i hidrolize ederken, glutatyon bağımlı enzimler [(GSH peroksidaz (GSH-Px), GSH redüktaz, GSH-S-tansferaz)] hem  $H_2O_2$ 'i hem de organik hidroperositleri detoksifiye ederler (Hermes-Lima 2004). Biyolojik sistemlerde ROS'i

özellikle çoklu doymamış yağ asitlerince zengin lipidleri okside ederek lipid peroksidasyonuna neden olur (Jeong ve ark. 2009). Bir tripeptid olan GSH (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinylglycine); hücrede ROS'nin ve elektrofillerin temizlenmesi, tiyol-disülfid yapılarının onarımı ve sinyal aktarımı gibi hücre için çok önemli foksiyonlara sahip olan düşük moleküler ağırlıklı antioksidandır (Halliwell ve Gutteridge 1999). Glutasyon bağımlı enzimler yüksek yapılı canlılarda oksidatif strese dirençte önemli bir yer tutar. Oksidatif koşullar altında *de novo* sentezi artar (Upadhyay ve ark. 2008). Glutasyon membranları lipid peroksidasyonuna karşı korur (Ritola ve ark. 2002). *In vivo* aynı substrata etkili olan iki enzimden katalaz inhibisyonu, tamamlayıcı olarak glutasyon bağımlı enzimlerin aktivasyonlarında artışla sonuçlanır (Bagnyukova ve ark. 2005). Totan ve ark. (2001) CAPE'in, GSH düzeyini arttırarak hücre membranlarını lipid peroksidasyonuna karşı koruduğunu belirtmişlerdir.

Nitrik oksit (NO) oksidatif strese neden olan ve nitrik oksit sentazlar tarafından birçok hücrenin ürettiği, yapısında azot içeren serbest radikaldir. Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri L-arjininden nitratin indirgenmesiyle NO üretimini sağlarlar (Feletou ve ark. 2010). Kan damarları endotelyumunda nitrik oksit sinyali düz kas gevşemesine neden olarak damarlarda kan akımını arttırır. İnsanlarda aterosiklerozda, diyabette ve hipertansiyonda NO sentezinde bozulmalar olduğu birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Saleh ve ark. 2010). TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IFN- $\gamma$  gibi sitokinler, NOS'lar üzerine uyarıcı etki yapar (Khattab ve ark. 2004). Yangı sürecinde oksidatif stresin başlamasıyla NO ve O<sub>2</sub> anyonu, bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilerek salınır ve peroksinitritleri meydana getirirler. Peroksinitrit radikalleri ise DNA'da kırıklara ve lipidlerde peroksidasyona neden olur. Song ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada CAPE'in iNOS katalitik aktivitesini ve gen ekspresyonunu baskılayarak yangı önleyici etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Yine Armutçu ve ark. (2004), CAPE'in antioksidan özelliğinin NOS aktivasyonunu baskılayarak antioksidan etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Transkripsiyon faktörlerinden nükleer faktör kapa B (NF-kB), inhibitör faktör kapa B (iK-B) tarafından sitoplazmada inaktif halde tutulur. Ancak mitojenler, inflamatorik sitokinler (TNF- $\alpha$ , IL-1 gibi), bakteriyel ürünler, protein sentez inhibitörleri, oksidatif stres (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi), ultraviyole ışınları ve forbol esterleri gibi uyarınlar, iK-B'nin fosforilasyonunu sağlayarak, NF-kB'nin hücre çekirdeğine translokasyonuna sebep olurlar. Bunun sonucunda da hücrelerde reaktif oksijen türlerinin üretilmesini sağlarlar (Takada ve ark. 2003, Takaoka ve

ark. 2005). CAPE, NF-kB'nin p65 alt üyesinin hücre çekirdeğine translokasyonunu önleyerek reaktif oksijen türlerinin üretimini baskılar (Marquez ve ark. 2004).

İnsan menşeyli akciğer alveolar bazal epitel (A549) hücre hattının kullanıldığı bu araştırmada, hücrelerde hidrojen peroksit kullanılarak oluşturulan oksidatif stres ve yangı üzerine, CAPE'in oksidatif stresi önleyici ve yangı giderici etkinliği biyokimyasal ve moleküler teknikler kullanılarak araştırıldı.

## 2. GENEL BİLGİ

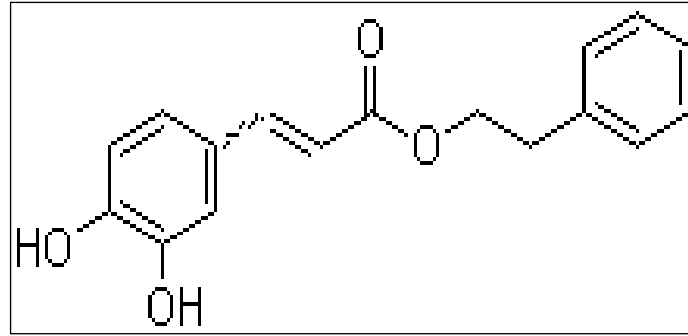
### 2.1. Fenolik Bileşikler, Propolis ve Kafeik Asit Fenetil Ester

Fenolik bileşikler, bitkiler aleminde yaygın ikincil metabolitlerin büyük bir grubunu oluşturup, hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonuna göre değişik gruplara ayrılırlar. Polifenollerin en yaygın grubu C6-C3-C6 flavon iskeleti üzerine kurulmuş olan flavonoidlerdir. Doğada 400'den fazla flavonoid tanımlanmış olup, halka yapılarına göre; flavonoller, flavonlar, flavanonlar, katesinler, antosiyanidinler ve izoflavonoidler gibi isimler almaktadır (Koca ve Karadeniz 2005). Flavonoidlerin lipid oksidasyonu üzerindeki etkileri, peroksi radikalleriyle reaksiyona girmeleri sonucunda elektron transferi yolu ile hidroksil ve süperoksit radikallerini yakalamalarıyla ilişkilidir (Koca ve Karadeniz 2005).

Propolis bal arılarının bitkilerden toplayıp balmumu ile karıştırdığı ve larva gözeneklerine yumurta bırakılmadan önce kovan içi açıklıkların kapatılmasında kullandıkları yapışkan, koyu renkli bir bileşiktir. Propolisin kovan içindeki en önemli işlevi kovandaki arıları hastalık etkenlerine karşı korumaktır. Bileşimindeki başlıca organik madde grupları; flavonoidler, alifatik ve aromatik asitler ile esterleri, alkoller, ketonlar, aldehitler, terpenler, kalkanlar, aminoasitler ve şekerlerdir (Sorkun ve ark. 2001, Kartal ve ark. 2003). İnsanlar propolisi çok eski tarihlerden günümüze kadar antiseptik, antibakteriyal, antifungal, antiviral, nematosidal, yangının giderilmesi, oksidatif stresin önlenmesi, doku yenilenmesinin hızlandırılması, anestezi, tümör oluşumunu önleyici, kapiller damarların güçlendirilmesi, karaciğerin korunması, bağışıklığın uyarılması ve antidiyabetik gibi farklı amaçlarda kullanmışlardır (Hady ve ark. 2002, Kartal ve ark. 2003, Cihangir ve ark. 2005). Antimikrobiyal etkinin temelde reçine içindeki flavonoidler, aromatik asitler ve esterlerden kaynaklandığı belirtilmektedir (Cushnie ve ark. 2007). Antimikrobiyal etkili olan bileşikler krisin, tektkrisin, galangin, isalpinin, 5-hidroksi-4 $\Delta$ ,7-dimetoksiflavon, pinokembrin, rhamnositrin, 3-asetil pinobanksin, kafeik asit, ferulik asit ve kafeik asit esterleridir (Kosalec ve ark. 2003).

Kafeik asit fenetil ester (Şekil 2.1), propolisin yapısında bulunan fenolik bir bileşiktir. Yapılan araştırmalara göre CAPE, antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, immun uyarıcı ve tümör oluşumunu önleyici etkilere sahiptir (Borelli ve ark. 2002, Son ve ark. 2002, Ahn ve ark. 2004, Serafini ve ark. 2010). CAPE yangı önleyici etkisini, hücre membranından

araşidonik asit salınımını önleyerek, siklooksijenaz 1 ve 2 (COX-1 ve COX-2)'nin aktivitesini baskılayarak (Büyükberber ve ark. 2009) veya yangı başlatıcı sitokinler (TNF- $\alpha$  ve IL-1 gibi) uyarımlı NF-kB aktivasyonunu bloke ederek (Marquez ve ark. 2004) gösterir. Antioksidan özelliğini ise lipooksijenaz aktivitesini baskılayarak (Banskota ve ark. 2001) veya ROS ve RNS'nin üretimini engelleyerek (Çetinkale ve ark. 1997) gösterir. CAPE hücre membranını lipid peroksidasyonuna karşı, bir aldehit olan malondialdehit (MDA) (Armutçu ve ark. 2004, Oktar ve ark. 2009) ve tiyol gruplarının onarılmasından sorumlu olan glutatyon (GSH) düzeyini arttırarak (Totan ve ark. 2001) korur. Ayrıca CAPE, hücreleri antioksidan enzimlerden XO (Kartal ve ark. 2003, Çelik ve Erdoğan 2008) MPO (myeloperoksidaz) (Gürel ve ark. 2004) GSH-Px (Çelik ve Erdoğan, 2008), SOD ve CAT (Parlakpınar ve ark. 2005) aktivitelerini arttırarak da oksidatif hasara karşı korur.



Şekil 2.1. Kafeik asit fenetil esterinin kimyasal yapısı

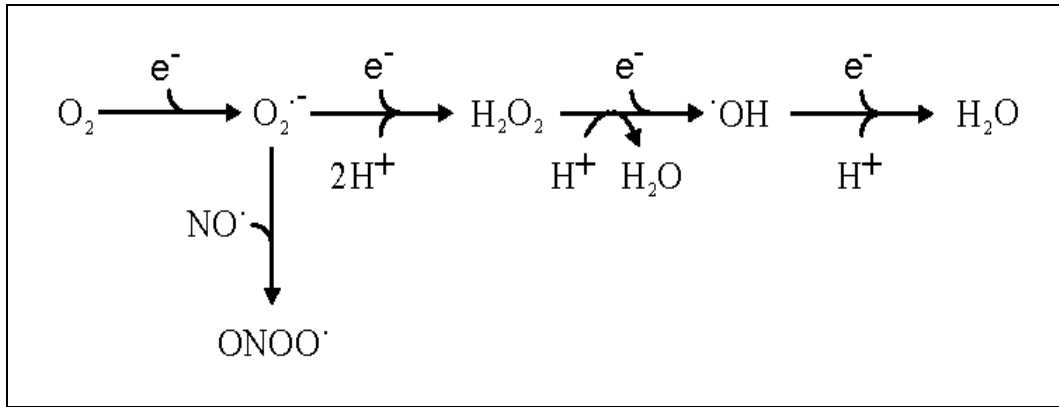
Kafeik asit fenetil ester iNOS gen ekspresyonunu engelleyerek yüksek düzeyde NO üretimini baskılar (Cicala ve ark. 2003, Çelik ve Erdoğan 2008). Ayrıca serbest kalsiyumun endotel hücrelere membran geçişini baskılayarak, damarlarda gevşemeye neden olur (Cicala ve ark. 2003). Araştırmalarda kullanılan CAPE'in oksidatif stresi azaltarak deneysel ortamda kanser önleyici bir bileşik olduğu da ortaya konmuştur (Lee ve ark. 1999). CAPE, bir insan lösemik hücre hattı olan HL-60 hücrelerinde, mitokondriyal bozukluğa, Bcl-2 gen ekspresyonu azalmasına (Down-regülasyon), Bax ekspresyonu artışına (Up-regülasyon) ve kaspaz-3 aktivasyonuna neden olarak apoptozu uyarmaktadır (Chen ve ark. 2001a, Chen ve ark. 2001b).



## 2.2. Oksidatif Stres, Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi

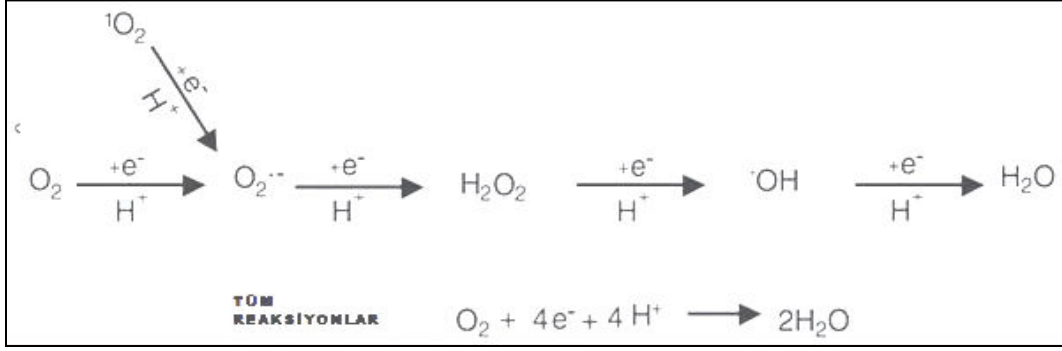
Serbest radikaller; kovalent bağ taşıyan bir molekülün yıkımı, bir elektronun eklenmesi, elektron kaybı veya bir molekülün parçalanması sonucu ortaya çıkar (Schonelch 1999). Klinik ve deneysel tıpta araştırmacılar serbest oksijen radikallerini, reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) olarak ele almaktadır (Şekil 2.2) (Halliwell ve Gutteridge 1999).

Reaktif oksijen ve nitrojen türleri; UV, X-ray ve gama ışınlarına, metal katalizli reaksiyonlarına, atmosfer kirleticilere maruziyet sonucu, yangı sürecinde nötrofil ve makrofojlarda başta olmak üzere birçok hücrede ortaya çıkmaktadır (Cadenas 1989).



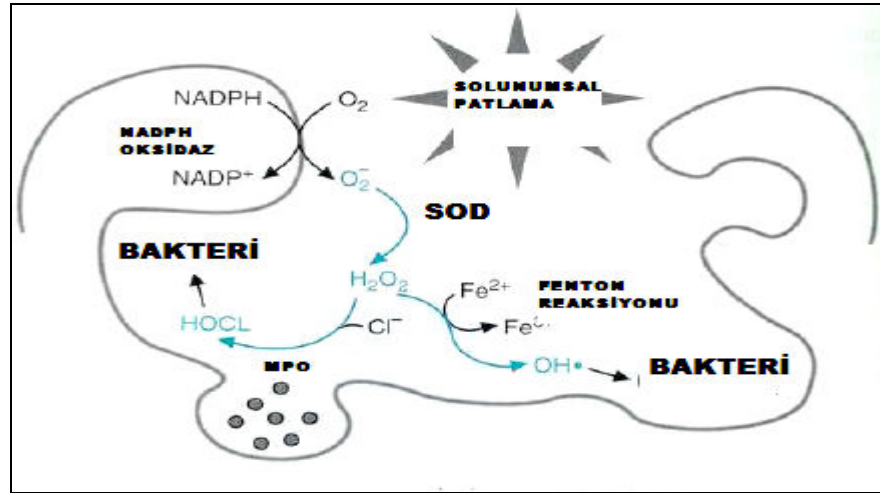
Şekil 2.2. Reaktif oksijen ve azot türlerinin oluşumu

Başlıca serbest radikaller; mitokondriyal elektron transport zinciri, otooksidasyon reaksiyonları, NADPH bağımlı oksidazlar (ksantin oksidaz, sitokrom P450 redüktaz ve glukoz oksidaz gibi), redoks tepkimeleri ve araşidonik asit metabolizması sonucu meydana gelirler. Yangıda fagositik hücreler ROS üretimini oksijen moleküllerini indirgeyerek gerçekleştirir (Seshiah ve ark. 2002). Reaktif oksijen türleri, normal oksijen metabolizması sırasında meydana gelen  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^{\cdot}$  ve  $\text{HOCl}^{\cdot}$  radikallerinden oluşur. Süperoksit anyonu hemen hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur (Şekil 2.3). İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir (Valko ve ark. 2004).



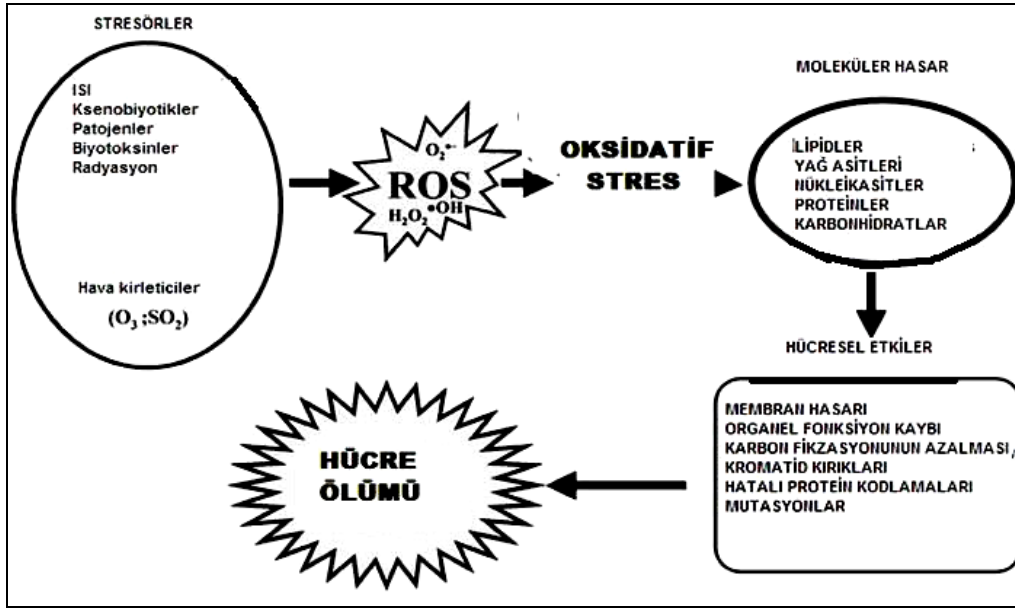
Şekil 2.3. Serbest radikallerin oluşum reaksiyonları (Scandalios 2005)

Reaktif oksijen ve azot türlerinin biyolojik sistemlerde yararlı etkilerinin yanında zararlı etkileri de vardır (Valko ve ark. 2004). Serbest radikallerin yararlı etkilerine, yangı oluşturan etkenlere karşı savunmada ve hücreiçi-hücrelerarası sinyal iletiminde önemli roller oynadıkları örnek olarak verilebilir. Makrofajlar ve nötrofiller, IL-12 ve TNF- $\alpha$  ile uyarıldıklarında patojenlere karşı bakterisidal etkilerini ürettikleri ROS ve RNS ile gösterirler (Şekil 2.4) (Aoki ve Xing 2004).



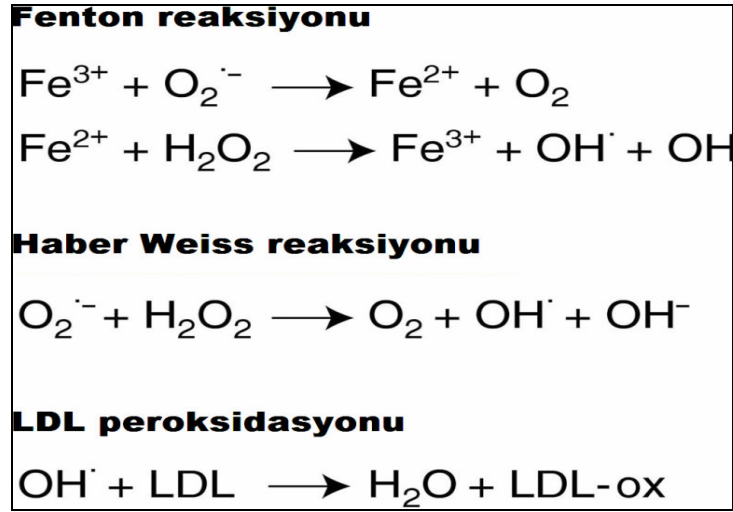
Şekil 2.4. Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama

Düşük ROS konsantrasyonları hücre mitozunu uyarırken, yüksek konsantrasyonları ise nükleik asitler, proteinler ve lipidler gibi hücre makromoleküllerinde yapısal bozukluklar yaparak doku hasarı ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Şekil 2.5) (Poli ve ark. 2004). Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin yaşlanmayla ortaya çıkan nörodejeneratif bozukluklar, artrit, ateroskleroz ve kanser gibi hastalıkların gelişiminde önemli rol oynadığı birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Lovat ve ark. 2004, Saleh ve ark. 2010).



Şekil 2.5. Serbest radikallerin hücresel yapılarda meydana getirdiği hasarlar ve sonuçları (Scandalios, 2005).

Hidrojen peroksit,  $O_2^-$ 'in ortamdaki moleküllerden bir elektron alması sonucu oluşan peroksitin, iki proton ( $H^+$ ) ile birleşmesiyle meydana gelir (Şekil 2.3). Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi,  $O_2^-$  dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar (Desideri ve Falconi 2003). Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde ROS'i kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü  $Fe^{2+}$  veya diğer geçiş metallerinin (Cu, Mn, Cr, Co ve Mo gibi) varlığında 'Fenton reaksiyonu' sonucu,  $O_2^-$  radikali varlığında ise "Haber-Weiss" reaksiyonu sonucu çok reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali ( $OH^\cdot$ ) oluşturur (Şekil 2.6) (Cho ve ark. 2009).

