

**SIÇAN AKCİĞERİNDE
BLEOMİSİN İLE İNDÜKLENEN
OKSİDATİF STRESİN ÖNLENMESİNDE
PİCEATANNOL'UN ETKİLERİ**

YUNUS EMRE SARI

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak-2015

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Yunus Emre Sarı'nın “Sıçan Akciğerinde Bleomisin ile İndüklenen Oksidatif Stresin Önlenmesinde Piceatannol'un Etkileri” başlıklı Moleküler Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 19.12.2014 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Yard.Doç.Dr. Volkan Kılıç	
Üye : Doç.Dr. Miriş Dikmen	
Üye : Yard. Doç. Dr. Zerrin Cantürk	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SIÇAN AKCİĞERİNDE BLEOMİSİN İLE İNDÜKLENEN OKSİDATİF STRESİN ÖNLENMESİNDE PİCEATANNOL'UN ETKİLERİ

Yunus Emre SARI

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç. Dr. Volkan KILIÇ
2014, 69 sayfa

Bu çalışmada, bleomisin'in neden olduğu oksidatif strese karşı piceatannolun etkileri sıçan akciğerinde incelenmiştir. 200-250 gr ağırlığındaki erkek Wistar cinsi sıçanlar 4 grup halinde oluşturulmuştur. Deney grupları; kontrol grubu (serum fizyolojik uygulanmış i.p), bleomisin uygulanan grup (tek doz i.p 10 mg/kg), bleomisin (10 mg/kg i.p) ve piceatannol (4mg/kg i.p) uygulanan grup, son grup ise piceatannol (4 mg/kg i.p) uygulanmış sıçanlardan oluşmaktadır.

Deneylerde biyokimyasal teknikler kullanılmıştır. Akciğer dokusundaki toplam protein düzeyleri belirlenmiştir. Lipid peroksidasyonunun bir belirteci olarak malondialdehit (MDA) seviyeleri ölçülmüştür. Lipid peroksidasyonu bulgularını desteklemek ve oksidatif stresi belirleyebilmek amacıyla, antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

Piceatannolun, akciğerlerde bleomisin maddesinin indüklediği oksidatif stresin azalmasını hücrelerdeki serbest radikalleri yakalama yoluyla yaptığını ve ayrıca bu hücrelerde hücrelerin antioksidan kapasitesini arttırdığı biyokimyasal testlerin sonunda gözlemlenmiştir. Artan antioksidan kapasite sayesinde, lipid peroksidasyonu azalmakta ve hücredeki zararlı yapılar korunmaktadır.

Biyokimyasal bulgular, piceatannolun 4.0 mg/kg dozu bleomisin ile meydana gelen oksidatif strese bağlı hücre hasarının önlenmesinde etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışma ile bleomisin'in, piceatannol ve hücrenin başlıca antioksidan bileşenleri arasındaki in vivo etkileşimleri ilk defa ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Piceatannol, Bleomisin, Oksidatif Stres, Antioksidan

Enzimler

ABSTRACT

Master of Science in Biology

THE EFFECTS OF PICEATANNOL ON THE LUNGS OF RATS AGAINST OKSIDATIVE STRESS CAUSED BY BLEOMYCIN

Yunus Emre SARI

**Anadolu University Institute of Science
Department of Biology**

**Supervisor: Ass.prof. Volkan KILIÇ
2014, 69 pages**

In this Study ,the effects of Piceatannol(PC) on the lungs of rats against oksidative stress caused by Bleomycin(BLM) have been examined.Wistar male type of rats are divided into 4 groups; 1.control group, 2. group subjected to only bleomycin toxicity (10 mg / kg), 3.the ones subjected to piceatannol(4 mg/kg) and bleomycin toxicity(10 mg / kg), 4.the ones given only piceatannol(4mg/kg).

In the experiments, biochemical techniques have been used and total protein leves in lung tissues have been measured. As an indication of lipid peroxidation, levels of Malondialdehit (MDA) has been measured. SOD , Glutation Peroksidase and Catalase enzym activities have been determined in order to support the findings of lipid peroxidation and decide on the oxidative stress. Biochemical tests show that PC decreases oxidative stress that BLM makes up in lung through cathing free radikals in cells and increases antioxidant capacity of cells. As a result of increased *antioxidant capacity* in cells, lipid peroxidation diminishes and membrained structure of cells are conserved.

Biochemical findings indicate that PC (4 mg/kg) is effective in the prevention of cell damage related to oxidative stress caused by BLM.With this study, in vivo interaction among antioxidat components of BLM , PC and cells is shown for the first time.

Key Words: Piceatannol, Bleomysin, Oxidative Stress, Antioksidan Enzymes

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KONU VE KAPSAM	2
2.1. Serbest Radikaller.....	2
2.1.1. Reaktif Oksijen Türevleri.....	2
2.1.1.1. ROS Sınıflandırılması.....	3
2.1.1.2. Ros Kaynakları.....	4
2.1.2. Biyolojik Sistemlerde Serbest Radikaller.....	6
2.1.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$).....	6
2.1.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	6
2.1.2.3. Hidroksil Radikali ($\cdot OH$).....	7
2.1.2.4. Singlet Oksijen ($^1O_2$).....	7
2.1.2.5. Peroksil ve Alkoksil Radikalleri ($ROO^{\cdot}$, $RO^{\cdot}$).....	8
2.1.2.6. Nitrik Oksit ($NO^{\cdot}$).....	8
2.1.3. Serbest Radikallerin Etkileri.....	8

2.1.3.1. DNA ve Nükleik Asitler Üzerine Etkileri.....	9
2.1.3.2. Proteinler Üzerine Etkileri.....	9
2.1.3.3. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri.....	9
2.1.3.4. Lipitler Üzerine Etkileri.....	10
2.1.3.5. Oksidatif Strese Bağlı Hücresel Değişiklikler.....	11
2.2. Akciğer ve Yapısı.....	16
2.3. Bleomisin.....	17
2.3.1. Bleomisin'in Kimyasal Yapısı.....	18
2.3.2. Bleomisinli Hayvan Modelleri.....	20
2.3.3. Bleomisinli Modellerde İlaç Etkileşim Çalışmaları.....	21
2.3.4. Bleomisin'in Etki Mekanizması.....	22
2.3.5. Bleomisin'in Tedavide Kullanımı.....	23
2.4. Serbest Radikallere Karşı Savunma Mekanizmaları.....	24
2.4.1. Antioksidanlar	24
2.4.2 Antioksidan Enzimler.....	27
2.4.2.1. Süperoksit Dismutaz.....	27
2.4.2.2 Glutasyon Peroksidaz.....	28
2.4.2.3. Glutasyon.....	29
2.4.2.4. Katalaz.....	30
2.4.3. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	30
2.4.3.1. Fitokimyasalların antioksidan rolü.....	30
2.4.3.2. Polifenoller.....	31
2.4.3.3. Flavonoidler.....	32

3. MATERİYAL ve YÖNTEM	38
3.1. Materyal.....	38
3.1.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Deney Gruplarının Oluşturulması.....	38
3.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	38
3.2. YÖNTEM.....	39
3.2.1. Biyokimyasal İncelemeler İçin Uygulanan İşlemler.....	39
3.2.1.2. Süperoksit Dismutaz (Cu-Zn SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	40
3.2.1.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	43
3.2.1.3. Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü.....	45
3.2.1.4. Malondialdehit (MDA) Tayini ile Dokulardaki Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi.....	46
4. BULGULAR	48
4.1. Toplam Protein Analizleri.....	48
4.2. Biyokimyasal Analizler.....	49
4.2.1. SOD Enzim Aktivitesi.....	48
4.2.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesi.....	49
4.2.3. Katalaz Enzim Aktivitesi.....	51
4.2.4. MDA Düzeyleri.....	52
5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER	53
KAYNAKÇA.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Reaktif oksijen türevleri.....	4
2.2. ROS kaynakları.....	5
2.3. Lipid peroksidasyon reaksiyonları.....	11
2.4 Hücrede oksidatif strese bağlı olarak gelişen olaylar.....	12
2.5. Normal ve hasarlı hücrenin şematik yapısı	15
2.6. Bleomisin'in kimyasal yapısı	19
2.7. Antioksidanların sınıflandırılması.....	26
2.8. Glutasyon molekülünün kimyasal yapısı.....	29
2.9. Kuersetin (Flavonoidlerin kimyasal yapısı	33
2.10. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.....	33
2.11. Trans – resveratrol.....	34
2.12. Resveratrol'ün etkili olduğu durumlar.....	35
2.13. Piceatannol (trans-3,4',3',5-tetrahydroxystilbene) (PC).....	36
3.1. SOD aktivitesi belirlenirken meydana gelen reaksiyonlar.....	40
3.2. Zamana karşı absorbands grafiği.....	42
3.3. Malondialdehit tiobarbitürik asit kompleksi sonucunda oluşan bileşiğin yapısı.....	46
4.1. SOD aktivitesi sonuçları grafiği (* kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılık.....	49
4.2. GPx aktivitesi sonuçları grafiği (* kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılık.....	50
4.3. Cat aktivitesi sonuçları grafiği (* kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılık.....	51
4.4. MDA düzeyi sonuçları grafiği (* kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılık.....	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

3.1. Vs/Vc oran tablosu.....	43
4.1. Deney gruplarına göre toplam protein değerleri(* $P \leq 0.005$ Dunnet-test)....	48
4.2. Deney gruplarına göre SOD enzim aktivitesi değerleri (U/mg prt) ve kontrol grubu ile istatistiksel açıdan karşılaştırılmaları (* $P \leq 0.005$ dunnett's T3test).....	49
4.3. Deney gruplarına göre glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi değerleri (nmol/mg protein) ve kontrol grubu ile istatistiksel açıdan karşılaştırılmaları(* $P \leq 0.005$ dunnett's T3-test).....	50
4.4. Deney gruplarına göre katalaz enzim aktivitesi değerleri (U/ml) ve kontrol grubu ile istatistiksel açıdan karşılaştırılmaları (* $P \leq 0.005$ dunnett's T3-test).....	51
4.5. Deney gruplarına göre MDA değerleri (nmol/mg protein) ve kontrol grubu ile istatistiksel açıdan karşılaştırılmaları(* $P \leq 0.005$ dunnett's T3- test).....	52

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BLM	: Bleomisin
CAT	: Katalaz
Ca ²⁺	: Kalsiyum iyonu
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DTPA	: Dietilentriaminpentaasetik asit
GSH	: Glutatyon
GPx	: Glutatyon Peroksidaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
İPF	: İdiopatik Pulmoner Fibrozis
İP	: İntraperitoneal
İ.T	: İntra trakeal
LOO [·]	: Lipid peroksil radikali
MDA	: Malondialdehid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NO [·]	: Nitrik Oksit
NO ₂ ⁻	: Nitrit
NO ₃ ⁻	: Nitrat
·OH	: Hidroksil Radikali
PC	: Piceatannol
PF	: Pulmoner Fibrozis

RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktiv Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
Tyr	: Tirozinle
$^1\text{O}_2$	: Singlet Oksijen

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dokularda meydana gelen reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikaller DNA, protein, karbonhidrat ve lipidler gibi biyolojik açıdan önemli materyallere zarar verebilmektedir. Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında bleomisin (BLM) gibi antineoplastik ajanların bulunması nedeniyle serbest radikaller toksikolojik açıdan da önemlidir. BLM, bleomisin-demir kompleksi oluşturarak moleküler oksijeni, süperoksit ve hidroksil radikallerine dönüştürür. Bu da DNA' da iplikçik kırılmalarına ve DNA-RNA-protein sentezinde hasara sebep olarak anti-neoplastik etki gösterir [1,2].

Bleomisin doku ve organlarda reaktif oksijen türevlerinin aşırı üretimini indükleyerek süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) gibi endojen antioksidan enzimlerde aktivite kaybına neden olmaktadır. Oluşan reaktif oksijen ürünleri (ROS) savunma sisteminin koruyucu etkisini aşacak şekilde fazla oluşmaları sonucu, metabolizma da zararlı etkiler meydana getirebilmektedir.

Antioksidanların tedavi amaçlı olarak kullanımı, enfeksiyon sırasında ortaya çıkan oksidatif stresi engelleyerek DNA ve diğer yaşamsal makromoleküllerin zarar görmesini önleyebilecek önemli bir farmakolojik araç olabilir [4].

Piceatannol (trans-3,4',3',5-tetrahydroxystilbene) (PC), antikanser özellikleri sıklıkla çalışılmış doğal bir stilben bileşiği olan resveratrol'ün 3' pozisyonunda ilave bir fenolik gruba sahip olan analogudur. Yapısındaki farklılık nedeniyle, piceatannol, serbest radikallerle daha kolay etkileşime girebilmekte ve daha kararlı reaksiyon ürünleri oluşturmaktadır. Piceatannol'ün süperoksit radikalini ($O_2^{\cdot-}$) temizlemek için kullanılması gereken konsantrasyonu resveratrol ile karşılaştırıldığında daha düşüktür. Bununla birlikte, Piceatannol'ün, lipid peroksil radikali ($LOO^{\cdot}$) için de resveratrol'den çok daha güçlü bir süpürücü olduğu bilinmektedir. Piceatannol'ün antiinflamatuvar, antikarsinogenik ve belli bir düzeydeki antimutajenik etkileri de, son yıllarda yapılmış çalışmalarla ortaya konulmuştur [5]. Bu nedenle, çalışmamızda bu eksojen antioksidan molekülün, hücre hasarını önlemedeki potansiyelinin, antioksidan enzim düzeyleri ile bağlantılı olarak araştırılarak ortaya koyulması amaçlanmıştır.

2.KONU VE KAPSAM

2.1.Serbest Radikaller

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında parakuat, alloksan gibi kimyasalların etkisi altında kalma, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, alkol ve uyuşturucular gibi alışkanlık yapıcı maddeler bulunması nedeniyle serbest radikaller toksikolojik açıdan da önemlidir [7, 8, 9, 10].

Çoğu olayda serbest radikal üretimi, pato-mekanizmanın bir parçasıdır ve pek çok ksenobiyotiğin toksisitesi, serbest radikal üretimi ile ilgilidir. Kadmiyum ve kurşun gibi bazı çevre kirleticilere uzun süre mesleki maruz kalmalar, oksidatif strese neden olabilir ki bu, biyolojik sistemlerdeki istenmeyen süreçlerin oluşmasına zemin hazırlar [11, 12]. Oksidatif stres basit bir şekilde, vücudun antioksidan savunması ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanabilir.

Oksidatif stres, toksisitenin olası bir mekanizması olarak son on yıldır toksikolojik araştırmaların odağı haline gelmiştir. Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir [13]. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir.

2.1.1.Reaktif oksijen türevleri

Atomlarda elektronlar “orbital” adı verilen uzaysal bölgede çiftler halinde bulunurlar. Atomlar arasında etkileşim ile bağlar meydana gelmekte ve moleküler yapı oluşmaktadır. Serbest radikal, atomik veya moleküler yapılarda eşlenmemiş tek elektron bölümlerine verilen addır. Diğer moleküller ile elektron alışverişine

giren bu moleküllere "oksidan moleküller" veya "reaktif oksijen türevleri (Reactive oxygen species: ROS)" olarak adlandırılırlar [1,14].

2.1.1.1.ROS sınıflandırılması

Canlılarda pek çok ROS türü farklı şekillerde meydana gelebilir ancak en sık olarak lipid yapılarla oluşur. Örneğin; doymamış yağ asitlerinin alil grubundan bir hidrojen çıkarsa lipid radikali meydana gelir. Oluşan lipid radikali oksijen ile reaksiyona girer ve lipid peroksi radikalini oluşturur. Lipid peroksi radikali diğer lipidlerle zincir reaksiyonu başlatır ve lipid hidroperoksitler oluşur.

Ortamda bulunan demir ve bakır iyonları lipid peroksidasyonunu hızlandırır [2,15]. Lipid radikaller yüksek derecede sitotoksik ürünlere de dönüşebilir. Bunlar arasında en çok bilinen ürün aldehit grubundan malondialdehitdir (MDA).

Hidrojen peroksit membranlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik rollere sahip olabilir, fakat çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığından radikal olarak adlandırılmaz. Bu nedenle "Reaktif oksijen türevleri", süperoksit gibi radikaller, ayrıca hidrojen peroksit gibi radikal olmayanlar için ortak olarak sıkça kullanılan bir terimdir [15]. Oksijen molekülü, orbitalinde çiftlenmemiş elektron taşıyorsa süperoksit radikali olarak adlandırılır.

Diğer ROS grubunda ise normal oksijenden çok daha hızlı bir biyolojik molekül olan "singlet oksijen" bulunmaktadır. Singlet oksijen molekülü yapısında iki adet çiftlenmemiş elektron taşır. Singlet oksijen hücre membranındaki poliansatüre yağ asitleriyle doğrudan reaksiyona girerek lipid peroksitlerin oluşumuna yol açar [14,15].

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$)	Lipit hidroperoksit (LOOH)
Hidroperoksil radikali ($HO_2^{\cdot}$)	Hipokloröz asid (HOCL)
Alkosil radikali ($LO^{\cdot}$)	Singlet oksijen ($^1\Delta gO_2$)
Peroksil radikali ($LOO^{\cdot}$)	Ozon (O_3)
Thiyl radikali ($LS^{\cdot}$)	Peroksinitrit ($ONOO^-$)
Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$)	

Şekil 2.1 Reaktif oksijen türevleri [15]

2.1.1.2 Ros kaynakları

Mitokondrilerdeki oksijenli solunumda olduğu gibi birçok anabolik ve katabolik işlemler sırasındaki reaksiyonlarda moleküler düzeyde elektron kaçışları olur ve bu sırada ROS'lar oluşur [17,18]. İskemi, hemoraji, travma ve radyoaktivite gibi durumlarda mitokondrilerdeki aerobik oksidatif fosforilasyon dengesi etkilenir ve elektron taşıma sisteminden elektron kaçakları daha fazla olur ve ROS düzeyi artar. ROS'ların düzeyi, yaşlanma süreci ile paralel bir artış gösterir. Yaşlanma ile protein karboksilasyonunun artışı ve katalize edici tüm enzimlerin azalmasının bu dengesizlikte önemli rolleri vardır. Enfeksiyöz olaylarda başta *Staphylococcus aureus* gibi patojenler ayrıca lökotrienler, prostaglandinler gibi mediyatör maddeler nötrofil, eozinofil ve makrofajları aktive ederler, membrana bağlı NADPH oksidaz enzimi yoluyla ROS salgılanmasına yol açarlar [19,20].

I - Normal biyolojik işlemler:
1 - Oksijenli solunum
2 – Katabolik ve anabolik işlemler
II - Oksidatif stres yapıcı durumlar
1 - İskemi - hemoraji - travma – radyoaktivite intoksikasyon
2 - Ksenobiotik maddelerin etkisi
a-) İnhale
b-) Alışkanlık yapan maddeler
c-) ilaçlar
3 - Oksidan enzimler
a-) Ksantin oksidaz
b-) İndolamin dioksigenaz
c-) Triptofan dioksigenaz
d-) Galaktozoksidaz
e-) Siklooksigenaz
f-) Lipooksigenaz
g-) Monoamino oksidaz
4 - Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu
5 – Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelial hücreler)
6 – Uzun süreli metabolik hastalıklar
7 – Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara
III - Yaşlanma süreci

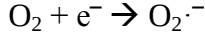
Şekil 2.2 ROS kaynakları [20]

Nötrofiller tarafından kullanılan antibakteriyel savunma mekanizması myeloperoksidaz enzimidir. Süperoksit radikalının dismutasyonu sonucu oluşan hidrojen peroksit myeloperoksidaz enzimi aracılığıyla reaksiyona girerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan hipoklorik asidi oluşturur. Enfeksiyöz ajanlarla savaş için gerekli olan ROS'lar kan hücreleri tarafından aşırı salgılanacak olurlarsa bu kez yarar yerine zararlı olmaya başlarlar [21,22].

2.1.2. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller

2.1.2.1 Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)

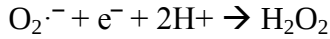
Aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu kararsız bir yapı olan süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) meydana gelir [16,18].



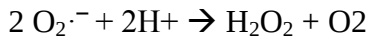
Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direk olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır [16]. Asıl kaynağı endotel hücreler, lenfositler, endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi normal hücresel reaksiyonlar sonrasında ortaya çıkan zayıf bir oksidandır [17,18]. Süperoksit radikali bunun dışında başka olaylardada meydana gelebilir. Örneğin, iskemik-reperfüzyonda aktive olan ksantin oksidaz gibi enzimlercede endojen olarak oluşturulabilir [20].

2.1.2.2 Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Moleküler oksijenin etrafındaki moleküllerden 2 elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksiti (H_2O_2) meydana getirir [16].

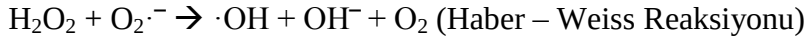
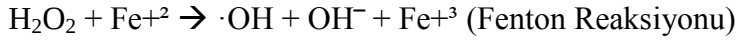
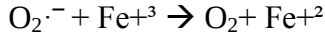


Biyolojik sistemlerde H_2O_2 'in asıl kaynağı oksijenin dismutasyonu ya da oksijenin doğrudan indirgenmesiyle oluşur [16,17,18].



Hidrojen peroksit yağda çözünabilir özelliğinden dolayı membranlardan kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır [16,17].

Hidrojen peroksit, eşleşmemiş elektron içermediğinden dolayı aslında gerçek bir serbest radikal değildir; fakat reaktif oksijen oluşumunu tetikleyen en önemli unsurlardan biri olduğu için ROS türleri içinde sayılır ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Özellikle süperoksit anyon radikali ile reaksiyona girerek, hücrede en reaktif ve zarar verici olan hidroksil radikalini oluşturur [16,18].



2.1.2.3 Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$)

Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$), hidrojen peroksitin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle (Fenton Reaksiyonu ile) meydana gelir. Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur [16,18]. Son derecede reaktif bir oksidan radikaldir. Yarılanma mr oldukça kısadır, meydana geldiği yerde büyük hasara neden olur.

Dokular radyasyona maruz kaldıklarında, enerjinin çoğu hücre içindeki su tarafından absorbe edilmekte ve radyasyon, oksijen ile hidrojen arasında kovalent bağa neden olmaktadır [14,17]. Hidroksil radikalının DNA'nın pürin ve pirimidin bazları ile etkileşmesi baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları oluşabilir. Hücre zarında zincirleme lipid peroksidasyonunu başatabilir ve bunun sonucunda zarın yapısı bozulur ve dolayısı ile zarın geçirgenliğini artırarak hücrenin ölümüne yol açabilir [18,21].

2.1.2.4 Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)

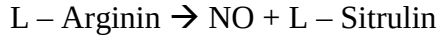
$^1\text{O}_2$ ortaklanmamış elektronu olmadığı için non-radikal reaktif oksijen molekülüdür. Reaktivitesi çok yüksek bir oksijen türüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur [23,24]. Poliansature yağ asitleri ile tepkimeye girerek yarı ömrü uzun olan peroksil radikalini meydana getirir ve hidroksil radikali kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilmektedir [3,23]. Karbon-Karbon ift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Bunlar DNA, NADPH, karotenler, histidin, metionin, bilirubin ve kolesterol gibi bileşiklerdir. Ayrıca ışığa maruz kalan lens veya kloroplast gibi birçok pigment sisteminde de singlet oksijen oluşur [3,23].

2.1.2.5 Peroksil ve alkoksil radikalleri (ROO· , RO·)

Plazma membranı üzerindeki doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunda peroksil ve alkoksil radikalleri açığa çıkar. Bu radikaller, bir H⁺ atomunu atarlar. Böylece organik hidroperoksidler ve alkol oluşur. Hidrojen atomunun atılması, bir başka lipid üzerinde karbonun oksijenle birleşmesi ve başka bir lipid peroksid oluşturmaya sona erer. Yeni oluşan lipid peroksid kararlı hale geçebilmek için bir H⁺ atomunu atar ve zincir reaksiyon süreklilik kazanır. Sonuçta, plazma membranının peroksidatif hasarı oluşur [16,21].

2.1.2.6 Nitrik oksit (NO·)

Serbest bir radikal olan ve diğer serbest radikallerle reaksiyona girebilme eğiliminde olan nitrik oksit, Nitrik oksit sentetaz adlı bir enzim ile endotelde bir amino asit olan L – arginin’in terminal guanidin grubunun oksitlenmesi ile oluşmaktadır [21,22].



Nitrik oksit (NO) oluşuktan sonra: Methemoglobin ile nitrite (NO₂⁻) ve nitrate (NO₃⁻) dönüştürülerek inaktive olur; süperoksit anyonları (O₂⁻) ile birleşerek peroksinitrite (ONOO⁻) dönüşür. Peroksinitrit, hidroksil radikalleri (OH·) ve Tirozinle (Tyr) birleşerek nitrotirozini oluştururlar. OH· ve ONOO⁻ radikal hasarına sebep olurlar [21].

2.1.3. Serbest radikallerin etkileri

Serbest radikaller vücut dışından ekzojen etkilerle oluşabileceği gibi insan metabolizmasının doğal bir sonucu olarak endojen olarak da oluşabilirler. Dokularda meydana gelen serbest oksijen radikalleri vücutta antioksidan savunma mekanizmasının kapasitesini geçtikleri zaman çeşitli bozukluklara yol açarlar. DNA, protein, karbonhidrat ve lipid gibi biyomoleküllere zarar vererek hücrelerde yapısal ve metabolik değişiklikler ve hasarlara neden olurlar [16,17,18].

Serbest radikallerin hücre dışı etkileri hücreler arası boşluk ve sıvılarda ortaya çıkar. Özellikle eklem ve beyin omurilik sıvılarında antioksidan savunmanın yetersiz olması nedeniyle, bu bölgelerde serbest radikallere bağlı yıkımın daha fazla olduğu gözlenmektedir [19]. Serbest radikallerin bu etkileri aşağıdaki başlıklar halinde incelenebilir.

2.1.3.1 DNA ve nükleik asitler üzerine etkileri

Hidroksil radikali, hücre zarından kolay bir şekilde geçtiğinden dolayı DNA'nın ana yapı taşı olan pürin ve pirimidin bazlarına etki ederek hücrede lezyonlara, mutasyona ve ölüme yol açarlar. Bu yüzden DNA ve nükleik asitler serbest radikallerden kolayca etkilenebilirler [16,17,18].

2.1.3.2 Proteinler üzerine etkileri

Proteinler, serbest radikallere karşı doymamış yağ asitlerine oranla daha az etkilendirler ve zarar verici zincir reaksiyonlarının hızla ilerleme olasılığı daha düşüktür. Proteinlerin serbest radikallerin zararlı etkilerinden ne derece etkileneceği proteinlerin amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt (sülfür) içeren moleküllerin serbest radikaller ile etkileşimi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitler ve bunların oluşturduğu proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilendirler [3,8,18].

2.1.3.3 Karbonhidratlar üzerine etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine etkileri monosakkaritlerin otooksidasyonu ile gerçekleşir ve bu otooksidasyon sonucunda hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler oluşur. Bunların diyabet, sigara, alkol tüketimi ve bazı kronik hastalıklarla ilişkileri çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir [3,18]. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz

bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Bu durum, kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynadıklarını düşündürmektedir [18].

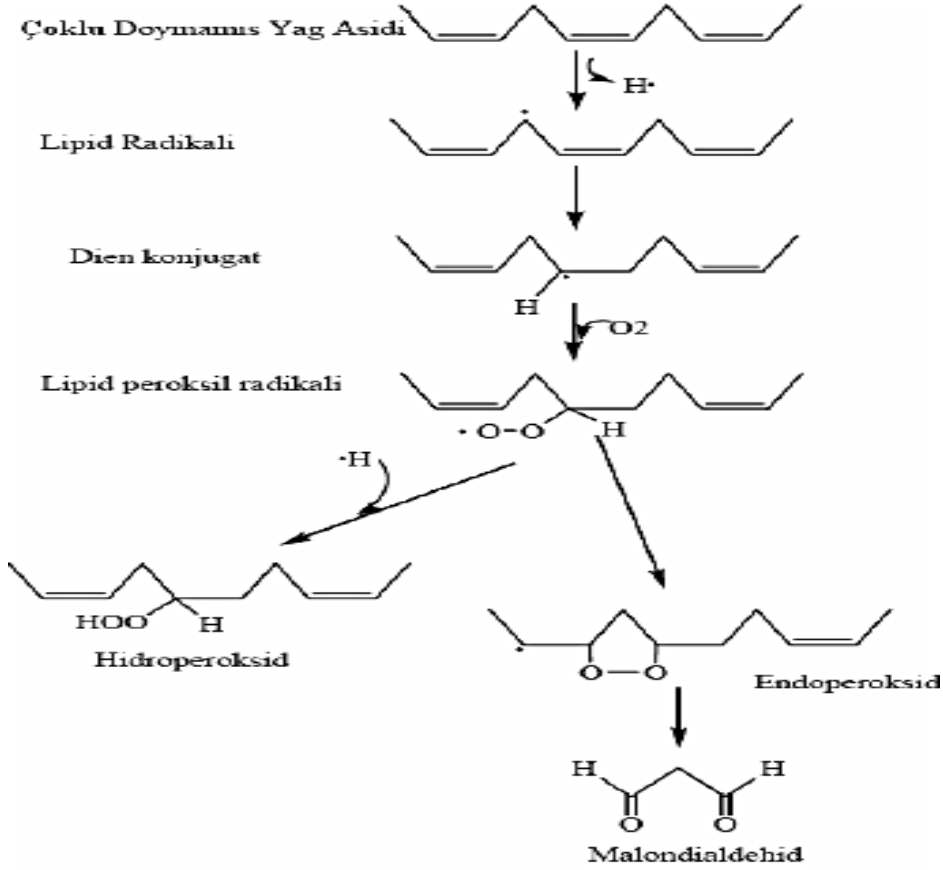
2.1.3.4 Lipitler üzerine etkileri

Hücre zarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca etkileşime girebilirler bu nedenle, lipitler diğer biyomoleküllere göre en hassas olanlardır. Poliansature yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipit peroksidasyonu olarak bilinir ve kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerlediği için hücrede hasara sebep olur. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür [29,30].

Lipid peroksidasyonu, membran yapısında bulunan Poliansature (çoklu doymamış) yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlar. Bunun sonucunda yağ asidi lipid radikali özelliği kazanır. Oluşan lipid radikali oldukça dayanıksızdır ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle “dien konjugatları” (Bir alkenin iki çift bağı arasında bir tane tekli bağ varsa buna konjuge dien denir) ve daha sonra lipid radikalinin moleküler oksijenle etkileşime girmesi sonucu lipid peroksil radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, hücre zarındaki diğer doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine dönüşürler [18]. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder. Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle sona erer. Bu ürünler MDA (Malondialdehit) ve 4-hidroksinonenal’dır (şekil 2.3) [18,23].