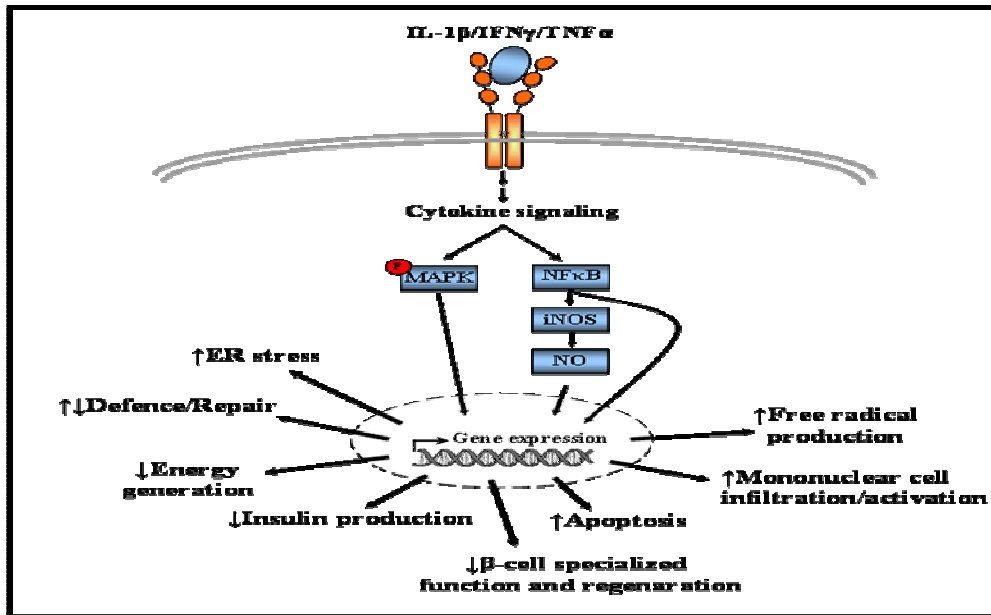


Şekil 2.6. Fenton veya Haber Weiss reaksiyonu sonucu oluşan hidroksil radikalının neden olduğu lipid peroksidasyonu

Reaktif oksijen türleri özellikle çoklu doymamış yağ asitlerince zengin lipidlerde değişiklik yaparak lipid peroksidasyonuna sebep olur (Şekil 2.6). Hücre membranlarındaki yağ asitleri ve kolesterolün doymamış bağları serbest radikaller ile reaksiyona girerek peroksidasyon oluşur. Lipid peroksidasyonunu başlatıcı faktör  $\text{OH}^{\cdot}$  radikalidir (Nyska ve Kohen 2002).  $\text{OH}^{\cdot}$  radikali, yağ asitlerinin metilen moleküllerinden bir proton ( $\text{H}^+$ ) çıkararak lipid radikalini ( $\text{L}^{\cdot}$ ) oluşturur ve sonrasında bu radikal oksijen molekülüyle reaksiyona girerek lipid peroksit radikalini ( $\text{LOO}^{\cdot}$ ) meydana getirir. Lipid peroksit radikali ise diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna neden olan zincirin başlamasına neden olur (Piga ve ark. 2007). Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki asıl önemi lipid peroksidasyonundaki etkileriyle ilgilidir. Geçiş metalleri lipid peroksidasyonunu başlatmaktan çok, sentezlenmiş olan lipid hidroperoksitlerinin ( $\text{LOOH}^{\cdot}$ ) parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize ederler (Marnett ve ark. 2002).

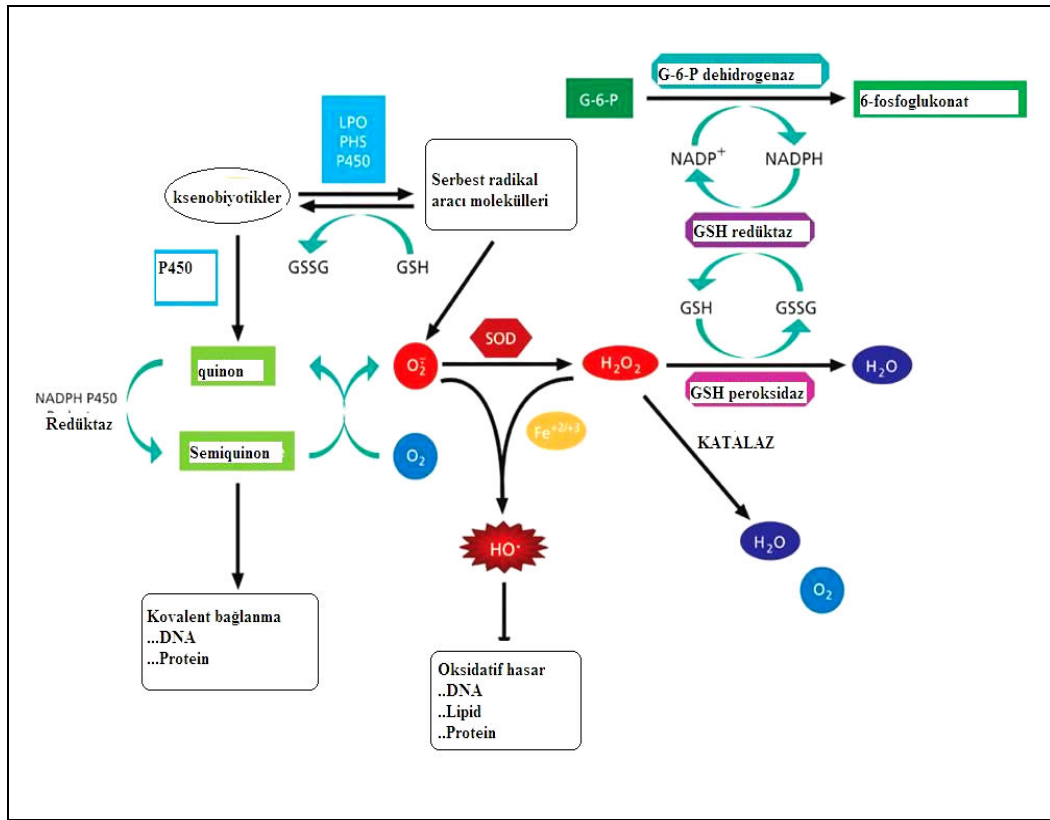
Endotelial kökenli salınım faktörü olan NO, nitrik oksit sentaz enzimlerinin L-arjinindeki inorganik nitratı indirgemesiyle meydana gelir. Kan damarları endotelinde nitrik oksit sinyali, düz kas gevşemesine neden olarak kan akımını artırır. Aynı zamanda prooksidatif ve antioksidatif sinyal etkilerine de sahiptir (Aldetron ve ark. 2001). Yarı ömrü çok kısa olan lipofilik özellikteki bu radikal, bir atom azot ile oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden oluşur. Nitrik oksit sentaz (NOS)'lar sinir dokuda, vasküler endotelde, trombositlerde ve diğer dokularda eksprese edilir. Nitrik oksit sentazın nöronal NOS (tip I,

nNOS), endotelial NOS (tip III, eNOS) ve uyarılabilir NOS (tip II, iNOS) olmak üzere farklı lokalizasyon ve düzenlenmeye sahip üç izoenzimi vardır (Chiues 1999, Carr ve ark. 2000). Yangı sürecinde oksidatif stresin başlamasıyla NO ve O<sub>2</sub> anyonu bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilerek salınır. Bu moleküller birbirleriyle etkileşime girerek kuvvetli bir oksidatif radikal olan peroksinitriti (ONOO<sup>-</sup>) meydana getirirler (Şekil 2.2). Bu radikal ise DNA'da kırılmalara ve lipid peroksidasyonuna neden olabilir. İnsanlarda aterosklerozda, diyabette ve hipertansiyonda NO sentezinde artışlar olduğu belirtilmiştir (Saleh ve ark. 2010). Song ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada CAPE'in iNOS'un katalitik aktivitesini ve gen ekspresyonunu baskılayarak yangı önleyici etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Yine Armutçu ve ark. (2004), CAPE'in NOS aktivasyonunu baskılayarak antioksidan etki gösterdiğini saptamışlardır. Tümör nekroz faktör alfa, IL-1 ve IFN- $\gamma$  nitrik oksit sentazlar üzerine uyarıcı etki yaparak yangının başlamasına neden olurlar (Shami ve ark. 1995). Akciğerlerde yüksek seviyede NO üretiminden sorumlu hücreler epitel hücreleri, makrofajlar, monositler ve eosinofillerdir (Coleman, 2002). Epitel hücre kültürlerinde TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  gibi sitokinler iNOS ekspresyonunu uyarır (Şekil 2.7) (Berkman ve ark. 1996). Nitrik oksitin endotel hücreler, düz kas hücreleri, hepatositler ve fibroblast gibi çok farklı hücre tiplerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu ve poliaminlerin sentezinde görevli ornitin dekarboksilaz enzim aktivitesini baskılayarak hücre proliferasyonunu azalttığı belirtilmiştir (Santarelli ve ark. 2006). Wang ve ark. (2003) nöroblastoma hücrelerinde NO'nun p53 aracılığı ile apoptozu uyardığını belirtmişlerdir.



Şekil 2.7. Yangı başlatıcı sitokinlerin uyarımıyla NO üretimi ve hücresel etkileri

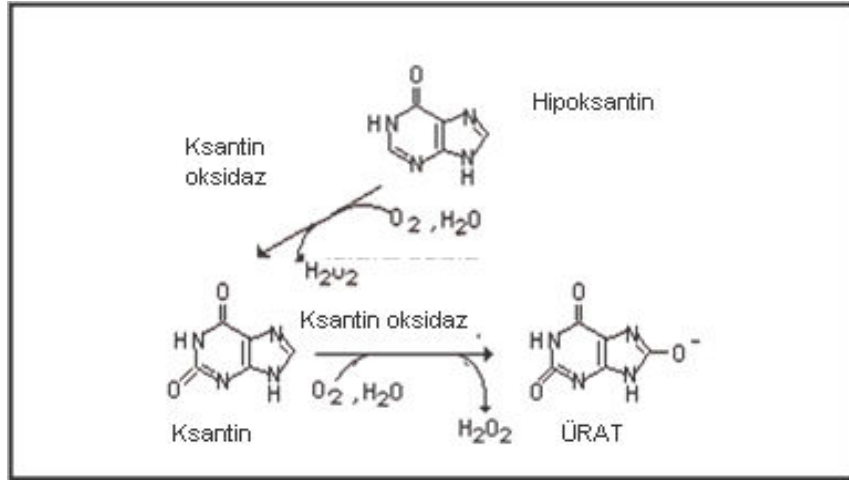
Süperoksit dismutaz, CAT, GSH-redüktaz ve GSH-peroksidaz enzimatik antioksidanlar, vitaminler (Vitamin E, C ve karotenoidler), tiyol antioksidanlar (glutasyon, tiyoredoksin, lipoik asit gibi), doğal flavonoidler, melatonin gibi moleküller non-enzimatik antioksidanları oluşturur (Mates ve ark. 1999). İyi bir antioksidan serbest radikalleri belirli bir şekilde ortadan kaldırır, redoks tepkime veren metalleri tutar, diğer antioksidanların aktivitelerini tetikler, gen ekspresyonunu pozitif etki eder, organizmada kolayca emilir, membran ve sulu ortamlarda da oldukça fonksiyoneldir (McCall ve Frei 1999).



Şekil 2.8. Reaktif oksijen türleri ve antioksidanlar arasındaki ilişki.

Ksantin oksidaz (XO) insanların içinde olduğu birçok türde purin katabolizmasında çok önemli rollere sahip bir enzimdir. XO hipoksantini ksantine, ksantini ürik asite dönüştüren reaksiyonları katalizler (Şekil 2.9). Bu sırada moleküler oksijen indirgenerek  $O_2^-$  anyonu açığa çıkar (Valko ve ark. 2004). Ksantin oksidaz hasarlanmamış dokularda bir dehidrojenaz olarak vardır, pürinlerin yıkılım yolunda hipoksantinden ksantin ve ksantinden ürik asit oluşumu basamaklarında elektron akseptörü olarak moleküler oksijenden daha çok nikotinamid adenin dinükleotid ( $NAD^+$ ) kullanır (Zanotto ve ark. 2008). Kartal ve ark. (2003)

yaptıkları çalışmada, akciğer ve böbrekte CAPE'in XO aktivitesini baskılayarak antioksidan özellik gösterdiğini belirtmişlerdir.



Şekil 2.9. Ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyon.

Süperoksit dismutaz, süperoksit serbest radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan bir enzimdir (Wondrack 2009). Süperoksit dismutazın fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri,  $O_2^-$  anyonunun neden olduğu lipid peroksidasyonuna karşı korumaktır. Ayrıca SOD fagosite edilmiş bakterilerin hücre içinde öldürülmesinde de rol oynar (Burduk ve ark. 2005). Gürel ve ark. (2004) yaptıkları bir çalışmada CAPE'in, yanık kaynaklı doku hasarının meydana getirdiği oksidatif strese azalan SOD aktivitesini önemli derecede arttırdığını göstermişlerdir.

Katalaz bitki, hayvan hücrelerinde ve aerobik bakterilerde bulunan bir enzimdir. Katalaz ( $H_2O_2$  oksidoredüktaz) yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Katalaz esas olarak peroksisomlarda daha az olarak sitozolde bulunur. Hidrojen peroksiti suya ve oksijene parçalar. Hidrojen peroksitin yanında metilhidroperoksit ve etil hidroperoksit gibi lipidlerde peroksidasyona neden olan moleküllerin parçalamasını da sağlayarak hücreleri solunumsal patlamaya karşı korur (Mates 1999). Parlakpınar ve ark. (2005) genisteinle oluşturdukları oksidatif stres modelinde CAPE eklenmesinin azalan SOD ve CAT aktivitelerini iyileştirdiğini rapor etmişlerdir.

Bir tripeptid olan glutatyon (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinylglycine), hücrede ROS'nin ve elektrofillerin temizlenmesi; tiyol-disülfid yapılarının onarımı ve sinyal aktarımı gibi hücre için çok önemli fonksiyonlara sahip olan düşük moleküler ağırlıklı antioksidandır (Halliwell ve

Gutteridge 1999). Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)'ın selenyum bağımlı ve selenyum bağımsız (Glutasyon-S-transferaz, GST) olmak üzere iki tane alt izoformu vardır.

Yüksek konsantrasyonda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indirgenmiş glutasyonun (GSH) okside glutatyona (GSSH) dönüşümünü sağlar. Bu reaksiyonda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suya dönüştürülerek detoksifiye edilir. Böylelikle membran lipidlerini peroksit anyonuna karşı koruyarak membran bütünlüğünü ve hemoglobini oksidatif strese karşı korur (Conner ve ark. 2002). Tiyol gruplarının (-SH) etkin olarak hücreyi koruyabilmesi için büyük kısmı GSH redüktazlar tarafından katalizlenen reaksiyonla redükte halde tutulması gereklidir (Kristina ve ark. 2007). Okside şekli serbest radikallerin inhibisyonuna, indirgenmiş sülfidril gruplarının stabilizasyonunda ve tokoferol ile askorbatın rejenerasyonunda görevlidir (Armstrong 1998). Öncelikle araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere karşı GST'ler selenyum bağımsız GSH-Px aktivitesi gösterirler (Upton ve ark. 2009). Frenkel ve ark. (1993) yaptıkları çalışmada CAPE'in insan polimorf çekirdekli lökositlerde oksidatif patlamayı baskıladığını, ayrıca nötrofillerde ise ROS'lerinin üretimini bloke ettiğini göstermişlerdir. Totan ve ark. (2001) CAPE'in korneal neovaskülerizasyonda ve lens epitel hücrelerinin dönüşümünün baskılanmasında GSH düzeyini artırarak koruyucu bir etki de gösterdiğini belirtmişlerdir.

### 2.3. Oksidatif Stres ve Yangı

Oksidatif stres, artan hücre içi serbest radikal moleküllerine karşın antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalmasıyla ortaya çıkar (Aquilano ve ark. 2007). *In vitro* koşullardaki araştırmalarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidatif stres oluşturmada iyi bir model olarak bilinir (Bi ve ark. 2008). Hidrojen peroksit, oksidatif hasarı ATP sentezini bozarak ve serbest radikal oluşumunu arttırarak gerçekleştirir (Jiang ve ark. 2004). Hidrojen peroksit ve demir bir fenton reaksiyonu ile etkileşime girerek nükleik asitler, lipidler ve proteinler gibi makromolekülleri okside edebilecek çok güçlü bir molekül olan OH<sup>-</sup> reaktifi açığa çıkar (Cho ve ark. 2009). Hidrojen peroksit ve OH<sup>-</sup> radikalleri hücre sel makromoleküllerde fonksiyonel ve yapısal bozulmalara neden olarak apoptozu uyarırlar (Hwang ve Yen 2008). Hidrojen peroksit özellikle DNA'da tek veya çift zincir kırıklarına yol açarak zarar verebilir. Aynı zamanda DNA molekülüne metal geçişini sağlayarak da dolaylı olarak zarar verebilir (Halliwell ve Gutteridge 1999).

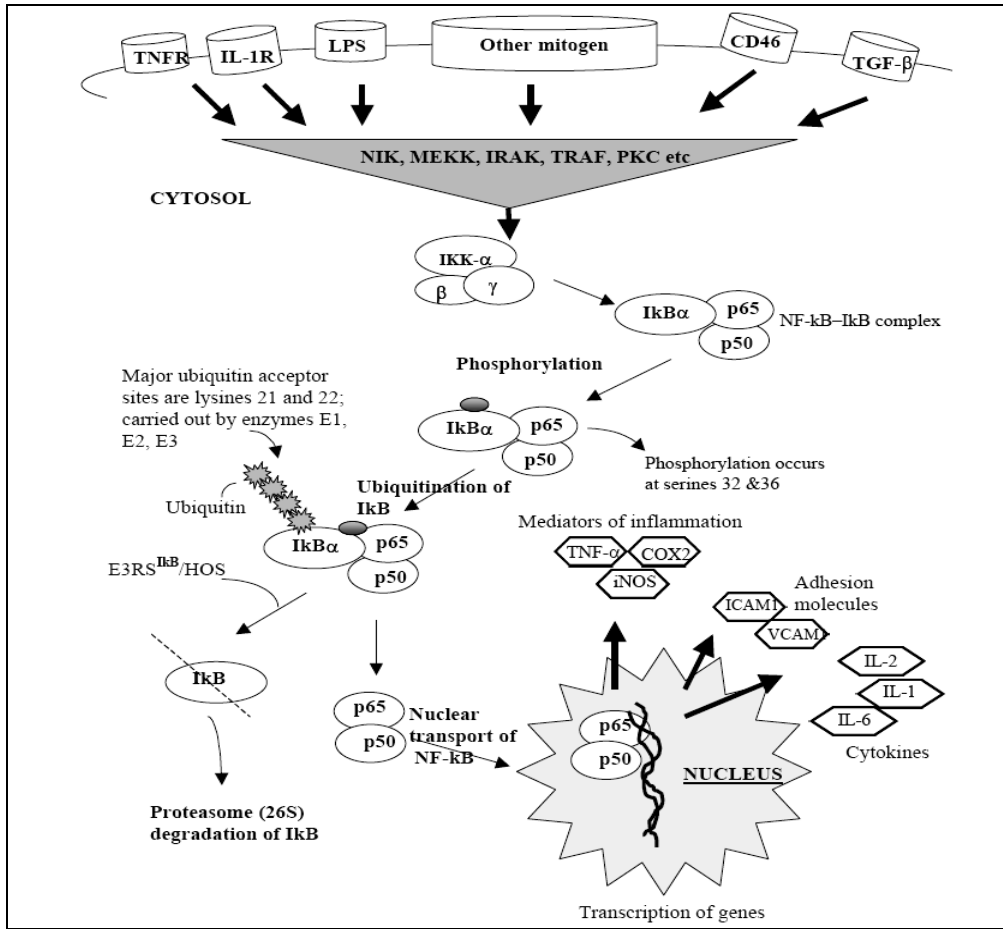


Mitokondri uyarımlı apoptotik yolak, mitokondriyal membran potansiyelinin (MMP) azalması ve yetersiz ATP üretimi ile ilişkilidir (Hwang ve Yen 2008). Hidrojen peroksit uyarımlı apoptoz, MMP'de düşme, sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımı ve kaspazların aktive edilmesinden kaynaklanır (Jung ve ark. 2007, Yu ve ark. 2008). Xu ve ark. (2008) sıçan PC12 hücrelerine 24 saat süreli H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının mitokondriyal depolarizasyona neden olduğunu göstermişlerdir. Crispo ve ark. (2010) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uyarımlı apoptozun, poli-ADP riboz polimeraz (PARP) ve ölüm reseptör aracılı yollarla meydana geldiğini ileri sürmüşlerdir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar özellikle nörodejeneratif hastalıklarda meyvelerden elde edilen antioksidan özellikteki polifenollerin, hücreleri ROS uyarımlı apoptozdan koruduğu yönündedir (Martin 2006). Günümüzde yapılan çalışmalarda araştırmacılar, oksidatif stres mekanizmalarını araştırmak için *in vitro* şartlarda hücreleri H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uyarımlı apoptozdan korumak amacıyla birçok polifenol bileşiğin (epigallokateşin gallat, metil galat, gallik asit, NAC) antioksidan etkileri ve etkinliklerini araştırmıştır (Sasaki ve ark. 2002, Piga ve ark. 2007). Crispo ve ark. (2010) PC12 hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uyarımlı apoptozun kaspaz 9, DNA fragmentasyonu ve mikondriyal depolarizasyona neden olduğunu göstermişlerdir.

Nükleer faktör kapa B (NF-kB), bağışıklık sisteminde önemli roller üstlenen bir transkriptör faktördür (Bonizzi ve Karin, 2004). Sitokin, iNOS, siklooksijenaz 2 (COX-2), büyüme faktörleri ve apoptoz inhibitörlerinin ekspresyonunu düzenler (Memet 2006). Memelilerde NF-kB ailesi p50, p52, RelA (p65), c-Rel ve RelB proteinleri olmak üzere 5 üyeden oluşur (Hoffman ve ark. 2006). İnhibitör faktör kapa B (iK-β)'nin baskılanmasıyla sitoplazmada inaktif halde tutulur. Ancak mitojenler, yangı başlatıcı sitokinler (TNF-α, IL-1 gibi), bakteriyel ürünler, protein sentez inhibitörleri, oksidatif stres, ultraviyole ışık ve forbol esterleri gibi uyaranlar iK-B'nin fosforilasyonunu sağlayarak, NF-kB'nin hücre çekirdeğine translokasyonuna neden olur ve hücrede serbest radikal üretimi başlar (Takaoka ve ark. 2005). Li ve ark. (2000) CAPE'in, insan koroner arter endotel hücrelerinde, okside-LDL aracılı NF-kB aktivasyonunu inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Kemoterapide CAPE'in intestinal karsinogenezi baskıladığı (Mahmoud ve ark. 2000) ve türevlerinin ağız kanserini önlemede potansiyel ajanlar olduklarını belirtilmiştir (Lee ve ark. 2000). Marquez ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada CAPE'in farklı inflamatorik ve reaktif oksijen türleri uyarımlı NF-kB

bağımlı gen ekspresyonunu azaltarak veya NF- $\kappa$ B p65 alt üyesinin hücre çekirdeğine geçişini engellediğini belirtmişlerdir.