MDA lipid peroksidasyonun değerlendirilmesinde sıkça kullanılan bir parametredir. MDA proteinlerin amino gruplarına, fosfolipidler veya nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini gösterir [18,28]. Ayrıca MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin

agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkilerinden dolayı, MDA mutajenik, genotoksik ve karsinojeniktir [28].



Şekil 2.3 Lipid peroksidasyon reaksiyonları[18]

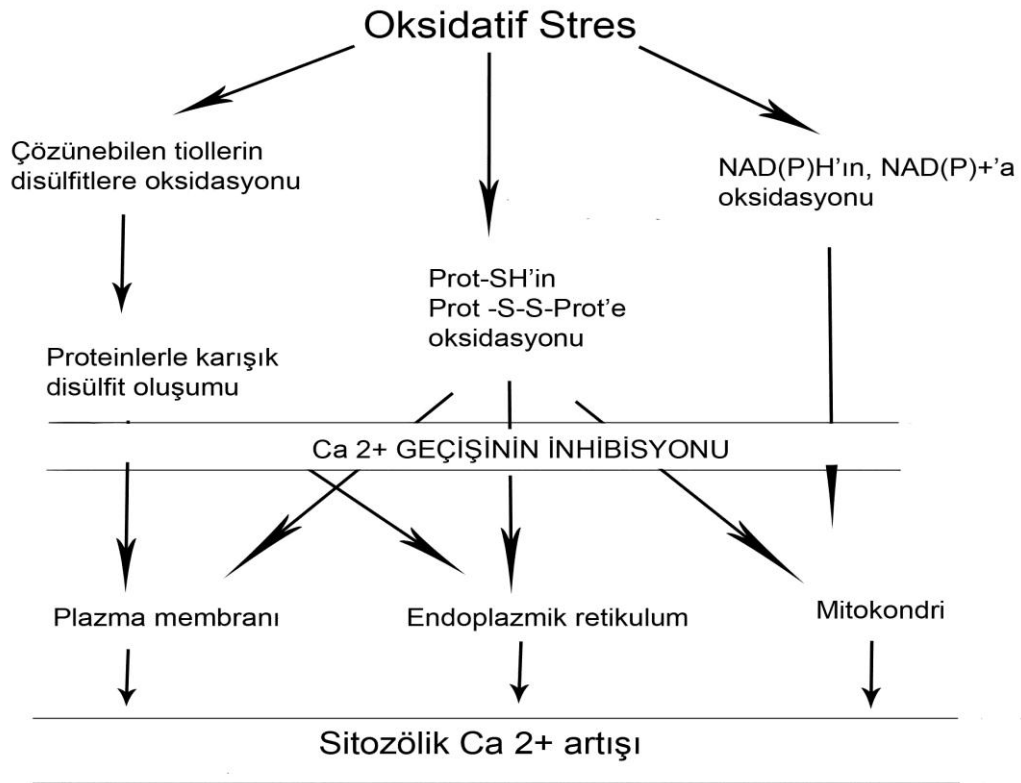
2.1.3.5 Oksidatif strese bağlı hücresel değişiklikler

Hücrede ve zarlı yapılardaki şişme, hipoksik ve toksik olayların neden olduğu hasarın ilk belirtisidir. Bu durum, sitozölik serbest kalsiyum iyonu (Ca^{2+}) seviyesindeki artıştan kaynaklanmaktadır [32].

Hücrede meydana gelen son değişiklik ise geri dönüşümsüz hücre hasarıdır. Hücre morfolojisinde oksidatif strese bağlı olarak meydana gelen değişiklikler hücre iskeletinin zarar görmesinin bir sonucudur. Doku hasarına bağlı olarak ortaya çıkan inflamasyonda, lökositler tarafından süperoksit anyon radikali ve H_2O_2 üretimi gerçekleşir ve lizis başlar. Oksidan üretimi GSH'un

yükseltgenmesine, NAD kaybına, poli-ADP riboz polimeraz aktivasyonuna eşlik eden tek zincir DNA kırılmalarına, hücre ATP kaybına ve hücre içi serbest Ca^{2+} seviyesinde artışa neden olmaktadır. Hasarlı ve ölüme gitmekte olan hücrelerde şişme ve hücre zarında balonlaşma gibi değişiklikler meydana gelir.

Hücre zarındaki balonlaşma, hücre içi GSH düzeyi ve Ca^{2+} homeostasisindeki değişikliğe bağlı olarak hücre iskeletinin organizasyonunun bozulmasının bir sonucudur. Buna, mitokondri ve diğer organellerdeki şişme eşlik eder [34]. Sitozolik Ca^{2+} seviyesindeki artış, ağır metaller, organik sülfhidril reaktifleri ve oksidanların varlığında mitokondri zarlarının geçirgenliğinde bozulmaya yol açar. Mitokondri zarlarının geçirgenliğindeki bu bozukluk mitokondriden sitoplazmaya kontrolsüz olarak Ca^{2+} iyonları ve diğer iyonların salınımına yol açmaktadır. Mitokondri matriksinde proteinlerden oluşan koloidal bir karışım kalır. Sitoplazmadan mitokondri içine su girişi gerçekleşir ve bu durum mitokondrilerde şişme ile sonuçlanır [32,34]. Hücrede oksidatif strese bağlı olarak gelişen olaylar Şekil 2.4’de şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.4 Hücrede oksidatif strese bağlı olarak gelişen olaylar [34]

Hücrede adaptasyon, nekroz ve apoptoz

Hücreler, çeşitli fiziksel ve patolojik uyaranlara maruz kaldıklarında adaptasyonla vücuttaki metabolik işlemlere ve enerji ihtiyaçlarına cevap oluştururlar. Adaptasyon; hücrelerin fonksiyonunda veya morfolojisinde çevre koşullarının etkisiyle oluşan değişiklikleri geri dönüşümlü olarak ayarlayan bir mekanizmadır. Eğer uyarılar ortadan kalkarsa, hücreler normal durumlarına geri dönerler. Karsinojenik kimyasallarla uzun süre uyarılma gibi belirli durumlarda, geri dönüşümlü hücresel değişiklikler geri dönüşümsüz hale gelebilir. Eğer dış uyarı hücrenin uyum kapasitesini aşarsa geri dönüşümsüz hücre hasarları meydana gelir ve sonunda hücre ölümleri oluşur. Oksidatif strese maruz kalan bir hücre ölüme gidebilir [40].

Hücre ölümü iki mekanizma yoluyla gerçekleşmektedir. “Nekroz” ve “Apoptoz”. Oksidatif stres bu iki olayın ortaya çıkışında pek çok nedenin arasında önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin kültürdeki memeli hücrelerine H_2O_2 'in milimolar (mM) düzeyde ilave edilmesi nekroza neden olurken, daha düşük seviyedeki H_2O_2 , apoptoz'u tetiklemektedir. Nekrotik hücre ölümü sırasında organellerde şişme, mitokondri, peroksizom ve lizozom membranlarının yapısal bütünlüğünde bozulma meydana gelir. Sonunda hücre zarında meydana gelen parçalanma ile birlikte çeşitli enzimleri ve pro-oksidanları bulunduran hücre içeriği dağılarak komşu hücreleri etkilemektedir. Apoptoz hücrenin içsel intihar mekanizmasıdır. Apoptoz'a giden hücre içeriğini dış ortama bırakmaz ve genel olarak apoptoz çevredeki hücreleri etkilemez [35,37].

Nekroz'a giden hücrelerde şişme ve sitoplazmadaki eozinofilik granüllerde artış meydana gelmektedir. Ribozomların kaybına bağlı olarak bazofilik özellik azalır. Sitoplazmadaki vakuollerde artış ve mitokondrilerde şişme gözlenir. Nekrozun dokularda farklı çeşitleri görülebilmektedir. “Pıhtılaşan nekroz” hücrenin artan asiditesine bağlı olarak yapısal ve enzim proteinlerinin denatürasyonu ile gerçekleşir. Hücreler ana hatlarını nisbeten korurlar. Asidik sitoplazma eozinofilik hale gelir. “Sıvılaşan nekroz” ölü hücrelerin enzimatik parçalanması sonucunda meydana gelir. Dokular parçalanan, akışkan hücrelerden

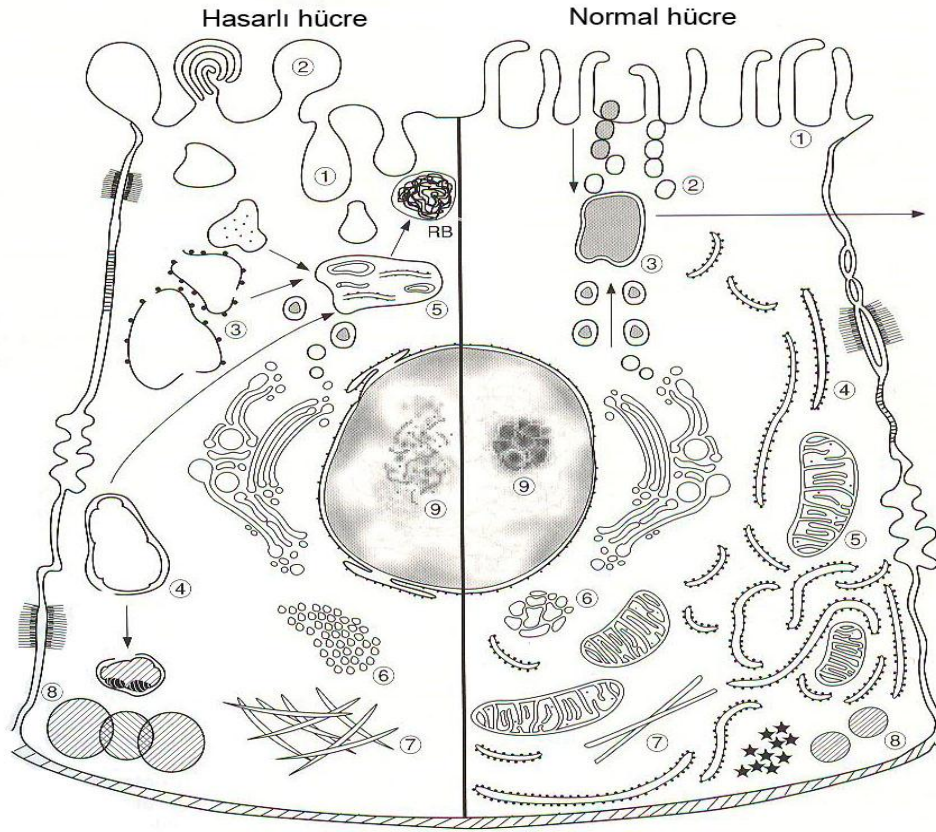
ibarettir. “Kazeöz nekroz” nekrotik alanda peynire benzeyen oluşumlarla karakterizedir. Pıhtılaşan nekrozdan farklı olarak doku yapısı tamamen bozulur. “Yağlı nekroz” yağlı dokularda enzimlerin lipolitik etkilerinin sonucunda ortaya çıkar. Pankreatik hasar nedeniyle aktif pankreatik enzimlerin dokulara salınımı sonucunda yağ hücrlerinin membranları zarar görür. Hücreler yağ hücreleri tarafından salınan serbest yağ asitlerine uzun süre maruz kaldıklarında sodyum, potasyum ve kalsiyumla bağlanarak sabunlaşır [37].

Apoptoz’a giden hücrede ise büzülme gerçekleşir. Sitoplazmada balonlaşma ve sitoplazmik içerikte büzülme gözlenir. Çekirdek zarının çevresinde heterokromatin birikimler meydana gelir. Organeller hücre fragmentlerine ayrılınca dahi yapılarını korumaktadır. Hücre küçük fragmentlere ayrılarak apoptotik cisimcikler’i oluşturur. Komşu hücreler ve bölgesel makrofajlar apoptotik cisimcikleri fagosit ederek inflamasyonun başlamasını önler [38].

Geri dönüşümlü hücre hasarının belirtileri ise hücrelerde şişme (hidrofobik şişme ve dejenerasyon olarak da adlandırılır), yağlı değişiklik ve hücre yüzeyindeki balonlaşmalardır. Hücre şişmesi sitoplazmadaki su miktarının artmasının bir sonucudur. Hücre büyük, soluk renkli bir sitoplazmaya ve normal olarak lokalize olmuş bir çekirdeğe sahiptir. Bu değişiklik hücre zarındaki hasara bağlı olarak iyonik ve ozmotik dengelerin değişmesi sonucunda meydana gelmektedir [38,37].

Hücrelerde meydana gelen adaptasyon olayları çeşitli morfolojik değişiklikler olarak mikroskopta gözlenebilir. Bu değişiklikleri adlandırmak gerekirse; hücre büyüklüğündeki artış (hipertrofi), hücrelerin sayıca artması (hiperplazi), hücrelerin boyutundaki azalma (atrofi), hücre çoğalmasının durması (aplazi), hücre sayısının azalması (hipoplazi) ve normal dışı hücre gelişimi (diplazi) şeklindedir [37]. Bunun yanı sıra çeşitli maddelerin normal dışı miktarlarının hücre sitoplazması, organeller veya çekirdekte biriktiği gözlenebilir. “Yağlı değişiklik” hücrelerin sitoplazmasında trigliseritlerin depolanması sonucunda meydana gelir. Küçük damlalar şeklindeki birikimler, geniş vakuollerin içerisinde bir araya gelerek sitoplazmayı kaplar. Yağ metabolizmasında görev alan başlıca organ olması nedeniyle, yağlı değişiklik özellikle karaciğer hücrelerinde sıklıkla görülmektedir.

Hücrelerde glukoz ve glikojen metabolizması ile ilgili hasarlar sonucunda glikojen birikimleri meydana gelebilir. Lipofuksin, melanin, hemoglobin gibi endojen kaynaklı veya karbon gibi eksojen kaynaklı maddeler olan çeşitli pigmentler de hücrelerde stres koşullarının neden olduğu hasarlara karşı bir adaptasyon mekanizması olarak birikebilmektedir. Adaptasyona bağlı morfolojik değişiklikler çekirdekte de gözlenmektedir. Bunlar ; çekirdek zarında şekilsel bozukluklar ve kopmalar, çekirdekte parçalanma (karyoreksis), kromatinlerde liziz (karyoliz), çekirdek içeriğinde kümeleşme (piknoz) meydana gelebilir [37]. Şekil 2.5’ de normal yapıdaki hücre ve hasar oluşturan etkene karşı meydana gelen hücresel yanıtlar şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil. 2.5 Normal ve hasarlı hücrenin şematik yapısı [39]

Şekil 2.5 .Sağda: Normal hücre 1) Hücre zarı lipid, protein ve karbohidratlardan oluşan seçici-geçirgen yapıdadır. ATP-bağımlı sodyum potasyum pompası (ATPaz) membran boyunca su-tuz gradienti sağlamakta, hücre içi kalsiyum seviyesini yüksek, potasyum seviyesini düşük

tutmaktadır. 2) Absorbe edici vakuoller 3) Primer lizozomlarla birleşmiş absorbe edici vakuoller 4) Geanüllü endoplazmik retikulum 5) Mitokondri 6) Küçük veziküller içeren düz endoplazmik retikulum 7) Hücre iskeleti 8) Lipid, protein ve glikojen gibi metabolitler 9) Nukleus

Şekil 2.5 .Solda: Hasara karşı oluşan hücresel yanıt 1) Akut hücre hasarı ile hücre içine su girişi gerçekleşir ve hücre membranından içi sıvı dolu vakuoller meydana gelir 2) Mikrovilluslar ödemli ve şişkin durumdadır 3) GER sisternalarında su ve diğer sıvılar birikerek şişmeye neden olur. Ribozomlar zarar görür vr protein sentezi azalır 4) Su birikimi mitokondrilerde şişme ve parçalanmaya neden olur 5) Lizozomlardan otofagozomlar meydana gelir. Bu sindirim vakuolleri mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi organellerin fragmentlerini içerir. 6) Düz endoplazmik retikulum genişler 7) Hücre iskeletini oluşturan fibriller agregatlar halinde sitoplazmik cisimcikleri meydana getirirler 8) Hücre içi lipid damlacıklarında artış meydana gelir 9) Hücre çekirdeğinin yapısında bozulmalar meydana gelir, çekirdekçik dağılır veya kaybolur.