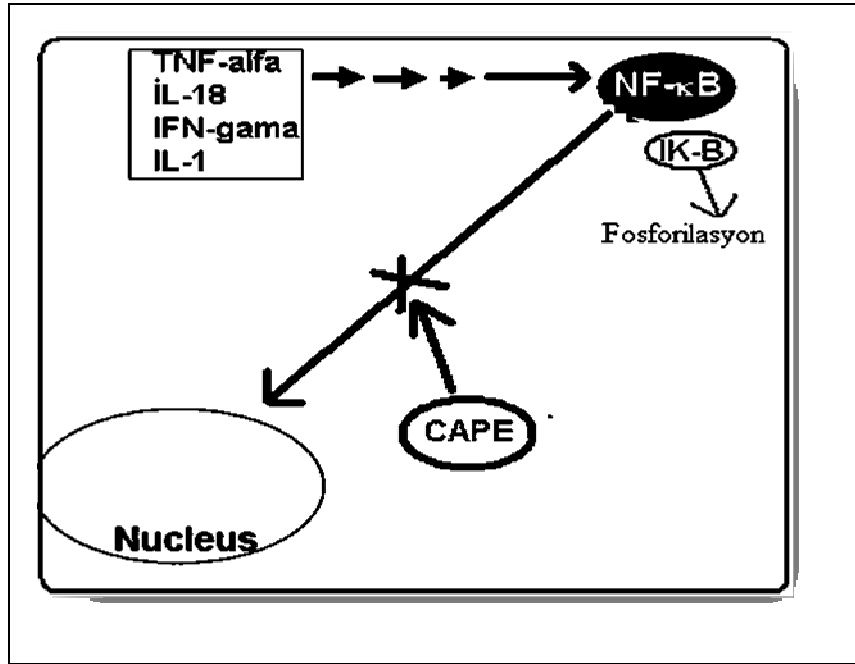
Şekil 2.10. Hücre içi nükleer faktör kapa B sinyal iletim yolağı ve hücre sel etkileri (Tripathi ve Aggarwal 2006)

Sitokinler yangının başlaması ve devamından sorumlu polipeptidlerdir. Sitokin sekresyonu, bakteriyel ürünler, immün kompleksler, toksinler ve fiziksel etmenler tarafından uyarılabilir. Sitokinler başlıca 3 etkiye sahiptir. Birincisi sistemik akut faz reaksiyonlarını tetikleyici etkileridir. Aktive olmuş makrofajlardan salınan IL-1 ve TNF- $\alpha$  akut faz proteinlerinin kan değerlerindeki artışı, ateş oluşumu ve iştah kaybından sorumludurlar. İkincisi, endotelial etkilerdir. Lökositlerin adezyonuna, prokoagulan aktivitesine ve trombosit kümeleştirici faktör (TAF) aktivasyonuna etki ederler. Üçüncüsü; fibroblastik etkileridir. Kollagen sentezi ve fibroblast proliferasyonunu arttırırlar (Drenth ve ark. 1995). Özellikle IL-1 ve TNF- $\alpha$  birçok ortak biyolojik özellikleri paylaşan proinflamatuvar (yangı başlatıcı) sitokinlerdir. Her ikisi de aktive makrofajlar, lenfosit ve diğer hücre tipleri tarafından sentezlenirler (Park ve Barbul 2004).

Tümör nekroz faktör, immüno-inflamatuar reaksiyonlarda parakrin ve otokrin salınımlı düzenleyici bir sitokindir. Aynı zamanda birçok hücre tipinde büyüme ve farklılaşmayı düzenler. Özellikle interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) ile birlikte sitotoksik etki gösterir. Tümör nekroz faktör alfa ve IL-8, nötrofillerin kemotaksisi ve aktivasyonuna neden olur. Yapılan çalışmalarda, TNF- $\alpha$ 'nın akut inflamasyonda ve antitümöral bağışıklıkta çok önemli rollere sahip bir sitokin olduğunu göstermektedir. Nötrofil ve endotel hücrelerini uyararak adezyonun ve kemotaksisin gerçekleşmesini sağlar. Tümör nekroz faktör alfa monositler, makrofajlar, T ve B hücreleri, alveolar hücreler ve bazofiller gibi birçok hücre tipinde üretilmektedir (Gardner ve ark. 2003). Fibroblastların ve endotel hücrelerinin TNF- $\alpha$  aracılı proliferasyonu yara iyileşmesinde önemlidir. Ayrıca TNF- $\alpha$ , endotelyal vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM)'nün sentezinde önemli bir uyarıcı etkiye sahiptir. Reaktif oksijen türleri yangı başlamasında etkili olan TNF- $\alpha$  gen transkripsiyonuna neden olur. TNF- $\alpha$  hücrel sinyal yollarından iK-B'nin NF-kB'den ayrılmasına ve bunun sonucu olarakta NF-kB'nin hücre çekirdeğine geçişi gerçekleşerek gen ekspresyonu şekillenir (Rimal ve ark. 2005). Kafeik asit fentenil ester yangı önleyici etkisini ROS veya TNF- $\alpha$  uyarımlı NF-kB aktivasyonunu engelleyerek gösterir. (Ha ve ark. 2009, Toyoda ve ark. 2009, Liao ve ark. 2010).

İnterlökin 1 ise başlıca antijen sunan hücreler [monosit ve makrofajlar, langerhans hücreleri, dendritik hücreler, endotelyal hücreler, T lenfositleri, doğal öldürücü hücreler (NK), astrositler ve keratinositler] olmak üzere tüm çekirdekli hücrelerden sentezlenebilir (Dinarello ve ark. 2002, Gardner ve ark. 2003). İnterlökin 1 (IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ ) aynı zamanda siklooksijenaz-2 (COX-2), fosfolipaz A2 ve iNOS'un aktivatörüdür. Kafeik asit fenetil ester, IL-1 ve IL-18 gibi yangı başlatıcı sitokinlerin uyardığı NF-kB hücreiçi sinyal iletim yolağını bloke ederek yangının devamlılığını önler (Kyungsun ve Chulhee 2008). İnterlökin 1'e maruz kalmış hücrelerde yüksek miktarda protaglandin 2 (PGE-2) ve NO üretimi meydana gelir (Witowski ve ark. 2004).

İnterlökin-12, yardımcı T lenfositlerin farklılaşmasını ve aktivasyonunu sağlayan bir sitokindir (Sinigaglia ve ark. 1999). Birçok hücrede İFN- $\gamma$  üretimini ve litik etkisini artırır (Foti ve ark. 2006). İnterlökin 18, IL-1 ailesinin bir üyesi olup, yangının başlamasında önemli etkiye sahiptir. İmmun ve inflamatorik hastalıkların gelişim sürecinde ekspresyonu artar. Chandrasekar ve ark. (2003) kardiyomyositlerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uyarımlı oksidatif streste NF-kB aktivasyonuna bağlı olarak İL-18 mRNA transkripsiyonunun uyarıldığını göstermişlerdir.



Şekil 2.11. CAPE'in yangı başlatıcı sitokinleri uyarımıyla NF-κB aktivasyonunu önlemesi.

Kafeik asit fenetil ester, NF-κB ailesinden olan IFN salınımını düzenleyici faktör (IRF-1) ile IRF-8 ve IL-12-P35 ile IL12-P40 RNA ekspresyonunu baskılar (Jayakumar ve ark. 2008). NF-κB normalde sitozolde iκB'ye bağlı olarak inaktif halde tutulur. Ancak inflamasyon ve ilişkili genlerde gen transkripsiyonlarının artışı, NF-κB'yi aktif hale getirerek hücre çekirdeğine geçişine neden olur ( Linder ve ark. 2007). Literatürlerde CAPE'in NF-κB inhibisyonunu farklı yollarla gerçekleştirdiği rapor edilmiştir. T hücrelerin de CAPE NF-κB'yi direk olarak baskıladığı gibi, aynı zamanda iκB-α'nın fosforilasyonun baskılanması yoluyla da dolaylı olarak gerçekleştirebildiği belirtilmiştir (Orban ve ark. 2000, Marquez ve ark. 2004). Önce yapılan çalışmalarda, IL-12'nin "kapa B" bölgeleri var olduğu ve bu sitokinlerin transkripsiyonunda NF-κB'nin spesifik etkili rolünün olduğu, böylelikle CAPE'in NF-κB blokajıyla üretiminin engellenebileceği öne sürülmüştür (Liu ve ark. 2003, Jayakumar ve ark. 2008).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hücre Hattı

Araştırmada insan alveoler bazal epitel hücre hattı (A549) kullanıldı. Akciğer alveollerini kaplayan Skuamoz tip görünüşe sahip bu hücreler, su ve elektrolitler gibi maddelerin difüzyonundan sorumlu olmakla birlikte sürfektan madde salınımıyla akciğer alveollerini dışsal etkenlerden korumaktadır. Akciğer epitel hücreleri Dr. Mazella C. tarafından Paris Fransa'dan temin edildi.

#### 3.2. Hücre Pasajı

Akciğer alveol hücreleri %10 oranında ısı ile inaktif edilmiş fetal sığır serumu (FBS-Sigma) ve 100 IU/ml penisilin/streptomisin (Sigma) içeren DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium-Sigma) besi medyumunda (tam besi yeri) 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 hava bulunduran steril inkübatörde (Hera-Cell 150, Thermo) inkübe edildi. Hücrelerin çoğaltılması için yaklaşık 1x10<sup>6</sup>/ml sayıda hücre 20 ml medyum bulunan 75 cm<sup>2</sup> steril kültür kabına (flask) (Nunc, USA) konarak iki günde bir medyum değiştirilmek şartıyla inkübasyona bırakıldı. 3-5 gün süreyle hücre üremesi yeterli yoğunluğa ulaştığında 1/3 oranında pasajlandı. Çalışma grupları oluşturulurken flask tabanına yapışan hücreler 1-2 ml/75 cm<sup>2</sup> flask % 0,025 Tripsin/EDTA (Sigma) kullanılarak kaldırıldı. Sonra hücreler toplanarak oda ısısında 400 g ve 5 d süreyle santrifüj edildi. İşlem sonunda medyum atılarak dipte kalan hücre peleti 1ml taze komple medyumla kaldırıldı. Hücreler nazikçe al-ver yöntemiyle homojen olmaları sağlandı. Mikroskop (Olympos-CKX41) altında hücre sayımı tripan mavisi ile bir hemositometre (Neubauer Assistent) yardımıyla belirlenerek deneme grupları için ihtiyaç duyulan hücre sayısı flasklara eklendi.

### **3.3. Denemede kullanılan kimyasallar**

#### **3.3.1. Kafeik asit fenetil ester (CAPE)**

Araştırmada kullanılan CAPE, dimetil sülfoksit içinde (DMSO-Sigma) çözdürüldü. Çalışma süresince kullanılan CAPE konsantrasyonu elde edilen viabilite kontrollerine göre 5 µM/ml olarak belirlendi. Her uygulamada CAPE eklenmesi, hidrojen peroksit uygulamalarından 2 saat önce yapılarak inkübasyon periyotları bu süreden sonra başlatıldı.

#### **3.3.2. Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Araştırmada kullanılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Germany) konsantrasyonu, 24 saat inkübasyon sonrası viabilite kontrolleriyle 100 µM/ml olarak belirlendi. Çalışma süresince %30'luk stok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stoğundan bu konsantrasyonu sağlayan miktar (hücre medyumunda çözdürüldü) hücrelere uygulandı.

### **3.4. Homojenat hazırlama**

İnkübasyon sonrası hücreleri yapışmış oldukları hücre kültürü zemininden kaldırmak için 25 cm<sup>2</sup>'lik flaslara 300 µl tripsin (% 0,025) eklenerek 1-2 d beklendi. Daha sonra flasklar hafif çırpma hareketiyle hücrelerin kalkmaları sağlandı. Suspense hücreler pipet ile toplanarak ependorf tüplere aktarıldı. Daha sonra oda ısısında 400 g devir 5 d süreyle santrifüj edilerek hücre peletleri elde edildi. Homojenatlar hazırlanırken PBS (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-pH:7) ile 2 kez yıkandıktan sonra tekrar santrifüj edildi ve üzerlerine içerisinde %1 triton X-100 (Merck), 50 mM HEPES pH 7.2, 10 mM EDTA, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O ve %8 oranında proteaz inhibitor kokteyli [aprotinin, fenilmetansülfonilflorid (PMSF), leupeptin, sodyum florid] bulunan lizis bafır eklendi. Deterjanla çözünmeyen hücresel proteinler 12 000 g, 4 °C'de 10 d süreyle santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Süpernatantların protein düzeyleri Bradford metodu ile ölçüldü.

### **3.5. Tripan mavisi boyasıyla canlı-ölü hücre değerlendirilmesi ve hücre sayımı**

Tripan mavisiyle ölü hücreler boyanırken canlı hücreler boyanmaz. Çünkü canlı hücrelerde membran bütünlüğü bozulmadığından boya sitoplazmaya geçemez (Leszczynski ve ark. 2001). Seyreltilmiş hücre süspansiyonundan 20 µl alınarak, üzerine aynı miktarda tripin mavisi solüsyonu eklenerek pipetle al-ver yöntemiyle karışmaları sağlandı. Hemositometre laminanın (Neubauer Assistent) her iki bölümüne hücre-metilen mavisi karışımından 1'er damla damlatıldı. Lam üzerindeki bulunan dört karedeki hücreler invert mikroskop altında sayıldı ve ortalama sayıyı belirlemek için dörde bölündü. Elde edilen hücre sayıları 'x10<sup>4</sup>' olarak ifade edilerek kaydedildi. Görüntüler özel ataçmanlı dijital fotoğraf makinesi (Olympus C-7070) ile fotoğraflandı.

### **3.6. Biyokimyasal Analizler**

#### **3.6.1. Bradford Yöntemi ile Protein Analizi**

Bu yöntemin prensibi, boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250'nin, negatif yüke sahip olması nedeniyle protein üzerindeki pozitif yüke bağlanmasıdır. Bu boyanın kırmızı ( $\lambda_{\max} = 465\text{nm}$ ) ve mavi ( $\lambda_{\max} = 595\text{nm}$ ) olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Protein bağlanmasının göstergesi, kırmızı formun mavi forma dönüşüdür. Yöntem: test gruplarındaki hücrelerin flasklardan bir kazııcı aparat yardımıyla toplanması ve homojenize edilmesini takiben örneklerden 20 µl alınarak üzerine 200 µl Bradford ayracı ve 580 µl distile su ilave edilerek test tüpleri hazırlandı. Tüpler oda ısısında 10 d bekletildikten sonra, spektrofotometre (Shimadzu)'nin 595 nm ışık dalga boyunda absorbans değeri ölçüldü. .Sığır serum albumininin farklı standart konsantrasyonları hazırlanarak elde edilen standart eğriden örneklerin protein düzeyleri hesaplandı (Bradford, 1976).

#### **3.6.2. Nitrik oksit (NO) Düzeylerinin Belirlenmesi**

Akciğer epitel hücrelerinin bulunduğu flasklardan 24 saat inkubasyon sonucu elde edilen medyumlardaki NO seviyeleri ölçüldü. Nitrik oksit yarı ömrü çok kısa olan bir moleküldür. Bu nedenle NO üretimi, nitrik oksitin öncül molekülleri olan nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) ve nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) düzeylerinin saptanmasıyla hesaplanmaktadır. Bu amaçla çalışma da, Costas ve

Wakid (1990) tarafından geliştirilen 'Griess metodu' uygulama için kullanıldı. Bu metod takip edilerek; kadmiyum granülleri (2-25 g), süzgeç kağıdından süzdürülerek 3 kez deiyonize su ile yıkandı. Daha sonra granüller glisin-NaOH tampon II (15 g/L, pH=9.7) içinde 5 mmol/L  $\text{CuSO}_4$  solüsyonunda 5 d karıştırılarak aktive edildi. Her test grubundan 300  $\mu\text{l}$  miktar alınarak, üzerlerine 250  $\mu\text{l}$  75 mmol/L  $\text{ZnSO}_4$  ve 350  $\mu\text{l}$  55mmol/L NaOH eklendi. Bu karışım 10000 x g rotor hızında 4°C'de 3 d santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlardan 750  $\mu\text{l}$  pipetlenerek farklı ependorf tüplere alındı ve üzerlerine 250  $\mu\text{l}$  glisin tampon I (45 gr/L pH: 9.7) ilave edildi. Bu tüplere yukarıda belirtildiği gibi aktifleştirilen kadmiyum granüllerinden bir pens yardımıyla her tüpe bir granül olacak şekilde eklendi. 10 d karıştırıldıktan sonra hazır hale gelen örneklerden 300  $\mu\text{l}$  alınıp üzerlerine 1125  $\mu\text{l}$  ayıraç 1 (N-naftil etilen diamin) ve 1200  $\mu\text{l}$  ayıraç 2 (sülfanilik asit, 3 mmol/L HCL) eklendi. Örnek yerine su ilave edilerek hazırlanan köre karşı spektrofotometrenin 546 nm ışık dalga boyunda absorbans ölçümleri yapıldı. Elde edilen veriler  $\mu\text{mol/ml}$  protein cinsinden hesaplanıp kaydedildi.

### 3.6.3. Glutasyon (GSH) Analizi

İndirgenmiş glutasyon (GSH) düzeylerinin ölçümü, Sedlak ve Lindsay (1968) tarafından geliştirilen metoda göre yapıldı. Bu yöntemin prensibi, reaksiyona ilave edilen 5,5-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB, Merck)'in ortamda bulunan sülfidril grupları tarafından indirgenmesi sonucu, 1 mol sülfidril karşılık 1 mol 2-nitro-5-merkaptobenzoik asit oluşumuna dayanmaktadır. Özetle metotta şu aşamalar takip edildi. Elde edilen hücre süpernatantlarından 250  $\mu\text{l}$  alınıp aynı miktarda % 10'luk triklor asetik asit (TCA, Sigma) ile karıştırılarak 8600 rpm rotor hızında 15 d santrifüj edildi. Deproteinize edilen örneklerden 250  $\mu\text{l}$  alınıp temiz tüplere aktararak üzerlerine 2 ml 0.3 M'luk  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ilave edildi. Üzerlerine 250  $\mu\text{l}$  DTNB eklenip vorteksle karışımları sağlandıktan sonra 5 d oda ısısında bekletildi ve daha sonra spektrofotometrede 410 nm ışık dalga boyunda distile suya karşı okunarak  $\mu\text{mol/mg}$  protein olarak kaydedildi.



### 3.6.4. Katalaz (CAT) Aktivitesi Analizi

Farklı test gruplarından 24 saat inkübasyon sonucu elde edilen hücre homojenatlarında katalaz aktivite tayini Luck (1965) tarafından geliştirilen metod kullanılarak yapıldı. Bu yöntemin prensibi  $H_2O_2$ 'in ışık spektrumunun ultraviyole dalga boyunun azalmasıyla artan bir absorbans vermesine dayanır. Uygun bir tampon içinde (PBS) bulunan  $H_2O_2$ 'nin örnekte bulunan katalaz etkisiyle yıkılması sonucu 240 nm absorbansta azalma görülür. Absorbansta gözlenen azalma hızı katalaz aktivitesi ile doğru orantılı olarak kabul edilir.

Fosfat tamponu (1/15 mmol/L; pH=7) için 3.522 g.  $KH_2PO_4$  ve 14.61 g.  $Na_2HPO_4$  distile suda çözüldü ve 1 L'ye tamamlanarak pH 7'ye ayarlandı. Fosfat tamponunda  $H_2O_2$  çözeltisi (10 mM), % 30'luk  $H_2O_2$  çözeltisinden 0.16 ml alınarak daha önce hazırlanmış olan fosfat tamponunun 100 ml'sinde seyreltildi. Her örneğin analizinden önce örnekte bulunabilecek maddelerin neden olabileceği absorbans yükselmesi saptamak ve sadece örnekten kaynaklı farkın elde edilmesi amacıyla kör deney tüpleri hazırlandı. Kör deney tüpü için quartz küvete 2.95 ml fosfat tamponu üzerine 50 µl numune eklendi. Spektrofotometre her örneğin kendisine ait kör deney olarak kabul edilen bu küvete göre sıfırlandı. Test işaretli quartz küvetlere ise 2.95 ml fosfat tampon içinde hazırlanmış  $H_2O_2$  çözeltisi kondu ve üzerlerine 50 µl örnek eklenerek tam karışım sağlanması için küvetler alt-üst edilerek spektrofotometreye yerleştirildi. 240 nm ışık dalga boyunda 30 s içinde absorbanslarda meydana gelen azalmalar takip edilerek "k" hız sabiti elde edildi. Okunan değerler µmol/mg protein cinsinden hesaplanarak kaydedildi.

### 3.6.5. Total Antioksidan Kapasite (TAS) Analizi

Demir-2-o-dianisidine kompleksi,  $H_2O_2$  ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü düşük pH'da renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidil radikallerini meydana getirirler. Dianisidil radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumunu arttırmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 2000).

TAS düzeyleri yukarıda belirtilen prensiplere dayanan ticari kitler (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılarak analiz edildi. Bu amaçla kitte bulunan Reagent 1'den 800

$\mu\text{l}$  alındı ve üzerlerine 50  $\mu\text{l}$  örnek eklenerek spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda ilk ölçümler yapıldı ve kaydedildi. Sonrasında bu test tüplerine 125  $\mu\text{l}$  Reagent 2 eklenerek 10 d oda ısısında tutuldu ve tekrar 660 nm absorbans değerleri ölçülerek kaydedildi. Aynı işlemler standardın 660 nm'de absorbansını ölçmek için örnek yerine standart solüsyonu eklenerek gerçekleştirildi. Okunan değerler aşağıdaki formülde yerlerine konarak net değerler hesaplanarak  $\mu\text{mol Trolox Eqiv./L}$  olarak kaydedildi.

Sonuç =  $(\Delta \text{ Abs Std 1} - \Delta \text{ Abs Örnek} / \Delta \text{ Abs Std 1} - \Delta \text{ Abs Std 2}) \times \text{Std 2 değeri}$

$\Delta \text{ Abs Std 1} = \text{Std 1'in 2. absorbans değeri} - \text{Std 1'in 1. absorbans değeri}$

$\Delta \text{ Abs Std 2} = \text{Std 2'in 2. absorbans değeri} - \text{Std 2'in 1. absorbans değeri}$

$\Delta \text{ Abs örnek} = \text{Örneğin 2. absorbans değeri} - \text{Örneğin 1. absorbans değeri}$

### 3.6.6. Total Oksidan Kapasite (TOS) Analizi

Örneklerdeki oksidanlar, ferroz-iyon şelatör kompleksini ferrik iyonla okside eder. Ferrik iyonlar asidik ortamda kromojenle renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, örneklerdeki oksidan moleküllerin toplam miktarı ile ilişkilidir. Bu testte kalibratör olarak hidrojen peroksit kullanılır. Sonuçlar her litredeki eşdeğer mikromolar hidrojen peroksit göre belirlenir (Erel 2005). Örneklerdeki TOS düzeyleri yukarıda belirtilen prensibe dayanan ticari kitler (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılarak analiz edildi. Bu amaçla kitede bulunan Reagent 1'den 1000  $\mu\text{l}$  alındı ve üzerlerine 150  $\mu\text{l}$  örnekler eklenerek spektrofotometrede 530 nm dalga boyunda ilk ölçümler yapıldı ve kaydedildi. Sonrasında bu test tüplerine 50  $\mu\text{l}$  Reagent 2 eklenerek 10 d oda ısısında tutularak tekrar 660 nm absorbans değerleri ölçülerek kaydedildi. Aynı işlemler standardın 660 nm'de absorbansını ölçmek için örnek yerine standart solüsyonu eklenerek gerçekleştirildi. Okunan değerler aşağıdaki formülde yerlerine konarak net değerler  $\mu\text{mol H}_2 \text{ O}_2 \text{ Eqiv./L}$  cinsinden hesaplanarak kaydedildi.