2.2. Akciğer ve Yapısı

Akciğerler, sağ ve sol akciğerler olarak göğüs içerisinde yerleşmiş ince duvarlı elastik süngere benzeyen organlardır. Akciğerler dış ortama (Atmosfere) ağız, burun, farinks, trakea ve bronşlar yoluyla bağlanırlar. Ana bronşlardan segmental bronşlar dallanarak küçük bronşiyoller (yaklaşık 25 tane) vasıtasıyla alveollere hava geçişi olur. Bu dallanmanın distale ilerlemesiyle birlikte çap azalmakta, ancak dallanma sayısı artmaktadır.

Alveoller, her biri bir terminal bronşiyole bağlı ve bir asiner arteriyol ile beslenen asinüsler şeklinde yapılardır. Duktustan ve respiratuar bronşiolde köken alan alveoller çok küçük çaplı (200 mikron) keseler olup, duvarları bağ dokusunun içine gömülü ince duvarlı, kapillerlerle çevrilmiş ince bir tabaka alveoler hücrelerden oluşur. Her bir akciğerde yaklaşık 300 milyon alveol vardır. Yetişkin bir insan akciğerinde gaz değişimi yapılan toplam yüzey alanı ortalama olarak 80 m²'dir.

Akciğerler sağda üst, orta ve alt loblar, solda ise üst ve alt loblar şeklinde organizedir. Loblar her biri ayrı segmental bronş, pulmoner arter ve pulmoner ven dallarına sahip segmentlerden oluşur. Pulmoner damarların dallanması bronşlar ve bronşiyollerin dallanması ile paralellik gösterir. Ana pulmoner arter kalbin sağ ventrikülünden gelen venöz kanı taşır [42].

2.3. Bleomisin

Bleomisin çok yaygın olarak kullanılan antitümöral etkili bir antibiyotiktir. Akciğer, böbrek, periton ve lenf sisteminde yüksek oranda biriktiği için deri kanserleri, baş boyun kanserleri, uterus kanseri, serviks kanseri, hodgkin hastalığı, retikülosarkom, lenfosarkom, embriyonel hücreli koriokarsinom ve teratokarsinom tedavilerinde kullanılmaktadır.

Bleomisin ile indüklenen doku ve organ hasarı; reaktif oksijen türlerinin miktarında artış ve dolayısıyla DNA sentezi inhibisyonu, ayrıca membran lipitlerinin yapılarının zarar görmesi ile karakterizedir.

Bleomisini inaktive eden hidrolaz enziminin akciğer dokusunda diğer dokulara oranla çok düşük düzeyde bulunmasından dolayı yan etki olarak özellikle akciğerlerde fibrozis ve interstisyel pnömoni oluşturmaya ve BLM kullanılan hastalarda akciğer hasarı gelişme oranı %3-40 oranında değişmektedir [43,44]. Bleomisin'in neden olduğu akciğer fibrozisine serbest oksijen radikallerinin hücre ve hücre yapılarına verdiği zararın sebep olduğu düşünülmektedir.

Bleomisin antineoplastik bir ilaçtır. Antineoplastik ilaçlar, vücutta patolojik bir şekilde çoğalmakta olan kanser hücrelerini yok ettikleri gibi hızlı çoğalan normal hücreleri de (embriyo ve fötüs hücreleri, bağırsak ve ağız mukozası epiteli, kemik iliği hücreleri gibi) yok edebilirler. Bu nedenle, halen kullanılmakta olan ilaçlar antikanser olmaktan ziyade “antiproliferatif” dir.

Antineoplastik ilaçların kanserojen, teratojen ve mutajen etkileri vardır. Tedavide ilaç seçimi ve uygulamasının tümörün türüne ve dönemine göre uygun seçilmesi ve mutlaka bir onkoloğun gözetiminde yapılması gerekir [95].

Antineoplastik kemoterapinin ana ilkesi, hastanın sağlıklı hücrelerine zarar vermeden, tümörün büyümesini ve çoğalmasını durdurmak ya da yok etmektir. Ancak, antineoplastik ilaçların çoğu selektif olmadığından, kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücrelere de zarar vermektedir. Yani bu tür ilaçların kanserojen, teratojen ve mutajen etkileri vardır.

En çok etkilenen hücreler, barsak epiteli, kıl follikülleri, kemik iliği kök hücreleri gibi proliferatif indeksi yüksek hücrelerdir [49].

Bleomisin çoğunlukla akciğer ve deride birikerek, buradaki DNA'yı oksijen radikalleri oluşturarak parçalar. Teorik olarak bu oksidanlar ve bölgesel olarak üretilen antioksidanlar arasındaki dengesizlik, epitel hasarı ve interstisyel fibroza neden olabilir [45,46].

Bleomisin, Pulmoner fibrozis(PF) ile hayvan deneylerinde kullanımında tercih edilmesi, insan kemoterapisindeki majör advers ilaç yan etkisi olan fibrozis oluşturma özelliğine dayanmaktadır. Akciğer toksisitesi bleomisin kullanmış hastaların ortalama %10'unda meydana gelirken ,yaklaşık %1 hastada ise haftalar ve aylar içinde progrese olabilir [48].

2.3.1. Bleomisin'in kimyasal yapısı

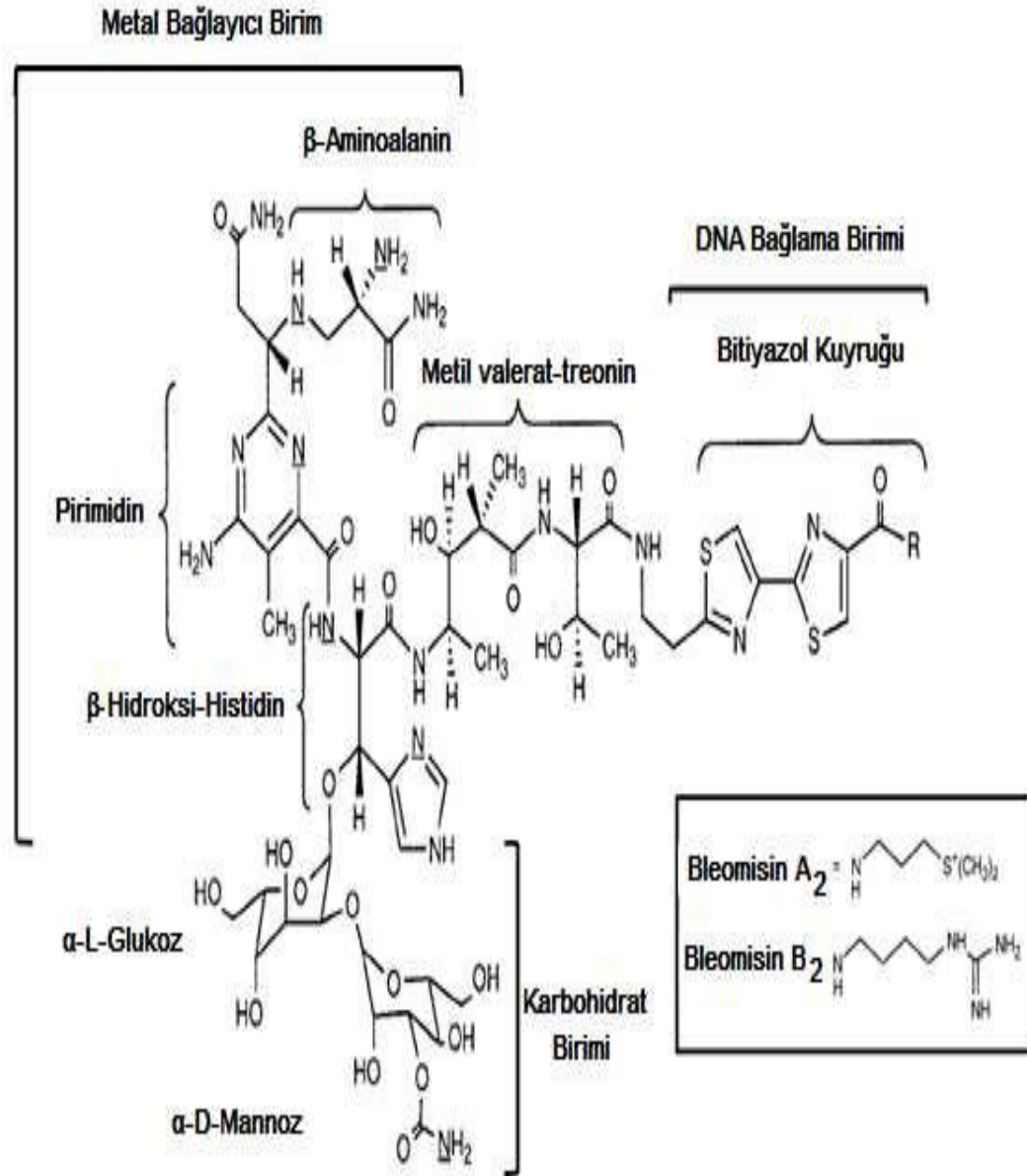
Bleomisin (BLM), *Streptomyces verticillus* adlı aktinomiset türünden izole edilmiş antitümöral etkili bir antibiyotiktir [50]. Bleomisin skuamöz hücre, hodgkin hastalığı, testiküler ve lenfomatöz kanserlerin tedavisinde efektif bir ajandır [51].

Bleomisin grubu ilaçlar 200'ün üzerinde yakın ilişkili bileşik içerirken, bleomisin'in uygulanan formu olan Blenoxane başlıca A2 ve B2 formlarını içermektedir [52]. Şekil 2.6'da A2 ve B2 yapıları aşağıda gösterilmiştir.

Bleomisin ailesi terminal amin kısmının birbirinden farklı olması ile ayrılır. Demir bakır ve kobalt gibi birçok metali, Bleomisin indüklü DNA kırılmasını desteklediği gösterilmiştir. Fakat demirin *in vivo* olarak etki gösteren başlıca metal olduğuna inanılmaktadır [53].

Bleomisin kimyasal yapısı şekil 2.6 'da gösterilmektedir. Bleomisin'in yapısında 3 ana bölge vardır; 1. Metal bağlayıcı birim, 2. DNA bağlama birim, 3.Karbonhidrat birimi.

Bleomisin'ler, katyonik moleküller olup hücre zarından geçişi Bleomisin bağlayıcı proteinlerle bağ kurarak olmaktadır. Alınan Bleomisin ya nükleusa transloke olur, ya da Bleomisin hidrolaz tarafından parçalanır. Bleomisin hidrolaz ise normal ve malign hücrelerde bulunan bir sistein proteazdır. Fakat akciğer ve deride çok az bulunmaktadır [50,51].



Şekil 2.6 Bleomisin'in kimyasal yapısı [52]

2.3.2. Bleomisinli hayvan modelleri

Bir antineoplastik ajan olan BLM'nin etki mekanizması; BLM-demir kompleksinin moleküler oksijeni süperoksit ve hidroksil radikaline indirgeyerek, DNA liflerinde kırılma oluşturmaktadır [54]. Yapılan *in vitro* çalışmalarda antioksidan tedavisi ile BLM'ye bağlı DNA ve hücre hasarının inhibe olduğu

gösterilmiştir [53,54]. BLM ile oluşturulan akciğer fibrozisinin patofizyolojisinde iki faz vardır. Erken inflamatuvar fazda, interstisyel ve alveoler alanlara makrofaj, nötrofil ve lenfosit infiltrasyonu olurken, ikinci fazda fibrozis gelişir. Reaktif oksijen radikalleri ve proteazlar genellikle bu inflamatuvar hücrelerden salgılanarak akciğer dokusunda hasar oluşturur ve onarım sürecinde aşırı fibrozis gelişir [51]. *İdiyopatik pulmoner fibrozis (IPF)* 'nin gelişimi sırasında nötrofiller de önemli rol oynamaktadır [54]. BLM uygulaması ile fibrozis oluşturulan önceki çalışmalarda deney süresi 15 gün olarak belirtilmiştir [52].

Bleomisin özellikle PF 'de kullanılmasının sebebi, instilasyondan çok kısa bir zaman sonra inflamasyon ve fibrozis oluşturmastır. Ayrıca deney hayvanları ile yapılan çalışmalar göstermiştir ki; BLM'nin kullanıldığı deneylerde hücre ve dokulardaki değişimler (histopatolojik görünüm, alveoller arası dallanmalar ve alveoler boşluğun obliterasyonu) ile İPF'li hastaların patolojik görünümüne benzerdir. Aynı zamanda bleomisin modelinin oluşturulması kolay, geliştirilebilir olması, yaygın ulaşılabilmesi, üretilebilmesi ve İPF'ye ait en önemli ölçütlerin birçoğunu karşılayabilmesi nedeni ile iyi bir hayvan modelidir. Bu nedenle de bleomisin ile oluşturulan modeller deneysel çalışmalarda oldukça popülerdir. Yapılan çalışmalarda ilk olarak artan proinflamatuvar sitokinler (IL-1, TNF-alfa, IL-6 ve IFN-gama) sonra pro-fibrotik markırlar (TGF- β 1, fibronektin ve prokollajen-1) salınır. 14. gün civarında sitokin salınımında pik oluşur. İnflamasyon ve fibrozis arasındaki geçiş dönemi bleomisin verildikten sonraki ilk 9 günlük dönemde olur [56].

Bleomisin standart uygulama yolu instilasyondur ve bronkosentrik türde fibroze neden olur. İntravenöz ve intraperitoneal uygulamada subplevral skar oluşumunu indükleyici tarzda ve insanlardakine benzer tarzda fibrozis gelişir. Bleomisin modelleri çoğunlukla sitokinler, growth faktör ailesi ve pulmoner fibroze uzanan sinyal yolunu içerir. Örneğin pulmoner fibrozis gelişiminde TGF- β 1'in anahtar rol oynadığının bilinmesi ve deneyde kullanılması, fibrozis gelişimin gösterilmesinde yardımcıdır. En yeni ajanlar (TGF- β antagonistleri gibi) ve daha eski bilinen (ACE inhibitörleri) ilaçlarla birlikte bleomisinle oluşturulan modellerde TGF- β 1 'in keşfedilmesi oldukça umut vericidir. Bu ilaçlardan biri olan decorin endojen bir proteoglikan ve TGF- β inhibitörü olarak bilinir.