Sonuç =  $(\Delta \text{ Abs Std 1} - \Delta \text{ Abs Örnek} / \Delta \text{ Abs Std 1} - \Delta \text{ Abs Std 2}) \times \text{Std 2 değeri}$

$\Delta \text{ Abs Std 1} = \text{Std 1'in 2. absorbans değeri} - \text{Std 1'in 1. absorbans değeri}$

$\Delta \text{ Abs Std 2} = \text{Std 2'in 2. absorbans değeri} - \text{Std 2'in 1. absorbans değeri}$

$\Delta \text{ Abs örnek} = \text{Örneğin 2. absorbans değeri} - \text{Örneğin 1. absorbans değeri}$

### 3.6.7. Tiazol Mavisi Tetrazolyum Bromid (MTT) Viabilite Testi

Tiazol Mavisi Tetrazolyum Bromid kullanılarak bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle nicel olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlıklı hücrelerde mitokondrial redüktazlar tarafından MTT'nin tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon mitokondrial bir enzim olan süksinat dehidrogenaz aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir (McGahon ve ark. 1995). Bu amaçla 24 kuyucuklu pleytlerde deneme grupları oluşturuldu. 24 saatlik inkübasyon sonucu kuyucuklardan süpernatantlar alınarak yerlerine PBS'te çözdürülmüş MTT ayracı eklendi. %5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C'lik inkübatörde 90 d, bekletildi. Daha sonra her bir kuyucuğa 1 ml izopropil alkol/HCL ayıracından eklenerek 5 d beklendi. Oluşan formazan ürünlerinin çözdürülmesi sağlandı. Kuyucuklardaki süpernatant ependorflara alınarak inkübatörde her bir deneme grubu kuyucuklarındaki süpernatantlar alınarak ependorflara alındı. Örnekler spektrofotometrenin 595 nm ışık dalga boyunda okunarak kaydedildi.

### 3.7. RNA İzolasyonu

İnkübasyonlar sonucu test gruplarının bulunduğu 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklardaki medyumlar atıldı. ve hücreler steril bir kazıyıcı yardımıyla kaldırılarak ependorf tüplere alındı. Üzerlerine 1 ml RNA izolasyon reaktifi (Trizol Reagent, Sigma) eklendi ve vorteksle karıştırıldı. Tüpler oda ısısında 5 d bekletildikten sonra 12000 g, 4° C'de 10 d santrifüj edildi. Süpernatantlar otoklav edilmiş 1,5ml'lik ependorflara aktarılarak oda ısısında 5 d bekletildi. Sonra tüplere 0.2 ml kloroform ilave edilip, 15 saniye süreyle vortekste karıştırıldı. Daha sonra oda ısısında 15 d bekletilen örnekler 12000 g ve 4°C'de 15 d santrifüj edildi. Santrifüj sonrası meydana gelen üç fazdan üstteki renksiz fazlar (RNA içerir) yeni ependorf tüplere alınıp, üzerlerine 0.5 ml izopraponol (Merck) ilave edildi. Tüpler oda ısısında 5-10 d süreyle tutulduktan sonra 12000 g 10 d süreyle santrifüj edilerek RNA peletlerinin oluşması sağlandı. Peletler üzerindeki süpernatantlar alınıp RNA % 75'lik etil alkol (Merck) ile yıkanması sağlandı. RNA vorteks edilip, 7500 g'de 5 d süreyle tekrar santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlar atıldıktan sonra RNA'lar 10-15 d süreyle hava akımında kurutulması sağlandı. Her tüpteki RNA peletleri üzerine 25-30 µl su (DEPC water-dietilpirokarbonatlı su) ilave edilip, birkaç kez al-ver muamelesiyle pipetlenerek çözümleri sağlandı.

Total RNA miktarları ve saflıkları spektrofotometrede 260 nm ( $OD_{260}$ ) ve 280 nm ( $OD_{280}$ ) ışık dalga boylarında değerler alınarak belirlendi. RNA/DNA oranları ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) 1.7-2.0 aralığındaki olan örneklerin saflığı yüksek kabul edilip, cDNA (komplementer-tamamlayıcı DNA) sentezinde kullanıldı.

### **3.8. cDNA Sentezi ve Reverz Transkripsiyon (RT-PCR)**

Elde edilen total RNA'lardan cDNA sentezi eldesinde şu metod takip edildi. Otoklavdan geçirilmiş 0.2 ml ependorf tüplere her bir örnek tüpünden 1-2 µg total RNA alınıp üzerlerine 1 µl oligo (dT-18) primer eklendi. Daha sonra bu tüpler DEPC uygulanmış su ile 12 µl'ye tamamlandı. Karışım 3-5 saniye 13000 g'de santrifüj edilip termal saykırda (Toshiba) 70° C'de 5 d reaksiyona tabi tutuldu. Süre sonunda karışım buz içinde soğutuldu ve santrifüj edilerek tüpün dibinde toplanması sağlandı. Tüpün üzerine 4 µl 5x reaksiyon tamponu, 1 µl revertAid m-multi-v reverz transkriptaz, 1 µl ribolock ribonükleaz inhibitör (20 U/µl) ile 2 µl dNTP (2 mM) karışımı konulup karıştırıldı (Fermentas, Germany). Kısa süreli santrifüj sonrası test tüpleri termal saykırda yerleştirilerek 42° C'de 60 d süre ile RN'lar cDNA'lara dönüştürüldü. cDNA sentezinin tamamlanması için tüpler 70°C'de 10 d inkübe edildikten sonra PCR kullanımına hazır hale getirildi ve kullanılmıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

### **3.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi, genetik materyaller (DNA ve RNA) üzerinde seçilmiş bir bölgenin *in vitro* şartlar altında ilgili gen bölgelerine spesifik oligonükleotid primerler ve *Taq* polimeraz enzim kullanılarak bir otomatik termal saykırda çoğaltılması metodudur. PCR reaksiyonunda temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır. Birincisi denatürasyon (DNA çift zincirinin açılması), ikincisi primerlerin spesifik oldukları gen bölgesine yapışması (annealing) ve üçüncüsü ise zincir uzaması (extention)'dır. Spesifik olmayan yapışmaların olmaması için döngü sayısı genellikle 30-40 olacak şekilde sınırlandırılır. Kısaca PCR reaksiyonu için test tüpler şu şekilde hazırlandı. Örneklerden elde edilen cDNA'lardan 1 µl alınarak, üzerlerine 0.5 U DNA *Taq* polimeraz içeren Syber Green

PCR mastermiks (Fermentas) ve mRNA üzerinde çoğaltılmak istenen genlere spesifik bir çift primer (oligonükleotid) ilave edildi.

Reaksiyonda 100 ng düzeyinde TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-18 ve iNOS spesifik primerleri literatürde belirtilen baz dizgeleri sentezi yaptırılarak kullanıldı (Tablo 1). DNA amplifikasyonu PCR yöntemi ile anlık PCR sistemi (Real-Time PCR, Stratagene, USA) kullanılarak yapıldı. Amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait kopya eşiği (Ct) değerleri karşılaştırılarak, hedef genlerin mRNA transkripsiyon düzeylerinin nisbi değişimleri  $2^{-DDCt}$  metodu ile hesaplandı (Paffl, 2001). Bu hesaplamada;  $DDCt = (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{beta actin}})_{\text{denek grubu}} - (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{beta actin}})_{\text{kontrol grubu}}$  formülü uygulandı; hesaplanan değer her bir gen için  $2^{-DDCt}$  formülünde yerine konularak mRNA transkripsiyon düzeyi misli olarak down- ya da up-regüle şeklinde belirlendi. Her örnek için kontrol gen olarak kabul edilen beta aktin geni (housekeeping gen) düzeltme için kullanılarak transkripsiyon seviyesi istenilen genlerdeki transkripsiyon seviyeleri hesaplanarak kaydedildi. Real Time PCR sisteminde Syber Green (Fermentas, Germany) boyası çift iplikcikli DNA parçasına bağlanarak elektriksel impuls ile birlikte floresan ışımaya yapar ve bu ışımaya sistemin lazer dedektörü tarafından alınarak bilgisayar ortamında grafik formatına çevrilir. Ölçülen floresans şiddeti PCR ürününün miktarı ile doğru orantılıdır. Daha sonra gruplar arasındaki farklar misli (katı) cinsinden tablolarda verildi.

### 3.10. İstatistiksel Metod

Araştırmada elde edilen veriler, SPSS 9.05 (Statistical Package for Social Sciences) programında, One-way ANOVA varyans analizi yöntemi kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar Duncan testi ile belirlendi.  $p < 0.05$  ve altı istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Değerler ortalama  $\pm$  standart hata (S.E) şeklinde verildi.

Çizelge 1. RT-PCR analizlerinde kullanılan primer baz dizgeleri ve PCR koşulları

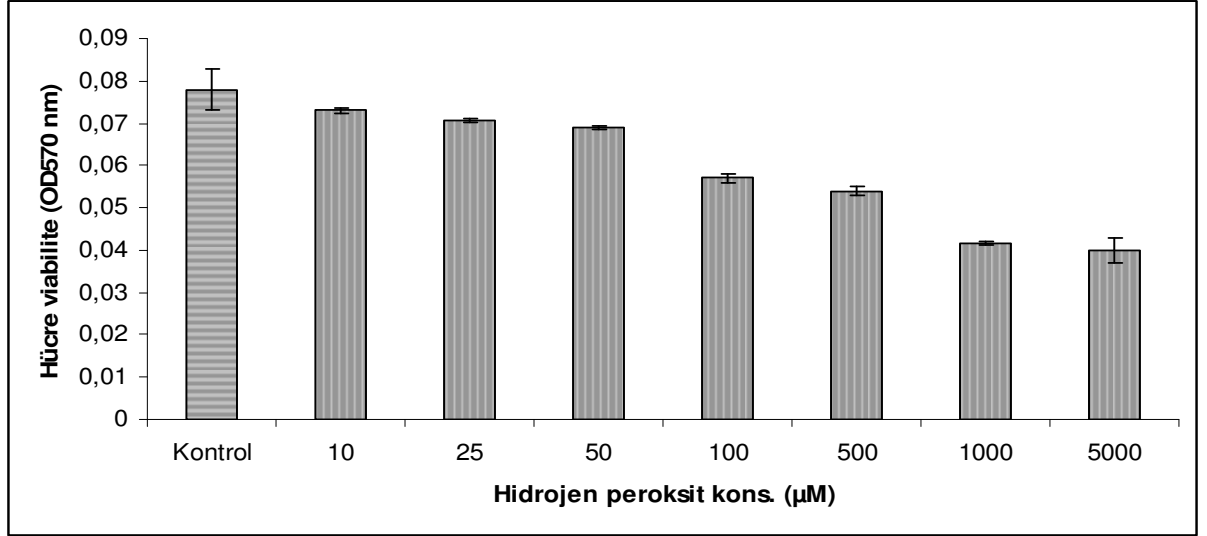
Transkript	Primer sekansları		PCR programları
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	R	5' CCT TGG TCT GGT AGG AGA CG 3'	Başlangıç 95°C 10d 95°C 45sn 60°C 1d 72°C 45sn
	F	5' CAG AGG GAA CAG TTC CCC AG 3'	
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	R	5' GGG TTG GGG GTG TGG TGA TGT 3'	Başlangıç 95°C 10d 95°C 15sn 58°C 1d 72°C 30sn
	F	5' TCC GAG GCA AAC AGC ACA TTC A 3'	
<b>iNOS</b>	R	5'TCC ATG CAG ACA ACC TT 3'	Başlangıç 95°C 10d 95°C 45sn 56°C 1d 72°C 45sn
	F	5' GGC CTC GCT CTG GAA AGA 3'	
<b>IL-12</b>	R	5' TGG GTC TAT TCC GTT GTG TC 3'	Başlangıç 95°C 10d 95°C 45sn 57°C 1d 72°C 45sn
	F	5' CCA AGA ACT TGC AGC TGA AG 3'	
<b>IL-18</b>	R	5' GCA TCT TAT TAT CAT GCT CTG GCA C 3'	Başlangıç 95°C 10d 95°C 45sn 60°C 1d 72°C 45sn
	F	5' GGC AAG CTT GAA TCT AAA TTA TGT C 3'	
<b>B-act</b>	R	5' CGT GGC CAT CTC TTG CTC GAA G 3'	Başlangıç 95°C 10d 95°C 45sn 56°C 1d 72°C 45sn
	F	5' CAT CGT CAC CAA CTG GGA CGA C 3'	

## 4. BULGULAR

### 4.1. Spektrofotometrik analiz ve hücre sayımı sonuçları

#### 4.1.1. Farklı konsantrasyonlardaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in hücre viabilitesi üzerine etkisi

24 kuyucuklu kültür kaplarındaki akciğer epitel hücrelerine (A549 hücreleri) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in farklı konsantrasyonları (10-5000 µM) eklendi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda MTT metoduyla viabilite kontrolleri yapıldı. Buna göre 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen grupta, canlı hücre sayısı kontrol grubuna göre anlamlı bir düzeyde azaldığı tespit edildi (Şekil 4.1).

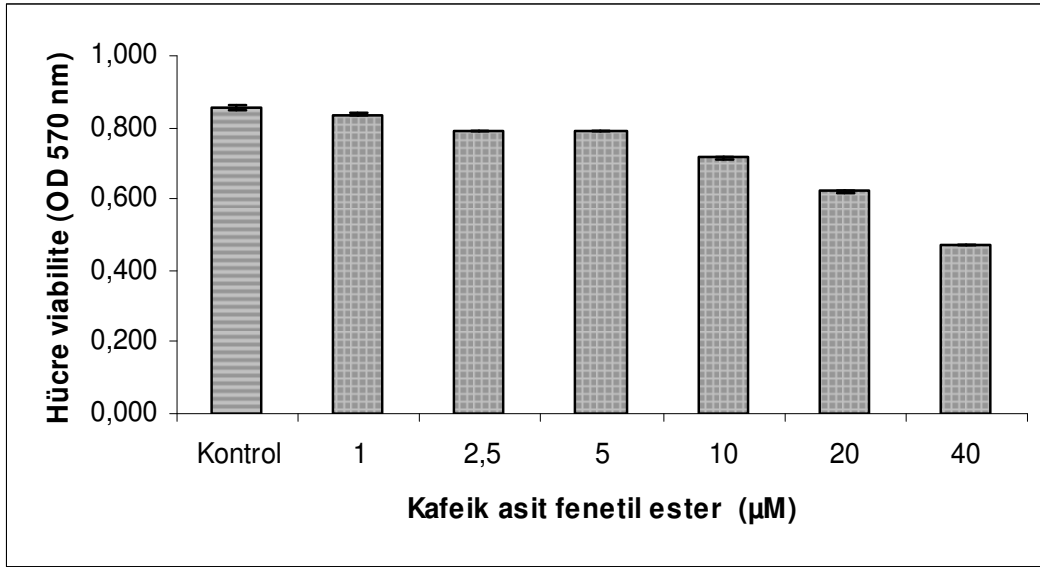


Şekil 4.1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in farklı konsantrasyonlarının hücre viabilitesi üzerine etkisi

İnkübasyon sonrası 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen gruptaki (0.057 ± 0.0008) hücre kayıpları kontrol grubuna (0.078 ± 0.004) göre yaklaşık % 27 oranında azalma gösterdiği tespit edildi (p<0.001). Araştırma süresince H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in 100 µM'lık konsantrasyonu hücrelerde stres oluşturmak amacıyla kullanıldı.

#### 4.1.2. Farklı konsantrasyonlardaki CAPE'in hücre viabilitesi üzerine etkisi

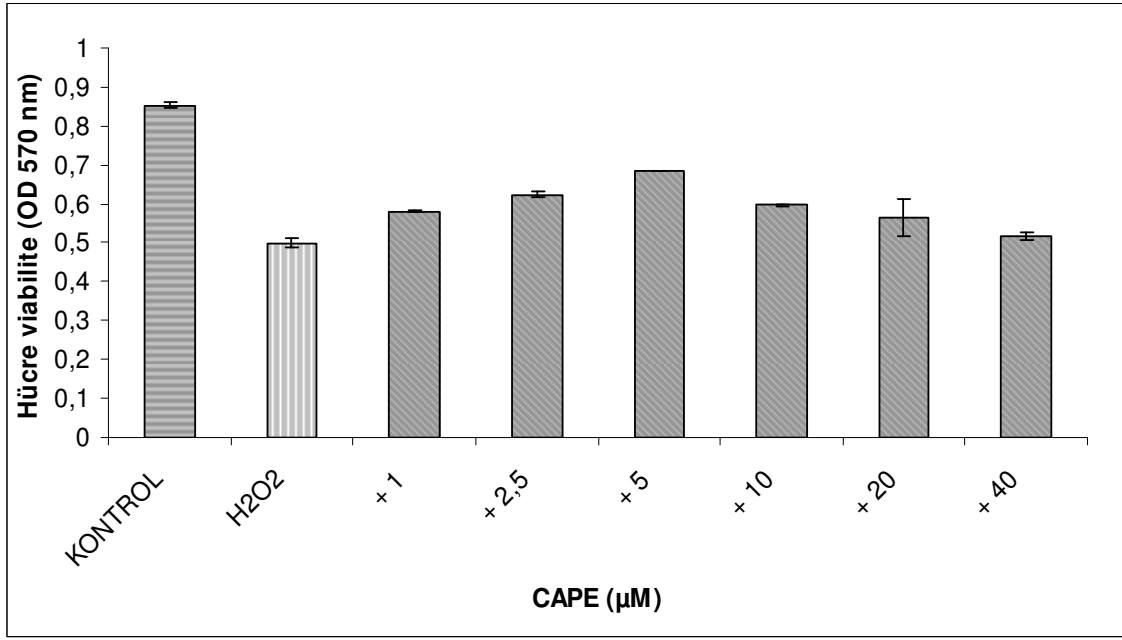
Akciğer epitel hücrelerine (24 kuyucuklu kültür kaplarında) farklı konsantrasyonlarda (1-40  $\mu\text{M}$ ) CAPE eklenerek, çalışmada kullanılacak etkili konsantrasyon tespiti için hücre viabilitesi kontrolleri MTT metoduyla değerlendirildi.



Şekil 4.2. Farklı CAPE konsantrasyonlarının hücre viabilitesi üzerine etkisi.

Buna göre; 24 saat inkübasyon sonrası 5  $\mu\text{M}$  CAPE eklenen grupta kontrol grubuna ( $0.854 \pm 0.005$ ) göre hücre viabilitesinde belirgin düzeyde ( $0.792 \pm 0.003$ ) azaldığı (Şekil 4.2) tespit edildi ( $p < 0.001$ ).



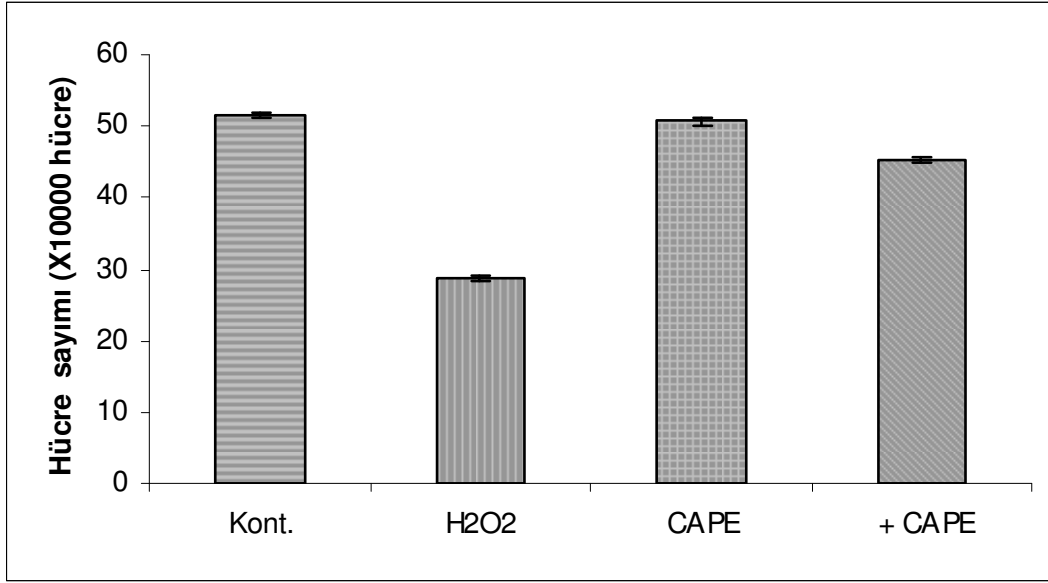


Şekil 4.3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM) ile birlikte farklı CAPE konsantrasyonlarının hücre viabilitesi üzerine etkileri.

Kafeik asit fenetil esterin 5 µM konsantrasyonun 2 saatlik ön muamelesinden sonra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen gruba, yalnız H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen gruba göre meydana gelen hücre kayıplarını CAPE'in önemli düzeyde iyileştirdiği (0.684±0.012)(Şekil 4.3) saptandı (p<0.001).

#### 4.1.3. Hidrojen peroksitin neden olduğu hücre ölümleri üzerine CAPE'in etkisi

Akciğer epitel hücrelerine (24 kuyucuklu kültür kaplarında) 5 µM CAPE 2 saatlik ön muameleyle uygulandı. Daha sonra 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenerek 24 saat inkübasyona süresi başlatıldı. Süre sonunda canlı hücre sayımı tripan mavisi boyama yöntemiyle ölçüldü.