Tartışmasız şekilde bazı özellikleri ve histolojik değişikliklere benzerlikleri olsa da progresif gelişen insan İPF'sini anlamaya çalışmak açısından bleomisinli hayvan modelleri ciddi sınırlandırmalar içerir. Mantıksal olarak da bleomisinle oluşan inflamatuvar cevapla birlikte serbest radikallerin aşırı üretimini, nötrofiller ve makrofajların aktive olması ile pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımını tetikler. Bu kaskad akut akciğer hasarında ortaya çıkar, sıklıkla fibrozis gelişse de yine de kısmen geridönüşümlü olur. Dolayısıyla yavaş ve geri dönüşümsüz progresyonundan dolayı, bleomisinli modellerle insan İPF'si tam olarak taklit edilemez. İlaç çalışmaları da hayvan modellerinin bu özelliği göz önüne alınarak yapılır [57].

2.3.3. Bleomisinli modellerde ilaç etkileşim çalışmaları

Potansiyel antifibrotik ajanların denenmesi, sıklıkla bleomisinin yardımı ile gerçekleştirilir. Bu modellerde birçok fibrotik süreci önleyici ya da yavaşlatıcı etken madde gösterilmiştir. Klinik kullanımda 1980-2006 yılları arasında 232 makale sınıflandırılmış, tüm makalelerde başarılı olduğu ve antifibrotik ajanın aynı zamanda koruyucu tedavi gösterdiği belirtilmiştir. Bleomisinin uygulanmasından sonraki ilk 7 gün içinde verilen ajan “koruyucu”, 7 günden sonra uygulanan ajanlar” tedavi edici” olarak adlandırılmaktadır.

Çalışmaların çoğunda BLM tek doz olarak intratrakeal instilasyon, intraperitoneal ya da intramuskular yöntemler ile kiloya uygun dozda verilmiş ve bleomisinin verildiği gün 0. gün kabul edilmiştir. Kas içine enjeksiyondan sonra, pik kan değerleri 30-60 dakika içinde görülmektedir. Benzer dozajların kana enjeksiyonu ile en yüksek pik konsantrasyonları elde edilmektedir. BLM' nin yarı ömrü yaklaşık 2,5 saattir [43]. Bleomisin'in eliminasyonu başlıca böbreklerle olur. Bleomisin'in alınmasından 24 saat sonra, ilacın yaklaşık %60'ı değiştirilmemiş olarak atılır.

Karşılaştırmak için yapılan gösterge çizelgesinde antiinflamatuvar ve antifibrotik ilaç etkinliğinin ayrımını yapmak önemlidir. İlaç etkinliği zamanlamaya kritik olarak bağımlıdır. Erken dönemde verilen ajanlar daha çok antiinflamatuvar ajanlardır ve koruyucu tedavi olarak değerlendirilir. Buna karşın doğru

antifibrotik ajanın belki de etkinliği geri dönüşümsüz olan, fibrotik dönemde kullanılması tedavi edici etkinliğin ortaya çıkarılması açısından önemlidir.

Geçmişte yapılan benzer çalışmalar tarandığında antifibrotik ajanların büyük kısmı koruyucu tedavi olarak uygulanmıştır. İlaç uygulamalarında oral, subkutan, intraperitoneal ve intravenöz enjeksiyon gibi farklı metodlar kullanılmıştır ve aynı zamanda adenovirus ve Japon Hemaglutinasyon Virus (HVJ) gibi gen modifiye teknolojiler de kullanılmıştır. Çalışmanın sonlandırılması ise bleomisin uygulamasından sonraki 1. günden 80. güne kadar değışmekte ancak en yaygın uygulama 14 ila 28 gün arasında olmaktadır. Çalışmada doğru sonlandırmayı seçmek önemlidir. Özellikle standart sonuç parametreleri 21 günden sonra yükselir ve 21 günden sonra akciğer hidroksiprolin düzeyi ve histomorfometri değeri bazal değeri döner.

Fibrozisi değlendirmede çeşitli metodlar mevcuttur. Örneğin semikantitatif histolojik analiz, bazı skorlama sistemleri (Ashcroft, Simpson ve Timbrell), hidroksiprolin düzeyi ve kollajen uzunluğunun ölçümü, BAL 'da toplam hücre sayısının analiz edilmesi, diferansiyel hücre sayımı, TNF-alfa ve TGF-β1 seviyesinin ölçümü. Proinflamatuvar mediatörler, örneğin monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ve makrofaj inflamatuvar protein-2 (MIP-2) gibi bazı vakalarda ölçülebilir diğer parametrelerdir [117].

2.3.4. Bleomisin'in etki mekanizması

Bleomisin, DNA'ya direkt bağlanarak ve tek ve çift zincir kırılmalarına yol açarak, büyüyen hücrelerde apoptozisi tetikler. Bu aktivite oksijen ve ferröz iyonuna bağlıdır [57]. Bleomisin'in anti-neoplastik etkisinin mekanizması, Bleomisin-demir kompleksinin, moleküler oksijeni, süperoksid ve hidroksil radikale redüklemesi esasına dayanmaktadır. Oluşan bu radikaller DNA'ya atak yaparak zincir kırıklarına yol açmaktadır ve bu da DNA-RNA-protein sentezinde (transkripsiyon ve translasyon basamakları) hasara sebep olarak anti-neoplastik etki gösterir [58]. Serbest oksijen radikallerinin rolü, süperoksid dismutaz'ın, Bleomisin indüklü DNA hasarını önlediğini gösteren çalışmalarla desteklenmiştir. Bleomisin'in oluşturduğu değışimler sonucu ortama göç eden inflamatuvar

hücrelerden bir çok oksijen metabolitinin salındığı ve DNA kırıkları dahil bir çok yapının fonksiyonlarının bozulması Bleomisin'in toksisitesi hakkında bildirilen gelişmelerdir. Bütün bu çalışmalara rağmen hasarın tam mekanizması tam olarak açıklanabilmiş değildir [59].

Bleomisin, aynı zamanda hücre siklusunu etkileyen spesifik bir ilaçtır ve hücre siklusunun G2 fazında birikimine neden olur [60]. DNA kırılması için, DNA ile Bleomisin'in metal bağlayıcı birimi ve bitiyazol kısmının etkileşimini gerektiren bir mekanizma önerilmiştir.

Labil Fe (II)-BLM-O₂ kompleksinin, aktive edilmiş Bleomisin'e dönüşümü, DNA'yı hasara uğratar. Bunun yanında son çalışmalarda, Bleomisin'in RNA'nın alınlmamış 3 boyutlu yapısını bozduğu çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir [60,61].

Deneyisel çalışmalar, Bleomisin hassasiyetinin birçok nedeni olabileceğini göstermiştir. DNA tamir mekanizmasındaki bozukluklar, çift zincir kırılmalarının tamirinde gerekli olan genlerdeki mutasyonlarla ilişkilidir. Bu mutasyonlar aşırı hassasiyete yol açarlar. Çift zincir tamirine katkıda bulunan bir gen olan RAD21'in inhibisyonu, hücrelerin BLM hassasiyetinin artmasına yol açar [58].

2.3.5. Bleomisin'in tedavide kullanımı

Bleomisin (BLM), germ hücreli tümörler, lenfomalar, kaposi sarkoma, servikal kanserler, baş ve boyun squamous hücreli kanserlerinin tedavisinde kullanılan doğal bir ilaçtır [61]. Bleomisin, Bleomisin hidrolaz adlı bir enzimle deaktive edilir. Bu enzim başlıca karaciğer, dalak, kemik iliği ve bağırsakta bulunur. Bleomisin uygulanması bazen ölümcül yan etkiler meydana getirebilmektedir. Akciğer ve deride Bleomisin Hidrolaz'ın yeterince olmayışından dolayı Bleomisin toksisitesi meydana gelir. Bleomisin'in alımından sonra ateş ve bazen de hipotansiyon görülebilmektedir [62].

Pulmoner toksisite, Bleomisin için doz sınırlayıcı bir yan etkidir ve bu yan etki genellikle kendini fizik muayenede öksürük, dispne, kuru inspiratuvar raller ve röntgende toraks infiltrasyonları olarak gösterir. 400 üniteden daha fazla doz alanlarda ve Bleomisin tedavisi öncesi mediastinal ya da göğüs bölgesine

radyoterapi uygulanmış olanlarda, PF'nin görülme oranı daha yüksektir. Nadir de olsa bazı olgularda pulmoner toksisite öldürücü olabilmektedir. Orta dereceli ateş, lokalize göğüs ağrısı ve gastrointestinal sistem şikayetleri gibi yan etkilere yol açan bleomisin, plevra boşluğunda sınırlı emilimi nedeniyle hastalarda az oranda sistemik toksisiteye yol açar [62].

2.4. Serbest Radikallere Karşı Savunma Mekanizmaları

Serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler.

Antioksidanlar karbonhidratlar, proteinler, DNA ve lipitler gibi hedef biyomoleküllerin oksidan hasarını önler veya geciktirirler dolayısıyla hücre ve daha genel manada dokular korunmuş olur. Antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirdiği gibi serbest radikalın meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler [63].

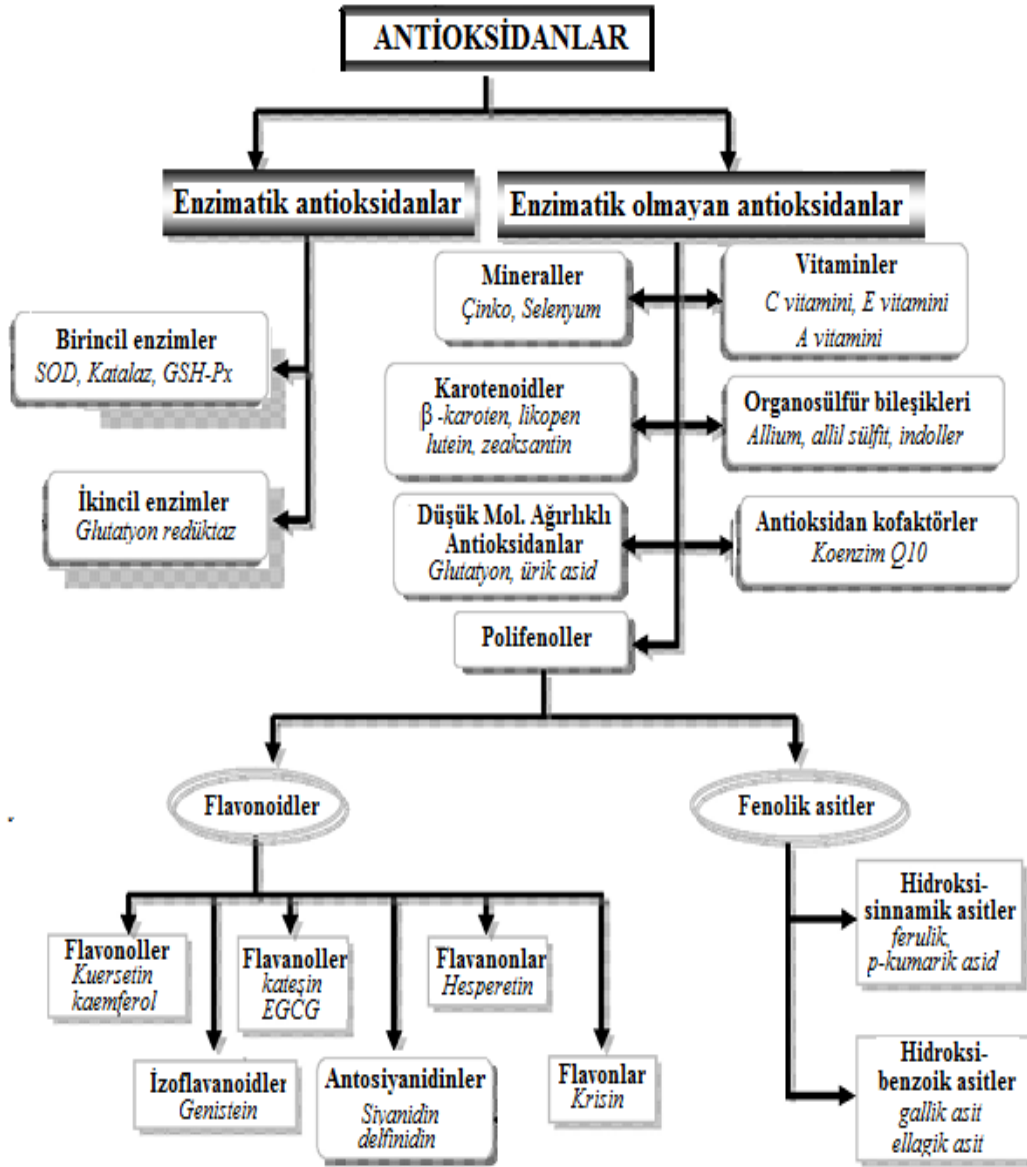
2.4.1. Antioksidanlar

Antioksidanlar, yükseltgenebilen substratlara göre daha düşük konsantrasyonlarda, substratın prooksidanlarla başlatılan oksidasyonunu ciddi derecede engelleyen ya da geciktiren maddelerdir. Son zamanlarda besin kimyası ve koruyucu tıbbın bitki kaynaklı doğal antioksidanlara karşı ilgisi artmaktadır. Bunun nedeni, bir çok sentetik antioksidanın örneğin (butilhidroksianizol ve butilhidroksitoluen) gibi kanserojen etki yapabileceğinin hayvan deneyleriyle gösterilmesidir [64].

Doğal antioksidanlar ise, insan organizması için genellikle zararsız olup yan etki göstermezler. Doğal antioksidanlar gıda sanayinde besinlerin bozulmasını önlemek, lipidlerin ve vitaminlerin parçalanmasını, besin rengini korumak için kullanılan önemli katkı maddeleridir. Yaşayan organizmalarda kompleks antioksidan sistemler bulunmaktadır. Bu sistemler enzimatik olmayan

antioksidanlar olarak bilinen albumin, glutatyon, askorbik asid, α -tokoferol, β -karoten, ürik asid, bilirubin, flavonoidler ve birçok polifenolik bileşik ile süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, askorbat peroksidaz ve katalaz gibi enzimleri içerirler [65]. (şekil 2.7)

Bu antioksidanlar, hücrelere zarar veren reaktif türleri (serbest radikaller) etkin bir şekilde süpürerek düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler. Bu reaktif bileşiklerin (reaktif oksijen türleri vb.) varlığı, sağlıklı bir yaşam için antioksidan bileşikleri ve enzimleri önemli kılmaktadır [63,65]. Biyolojik yapılarda ve gıdalarda mevcut olan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar çeşitli reaktif oksijen türlerinin ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$ ve H_2O_2) süpürücüleri olarak bilinirler [65].



Şekil 2.7. Antioksidanların sınıflandırılması.

Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek açısından dört ayrı şekilde etki ederler:

i-) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha az reaktif yeni bir moleküle çevirme “toplayıcı” etkidir. Antioksidan enzimler (SOD, katalaz, GSH-Px vb.) bu şekilde etkilidir.

ii-) Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme, “bastırıcı” etkidir. Askorbik

asit (C vitamini), α -tokoferol (E vitamini), flavonoidler (kuersetin, kateşin vb.) bu tarz bir etkiye sahiptirler.

iii-) Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincir reaksiyonlarını kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki, “zincir kırıcı” etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin, albumin gibi bileşikler bu şekilde etki ederler.

iv-) Serbest radikallerin oluşturdıkları hasarın onarılması, “onarıcı” etkidir.

Antioksidanlar, vücut hücreleri tarafından üretildikleri (endojen) gibi, gıdalar yoluyla da (ekzojen) alınabilmektedir. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, esas olarak vitaminler (C ve E vitaminleri), fenolik bileşikler (basit fenolik ve hidroksisinnamik asitler, flavonoidler vb.) ve karotenoidlerdir. Birçok araştırmada meyve ve sebze tüketimi ile belirli kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu saptanmıştır [65].

Antioksidanların en önemlileri polifenoller ve bunların türevleridir. Bu bileşikler oksidatif sistemde farklı şekillerde davranabilirler. Örneğin, oksijen konsantrasyonunu düşürebilirler veya hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali gibi ROS türlerini sönmeye uğrattırır (süpürürler). Hidroksil radikalleri gibi birincil radikalleri süpürerek zincir reaksiyonların başlamasını önlerler, metal iyonu katalizörlerini bağlarlar [66].

2.4.2. Antioksidan enzimler

Gıdalarda ve bu gıdaları tüketen insanlarda bazı enzimler, oksidatif hasara yol açan oksijeni, hidrojen peroksit ve süperoksit radikalleri gibi aktif oksijen türlerini uzaklaştırarak veya lipid hidroperoksitlerini azaltarak antioksidatif aktivite göstermektedir. Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz bu gruba giren enzimler arasında yer almaktadır [67].

2.4.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz enziminin başlıca görevi, dokularda ve hücrelerde oluşan reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini ortadan kaldırmaktır. Süperoksit

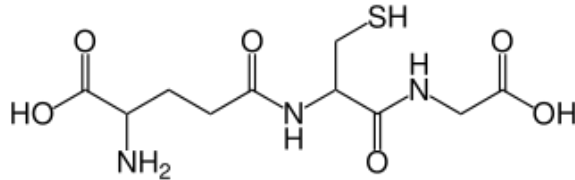
dismutaz enzimi, çok önemli bir süperoksit süpürücüsüdür. Daha çok ekstrasellüler matrikste olmak üzere hücre yüzeylerinde bulunur. Süperoksit dismutaz enzimi, oksidatif strese karşı hücreleri korumada en etkili enzimdir. Çünkü bu enzimin aktivitesi, Haber-Weiss reaksiyon substratlarının (O_2^- ve H_2O_2) konsantrasyonlarını belirler. Süperoksit dismutaz, süperoksit anyon radikalının (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. Süperoksit dismutaz, katalitik aktivitesi çok yüksek olan bir enzimdir [68]. Enzimin fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerinden korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder.



2.4.2.2 Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), hücredeki hidrojen peroksidin detoksifikasyonundan sorumlu anahtar rolü oynayan bir enzimdir. Glutatyon peroksidaz enzimi, sitozol ve mitokondride bulunur ve 4 adet selenyum atomu içerir. Peroksitlerin indirgenmesini katalizleyen glutatyon peroksidaz enzimi hücredeki indirgenmiş glutatyonu (GSH) yükseltgenmiş glutatyona (GSSG) dönüştürmektedir. Glutatyon peroksidaz glutatyonu hidrojen donör olarak kullanarak hidrojen peroksiti elimine etmektedir. Bu reaksiyonlar, canlı organizmada oksidatif stresin zararlı etkilerinden hücrel membranları korumaya yarar [42]. $ROOH$, H_2O_2 gibi bir hidroperoksit, tert-bütil hidroperoksit, kümene hidroperoksit gibi hidroperoksitlerdir [3,69].

2.4.2.3 Glutatyon



Şekil 2.8. Glutatyon molekülünün kimyasal yapısı

Tiol içeren bileşikler kolaylıkla okside ve redükte formlara dönüşebilmeleri nedeniyle çeşitli biyokimyasal reaksiyonlarda yaşamsal bir öneme sahiptirler. Glutasyon, karaciğerde, genetik bilgiye ihtiyaç duyulmadan sentezlenen, glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşan bir tripeptiddir. Biyolojik dokularda Glutasyon'un temel olarak redükte formunda bulunduğu bilinmektedir. GSSG, glutasyon Redüktaz (GR) enzimi sayesinde kolaylıkla GSH'a dönüşebilir [70,71].

Hücre içindeki düşük molekül ağırlıklı protein olmayan tiollerin en az %90'ını GSH oluşturmaktadır. Karaciğerdeki GSH konsantrasyonu ise, yaklaşık olarak böbreklerdekinin iki, akciğerlerdekinin ise üç katından daha fazladır [34,72].

Glutasyon, canlılarda çeşitli kimyasalların biyoaktivasyonu sonucu ortaya çıkan veya moleküler oksijenin metabolize edilmesiyle oluşan hücresel hasarların önlenmesinde rol alan başlıca koruma sistemidir. Çeşitli bileşiklerin ve metabolitlerinin elektrofilik merkezlerini enzimatik ve kimyasal mekanizmalar yoluyla tioeter bağlarına çevirirken aynı zamanda da hidroperoksitlerin glutasyon peroksidaz bağımlı yıkımında kofaktör olarak görev yapmaktadır. GSH serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Proteinlerdeki -SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur. Böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSSG protein sülfhidrilleri ile yer değiştirerek protein-glutasyon karışımı disülfidleri oluşturabilir [3,73].

2.4.2.4.Katalaz

Hücrelerin aktiviteleri sonucu ürün olarak hidrojen peroksit oluşur. Hidrojen peroksit, katalaz tarafından parçalanmazsa vücut için çok tehlikeli bir serbest radikal olan hidroksil radikalının öncülü olarak davranır ve bu radikal hücrede kalıcı hasarlara neden olur. Katalaz enzimi, toksik hidrojen peroksiti hücrelerden uzaklaştırmada önemli bir rol oynar. Bu amaçla, hücrelerin aktiviteleri sonucu oluşan hidrojen peroksiti vücut dokularına dağılmadan önce su ve moleküler oksijene ayrıştırır [66].

2.4.3.Enzimatik olmayan antioksidanlar

2.4.3.1.Fitokimyasalların antioksidan rolü

Beslenmenin sağlık üzerine kısa vadeli etkileri olduğu gibi aynı zamanda uzun vadede etkileride bulunmaktadır. Hastalıklara sebep olan durumların aslında direk olarak beslenmeyle alakası vardır. Örneğin, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve kanser başta olmak üzere birçok kronik hastalığın gelişmesinin ve ilerlemesinin altında yatan; bu durumdan muzdarip olan kişinin beslenme alışkanlıklarıyla ilişkilidir.

Beslenmenin etkileri sonraki kuşaklara da aktarılabilir [74]. Birçok çalışmanın sonuçlarına göre; beslenme kanserin oluşmasını, ilerlemesini, metastaz yapma özelliğini ve mortalitesini etkilemektedir. Ayrıca, artan istatistiki verilere göre kansere yakalanma riski büyük ölçüde genetik faktörlerle birlikte beslenme gibi çevresel faktörlere bağlıdır. Kanserın önlenmesinde ve tedavisinde bitkisel kaynaklı preparatların kullanılması giderek artmaktadır. Bu sebeplerden dolayı, ‘kemoprevansiyon’ terimi gittikçe önem kazanmaktadır [75]. Kemoprevansiyon, karsinogenezis sürecini önlenmek, ertelenmek ya da yavaşlatmak amacıyla doğal ya da sentetik ajanların kullanılması olarak tanımlanabilir.

ABD Ulusal Kanser Enstitüsü’nün verilere göre, potansiyel preventif 400 ajan bulunmaktadır. Bunlardan 40 kadarı klinik değerlendirme sürecindedir [76]. Fitokimyasallar, antioksidan gibi önemli biyolojik aktiviteye sahip, bitkilerde bulunan kimyasal bileşiklerdir. Fitokimyasallar, hücre içi sinyal yollar, onkogen yollar, hücre dışı inflamasyon, oksidasyon ve kalıtsal genetik mutasyonlar gibi hücrenin hassas homeostatik mekanizmalarını düzenleyen süreçlere etki etmektedirler. Diğer önemli etki mekanizmaları ise, DNA tamir genlerinin ve hücre siklusunu kontrol eden genlerin modülasyonunun, apoptozun uyarılmasının, anjiogenezin engellenmesi ve tümör hücrelerinin çevre dokulara yayılışını ve işlevlerinin bozulmasını önlemektir [77]. Ayrıca, bu bileşikler insan epigenomu üzerinde etki göstererek kanser tedavisinde ve önlenmesinde etkili olabilir. Epigenetik değişiklikler, DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklanmayan gen

fonksiyonundaki değişikliklerdir. Artan kanıtlara göre, çeşitli fitokimyasalların kanser hücresinde epigenetik hedefleri vardır ve bu besinlerin tüketilmesi anormal gen aktivitesini düzelterek kanserogenezi önleyebilir [74,77].

En sık çalışılan ve insan sağlığı üzerinde etkili olan fitokimyasallardan bazıları: polifenol grubundan epigalatlar (yeşil çayda bulunan EGCG), kurkumin (zerdeçal), kersetin ve resveratrol, izoflavon grubundan genistein (soya fasulyesi), izotiyosiyanat grubundan (brokoli ve lahanası), karotenoid grubundan likopendir [73,74,75]. Ancak, kemoprevansiyon amacıyla fitokimyasallarla yapılmış birçok çalışmaya rağmen günümüzde sağlıklı kişilerde kanser önlenme endikasyonu ile kullanılabilecek herhangi bir ilaç henüz yoktur. Bu ilaçların yaygınlaşması için daha çok sayıda klinik gözlemlere ve süreçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4.3.2 Polifenoller

Polifenoller, çeşitli meyve ve sebzelerde bulunan antioksidan etkili bileşikler olup insan diyetinin önemli bir parçasıdır. Kimyasal yapılarına göre çeşitli gruplara sahiptirler, ancak en önemli ortak özellikleri moleküllerinde birden fazla fenol grubu taşımalarıdır. Bazı çalışmalara göre, farklı besinsel polifenol sayısı 8000'i geçmektedir. Besin fenolikleri; flavonoidler, fenolik asitler ve fenolik polimerler olarak üç sınıfa ayrılır. Polifenolik bileşiklerin, özellikle flavonoidlerin antioksidan özellikleri farklı mekanizmalarıyla açıklanabilmektedir. Bu bileşikler, metal şelasyonu yaparak ve NADPH ve ksantin oksidaz gibi enzimleri inhibe ederek SOR oluşumunu engellemekte veya direk olarak serbest radikalleri ortamdaki elemine etmektedirler [76].

Polifenollerin sağlığımız üzerine etkileri tüketilen miktarına ve biyoyararlanıma göre değişmektedir. Bazı çalışmalarda, bu bileşenlerin bakteri, mantar ya da 15 protozoaların büyümesini ya da çoğalmasını engelledikleri gösterilmiştir. Ayrıca, polifenollerin bağırsak florasını artırma özelliğinden dolayı, probiyotik olarak da kullanılmaktadırlar [78].

Bir polifenolün antioksidan olabilmesi için iki temel şartı sağlaması gerekir: 1. Okside olabilen substratlara oranla düşük derişimlerde bulunduklarında,

otooksidasyonu veya serbest radikal merkezli erteleyebilmeli, geciktirebilmeli veya önleyebilmelidir [80].

2.Süpürme sonunda oluşan radikal, oksidasyon zincir reaksiyonunu kesmekte kararlı olmalıdır [80].

Polifenolik bileşikler arasında en çok çalışılan fitokimyasallar, yeşil çayda bulunan epigalatlar, zerdeçalda bulunan kurkumin ve üzümde bulunan resveratrol'dür. Örnek olarak yeşil çaydaki aktif maddelerin %50'sini oluşturan epigalokatekin-3-galat (EGCG), uzun zamandır antikanserojen ajan olarak araştırılmaktadır. Yapılan çok sayıda çalışmada EGCG tüketimiyle, oral, meme, prostat, mide, yumurtalık, özofagus, cilt, kolon, pankreas ve baş ve boyun kanserlerin inhibisyonu arasındaki pozitif ilişkisi saptanmıştır [82].

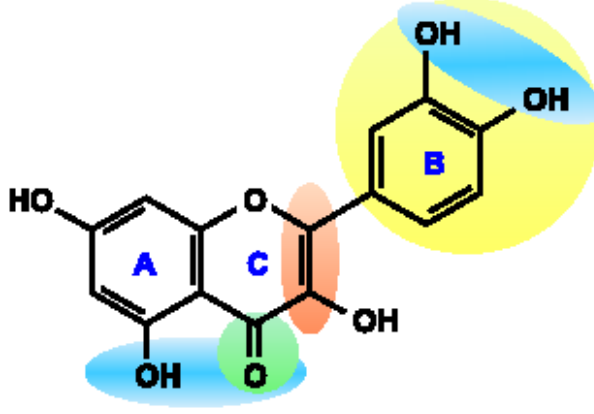
2.4.3.3 Flavonoidler

Flavonoidler; önemli antioksidan ve kelatlama özelliğine sahip, düşük molekül ağırlıklı ve en geniş bitki fenolikleri sınıfıdır. 6 karbonlu A, B ve C halkalarından oluşan heterosiklik bileşikler, hetero halkanın yükseltgenme derecesine göre farklılaşırlar. Aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C olarak ifade edilir. Karbon atomları C halkasındaki oksijenden bağlayarak, B halkasındaki karbon atomları ise üssü (") rakamlarla numaralandırılır (Şekil 2.10).

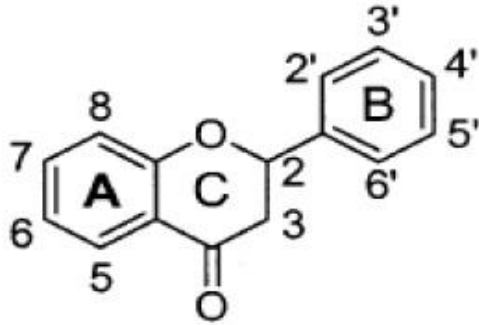
Doğada, birçoğu yaprak, çiçek ve kökte bulunan 4000'den fazla flavonoid çeşidi mevcuttur. Meyve, sebze, şarap, kakao ve çayda bol miktarda bulunurlar. Antioksidan aktivitelerini belirleyen ve aromatik halkalara bağlı olan birçok fenolik hidroksil grupları içerirler. Metal kelatlama, lipid peroksidasyonunu önleme, reaktif oksijen türlerini içeren diğer süreçleri azaltma (inhibe etme) özellikleri vardır. Yiyeceklerde genellikle 3-orto glikozidleri ve polimerleri şeklinde bulunurlar. Bu gruptaki bileşikler yapılarına bağlanan grupların türü, pozisyonu ve sayısına göre farklı radikal süpürme ve kelatlama aktivitesine sahiptirler [26].

Flavonoidler tarafından serbest radikallerin süpürülme yeteneği, en çok serbest 3-OH grubunun varlığına bağlıdır. 3-OH ve 3'',4'' kateşol yapısına sahip olan flavonoidlerin SOR türlerine karşı daha etkili oldukları bazı çalışmalarda

gözlemlenmiştir. Örneğin; Kuersetin şekil (2.9), siyanidin ve kateşinin antioksidan kapasiteleri bu özelliklerinden dolayı yüksektir [25,26].



Şekil 2.9. Kuersetin (Flavonoidlerin klasik antioksidan kapasitelerini belirlemede önemli olan özellikleri gösteren kimyasal yapısı) [25]



Şekil 2.10. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı [27]

Flavonoidler, fenolik halkalardan oluşan benzo- γ -pyran türevleridir [25]. Bu bileşikler; A, B ve C halkalarından oluşan halka yapısında çeşitli hidroksil, metoksi ve şekerleri sübstituent olarak içerirler. Halkalar arasındaki yapısal değişiklikler flavonoidleri çeşitli sınıflara ayırmaktadır (şekil 2.10) [27].