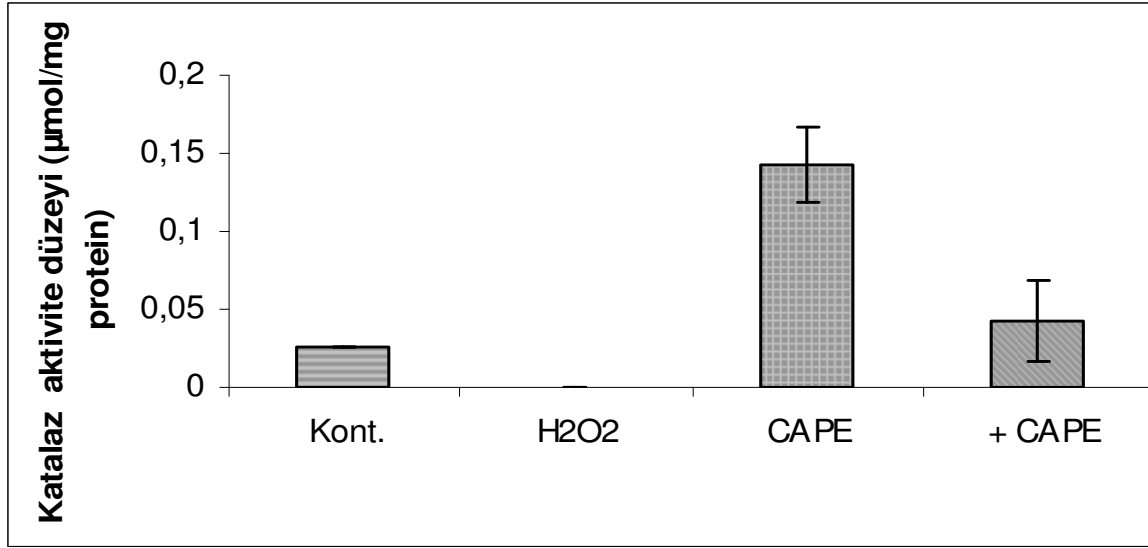


Şekil 4.4. A549 hücrelerinde CAPE ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in canlı hücre sayısı üzerine etkisi

Canlı hücre sayısı, kontrol grubuna ( $51.66 \times 10^4 \pm 0.4$ ) göre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen grupta ( $28.66 \times 10^4 \pm 0.3$ ) önemli derecede azaldığı, ancak CAPE ön muamelesinin bu azalmayı iyileştirerek hücre viabilitesini önemli düzeyde arttırdığı ( $45.16 \times 10^4 \pm 0.3$ ) saptandı ( $p < 0.001$ ).

#### 4.1.4. Hidrojen peroksite maruz bırakılan hücrelerde CAPE'in katalaz aktivitesi üzerine etkisi

Pleytlerdeki (24 kuyucuklu) akciğer epitel hücrelerine 5  $\mu\text{M}$  CAPE 2 saatlik süre ile uygulandıktan sonra 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  eklenerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda örneklerden elde edilen hücre homojenatlarında CAT aktivitesi araştırıldı.

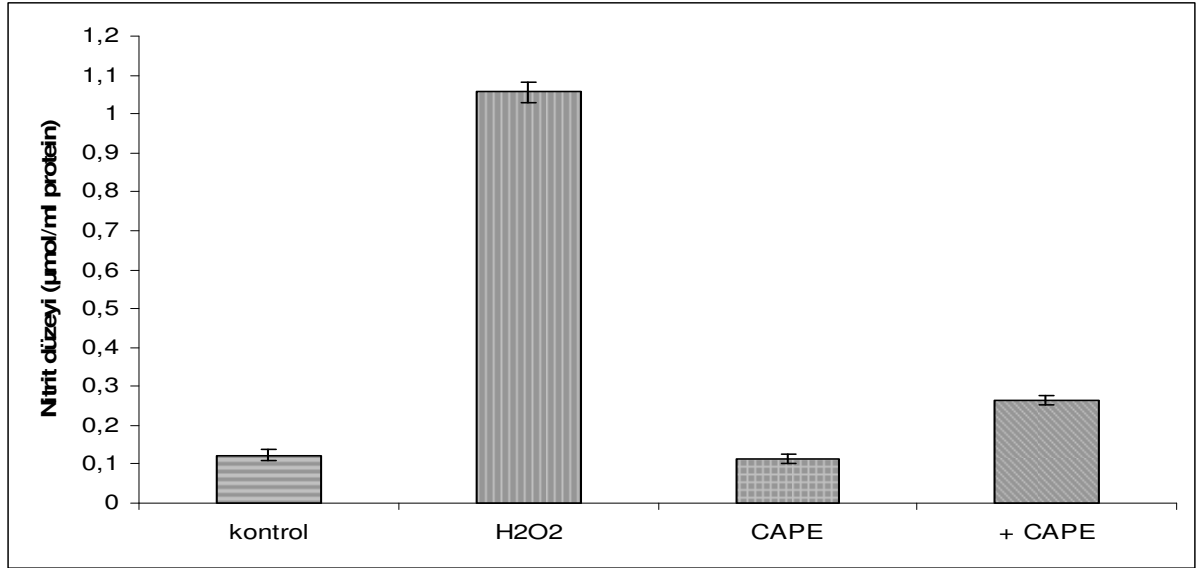


Şekil 4.5. CAPE ve  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in akciğer epitel hücrelerinde katalaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Buna göre, CAT aktivitesi sadece CAPE eklenmiş grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptandı. Ayrıca  $\text{H}_2\text{O}_2$  eklenen grupta katalaz aktivitesi ölçülemezken, CAPE ön muamelesi sonrası  $\text{H}_2\text{O}_2$  eklenen hücreler de kontrol grubuna ( $0,0263 \pm 0$ ) göre önemsiz derecede artış olduğu ( $p > 0,05$ ), ancak sadece  $\text{H}_2\text{O}_2$  eklenmiş gruba göre CAT aktivitesinin anlamlı derecede arttığı ( $0,0425 \pm 0,023$ ) saptandı ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.5. Hidrojen peroksitin neden olduğu NO üretimi üzerine CAPE'in etkisi

Akciğer epitel hücrelerine (24 kuyucuklu kültür kaplarında) 5 µM CAPE'in 2 saatlik ön uygulaması yapıldı. Sonra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenerek 24 saat inkübasyona bırakıldı ve alınan medyum örneklerinde NO düzeyi Griess yöntemiyle ölçüldü.

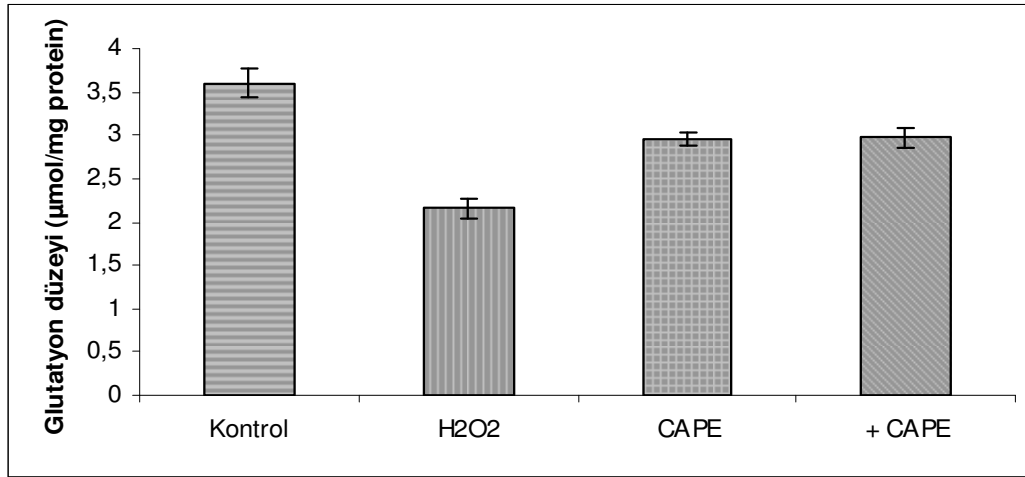


Şekil 4.6. A549 hücrelerinde CAPE ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in NO üretimi üzerine etkisi.

Nitrik oksit üretimi sadece CAPE eklenen grupta ( $0.112 \pm 0.011$ ) kontrol grubuna ( $0.123 \pm 0.014$ ) göre önemsiz derecede azalış gösterdiği saptandı ( $p > 0.5$ ). Ayrıca NO üretimi, sadece H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen grupta ( $1.056 \pm 0.027$ ) kontrol grubuna ( $0.123 \pm 0.014$ ) göre anlamlı derecede arttığı ( $P < 0.001$ ) saptandı. Ancak CAPE ön muamelesi sonrası H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen grupta ( $0.263 \pm 0.028$ ) CAPE'in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in meydana getirdiği NO üretimi artışını anlamlı derecede azalttığı ( $p < 0.001$ ) saptandı.

#### 4.1.6. Kafeik asit fenetil ester ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının glutatyon (GSH) düzeyi üzerine etkileri

Flasklardaki (25 cm<sup>2</sup>) A549 hücrelerine 5 µM CAPE 2 saatlik ön muameleyle uygulandı. Daha sonra hücelere 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda elde edilen hücre homojenatlarında GSH düzeyi ölçüldü.

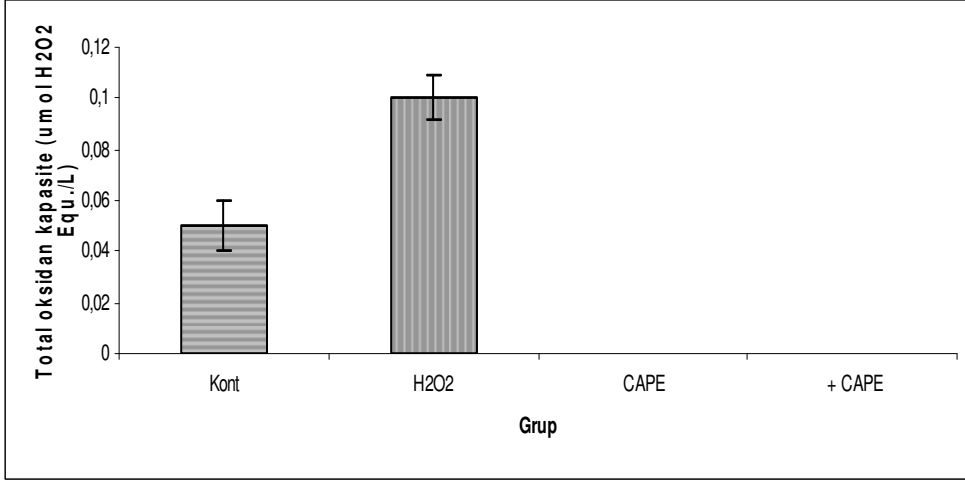


Şekil 4.7. Akciğer epitel hücrelerinde CAPE ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in GSH üretimi üzerine etkisi.

Glutatyon üretimi sadece H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen hücrelerde (2.153 ± 0.11) kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldı (P<0.001). Ancak CAPE ön muamelesinden sonra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e maruz bırakılan grupta (2.972 ± 0.11) ise CAPE, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in azalttığı GSH düzeyini anlamlı derecede arttırdığı saptandı (P<0.001).

#### 4.1.7. Total oksidan kapasite (TOS) üzerine CAPE ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in etkileri

Akciğer epitel hücrelerine (25 cm<sup>2</sup>'lik kültür kaplarında) 2 saatlik CAPE ön uygulamasını takiben H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda alınan örneklerden elde edilen hücre homojenatlarında TOS seviyeleri araştırıldı.

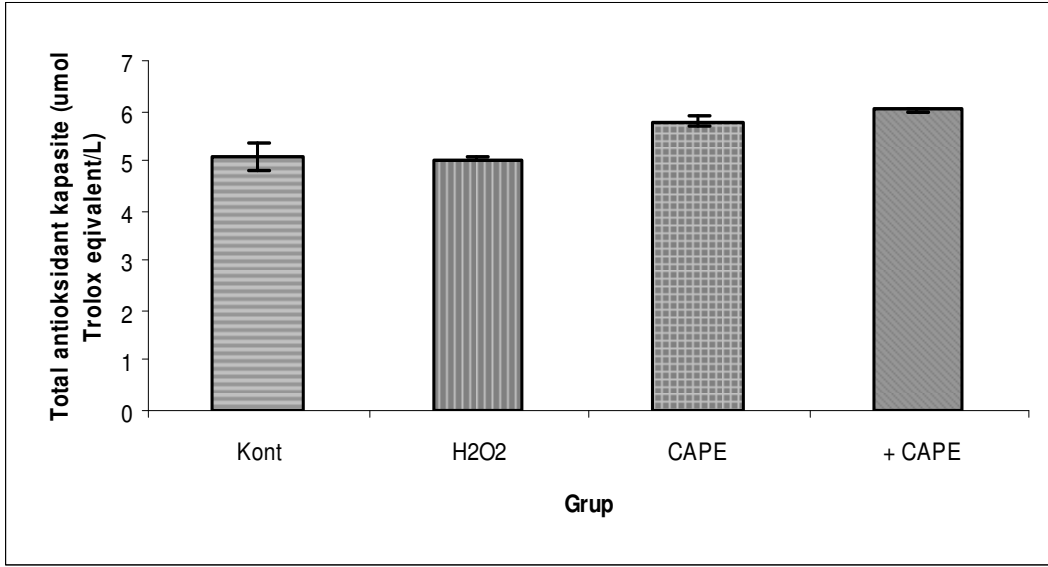


Şekil 4.8. A549 hücrelerine CAPE ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmasının total oksidan kapasite (TOS) üzerine etkisi.

Total oksidan kapasite sadece CAPE eklenen grupta ( $-0.04 \pm 0.033$ ) kontrol grubuna ( $0.1 \pm 0.008$ ) göre anlamlı derecede azaldığı saptandı ( $p < 0.001$ ). Ayrıca total oksidan kapasite sadece H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen grupta ( $0.502 \pm 0.010$ ) kontrol grubuna ( $0.1 \pm 0.008$ ) göre anlamlı derecede yükseldiği ( $p < 0.001$ ), ancak CAPE ön uygulamasından sonra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen grupta ( $-0.0773 \pm 0.006$ ) bu artışın CAPE tarafından giderilerek anlamlı derecede azaldığı saptandı ( $p < 0.001$ ).

#### 4.1.8. Total antioksidan kapasite (TAS) üzerine CAPE ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in etkileri

Kafeik asit fenetil esterin akciğer alveoler epitel hücrelerine (25 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda) 2 saatlik ön uygulamasını takiben H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda alınan örneklerden elde edilen hücre homojenatlarında TAS seviyeleri araştırıldı.

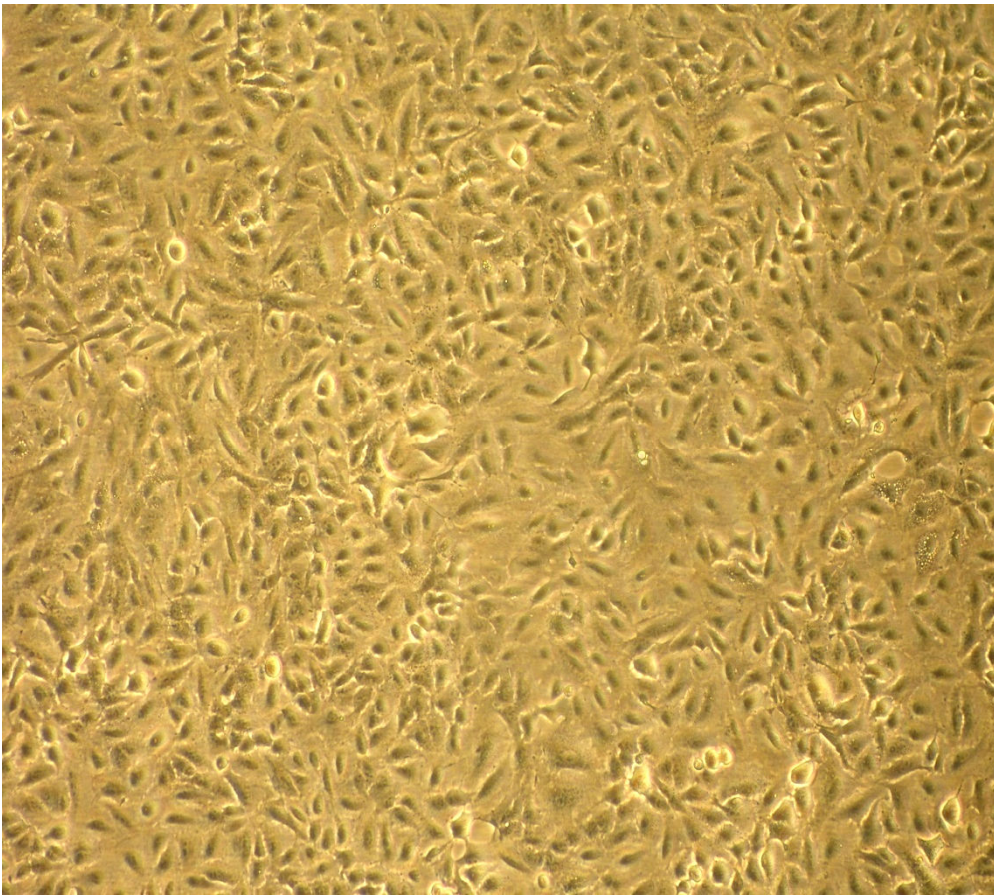


Şekil 4.9. A549 hücrelerine CAPE ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmasının total anti-oksidan kapasite (TAS) üzerine etkisi.

Total antioksidan kapasite sadece CAPE eklenen grupta ( $5.78 \pm 0.10$ ) kontrol grubuna ( $5.07 \pm 0.25$ ) göre anlamlı derecede artış gösterdi ( $p < 0.005$ ). Ayrıca TAS, sadece H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen grupta ( $5.04 \pm 0.06$ ) kontrol grubuna ( $5.07 \pm 0.25$ ) göre önemsiz düzeyde artış olduğu saptandı ( $p > 0.5$ ). Ancak CAPE ön muamelesi sonrası H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen grupta ( $6.02 \pm 0.04$ ) ise TAS hem sadece H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen gruba hemde kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükseldiği görüldü ( $p < 0.001$ ).

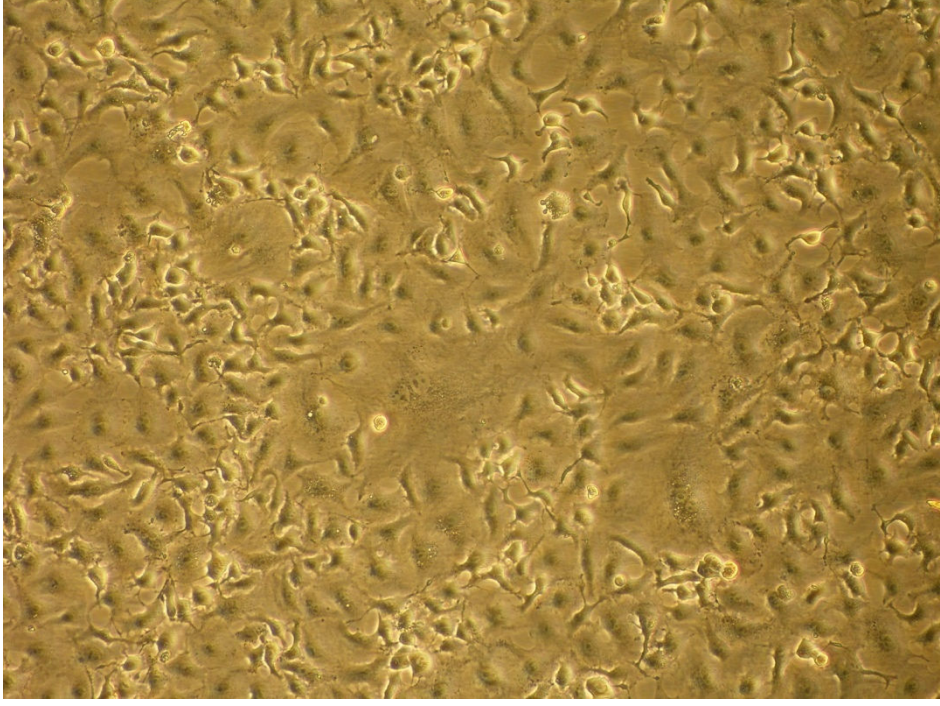
#### 4.2. Hidrojen peroksit ile muamele edilen akciğer epitel hücrelerinin morfolojisine CAPE'in etkisi

Akciğer epitel hücrelerine CAPE'in (5  $\mu$ M) 2 saatlik ön uygulamasını takiben  $H_2O_2$  (100  $\mu$ M) eklenerek 24 saat maruziyeti sağlandı. Süre sonunda elde edilen hücre örneklerinden invert mikroskopun 40X büyütme objektifi ile çekilen fotoğraflar incelendiğinde, hücre ölümlerinin  $H_2O_2$  uygulanan grupta (Şekil 4.11) kontrol grubuna (Şekil 4.10) göre önemli oranda arttığı, ancak CAPE tedavisinin (Şekil 4.13)  $H_2O_2$ 'in neden olduğu hücre ölümlerini önemli oranda azalttığı saptandı.

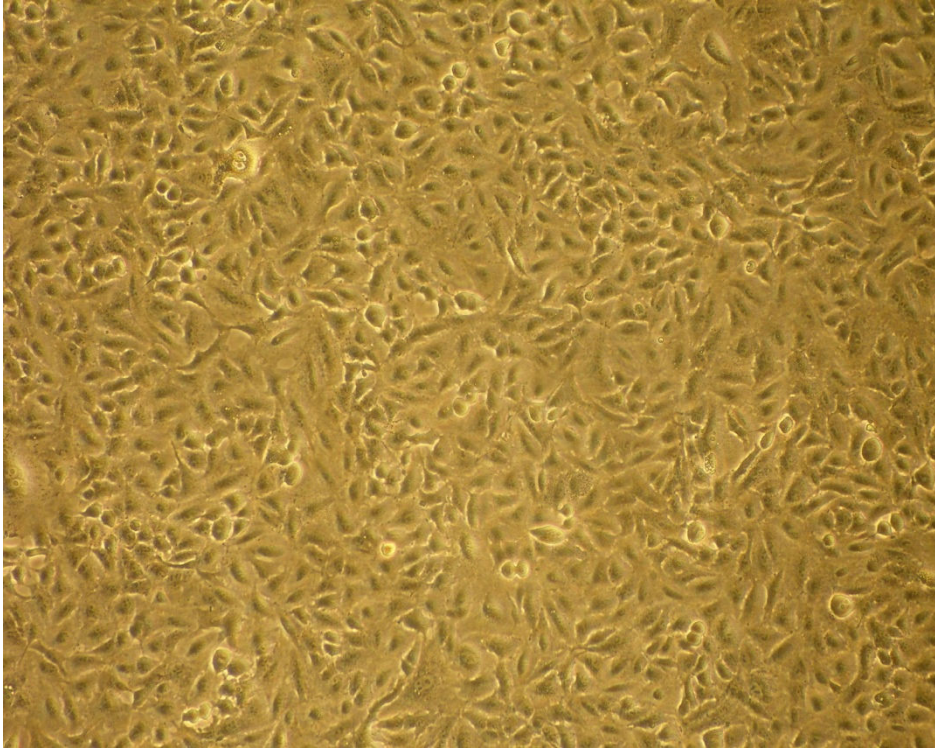


Şekil 4.10 A549 hücreleri kontrol grubu 24. saat mikroskop görüntüleri (40 X büyütme)

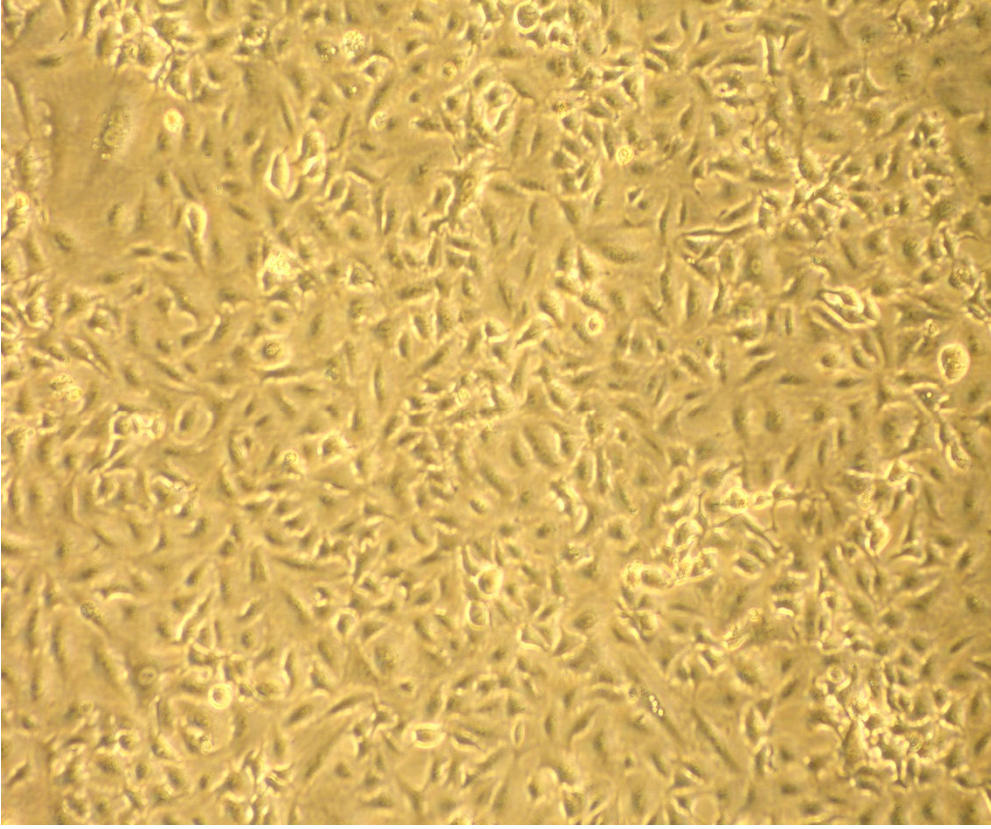




Şekil 4.11. A549 hücreleri  $H_2O_2$  (100  $\mu M$ ) eklenen grupta 24. saat mikroskop görüntüleri (40 X büyütme)



Şekil 4.12. Akciğer alveoler epitel hücrelerine CAPE (5  $\mu M$ ) eklenen grupta 24. saat mikroskop görüntüleri (40 X büyütme)



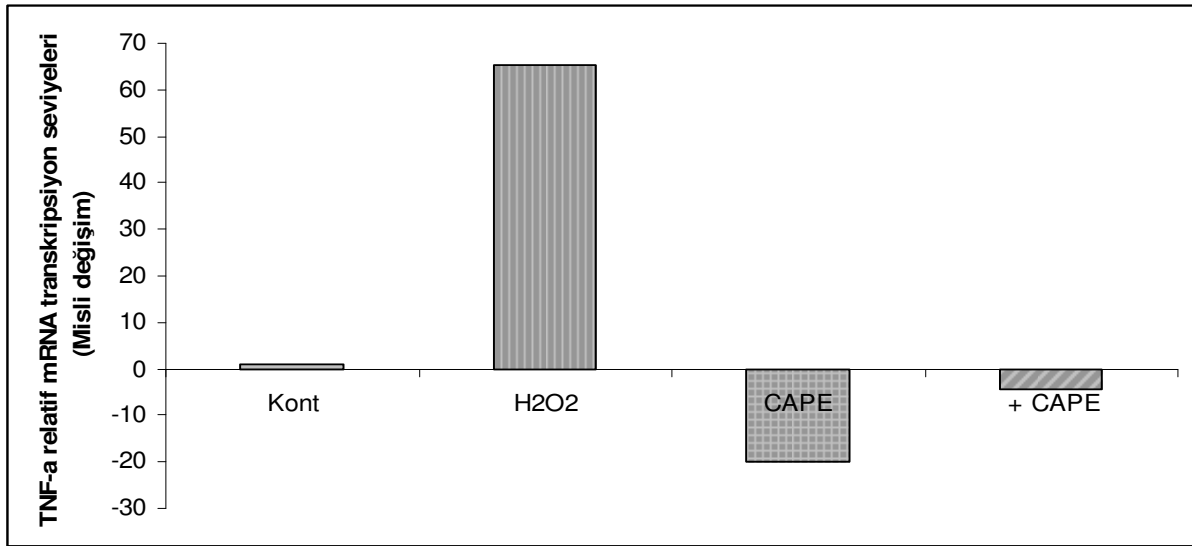
Şekil 4.13. A549 hücrelerine CAPE ön muamalesi sonrası  $H_2O_2$  eklenen grupta 24. saat mikroskop görüntüleri (40 X büyütme)

### 4.3. RT-PCR sonuçları

Akciğer epitel hücre kültür ortamına (25 cm<sup>2</sup> flasklarda) kafeik asit fenetil ester (5 µM) ön muamalesini takiben H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM) eklendi. 24 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezleri yapılarak belirli genlerin (sitokinlerden TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-18 ile IFN- $\gamma$  ve enzimlerden iNOS) mRNA transkripsiyon seviyeleri spesifik primerler kullanılarak RT-PCR yöntemiyle araştırıldı.

### 4.3.1. TNF- $\alpha$ mRNA transkripsiyonu

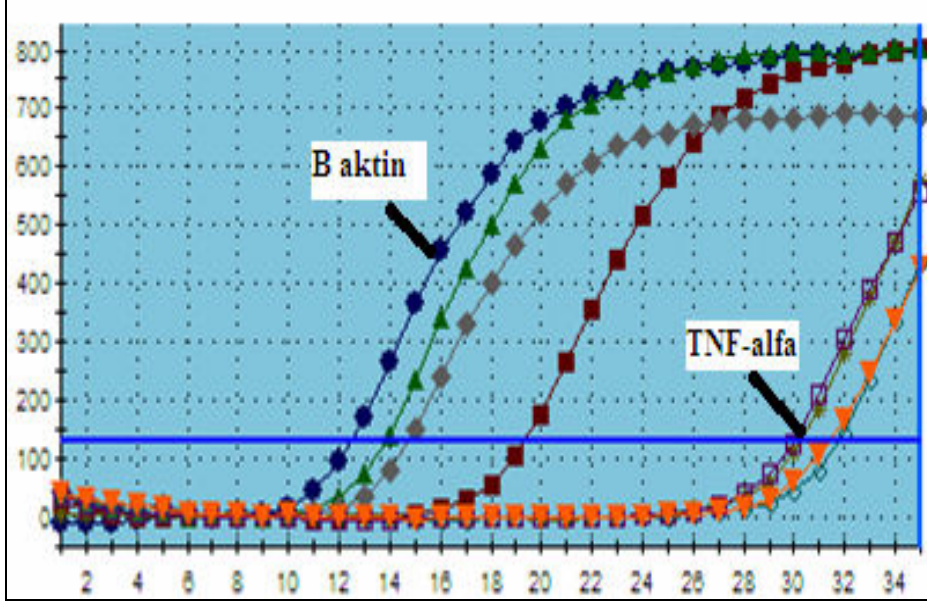
Çalışmadan yaklaşık 16 saat önce 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara bölünen A549 hücreleri üzerine 5  $\mu$ M düzeyinde CAPE eklendi. 2 saatlik ön inkübasyon sonrası üzerine 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilerek 24 saatlik inkübasyonları sağlandı. Süre sonunda elde edilen RNA örneklerinden yangı öncülü bir sitokin TNF- $\alpha$  mRNA transkripsiyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle araştırıldı.



Şekil 4.14. TNF- $\alpha$  mRNA transkripsiyon seviyeleri (24 saat).

Tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) mRNA transkripsiyon seviyesinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen grupta kontrol grubuna göre (yaklaşık 65 misli) uyarıldığı, ancak CAPE ön uygulamasının bu uyarılmayı tamamen iyileştirildiği saptandı (Şekil 4.10).

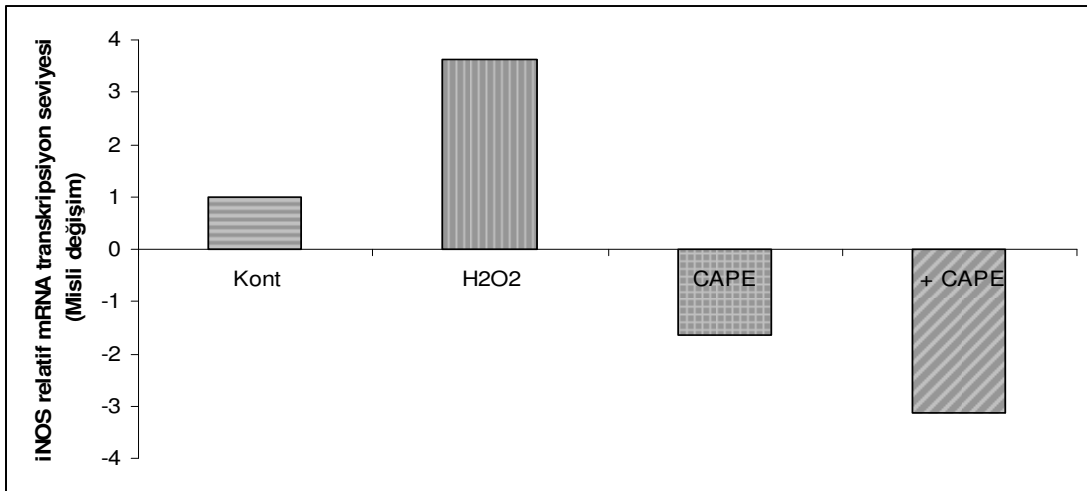




Şekil 4.15. Gerçek zamanlı PCR’da TNF- $\alpha$  ve  $\beta$ -aktin genleri mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrileri.

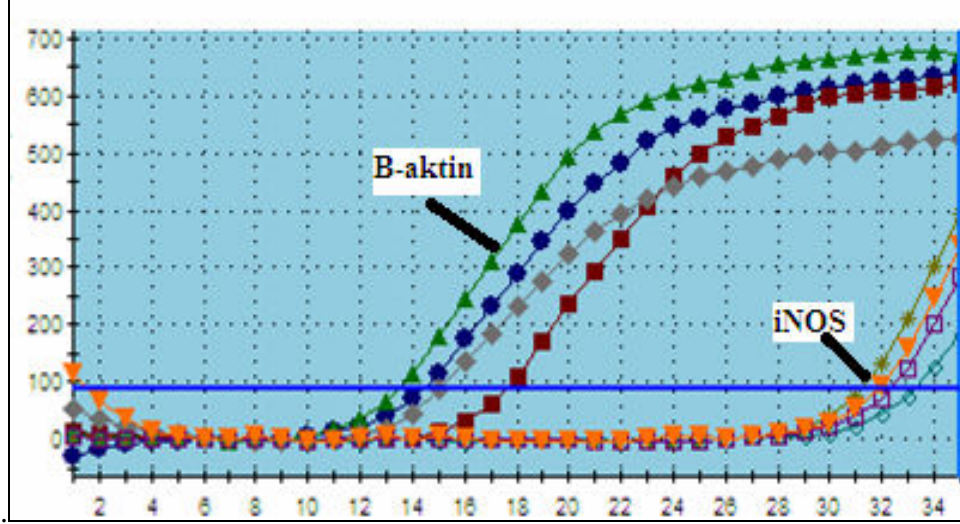
#### 4.3.2. iNOS mRNA transkripsiyonu

Akciğer epitel hücrelerine (25 cm<sup>2</sup>’lik flasklarda), 5  $\mu$ M CAPE’in 2 saatlik ön uygulamasını takiben 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Nitrik oksit üretiminden sorumlu enzimlerden birisi olan iNOS geni mRNA transkripsiyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle analiz edildi.



Şekil 4.16. iNOS mRNA transkripsiyon seviyeleri (24saat)

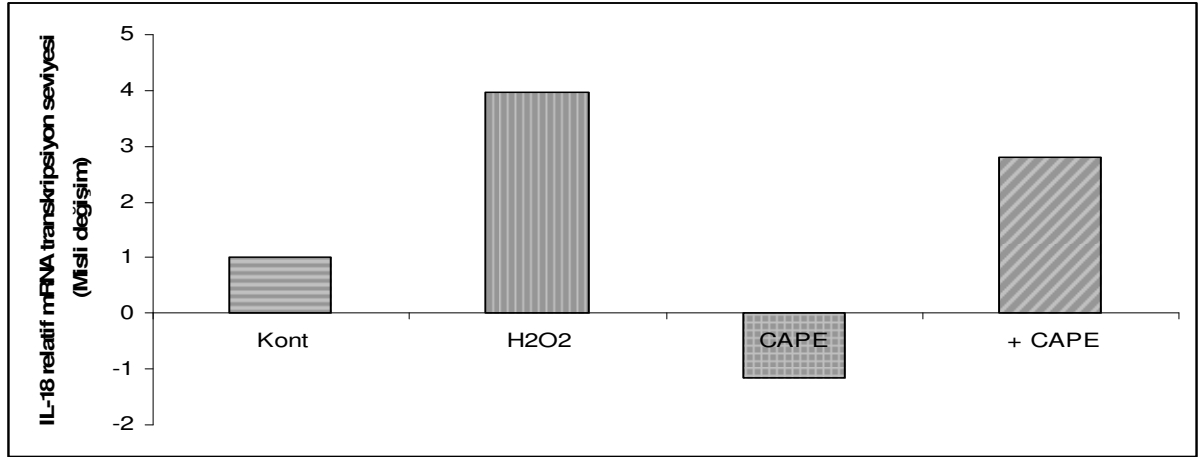
Buna göre; iNOS mRNA transkripsiyon seviyeleri, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen grupta kontrol grubuna göre (yaklaşık 3,5 misli) uyarıldığı, ancak CAPE ön muamelesi sonrası H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen grupta ise bu artışın CAPE tarafından %100 oranında iyileştirildiği saptandı (Şekil 4.11).



Şekil 4.17. Gerçek zamanlı PCR’da iNOS ve  $\beta$ -aktin genleri mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrileri.

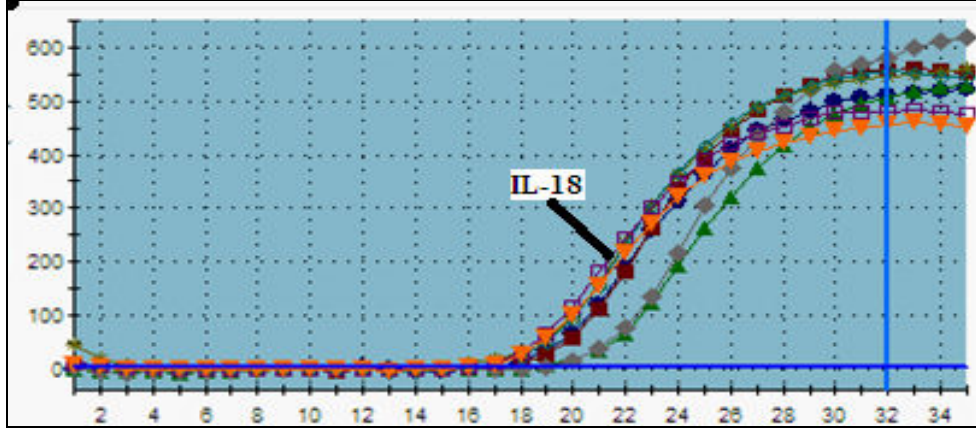
#### 4.3.3. IL-18 mRNA transkripsiyonu

25 cm<sup>2</sup> flasklardaki yaklaşık 10<sup>4</sup> akciğer epitel hücrelerine 2 saatlik inkübasyonla CAPE uygulandı. Daha sonra hücelere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yangı başlatıcı sitokinlerden IL-18 geni mRNA transkripsiyon seviyeleri gerçek zamanlı PCR yöntemiyle analiz edildi.



Şekil 4.18. IL-18 mRNA transkripsiyon seviyeleri (24 saat).

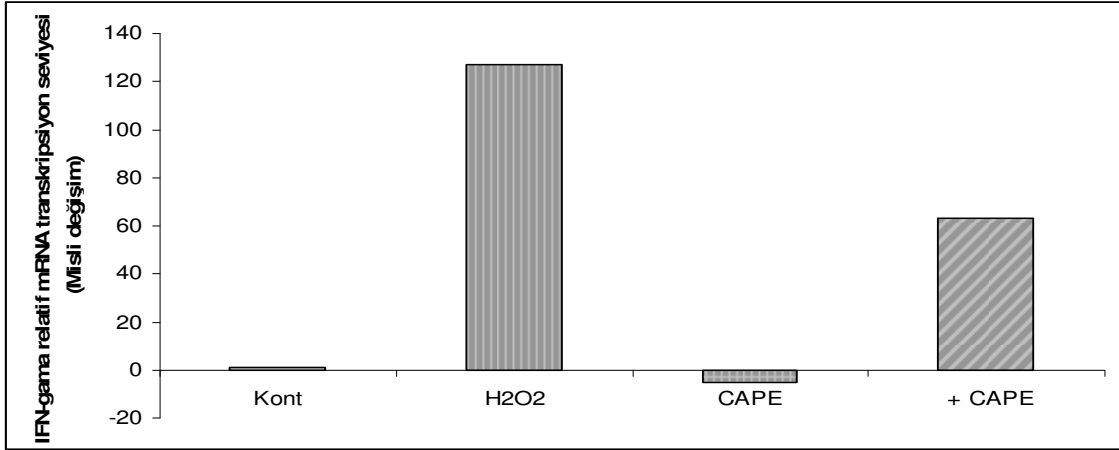
Buna göre; IL-18 geni mRNA transkripsiyon seviyeleri, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen grupta kontrol grubuna göre (yaklaşık 4 misli) uyarıldığı saptandı. Fakat CAPE ön muamelesi sonrası H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen grupta bu artışın CAPE tarafından %27 oranında baskılandığı görüldü (4.12).



Şekil 4.19. Gerçek zamanlı PCR’da IL-18 geni mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrileri.

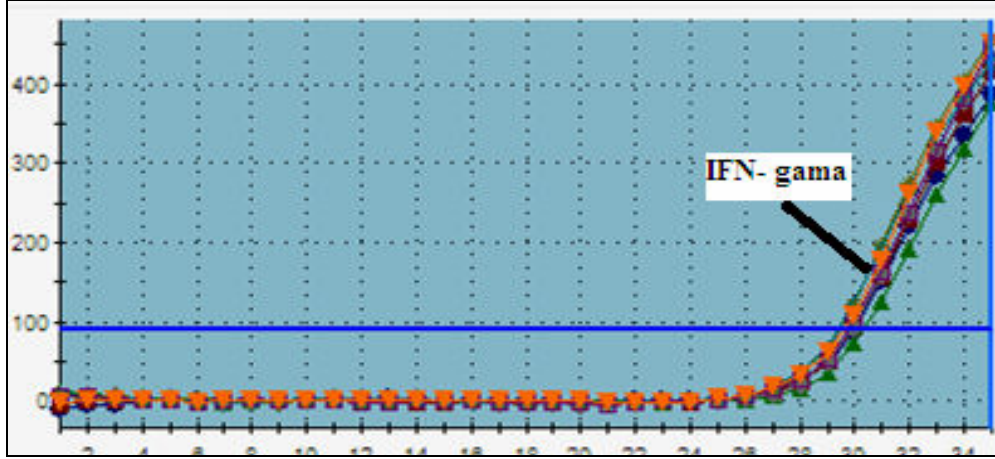
#### 4.3.4. IFN- $\gamma$ mRNA transkripsiyonu

Akciğer epitel hücrelerine CAPE’in 2 saatlik ön muamelesi sonrası  $H_2O_2$  eklendi. 24 saat inkübasyon sonrası elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. Yangının başlaması ve devamında büyük öneme sahip olan IFN- $\gamma$  geni mRNA transkripsiyon seviyeleri gerçek zamanlı PCR yöntemiyle analiz edildi.



Şekil 4.20. IFN- $\gamma$  mRNA transkripsiyon seviyeleri (24 saat).

Buna göre; IFN- $\gamma$  geni mRNA transkripsiyon seviyesi  $H_2O_2$ 'in eklenen grupta kontrol grubuna göre (127 misli) uyarıldığı, CAPE ön muamelesi sonrası  $H_2O_2$  eklenen grupta bu artışın yaklaşık %51 oranında baskılandığı görüldü (4.13).



Şekil 4.21. Gerçek zamanlı PCR’da IFN- $\gamma$  geni mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrileri.

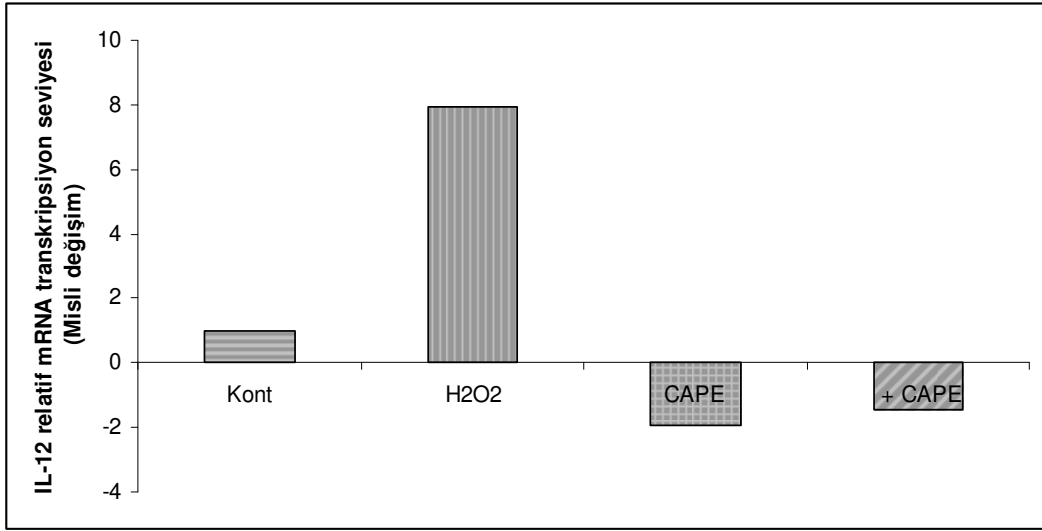
#### 4.3.5. IL-12 mRNA transkripsiyonu

25 cm’lik flasklarda üretilen hücelere CAPE eklenerek 2 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda hücelere  $H_2O_2$  eklenerek, 24 saat inkübasyon sonrası elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. Yangı başlatıcı ve IFN- $\gamma$  üretimini uyarıcı sitokinlerden IL-12 geni mRNA transkripsiyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle analiz edildi.