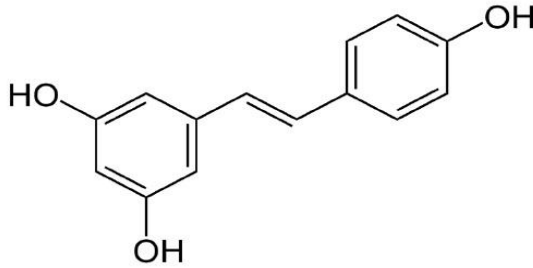
Resveratrol

Resveratrol (trans 3, 5, 4'-trihidroksitilben), en fazla kırmızı üzümün kabuğunda ve çekirdeklerinde bulunan bitki kaynaklı polifenolik bir bileşiktir. Aynı zamanda, fitoaleksinin yapısında bir bileşik olan Resveratrol, bitkilerde patojen enfeksiyon

bölgesinde, sentezlenen antimikrobiyal bir ajandır. Resveratrol, bitkilerde stilben-sentaz enzimi tarafından sentezlenmektedir. Botrytis cinerae patojeni, iklim değişiklikleri, ozon, ağır metaller ve UV radyasyona maruz kalma gibi çeşitli stres faktörleri resveratrol sentezini artırmaktadır [83].

Resveratrol ilk kez Japonya’da 1940 yılında akçöpleme bitkisinden (*Veratrum grandiflorum*) izole edilmiştir. Eski zamanlardan beri, bu madde *Polygonum cuspidatum* bitkisinin özütü şeklinde *Ayurveda alternatif tıbbında* ve geleneksel Çin tıbbında kullanılmıştır. Doksanlarda ‘Fransız paradoksu’nu, kırmızı şarabın aktif maddesinin resveratrol olmasıyla açıklayan hipotezler ortaya çıkmıştır. Son yıllarda resveratrol, kemoprevantif ve antineoplastik etkinliğinden dolayı bilim dünyasında çok ilgi çekmektedir ve binlerce makaleye konu olmuştur [84]. Bunun yanı sıra, yer fıstığında, soya fasulyesinde ve narda da yüksek düzeyde bulunabilir. En çok üzümde bulunduğundan, kırmızı şarap ve üzüm suyu resveratrolün önemli kaynaklarındandır [85]. Beyaz üzüm üretiminde üzüm kabukları fermente olmadığından, beyaz şarapta resveratrolün düzeyi düşüktür.

Resveratrol’ün iki farklı izoformu vardır: cis ve trans. Trans izomeri daha stabil ve biyolojik aktif formudur. Şekil 2.11’ de yapısı gözlenmektedir.

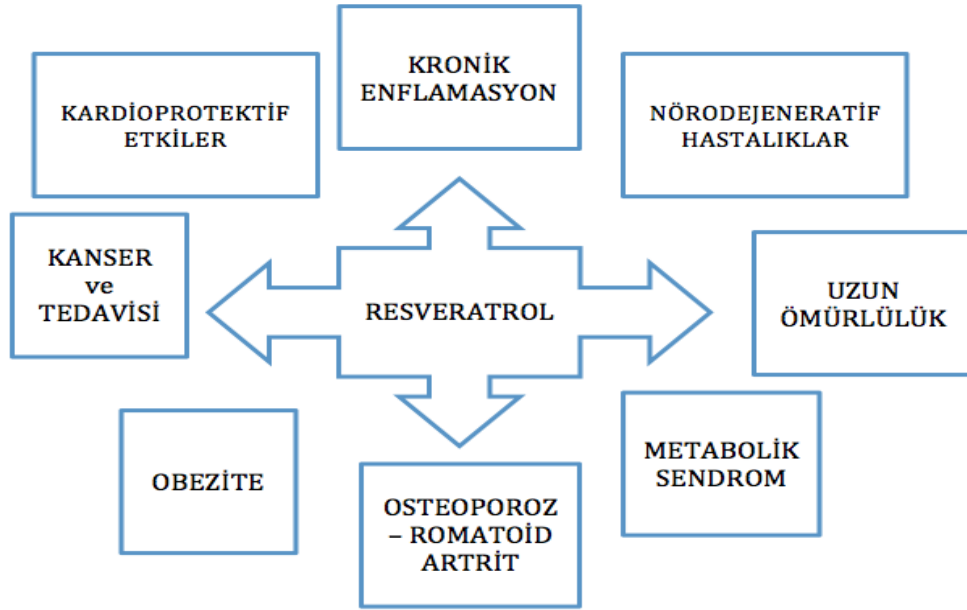


Şekil 2.11. Trans – resveratrol[32]

Resveratrolün biyolojik etkileri ve etki mekanizmaları

Dünya çapında obezite ve metabolik bozukluklar çağımızın pandemisi olarak kabul edilmektedir. Oksidatif stres ve inflamasyona bağlı olduğu kabul edilen bu patolojik durumlar için halen çözüm aranmaktadır. Resveratrolün antioksidan kapasiteyi artırması, antiemflamatuar ve insülin sinyalizasyon düzenleyici etkisi

ile kanser, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar üzerinde tedavi değeri olduğu söylenir [84]. Yapılan çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışma sonuçlarına göre; resveratrolün insan sağlığı üzerinde yararlı etkiler göstermesi beklenir. Resveratrolün etki mekanizması, farklı hücrelerde ve farklı patolojik durumlarında değişiklik göstermektedir. Şekil 2.12’de resveratrolün etkili olduğu farklı durumlar özetlenmiştir.

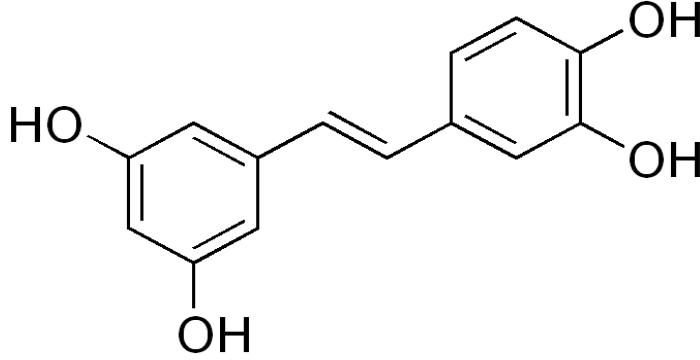


Şekil 2.12 Resveratrol’ün etkili olduğu durumlar [27]

Piceatannol

Piceatannol (trans-3,4',3',5-tetrahydroxystilbene) (PC), ravent (*Rheum rhabarbarum*), dutgiller, şeker pancarı, şarap, beyaz çay ve kırmızı üzüm gibi birçok bitkide doğal olarak bulunan bir polifenol'dür. Bitkilerde fungal enfeksiyonu ve diğer çevresel stres faktörlerinin etkilerini önlemek amacıyla sentezlenmektedir. Memeli sistemlerde ise, antioksidan, antiinflamatuvar, antikarsinojenik, antimetastatik, antiproliferatif ve antimutajenik etkiler göstermektedir [86,87]. Yapısal olarak PC, biyolojik özellikleri iyi çalışılmış bir

stilben bileşiği olan resveratrolün, 3' pozisyonunda ilave bir fenolik grup içeren analogudur [88].



Şekil 2.13 Piceatannol (trans-3,4',3',5-tetrahydroxystilbene) (PC) [88]

Bununla birlikte, antikanser özelliği ile bilinen resveratrol bileşiği ile ilgili olarak PubMed'de yapılan bir aramada yaklaşık olarak 4200 çalışmaya ulaşılabilirken, PC ile ilgili olarak yaklaşık 400 çalışmaya ulaşılabilir. Bu durum, PC'ün resveratrol'e göre daha etkin bir antioksidan molekül olması ile ilgili bulguların, son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiş olmasından kaynaklanmaktadır.

PC ve resveratrolün kristal yapısını inceleyen çalışmalarda elde edilen bulgular, 3'-OH hidrojen atomuna bitişik bir O-4' grubuna sahip olan PC'ün, 4'H atomunu serbest radikallere transfer etmesinin daha kolay olduğunu, bu nedenle de resveratrol'den daha etkili bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir [89].

Serbest radikallerle reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan semikinon radikali daha kararlı bir moleküldür [90]. PC'ün antioksidan özelliklerine dair yapılmış çeşitli çalışmalarda ($O_2^{\cdot-}$) ve ($LOO^{\cdot}$) serbest radikallerine karşı süpürücü etkilerinin resveratrole göre çok daha etkili olduğu belirtilmiştir [89,90]. Hücre kültürü'nde yapılan çalışmalar, PC'ün moleküler ortho-dihidroxy yapısının ve katekol grubunun, lösemi hücrelerinde hidroksil radikaliyle bağlı DNA hasarını önlediğini göstermiştir [91]. *Salmonella* TA 102 test suşu ile yapılan antimutajenite çalışmaları PC'nin orta seviyede bir antimutajenik etki gösterdiği belirtilmiştir [92,93]. PC'ün, deri, prostat, pankreas ve meme kanseri

hücrelerinde proapoptotik etkileri gösterilmiş olsada, apoptoz önleyici aktiviteside bazı araştırmalarda gösterilmiştir.

Sıçan PC 12 hücrelerinde deneysel olarak oluşturulan Alzheimer modelinde hücre içi ROS birikiminden kaynaklanan apoptoz ind ksyonu, PC uygulaması ile azaltılmıştır [93]. PC 12 hücrelerinde yapılan bir başka çalışma, hidrojen peroksit ve peroksinitrit toksisitesinin indüklediği apoptozun PC uygulaması ile önlenebileceği rapor edilmiştir [93,94]. PC büyük ölçüde karaciğerde metabolize olmakta ve bir glukuronid konjugat'a dönüşmektedir. Bununla birlikte molekülün s lfatlandığına dair bulgular da mevcuttur [5,90].

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deney hayvanlarının temini ve deney gruplarının oluşturulması

Çalışmalarda, Anadolu Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Birimi'nden temin edilen yaklaşık 200-225 g ağırlığındaki Wistar cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. Çalışmalar Anadolu Üniversitesi yerel etik kurulunun kuralları doğrultusunda yürütülmüştür.

Ratlar deney süresince 12 saat aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısısı $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve nemi % 55 ± 5 olarak ayarlanmış ortamda yaşatıldı. Hayvanlar deneye başlamadan 1 hafta önce polikarbon şeffaf kafeslere konularak ortam koşullarına adaptasyonları sağlandı. Yiyecek ve su ihtiyaçları sınırsız ve günlük olarak sağlandı ve kontrol edildi. Sağlık durumları günlük olarak izlendi. Deneyin başında ve sonunda vücut ağırlıkları tartıldı.

Çalışma Uygulanan Gruplar (Gruplardaki hayvan sayısı 5)

1. Kontrol (% 0.9 NaCl i.p.)
2. BLM (10mg/kg i.p.)
3. BLM (10 mg/Kg i.p.) + PC (4 mg/Kg i.p.)
4. PC (4 mg/Kg i.p.)

Kontrol grubuna intraperitoneal (i.p.) olarak 0.5 ml % 0.9'luk serum fizyolojik uygulanmıştır. BLM grubuna (i.p.) 10 mg/kg bleomisin sülfat (Bleocin-S Onko İlaç San. ve Tic. A.Ş.) tek doz uygulanmıştır (Akgedik ve ark, 2012). BLM + Piceatannol uygulanmasında ilk gün BLM (i.p.) 10 mg/kg uygulanmış olup 14. günden 29. güne kadar PC 4 mg/Kg (i.p.) uygulanmıştır. Piceatannol (PC) 4 mg/Kg (i.p.) 14 günden itibaren 29. güne kadar uygulanmıştır (Sebai ve ark., 2010). Uygulamalar sabah saat 09:00'da yapılmıştır. Tüm hayvanlar 29. gün öldürülüp diseksiyon yapılmıştır.

3.1.2. Deneylerde kullanılan kimyasal malzemeler

Deneyde kimyasal maddeler olarak Piceatannol (TCI 1928), Bleomisin (Bleocin-S Onko-İstanbul), süperoksit dismutaz enzim aktivitesi Oxis International.Inc. firmasından, lipid peroksidasyon düzeylerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan kitler Cayman chemical firmasından temin edilmiştir.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Biyokimyasal incelemeler için uygulanan işlemler

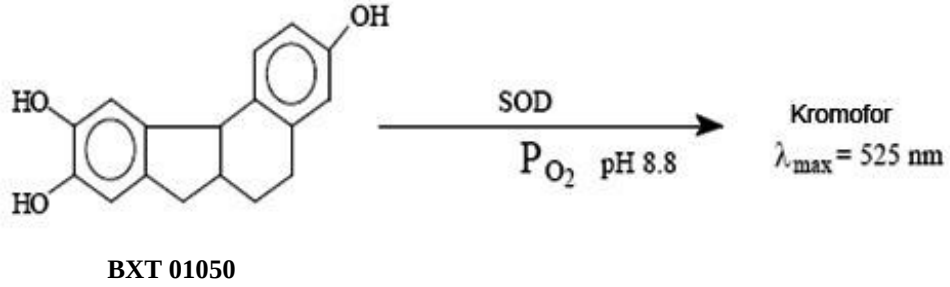
Toplam protein düzeyleri Bradford metoduna göre belirlenmiştir (Bradford 1976).

3.2.1.1 Süperoksit Dismutaz (Cu-Zn SOD) enzim aktivitesinin belirlenmesi

SOD enzim aktivitesi Nebot ve ark., (1993) metoduna dayalı ticari kit (Oxis SOD-525) kullanılarak yapılmıştır.

Prensip: SOD 525 metodu, 5,6,6a,11b-tetrahidro-3,9,10,-trihidroksibenzo [c] floren'in (BXT-01050) sulu alkali solüsyondaki Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimine bağımlı otooksidasyon oranının, reaksiyon sonucunda ortaya çıkan kromofora bağılı ölçümüne dayanmaktadır. 1-metil-2-vinilpiridinyum triflorometansülfonat (BXT 03077) merkaptanlara bağılı safsızlıkların giderilmesi amacıyla reaksiyon karışımında bulunmaktadır. Reaksiyon pH 8.8 de ve 37 °C'de, 3 mM borik asit ve 0,1 M dietilentriaminpentaasetik asit içeren 50mM 2 amino-2-metil-1,3-propandiol tampon içerisinde gerçekleşir. 525 nm' deki absorbans değişiminin kinetik ölçümü 5,6,6a,11b-tetrahidro-3,9,10,-trihidroksibenzo[c] floren'in 37 °C' deki reaksiyon karışımına eklenmesinden sonra gerçekleşir. SOD aktivitesi belirlenirken meydana gelen reaksiyonlar Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

1 ünite enzim: 37 °C sıcaklıkta ve pH 8.8’de 1 mikromol 5,6,6a,11b-tetrahidro-3,9,10,-trihidroksibenzo [c] floren’in (BXT-01050) 1 dakikadaki otooksidasyonunu sağlayan enzim aktivitesidir.



Şekil 3.1. SOD aktivitesi belirlenirken meydana gelen reaksiyonlar

Doku homojenatının hazırlanışı

- 1) -82 °C’den çıkarılan doku örneği 0.1 gr tartılarak, 0.16 mg/ml heparin içeren % 0.9’luk NaCl solüsyonu ile yıkanmıştır.
- 2) Doku üzerine 1 ml 0.25 M süktroz ilave edilir ve homojenize edilmiştir..
- 3) Homojenat 8500 g’de 10 dk +2 °C’de santrifüj edilmiştir.