Grup	mRNA net etki derecesi ( $2^n$ )
Kontrol	+ 1
$H_2O_2$	+ 7.94
Cape	- 1.94
Cape + $H_2O_2$	- 1.44

Çizelge 2. IL-12 mRNA transkripsiyon seviyeleri (24 saat)





Şekil 4.22. IL-12 mRNA transkripsiyon seviyeleri (24 saat).

Buna göre; IL-12 geni mRNA transkripsiyonu, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen grupta kontrol grubuna göre (7.94 misli) uyarıldığı, ancak CAPE ön muamelesi sonrası H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen grupta bu artışın CAPE tarafından % 100 oranında baskılandığı saptandı.

## 5. TARTIŞMA

Propolis yapısında biyolojik aktif kimyasallardan terpenler, sinamik asit, kafeik asit, aminoasitler ve flavonoidleri içerir (Cohen ve ark. 2004). Fenolik bir bileşik olan kafeik asit fenetil ester, propolis bileşiminde bulunan çok geniş etkilere sahip olan bir bileşiktir. Son yıllarda yapılan birçok çalışma CAPE'in anti-oksidan ve anti-inflamatorik etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir (Ahn ve ark. 2004). Yapılan literatür taramalarında *in vitro* çalışmalarda CAPE'in oksidatif stresi ve yangıyı önleyici etki mekanizmaları henüz yeterince ortaya konamamıştır. Bu tez çalışmasında insan akciğer epitel hücreleri kullanılarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşturulmuş oksidatif stres ve yangıya karşı CAPE'in etkinliği araştırıldı.

*In vitro* koşullarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidatif stres oluşturmak için iyi bir model olarak bilinir (Bi ve ark. 2008). Hidrojen peroksit oksidatif hasarı ATP sentezini bozarak ve serbest radikal oluşumunu artırarak gerçekleştirir (Jiang ve ark. 2004). Hidrojen peroksit ve OH<sup>-</sup> radikalleri hücresel makromoleküllerde fonksiyonel ve yapısal bozulmalara neden olarak apoptozu uyarır (Hwang ve Yen 2008). Mitokondriyal membran potansiyelinin (MMP) azalması ve yetersiz ATP üretimi mitokondriyal bozukluk olarak tanımlanan mitokondri uyarımlı apoptotik yolakla ilişkilidir (Hwang ve Yen 2008). Hidrojen peroksitin meydana getirdiği oksidatif stres uyarımlı apoptoz, MMP'de azalma, sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımı ve kaspazları aktive etmesinden kaynaklanır (Jung ve ark. 2007, Yu ve ark. 2008). Transkripsiyon faktörlerinden nükleer faktör kapa B (NF-kB), inhibitör faktör kapa B (iK-B) tarafından sitoplazma da inaktif halde tutulur. Ancak mitojenler, inflamatorik sitokinler (TNF- $\alpha$ , IL-1 gibi), bakteriyel ürünler, protein sentez inhibitörleri, oksidatif stres (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ultraviyole ışık ve forbol esterleri gibi uyarılar, iK-B'nin fosforilasyonuna sağlayarak, NF-kB'nin hücre çekirdeğine translokasyonuna sebep olurlar. Bunun sonucunda da hücrelerde reaktif oksijen türlerinin üretilmesini sağlarlar (Takada ve ark.2003, Takaoka ve ark. 2005).

Bu çalışmada oksidatif stres uyarımlı hücre ölümlerine karşı CAPE'in etkinliği araştırıldı. Bu amaçla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uyarımlı oksidatif stres modeli oluşturularak hücre canlılık testleri yapıldı. A549 hücrelerine 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 24 saatlik inkübasyonu sonrası hücre viabilite kontrolleri incelendiğinde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede hücre ölümleri şekillendiği, ancak 5  $\mu$ M CAPE'in 2 saatlik ön uygulamasını takiben H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maruziyeti sağlanan grupta ise bu hücre kayıplarının anlamlı derece de giderildiği gösterildi. Xu ve ark. (2008) rat PC12 hücrelerine 24 saat süreli 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maruziyetinin

mitokondriyal depolarizasyonun meydana geldiğini göstermişlerdir. Crispo ve ark. (2010) PC12 hücrelerinde  $H_2O_2$  uyarımlı apoptozun kaspaz 9 aktivasyonu artışından, DNA kırıklarından ve mikondriyal depolarizasyondan kaynaklandığını saptamışlardır. Davicino ve ark. (2009) BW 5147 lenfoma hücrelerini 24 saat süreli  $H_2O_2$  maruz bırakarak oluşturdukları çalışma da,  $H_2O_2$ 'in NF-kB aktivasyonu sonucu DNA'da hasar meydana getirerek hücre proliferasyonunu azalttığını göstermişlerdir. Bu araştırmadan elde edilen bulgularda olduğu gibi, Natarajan ve ark. (1996), yaptıkları çalışmada CAPE'in reaktif oksijen türleri ( $H_2O_2$ ) uyarımlı NF-kB gen ekspresyonunu önemli düzeyde baskıladığını ve yangı öncülü sitokin uyarımlı apoptozu önlediğini belirtmişlerdir. Marquez ve ark. (2004) CAPE'in, NF-kB p65 alt üyesinin hücre çekirdeğine translokasyonunu önleyerek reaktif oksijen türlerinin üretimini baskıladığını belirtmişlerdir. Bu literatür bilgileri ve elde ettiğimiz bulgulara göre oksidatif stres uyarımlı hücre ölümlerine karşı CAPE'in iyileştirici olabileceği düşünülebilir.

Oksidatif stres artan hücre içi serbest radikal moleküllerinin yok edilmesine karşı antioksidan savunma sisteminin yetersizliği ile ortaya çıkar (Aquilano ve ark. 2007). Oksijenin metabolizması sırasında reaktif oksijen türleri olarak adlandırılan birçok ürün meydana gelir. Bunlar  $O^{\cdot -}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$  ve NO gibi radikallerdir. Reaktif oksijen türleri, ksantin oksidaz, sitokrom P450 redüktaz ve glukoz oksidaz gibi mitokondriyal enzimlerin aktiviteleri sonucu, elektron taşıma zincirinde açığa çıkar (Paramo ve ark. 2010). Bu çalışmada  $H_2O_2$  uyarımlı oksidatif streste CAPE'in total oksidan kapasite (TOS) ve total antioksidan kapasite (TAS) üzerine etkileri araştırıldı. Yirmi dört süresince  $H_2O_2$ 'e maruz bırakılan hücre homojenatlarında total oksidan kapasitenin anlamlı derecede arttığı, ancak 5  $\mu$ M CAPE tedavisinin bu artışı önemli derecede giderdiği saptandı. Antioksidan kapasite ise  $H_2O_2$  eklenen hücrelerde kontrol grubuna göre önemsiz derecede artarken, CAPE'in TAS düzeyini hem kontrol grubuna hem de  $H_2O_2$  eklenen gruba göre anlamlı derecede arttığı saptandı. Ündeğer ve ark. (2009) V79 akciğer fibroblastlarına 24 saatlik 100  $\mu$ M  $H_2O_2$  maruziyeti ile oluşturdukları araştırmada, kontrol grubuna göre  $H_2O_2$  eklenen grupta hücre içi ROS'nin anlamlı derecede arttığını göstermişlerdir. Yine Bi ve ark. (2008) yeni doğmuş 1 günlük farelerden elde ettikleri primer astrosit hücrelerine 24 saatlik  $H_2O_2$  (100  $\mu$ M) maruziyetinin hücre içi ROS'i anlamlı derecede arttığını göstermişlerdir.

Daha önce yapılan çalışmalarda, CAPE'in hücreleri antioksidan enzimlerin [XO (Kartal ve ark. 2003, Çelik ve Erdoğan 2008), MPO (Gürel ve ark. 2004), GSH-Px (Çelik ve Erdoğan 2008), SOD ve CAT (Parlakpınar ve ark. 2005)] aktivitelerini arttırarak oksidatif hasara karşı koruduğu gösterilmiştir. Hücreiçi GSH ve CAT enzimi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i suya ve moleküler oksijene dönüştürerek antioksidan etki gösterir (Conner ve ark. 2002, Parlakpınar ve ark. 2005). Yürütülen bu çalışma da A549 hücrelerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maruziyeti sonucu oluşturulan oksidatif streste CAPE'in antioksidan kapasitede önemli yeri olan GSH üretimi ve CAT aktivitesi üzerine etkinliği araştırıldı. Hücrelerin 24 saat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maruziyetinde, GSH düzeyinin anlamlı derecede azaldığı gösterildi. Ancak hücrelerin CAPE ile ön muamelesinin bu azalışı anlamlı derecede önlediği saptandı. Hidrojen peroksit eklenen hücre homojenatlarında CAT aktivitesi tespit edilemezken, CAPE tedavisinin CAT aktivitesinin anlamlı derecede arttırdığı saptandı. Bu sonuçlara benzer olarak Bi ve ark. (2008) yeni doğmuş 1 günlük farelerden elde ettikleri primer astrosit hücrelerine 24 saatlik 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulayarak oluşturdukları araştırmada, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen grupta kontrol grubuna göre GSH düzeyinin ve CAT aktivitesinin anlamlı derecede azaldığını göstermişlerdir. Yine elde ettiğimiz sonuçlara benzer olarak Hino ve ark. (1999) A549 hücrelerine 24 saat süreli 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının CAT aktivitesini kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalttığını göstermişlerdir. Güney ve ark. (2007) yaptıkları *in vivo* florid uyarımlı oksidatif stres modelinde, CAPE'in azalan CAT aktivitesini anlamlı derecede arttırdığını göstermişlerdir. Durmuş ve ark. (2008) yaptıkları *in vivo* diabet modelinde CAPE'in azalan hücreiçi GSH düzeyinde artışlara neden olduğunu göstermişlerdir. Çelik ve Erdoğan (2008) diyabet uyarımlı oksidatif stres modelinde, azalan hücreiçi GSH düzeyinin CAPE tarafından anlamlı derecede iyileştirdiğini göstermişlerdir. Totan ve ark. (2001) gümüş nitrat koterizasyonu kaynaklı oksidatif stres çalışmalarında, azalan GSH düzeyini CAPE'in anlamlı derece iyileştirdiğini göstermişlerdir. Bu verilerin ışığında CAPE'in solunum yolu hücrelerinde serbest radikallerin meydana getirdiği hasara karşı antioksidan sistemi etkin bir şekilde uyarabileceği ve bu amaçla kullanılabilceği düşünülebilir.

Akciğerlerde yüksek seviyede NO üretiminden sorumlu hücreler epitel hücreleri, makrofajlar, monositler ve eosinofillerdir (Coleman 2002). Epitel kültürlerinde TNF-α, IL-1β, IFN-γ gibi sitokinlerin iNOS ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir (Berkman ve ark. 1996). Yangı sürecinde oksidatif stresin başlamasıyla NO ve O<sub>2</sub> anyonu, bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilerek salınır ve peroksinitritleri meydana getirirler. Peroksinitrit radikalleri ise DNA'da kırıklara ve lipidlerde peroksidasyona neden olur (Saleh ve ark. 2010). Bu

çalışmada akciğer epitel hücrelerinin 24 saat süresince 100 µM konsantrasyonda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile maruziyeti sonucu total oksidan kapasitede önemli yer tutan NO düzeyinin anlamlı düzeyde arttığı saptandı. Yapılan gerçek zamanlı PCR metoduyla bu artışın NO sentezinden sorumlu iNOS üzerinden gerçekleştiği tespit edildi. Nitrik oksit üretimi ve iNOS transkripsiyonu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> anlamlı derecede artış gösterdi. Ancak CAPE (5 µM) uygulanan grupta bu artışların anlamlı derecede giderildiği saptandı. Davicino ve ark. (2009) BW 5147 lenfoma hücrelerini 24 saat süreli H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e maruz bırakarak oluşturdukları çalışmada, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in düşük konsantrasyonlarının bile NO üretimini kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttırdığını göstermişlerdir. Song ve ark. (2002) CAPE'in iNOS'un katalitik aktivitesini ve gen ekspresyonunu baskılayarak yangı önleyici etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Durmuş ve ark. (2008) yaptıkları *in vivo* diabet modelinde, NO üretiminin CAPE tarafından azaltıldığını göstermişlerdir. Çelik ve Erdoğan (2008) diyabet uyarımlı oksidatif stres modelinde, diyabet kaynaklı iNOS mRNA transkripsiyon artışının CAPE tarafından baskılandığını göstermişlerdir. Yine Armutçu ve ark. (2004), CAPE'in antioksidan özelliğinin NOS aktivasyonunu baskılayarak antioksidan etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Kafeik asit fenetil esterinin solunum yollarında NO artışına bağlı gelişen oksidatif hasarın önlenmesinde etkin olabileceği düşünülebilir.

Yangı (inflamasyon) patojenler, fiziksel etkiler ve birçok kimyasalın dokularda oluşturduğu hasara karşı yüksek yapılı organizmaların geliştirdiği bir savunma mekanizmasıdır. Sitokinler yangının başlaması ve devamını sağlayan proteinlerdir (Ferrero ve ark. 2007). Sitokinlerin sekresyonu, bakteriyel ürünler, immün kompleksler, toksinler ve fiziksel etmenlerce uyarılabilmektedir (Drenth ve ark. 1995).

Tümör nekroz faktör alfa yangı başlatıcı sitokindir. Özellikle aktive olan makrofajlar, lenfosit ve diğer hücre tipleri tarafından sentezlenir ve salınır ( Park ve Barbul 2004). Akciğer yangısal hastalıkların gelişiminde TNF-α çok önemli bir role sahiptir (Kelley ve ark. 1990). İntelökin-12 yardımcı T lenfositlerin farklılaşmasını ve aktivasyonunu sağlayan bir sitokindir (Sinigaglia ve ark. 1999). Akciğer epitellerinde bulunduğu birçok hücrede İFN-γ üretimini ve litik etkisini artırır (Foti ve ark. 2006). İnterlökin 18, IL-1 ailesinin bir üyesi olup, proinflamatorik sitokin etkilidir. İmmun ve inflamatorik hastalıkların gelişim sürecinde ekspresyonu artar. Bu çalışmada kullanılan akciğer epitel hücrelerinin 24 saat süresince H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e maruziyeti yangı öncülü sitokinlerden TNF-α, IL-12, IL-18 ile bu sitokinlerin etkisiyle ekspresyonu uyarılan ve yangının devamını sağlayan İFN-γ mRNA transkripsiyon seviyeleri analiz edildi. Buna göre, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in bu sitokinlerin transkripsiyon seviyelerini önemli

düzeyde arttırdığı saptandı. Kafeik asit fenetil esterin bu artışları iyileştirildiği saptandı. Benzer olarak Hino ve ark. (1999) A549 hücrelerine 24 saat süreli 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının TNF reseptör ekspresyonunu anlamlı derecede arttırdığını göstermişlerdir. Çelik ve Erdoğan (2008) diyabet uyarımlı oksidatif stres modelinde, diyabet kaynaklı TNF- $\alpha$  ve İFN- $\gamma$  mRNA transkripsiyon artışının CAPE tarafından önemli derecede baskılandığını göstermişlerdir. Chandrasekar ve ark. (2003) kardiyomyositlerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uyarımlı oksidatif streste NF-kB aktivasyonuna bağlı olarak İL-18 mRNA transkripsiyonunun uyarıldığını göstermişlerdir. Jayakumar ve ark. (2008) insan monositik kökenli dendritik hücrelere CAPE uygulamasıyla oluşturdukları deneme modelinde, CAPE'in IRF-1, IRF-8, IL-12 RNA ekspresyonunu bloke ettiğini göstermişlerdir. NF-kB normalde sitozolde iK-B'ye bağlı olarak inaktif halde tutulur. Ancak inflamasyon ve ilişkili genlerde gen transkripsiyonlarının artışı, NF-kB'yi aktif hale getirerek hücre çekirdeğine geçişine neden olur (Wulczyn ve ark. 1996, Linder ve ark. 2007). Marquez ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada CAPE'in, NF-kB p65 alt üyesinin hücre çekirdeğine translokasyonunu önleyerek, ROS üretimini ve bunların uyarımıyla meydana gelen yangıyı baskıladığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlar CAPE'in iyi bir yangı önleyici flavonoid olabileceğini göstermektedir.

## 6. SONUÇ

Sonuç olarak, A549 insan akciğer epitel hücrelerinde ekzojen hidrojen peroksit uyarımlı oksidatif stres ve buna bağlı olarak gelişen yangı modelinde, arı propolisinin biyolojik aktif bileşeni olan kafeik asit fentenil esterinin anti-oksidan ve anti-inflamatuar etkinliği araştırıldı. Hidrojen peroksit oksidatif stresi etkin bir şekilde uyararak yoğun hücre ölümlerine sebep olduğu saptandı. Kafeik asit fentenil ester ise hidrojen peroksitin meydana getirdiği bu olumsuz tabloyu, etkin bir şekilde giderdiği bu araştırma sonuçlarına göre tespit edildi. Bu bağlamda CAPE'in solunum yollarında meydana gelen oksidatif stres kaynaklı durumların giderilmesinde uygun bir ajan olarak kullanılabilmesi düşünülebilir. Bu tez çalışmasında alınan sonuçlar, *in vitro* koşullarda oksidatif stres ve bunun sonucu ortaya çıkan yangıda, CAPE'in hangi hücresel mekanizmalarda değişiklikler meydana getirdiği konusunda sonraki yapılacak kapsamlı çalışmalar için bir kaynak olarak kullanılabilmesi gibi, aynı zamanda literatürdeki boşlukların doldurulmasına da büyük katkılar sağlayacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Ahn M.R., Kumazawa S., Hamasaka T., Bang K.S., Nakayama T.** Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *J Agric Food Chem.* **2004** 1.52(24):7286-92.
2. **Alderton W. K., Cooper Chris E. and Knowles R. G.** Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition *Biochem. J.* **2001.** 357:593–615.
3. **Aoki N, Xing Z.** Use of cytokines in infection. *Expert Opin Emerg Drugs.* **2004.** 9(2):223-36.
4. **Aquilano K., Filomeni G., Renzo D. L., Vito M., Stefano C., Salimei P.S., Ciriolo M.R. , Marfe G.** Reactive oxygen, nitrogen species are involved in sorbitolinduced apoptosis of human erithroleukaemia cells K562, *Free Radic. Res.* **2007.** 41: 452–460.
5. **Armstrong L, Jordan N, Millar A.** Interleukin 10 regulation of TNF- $\alpha$  from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax.* **1996.** 51:143-9.
6. **Armutcu, F., Gurel, A., Hostuner, M., Pabuccu, O., Altnyazar, C.** “Caffeic Acid Phenethyl Ester Improves Oxidative Erythrocyte Damage in a Rat Model of Thermal Injury”, *J. Burn Care Rehabil.* **2004.** 25:171-178.
7. **Atlante A., Valenti D., Gagliardi S., Passarella S.** A sensitive method to assay the xanthine oxidase activity in primary cultures of cerebellar granule cells. *Brain. Res. Brain Res. Protoc.* **2000.** 6(1-2):1-5.
8. **Bagnyukova T.V., Storey K.B., Lushchak V.I.,** Adaptive Response of Antioxidant Enzymes to Catalase Inhibition by Aminotriazole in Goldfish Liver and Kidney, *Comp. Biochem. Physiol,* **2005.**142: 335–341
9. **Banskota A.H., Tezuka Y., Kadota S.** Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res.* (**2001**). 15: 561-571
10. **Berkman N., Robichaud A., Robbins R.A., Roesems G., Haddad E.B. Barnes P.J.** Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by interleukin-4 ve interleukin-13 in human epithelial cells. *Immunology* **1996.** 89:363-7.
11. **Bi J., Jiang B. , Liu J. H., Lei C., Zhang X. L. and An L. J.** Protective effects of catalpol against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in astrocytes primary cultures. *Neuroscience Letters* **2008.** 19: 224-227.
12. **Bonizzi G. Karin M.** The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **2004.** 25: 280-288.
13. **Borelli F., Izzo, A.A., Di Carlo G.** Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. *Fitoterapia.* **2002.**73: 38-43.
14. **Bradford M.M,** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing a simple protein-dye binding. *Ann biochem,* **1976.** 72:248-254.
15. **Burduk P.K., Betlejewski S., Drewa G.** Antioxidant enzymes activity and concentration of lipid peroxidation products in chronic tonsillitis before and after surgery. *Otolaryngol Pol.* **2005.** 59(5):693-7.
16. **Buyukberber M., Savaş M. C., Bagci C., Koruk M., Gulsen M. T., Tutar E., Bilgic T., Ceylan N. Ö.** Therapeutic effect of caffeic acid phenethyl ester on cerulein-induced acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* **2009.**7; 15(41): 5181-5185.
17. **Cadenas E.,** Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. REV. Biochem.* **1989.** 58: 79-110.
18. **Celik S., Erdogan S.** Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects brain against oxidative stress and inflammation induced by diabetes in rats. *Mol. Cell. Biochem.* **2008.** 312: 39-46.