Kloroform-Ethanol ekstraksiyonu

Örneklerden Mn-SOD ve Fe-SOD’ın uzaklaştırılması amacıyla Kloroform-Ethanol Ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.

- 1) 800 µl soğuk kloroform/ethanol 37.5 / 62.5 (v/v) ile 500 µl süpernatant 30 sn karıştırılmıştır.
- 2) +4 °C’de 2500 g’de santrifüj edilmiştir.
- 3) Süpernatant deney yapılıncaya dek + 2 °C’de bekletilmiştir.

Kullanılan çözeltiler

Reaktif 1: 55 mM Tris/HCl (pH 8.8), 0.66 mM 5,5,6,6a,11b-tetrahidro-3,9,10-trihidroksibenzo[c]florene (BXT 01050), 0.5 mM dietilentriaminpentaasetik asit (DTPA), %2.5 etanol.

Reaktif 2: 55 mM Tris/HCl (pH 8.8), 33.3 mM 1-metil-2-vinilpiridinyum triflorometansülfonat (BXT 03077).

Tampon: 3 mM borik asit, 0.11 mM DTPA (pH 8.8), 55 mM 2-amino-2 metil - 1,3-propandiol (AMPD).

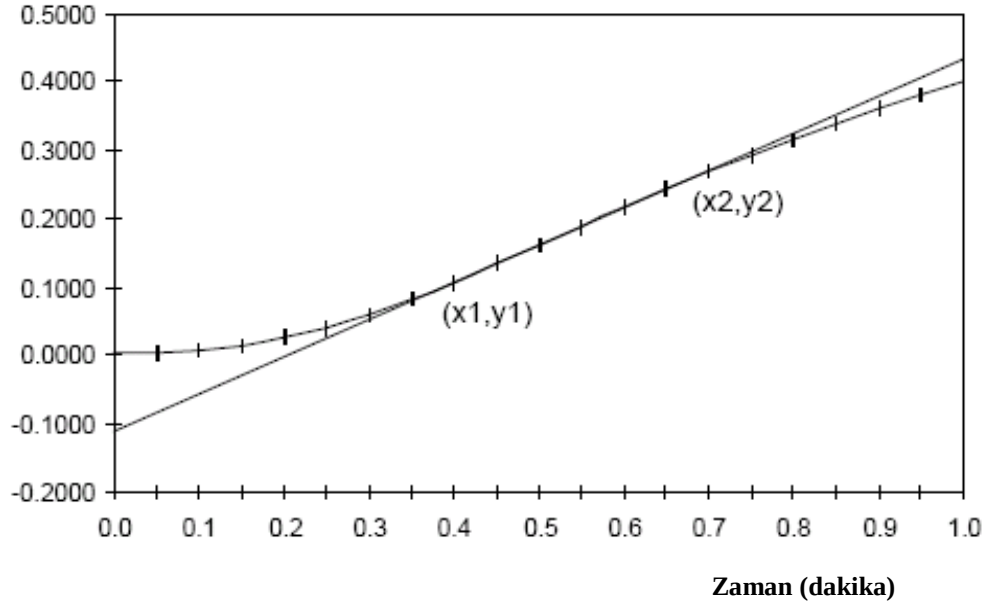
Deney

- 1) K r için 900  l tampon, 30  l R1 ve 30  l R2 bir t p içerisinde kar ştır lm şt r.
- 2) Deney için 900  l tampon oksijene doygun hale getirildikten sonra bir cam tüpe aktar lm şt r.
- 3) 40  l süpernatant veya distile su (kontrol için) tüpe ilave edilmiştir.
- 4) 30  l R2 test tüpüne ilave edilip kar ştır lm şt r.
- 5) 37  C'de 1 dk. süreyle inkübe edilmiştir.
- 6) 30  l R1 test tüpüne ilave edilip kar ştır lm şt r.
- 7) Yaklaşık 50 sn. bekletildikten sonra spektrofotometre küvetine aktarılarak 525 nm'de zamana kar şı absorbans okunmuştur.

SOD aktivitesinin hesaplanması

1 Dakikadaki absorbans değişiminin (ΔA) belirlenmesi

525 nm'deki



Şekil 3.2. Zamana karşı absorbans grafiği

Zamana karşı absorbans (Şekil 3.2) belirlendikten sonra ortaya çıkan eğride eğim hesaplanarak, 1 dakikadaki absorbans değişimi (ΔA) hem örnek (V_s) ($n=6$) hem de kontrol (V_c) ($n=6$) grupları için hesaplanmıştır [Eğim = $(y_2 - y_1) / (x_2 - x_1)$]. Her bir örnek için V_s/V_c değeri belirlenmiştir. Belirlenen değerler Çizelge 3.1'de gösterilen V_s/V_c oran tablosuna yerleştirilerek SOD aktivite ünitesi cinsinden belirlenmiştir.

Vs/Vc oran tablosu

Çizelge 3.1. Vs/Vc oran tablosu

Sonuçlar Ünite/ mg protein cinsinden ifade edilmiştir.

Vs/Vc	Units	Vs/Vc	Units	Vs/Vc	Units	Vs/Vc	Units	Vs/Vc	Units	Vs/Vc	Units	Vs/Vc	Units
1.00	0.00	2.00	1.00	3.00	2.18	4.00	3.57	5.00	5.25	6.00	7.32	7.00	9.93
1.05	0.05	2.05	1.06	3.05	2.24	4.05	3.65	5.05	5.35	6.05	7.44	7.05	10.08
1.10	0.09	2.10	1.11	3.10	2.31	4.10	3.73	5.10	5.44	6.10	7.56	7.10	10.23
1.15	0.14	2.15	1.17	3.15	2.37	4.15	3.80	5.15	5.54	6.15	7.68	7.15	10.38
1.20	0.19	2.20	1.22	3.20	2.44	4.20	3.88	5.20	5.63	6.20	7.80	7.20	10.53
1.25	0.24	2.25	1.28	3.25	2.50	4.25	3.96	5.25	5.73	6.25	7.92	7.25	10.69
1.30	0.29	2.30	1.34	3.30	2.57	4.30	4.04	5.30	5.83	6.30	8.04	7.30	10.85
1.35	0.33	2.35	1.39	3.35	2.64	4.35	4.12	5.35	5.93	6.35	8.16	7.35	11.01
1.40	0.38	2.40	1.45	3.40	2.71	4.40	4.21	5.40	6.03	6.40	8.29	7.40	11.17
1.45	0.43	2.45	1.51	3.45	2.77	4.45	4.29	5.45	6.13	6.45	8.42	7.45	11.34
1.50	0.48	2.50	1.57	3.50	2.84	4.50	4.37	5.50	6.23	6.50	8.55	7.50	11.50
1.55	0.53	2.55	1.63	3.55	2.91	4.55	4.46	5.55	6.34	6.55	8.68	7.55	11.67
1.60	0.58	2.60	1.68	3.60	2.98	4.60	4.54	5.60	6.44	6.60	8.81	7.60	11.84
1.65	0.63	2.65	1.74	3.65	3.06	4.65	4.63	5.65	6.55	6.65	8.94	7.65	12.02
1.70	0.69	2.70	1.81	3.70	3.13	4.70	4.71	5.70	6.65	6.70	9.08	7.70	12.20
1.75	0.74	2.75	1.87	3.75	3.20	4.75	4.80	5.75	6.76	6.75	9.22	7.75	12.38
1.80	0.79	2.80	1.93	3.80	3.27	4.80	4.89	5.80	6.87	6.80	9.35	7.80	12.56
1.85	0.84	2.85	1.99	3.85	3.35	4.85	4.98	5.85	6.98	6.85	9.50	7.85	12.74
1.90	0.90	2.90	2.05	3.90	3.42	4.90	5.07	5.90	7.09	6.90	9.64	7.90	12.93
1.95	0.95	2.95	2.11	3.95	3.50	4.95	5.16	5.95	7.21	6.95	9.78	7.95	13.12

3.2.1.2 (GSH-Px) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi Lawrence ve Burk (1976)'ya göre belirlenmiştir.

Prensip: GSH-Px ortamdaki H_2O_2 varlığında redükte glutasyonun (GSH) oksidasyonunu katalizler. Reaksiyon ortamında NADPH ve glutasyon redüktaz enzimi bulunması durumunda bir önceki reaksiyonda oluşan okside glutasyon (GSSG) redükte forma çevrilirken, beraberinde redükte formdaki NADPH, okside forma ($NADP^+$) dönüşür. NADPH'ın 340 nm dalga boyunda oluşturduğu absorbanstaki azalma ölçülerek GSH-Px enziminin aktivitesi belirlenir.

1 ünite enzim: 25 °C sıcaklıkta ve pH 7'de H_2O_2 katalizörlüğünde, 1 mikromol redükte glutasyonu okside forma dönüştüren enzim aktivitesidir.

Doku Homojenatının Hazırlanması

- 1) Doku örnekleri 1/10 (w/v) oranında, 5 mM EDTA içeren 50 mM potasyum fosfat tampon içerisinde homojenize edilmiştir.
- 2) Homojenat 15 dk süreyle 8000 rpm'de +4 °C'de santrifüj edilmiştir.
- 3) Süpernatant alınarak enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

Kullanılan çözeltiler

Tampon: Potasyum fosfat 50mM pH:7.0, EDTA 5 mM

Sodyum azid (NaN₃): 1 mM

Redükte glutatyon: (GSH) 2 mM

Hidrojen peroksit (H₂O₂): 0.25 mM

NADPH 0.2 mM

Testin uygulanışı

- 1) Spektrofotometre küvetinde 5 mM EDTA içeren 1 ml 50 mM potasyum fosfat tamponu içerisinde son konsantrasyon 1mM NaN₃, 0.2 mM NADPH+H⁻, 2 mM GSH, 1.2 U/ml glutatyon redüktaz enzimi hazırlanmıştır.
- 2) Örnek tüpü için bu karışıma 20 µl süpernatant ilave edilmiştir.
- 3) 0.25 mM H₂O₂ ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır.
- 4) 1 dakikadaki optik dansite değişimi örnek ve kontrol tüpleri için 340 nm'de 37 °C'de belirlenmiştir.

Hesaplamalar

$$\text{Ünite/ml enzim} = \frac{(\Delta OD_{340nm} / dk \text{ Örnek} - \Delta OD_{340nm} / dk \text{ Kontrol}) (2) (V_t) (df)}{6.22 (V_e)}$$

2 : okside olan NADPH'ın mikromolü başına otaya çıkan GSH miktarı (mikromol)

V_t : Toplam reaksiyon hacmi (ml)

df: Dilüsyon faktörü

6.22: NADPH'ın 340 nm'deki ekstinksiyon katsayısı (milimolar)

(V_e): Kullanılan enzim hacmi (ml)

3.2.1.3 Katalaz (CAT) aktivitesi ölçümü

CAT aktivitesi ölçümü Beers and Sizer (1952) metoduna göre gerçekleştirilmiştir.

Prensip: Bu yöntem hidrojen peroksitin 240 nm dalga boyunda verdiği absorbans değerinin, CAT enziminin katalizlediği reaksiyon sırasında azalma göstermesi ve bu azalmanın spektrofotometrik olarak izlenmesi temeline dayanır. Absorbanstaki dakikalık düşüş hızı enzim aktivitesiyle doğru orantılıdır.

Doku homojenatının hazırlanması

1. Doku örnekleri 1/10 (w/v) oranında, 5 mM EDTA içeren 50 mM potasyum fosfat tampon içerisinde homojenize edilmiştir.
2. Homojenat 15 dk süreyle 8000 rpm'de +4 °C'de santrifüj edilmiştir.
3. Süpernatant alınarak enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

Kullanılan reaktifler

- A. 50 mM Potasyum fosfat tamponu (pH: 7.0)
- B. %0.0036 Hidrojen Peroksit solüsyonu (50 mM Potasyum fosfat tamponu ile hazırlanır)

Testin uygulanışı

1. Kör olarak A solüsyonu kullanılır. (3 ml)

2. Test tüpünde ise 2.9 ml A solüsyonu ve 0.1 ml örnek konulur.
3. Spektrofotometrede 240 nm’de köre karşı test tüpü 3 dakika boyunca okutulur.

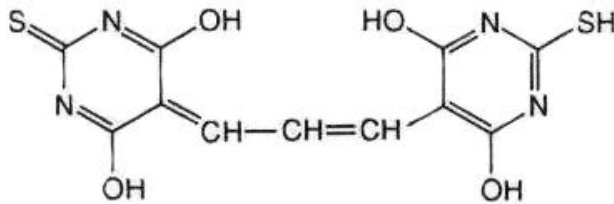
Hesaplamalar

$$\text{Ünite/ml Enzim} = \frac{A_{240} / \text{dakika} \times 1000}{43.6 \times \text{mikrolitre enzim (100)} / \text{mikrolitre reaksiyon hacmi (3000)}}$$

3.2.1.4 Malondialdehit (MDA) tayini ile dokulardaki lipid peroksidasyonunun belirlenmesi

MDA tayini Ohkawa ve Ohishi (1979) metoduna göre belirlenmiştir.

Prensip: 3 veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu tiobarbitürik asitle ölçülebilen Malondialdehit meydana gelmektedir. Tiobarbitürik asitle Malondialdehit spektrofotometrede 532 nm’de ölçülebilen pembe renkli bileşiği meydana getirmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 3.3. Malondialdehit tiobarbitürik asit kompleksi sonucunda oluşan bileşiğin yapısı

Kullanılan reaktifler

Sodyum dodesil sülfat çözeltisi % 8.1

Asetat Tamponu: % 20 pH 3.5

Tiobarbitürik asit solüsyonu: % 0.8

Bütanol/piridin karışımı: 15 / 1 (v:v)

Uygulanan işlemler

Doku homojenatının hazırlanması

- 1) Doku örnekleri % 10 (w:v) olacak şekilde % 1.15'lik KCl içerisinde homojenize edilmiştir.
- 2) Karışım 4000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir.
- 3) Süpernatant MDA tayininde kullanılmıştır.

Testin uygulanışı

- 1) 500 µl süpernatant üzerine 200 µl % 8.1'lik sodyum dodesil sülfat solüsyonu, 1500 µl % 20'lik asetat tamponu, 1500 µl % 0.8'lik tiobarbitürik asit solüsyonu ve 700 µl distile su ilave edilerek karıştırılmıştır.
- 2) Örnekler 95 °C'lik su banyosunda 1 saat bekletilmiştir
- 3) Örnekler soğutulduktan sonra üzerindeki berrak kısım fazla karıştırılmadan alınmıştır.
- 4) 4000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir.
- 5) Üstteki berrak kısım alınarak üzerine 1 ml distile su, 5 ml bütanol/piridin karışımı 15/1 (v:v) ilave edilmiştir
- 6) Karıştırılıp 4000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- 7) Üst kısımdaki sıvı alınarak 532 nm'de köre karşı absorbanans belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Toplam Protein Analizleri

Deney gruplarına göre toplam protein değerleri izelge 4.1’de gsterilmiştir.

Çizelge 4.1. Deney gruplarına gre toplam protein değerleri (* $P \leq 0.005$ Dunnet-test)

Deney Grupları	Toplam Protein Düzeyleri (miligram / ml)
Kontrol	$9,3 \pm 0,7$
BLM	$9,4 \pm 1,0$
BLM+PC	$9,7 \pm 0,5$
PC	$10,0 \pm 1,2$

Deney grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında kontrol grubu ile aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmadığı grlmştir.

4.2. Biyokimyasal Analizler