19. **Cetinkale O., Belce A., Konukoglu D., Senyuva C., Gumustas M.K., Tas T.** Evaluation of lipid peroxidation and total antioxidant status in plasma of rats following thermal injury. *Burns*. **1997**. 23(2):114-6.
20. **Chandrasekar B., Colston J.T., Rosa S.D., Rao P.P., Freeman G.L.** TNF-alpha and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce IL-18 and IL-18R beta expression in cardiomyocytes via NF-kappa B activation. *Biochem Biophys Res Commun*. **2003**. 303(4):1152-8.
21. **Chen Y.J., Shiao M.S., Hsu M.L.** Induction of apoptosis by caffeic acid phenethyl ester through activation of caspase-3, downregulation of bcl-2 and upregulation of Bax in human leukemic HL-60 cells. *J. Agri. Food. Chem*. **2001a**. 49: 5615-5619
22. **Chen Y.J., Shiao M.S., Wang S.Y.** The antioxidant caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis associated with selective scavenging of hydrogen peroxide in human leukemic HL-60 cells. *Anti-cancer Drug*. **2001b**. 12: 143-149
23. **Chiueh C.C.**, Neuroprotective properties of nitric oxide, *Ann. N.Y. Acad. Sci*. **1999**. 890:301-311.
24. **Cho E.S., Jang Y.J., Hwang M.K., Kang N.J., Lee K.W., Lee H.J.** Attenuation of oxidative neuronal cell death by coffee phenolic phytochemicals. *Mutat Res*. **2009**. 661(1-2):18-24.
25. **Cicala C., Morello S., Iorio C., Capasso R., Borrelli F., Mascolo N.** Vascular effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on isolated rat thoracic aorta. *Life Sci*. **2003**. 73(1):73-80.
26. **Cihangir N., Sorkun K., Salih B.** Chemical composition and antibacterial activities of propolis collected from different regions of Turkey. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*. **2005**. 34: 59-67.
27. **Cirasino L., Pisati A., Fasani F.** Contact dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis*. **1987**. 16: 110-111.
28. **Cohen H.A., Varsano I., Kahan E., Sarrell E.M., Uziel Y.** Effectiveness of an herbal preparation containing echinacea, propolis, and vitamin C in preventing respiratory tract infections in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med*. **2004**. 158(3):217-21.
29. **Coleman J.W.** Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clin Exp Immunol* **2002**. 129:4-10.
30. **Conner GE, Salathe M, Forteza R.** Lactoperoxidase and hydrogen peroxide metabolism in the airway. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. **2002**. 166(12): 57
31. **Cortas NK, Wakid NW.** Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem*, **1990**. 36: 1440-3.
32. **Crispo J. A.G., Piche M., Ansell D. R., Eibl J. K., Tai I. T. Kumar A., Ross G. M., Tai T.C.** Protective effects of methyl gallate on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2010**. 393:773-778
33. **Cushnie T.P., Hamilton V.E., Chapman D.G., Taylor P.W., Lamb A.J.** Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with the antibacterial flavonol galangin. *J Appl Microbiol*. **2007**. Nov;103(5):1562-7.
34. **Davicino R., Manuele M. G., Ferraro G., Micalizzi B., Anesini C.** Modulatory effect of hydrogen peroxide on tumoral lymphocytes proliferation. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. **2009**. 31.1:130-139
35. **Desideri A., Falconi M.** Prokaryotic Cu, Zn superoxidies dismutases. *Biochem. Soc. Trans.*, **2003**, 31:1322-1325.
36. **Dinarello C.A.** The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* **2002**. 20:1-13.

37. **Drenth J.P., Van Uum S.H., Van Deuren M.** Endurance run increased circulating IL-6 and IL-1 $\alpha$  but down-regulates ex vivo TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production. *J Appl Physiol* **1995**.79:1497-503.
38. **Durmuş M., Yılmaz R., H., Uz E., Özçelik N.** The Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Treatment on Levels of MDA, NO and Antioxidant Enzyme Activities in Retinas of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Turk J. Med. Sci.* **2008**. 38 (6): 525-530.
39. **Erel O.** A new colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin. Biochem.* **2005**. 38(12):1103-11.
40. **Feletou M., Köhler R., Vanhoutte P.M.** Endothelium-derived Vasoactive Factors and Hypertension: Possible Roles in Pathogenesis and as Treatment Targets. *Curr. Hypertens. Rep.* **2010**. Jun 8. [Epub ahead of print]
41. **Fenech M., Ferguson L.R.** Vitamins/minerals and Genomic Stability in Human, *Mutat. Res.* **2001**. 475: 1–6.
42. **Flora D., Izzotti S. A., Agostini D. F., Balansky R.M.,** Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points, *Carcinogenesis* **2001**. 22: 999–1013.
43. **Foti M., Granucci F., Ricciardi-Castagnoli P.** Dendritic cell interactions and cytokine production. *Ernst. Schering Res. Found Workshop* **2006**. 56:61-80.
44. **Gałecki P., Kedziora J., Florkowski A., Gałecka E.** Lipid peroxidation and copper-zinc superoxide dismutase activity in patients treated with fluoxetine during the first episode of depression. *Psychiatr Pol.* **2007**. 41(5):615-24.
45. **Gardner R.V., McKinnon E., Poretta C., Leiva L.** Hemopoietic function after use of IL-1 with chemotherapy or irradiation. *J. Immunol.* **2003**.171:1202-6.
46. **Ghafourifar P., Cadenas** Mitochondrial nitric oxide synthase, *Trends Pharmacol.* **2005** 26: 190-195.
47. **Golbidi S., Laher I.** Antioxidant therapy in human endocrine disorder. *Med. Sci. Monit.* **2010**. 16(1):9-24.
48. **Grilli M., Chiu, J. J.S. & Lenardo, M. J.** *Int. Rev. Cytol.* **1993**. 143:1-62.
49. **Güney M., Oral B., Karahan N., Mungan T.** "Protective effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on fluoride-induced oxidative stress and apoptosis in rat endometrium", *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2007**. 24:86-91.
50. **Ha J., Choi H.S., Lee Y., Lee Z.H., Kim H.H.** Caffeic acid phenethyl ester inhibits osteoclastogenesis by suppressing NF- $\kappa$ B and downregulating NFATc1 and c-Fos. *Int Immunopharmacol.* **2009**. 9(6):774-80.
51. **Hady A.E., Faten K., Hegazi A.G.** Egyptian propolis: 2. chemical composition, antiviral and antimicrobial activities and of East Nile Delta propolis from reclaimed lands. *Zeitschrift für Naturforschung C, J. Biosciences*, **2002**. 57: 386-394.
52. **Halliwell B., Gutteridge J.M.C.,** *Free radicals in biology and medicine*. Third ed. Oxford: Oxford Science Publications. **2000**. 6:17-24
53. **Halliwell B., Gutteridge, J.M.C.** *Free Radicals in Biology and Medicine*. **1999**. 3:28-33.
54. **Hermes-Lima M.,** *Oxygen in Biology and Biochemistry Role of Free Radicals*, Storey, K.B., *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, Wiley-Liss, Hoboken, **2004**. 17: 319–368.
55. **Hino T., Nakamura H., Abe S. Saito H., Inage M., Terashita K., Kato S., and Tomoike H.** Hydrogen Peroxide Enhances Shedding of Type I Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor from Pulmonary Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **1999**. 20. 1:122-128.

56. **Hoffmann A., Natoli G., Ghosh G.** Transcriptional regulation via the NF- $\kappa$ B signaling module. *Oncogene*. **2006**. 25: 6706-6716.
57. **Hwang S.L., Yen G.C.**, Neuroprotective effects of the citrus flavanones against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity in PC12 cells, *J. Agric. Food. Chem.* **2008**. 56: 859– 864.
58. **Jayakumar A., Donovan M.J., Tripathi V., Ramalho-Ortigao M., McDowell M.A.** Leishmania major infection activates NF- $\kappa$ B and interferon regulatory factors 1 and 8 in human dendritic cells. *Infect. Immun.* **2008**. 76:2138-48.
59. **Jeong J.B., Park J.H., Lee H.K., Ju S.Y., Hong S.C., Lee J.R., Chung G.Y., Lim J.H., Jeong H.J.** Protective effect of the extracts from *Cnidium officinale* against oxidative damage induced by hydrogen peroxide via antioxidant effect. *Food Chem. Toxicol.* **2009**.47(3):525-9.
60. **Jiang B., Liu J.H., Bao Y.M., An L.J.** Catalpol inhibits apoptosis in hydrogen peroxide-induced PC12 cells by preventing cytochrome c release and inactivating of caspase cascade. *Toxicon*. **2004**. 43(1):53-9.
61. **Jung J.Y., Han C.R., Jeong Y.J., Kim H.J., Lim H.S., Lee K.H., Park H.O., Oh W.M., Kim S.H., Kim W.J.**, Epigallocatechin gallate inhibits nitric oxide-induced apoptosis in rat PC12 cells, *Neurosci. Lett.* **2007**. 411:222–227.
62. **Kartal M., Yildiz S., Kaya S., Kurucu S., Topçu G.**. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, **2003**. 86: 69-73.
63. **Kelley J.** Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis.* **1990**. 141(3):765-88.
64. **Khattab M., Ahmad M., Al-Shabanah O.A., Raza M.** Effects of losartan on blood pressure, oxidative stress, and nitrate/nitrite levels in the nitric oxide deficient hypertensive rats. *Receptors Channels*. **2004**. 10(5-6):147-57.
65. **Kim Y.C., Haraki S., Kim D.J., Park C.B., Takasuka N., Baba-Toriyama H., Ota T., Nir Z., Khachik F., Shimidzu N., Tanaka Y., Osawa T., Uraji T., Murakoshi M., Nishino H., Tsuda H.**, Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on Mouse colon carcinogenesis after 1,2-dimethylhydrazine initiation. *Carcinogenesis*. **1998**. 19: 81-85.
66. **Koca N, Karadeniz F.**. Gıdalardaki dogal antioksidan bileşikler. *Gıda*. **2005**. 30(4): 229-236.
67. **Kosalec I., Bakmaz M., Pepeljnjak S.** Analysis of propolis from the continental and Adriatic regions of Croatia. *Acta. Pharm.* **2003**. 53(4):275-85.
68. **Kristina R., Reto H. A. and Mariana N. Nikolova-K.** Regulation of neutral sphingomyelinase-2 by GSH: a new insight to the role of oxidative stress in aging-associated inflammation. *Journal of Lipid Research*. **2007**. 48: 2443-2452.
69. **Kyungsun C. and Chulhee C.** Differential regulation of c-Jun N-terminal kinase and NF- $\kappa$ B pathway by caffeic acid phenethyl ester in astroglial and monocytic cells *JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY* **2008**. 105:557–564.
70. **Lancaster L.H., Christman J.W., Blackwell T.R., Koay M.A., Blackwell T.S.** Suppression of lung inflammation in rats by prevention of NF- $\kappa$ B activation in the liver. *Inflammation* **2001**. 25:25-31.
71. **Lee S.K., Song L., Mata-Greenwood E.** Modulation of in vitro biomarkers of the carcinogenic process by chemopreventive agents. *Anticancer Res.* **1999**. 19: 35-44.
72. **Lee Y.J., Liao P.H., Chen W.K., Yang C.Y.** Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. *Cancer Lett.* **2000**. 153: 51-56.
73. **Leszczynski D., Pitsillides C. M., Pastila R. K., Anderson R. R. and Lin C. P.** Laser Beam-Triggered Microcavitation: A Novel Method for Selective Cell Destruction. *Radiat. Res.* **2001**.156: 399–407

74. **Li D., Saldeen T., Romeo F., Mehta J.L.** Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: The potential role of transcription factor NF-kappa B. *Circulation*. **2000**. 102: 1970-1976.
75. **Liao Y.R., Hsu J.Y., Chu J.J., Fu L.S.** Caffeic acid phenethyl ester suppresses the induction of eotaxin in human lung fibroblast cells. *J. Asthma*. **2010**. 47(3):233-7.
76. **Lindner I., Cejas P.J., Carlson L.M., Torruellas J., Plano G.V., Lee K.P.** Signal transduction in DC differentiation: winged messengers and Achilles' heel. *Adv Exp Med Biol* **2007**. 590:1-29.
77. **Liochev S.I., Fridovic I.**, The Haber-Weiss cycle- 70 years later: an alternative view, Redox report **2002**. 7:55-57.
78. **Liu J., Cao S., Herman L.M., Ma X.** Differential regulation of interleukin (IL)-12 p35 and p40 gene expression and interferon (IFN)-gamma-primed IL-12 production by IFN regulatory factor 1. *J. Exp. Med.* **2003**. 198:1265-76.
79. **Longo R., Vanella A.** Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*. **2002**. 73: 21-9.
80. **Lovat P.E., Corazzari M., Goranov B., Piacentini M., Redfern C.P.** Molecular mechanisms of fenretinide-induced apoptosis of neuroblastoma cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2004**. 1028: 81-9.
81. **Luck H.** Catalase. In: *Methods in Enzyme Analysis*. Bergmeyer, H.U. eds. Verlag-Chemic. Weinheim/Bergstrasse, Germany, **1965**.
82. **Mahmoud N.N., Carothers A.M., Grunberger D.** Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis*. **2000**. 21: 921-927.
83. **Marnett L.J.**, Lipidperoxidation-DNA damage by malondialdehyde, *Mut. Res-Fund. Mol. Mech. Mutagen.* **1999**. 424:83-95.
84. **Marnett L.J.** Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*. **2002** Dec 27;181-182:219-22.
85. **Marquez N., Sancho R., Macho A., Calzado M. A., Fiebich B. L. And Munoz E.** Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF-kappaB transcription factors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004** 308: 993–1001.
86. **Martin K.R.**, Targeting apoptosis with dietary bioactive agents, *Exp. Biol. Med.* **2006**. 231: 117–129.
87. **Mates J.M., Perez-Gomez C., De Castro I.N.** Antioxidant enzymes and human diseases, *Clin. Biochem.* **1999**. 32: 595-603.
88. **Matsuki M., Watanabe T., Ogasawara A., Mikami T., Matsumoto T.** Inhibitory mechanism of melanin synthesis by glutathione, *Article in Japanese*. **2008**. 128(8):1203-7.
89. **Matsuura E., Hughes G. R. and Khamashta M. A.** Oxidation of LDL and its clinical implication. *Autoimmun Rev.* **2008**. 7: 558-566.
90. **McCall M.R., Frei B.**, Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Rad. Biol. Med.* **1999**. 26: 1034-1105.
91. **Memet S.** NF-kB functions in the nervous system: From development to disease. *Biochem. Pharmacol.* **2006**. 72: 1180-1195.
92. **Monti M., Berti E., Carminati G., Cusini M.** Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis*. **1983**. 9: 163
93. **Natarajan K., Singh S., Burke T. R., Grunberger D., and Aggarwal B. B.** Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-KB. *Immunology*. **1996**. 93: 9090-9095.

94. **Newsholme, P., Haber, E.P., Hirabara, S.M., Rebelato, E.L., Procopio, J., Morgan, D., Oliveira-Emilio, H.C., Carpinelli, A.R. and Curi, R.** Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J. Physiol.* **2007.** 583: 9-24.
95. **Newsholme, P., Keane, D., Welters, H.J. and Morgan, N.G.** Life and death decisions of the pancreatic  $\beta$ -cell: the role of fatty acids. *Clin. Sci.* **2007a.** 112: 27–42
96. **Nguyen, T., Brunson D., Crespi C.L., Penman B.W., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R.** "DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992.** 89 (7): 3030-4.
97. **Nyska A., Kohen R.,** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* **2002.** 30: 620-650.
98. **Oktar S., Yönden Z., Aydin M., Ilhan S., Alçin E., Oztürk O.H.** Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on iron-induced liver damage in rats. *J Physiol Biochem.* **2009.** 65(4): 339-44.
99. **Orban Z., Mitsiades N., Burke T.R. Jr, Tsokos M., Chrousos G.P.** Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor-kappa B and suppresses acute inflammation. *Neuroimmunomodulation* **2000.** 7: 99-105.
100. **Paramo B., Hernández-Fonseca K., Estrada-Sánchez A.M., Jiménez N, Hernández-Cruz A., Massieu L.** Pathways involved in the generation of reactive oxygen and nitrogen species during glucose deprivation and its role on the death of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience.* **2010.** 2.167(4): 1057-69.
101. **Park E.J., Barbul A.** Understanding the role of immune regulation in wound healing. *American J. Surgery* **2004.**187: 11-6.
102. **Parlakpınar H., Tasdemir S., Polat A., Bay-Karabulut A., Vardi N., Ucar M., Acet A.** Protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. *Toxicology.* **2005.** 14;207(2):169-77.
103. **Pastore A., Piemonte F., Locatelli M., Lo Russo A., Gaeta L.M., Tozzi G., Federici G.** "Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects". *Clin. Chem.* **2003.** 47 (8): 1467–1469.
104. **Piga R., Saito Y., Yoshida Y., Niki E.,** Cytotoxic effects of various stressors on PC12 cells: involvement of oxidative stress and effect of antioxidants, *Neurotoxicology* **2007.** 28: 67–75.
105. **Poli G.,Leonarduzzi G., Biasi F., Chiarpotto E.** Oxidative stress and cell signalling. *Curr. Med. Chem.* **2004.** 11:1163-1182.
106. **Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A., De Tata V., Casini A.F.** "The changing faces of glutathione, a cellular protagonist". *Biochem Pharmacol.* **2003.** 66:173-179
107. **Rimal B., Greenberg A.K., Rom W.N.** Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. *Curr Opin Pulm Med.* **2005.** 11(2):169-73.
108. **Ritola O., Peters L.D., Livingstone D.R., Lindström-Seppä P.,** Effects of In vitro Exposure to Ozone and/or Hyperoxia on Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione and Lipid Peroxidation in Red Blood Cells and Plasma of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Aquac. Res.* **2002.** 33:165–175.
109. **Sadowska A.M., Verbraecken J., Darquennes K., Backer D.W.A.** Role of N-acetylcysteine in the management of COPD, *Int. J. Chron. Obstruct. Pulm. Dis.* **2006.** 1:425–434.
110. **Saleh M.A., Clark S., Woodard B., Deolu-Sobogun S.A.** Antioxidant and free radical scavenging activities of essential oils. *Ethn. Dis.* **2010.** 20(1):78-82.
111. **Santarelli L., Bracci M., Mocchegiani E.** In vitro and in vivo effects of mercuric chloride on thymic endocrine activity, NK and NKT cell cytotoxicity, cytokine

- profiles (IL-2, IFN-gamma, IL-6): role of the nitric oxide-L-arginine pathway. *Int Immunopharmacol.* **2006.** 6(3):376-89.
112. **Sasaki N., Toda T., Kaneko T., Baba N., Matsuo M.,** Flavonoids suppress the cytotoxicity of linoleic acid hydroperoxide toward PC12 cells, *Biol. Pharm. Bull.* **2002.** 25: 1093–1096.
  113. **Scandalios J.G.** Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* **2005.** 38 (7): 995.
  114. **Sedlak J., Lindsay R.H.** Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem,* **1968.** 25(1):192-205.
  115. **Serafini M., Peluso I., Raguzzini A.** Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc. Nutr. Soc.* **2010.** 23:1-6.
  116. **Shami P.J., Moore J.O., Cockerman J.P., Halhorn W.J., Misukonis M.A., and Weinberg J.B.** Nitric oxide modulation of the growth and differentiation of freshly isolated acute non-lymphocytic leukaemia cells. *Leukaemia Research;* **1995.** 19(8): 527–534.
  117. **Sinigaglia F., D'Ambrosio D., Panina-Bordignon P., Rogge L.** Regulation of the IL-12/IL-12R axis: a critical step in T-helper cell differentiation and effector function. *Immunol. Rev* **1999.** 170: 65-72.
  118. **Son S., Lewis B.A.** Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure- activity relationship. *J. Agric. Food Chem.* **2002.** 50: 468-472.
  119. **Song Y.S., Park E.H., Hur G.M., Ryu Y.S., Lee Y.S., Lee J.Y., Kim Y.M., Jin C.** Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *Cancer Lett.* **2002.** 175(1):53-61.
  120. **Sorkun K., Suer B., Salih B.** Determination of chemical composition of Turkish propolis. *Zeitschrift für Naturforschung.* **2001.** 56: 666-668.
  121. **Storey K.B.** Oxidative Stress: Animal Adaptations in Nature, *Braz. J. Med. Biol. Res.,* **1996.** 29: 1715–1733.
  122. **Takaoka, A., Yanai H., Kondo S., Duncan G., Negishi H., Mizutani T., Kano, Shin-Ichi H., Kenya O., Yusuke, M., Tak M., Taniguchi T..** Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* **2005.**434:243–249.
  123. **Tripathi P. and Aggarwal A.** NF-kB transcription factor: a key player in the generation of immune response. *Current Science.* **2006.** 90: 4-25.
  124. **Totan Y., Aydin E., Cekic O., Dagloglu C.M., Borazan M., Daglioglu K., Gultek A.** Effect of caffeic acid phenethyl ester on corneal neovascularization in rats. *Curr. Eye Res.* **2001.**23: 291-297.
  125. **Toyoda T., Tsukamoto T., Takasu S., Shi L., Hirano N., Ban H., Kumagai T., Tatematsu M.** Anti-inflammatory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a nuclear factor-kappaB inhibitor, on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Int J Cancer.* **2009.** 125(8):1786-95.
  126. **Undeğer U, Başaran A, Degen GH, Başaran N.** Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food Chem Toxicol.* **2009.** 47(8): 2037-43.
  127. **Upadhyay G., Singh A.K., Kumar A., Prakash O., Singh M.P.** Resveratrol modulates pyrogallol-induced changes in hepatic toxicity markers, xenobiotic

- metabolizing enzymes and oxidative stress. *Eur J Pharmacol.* **2008.** 596(1-3):146-52.
128. **Upton J.R., Edens F.W., Ferhet P.R.** The effects of dietary oxidized fat and selenium source on performance, glutathione peroxidase and glutathione reductase activity in broiler chickens. *J. Appl. Poult. Res.* **2009.** 18: 193-202.
  129. **Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J.,** Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* **2004.** 266:37-56
  130. **Wang X., Zalacstein A., Oren M.** Nitric oxide promotes p53 nuclear retention and sensitizes neuroblastoma cells to apoptosis by ionizing radiation. *Cell Death Differ* **2003.**10:468-76.
  131. **Winston G.W., Di Giulio R.T.** Prooxidant and Antioxidant Mechanisms in Aquatic organisms, *Aquatic Toxicology,* **1991.** 19: 137–161.
  132. **Witowski J., Ksiazek K., Jorres A.** Interleukin-17: A mediator of inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci* **2004.** 61:567-79.
  133. **Wondrath G.T.** Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanism and opportunities. *Antioxid.Redox. Signal.* **2009.** 11: 3013-69.
  134. **Wulczyn F.G., Krappmann D., Scheidereit C.** The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J Mol. Med.* **1996.** 74: 749-69.
  135. **Xu H.B., L. Li, Liu G.Q.,** Protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells by guggulsterone, *Yao Xue Xue Bao* **2008.** 43:1190–1197.
  136. **Yağmurca M., Erdoğan H., Iraz M., Songur A., Uçar M., Fadillioğlu E.** Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent against doxorubicin nephrotoxicity in rats. *Clin. Chim. Acta.* **2004.** 348(1-2): 27-34.
  137. **Yoon J.H., Lee M.S., Kang J.H.** Reaction of ferritin with hydrogen peroxide induces lipid peroxidation. *BMB Rep.* **2010.** 43(3):219-24.
  138. **Yu Y., Du J.R., Wang C.Y., Qian Z.M.,** Protection against hydrogen peroxide-induced injury by Z-ligustilide in PC12 cells, *Exp. Brain Res.* **2008.** 184: 307– 312.
  139. **Zhong, G., Lifang, S., Qiang, D., Kyung, S. P. and Geller D.A.** Identification of a classic cytokine-induced enhancer upstream in the human iNOS promoter. *FASEB J.* **2007.** 21: 535-542.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1981 yılında doğdu. İlk ve orta öğretimini Tarsus, lise öğrenimini ise Mersin'de tamamladı. 2000 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesini kazandı. 2005 yılında mezun oldu. 2006 eylül ayında Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı.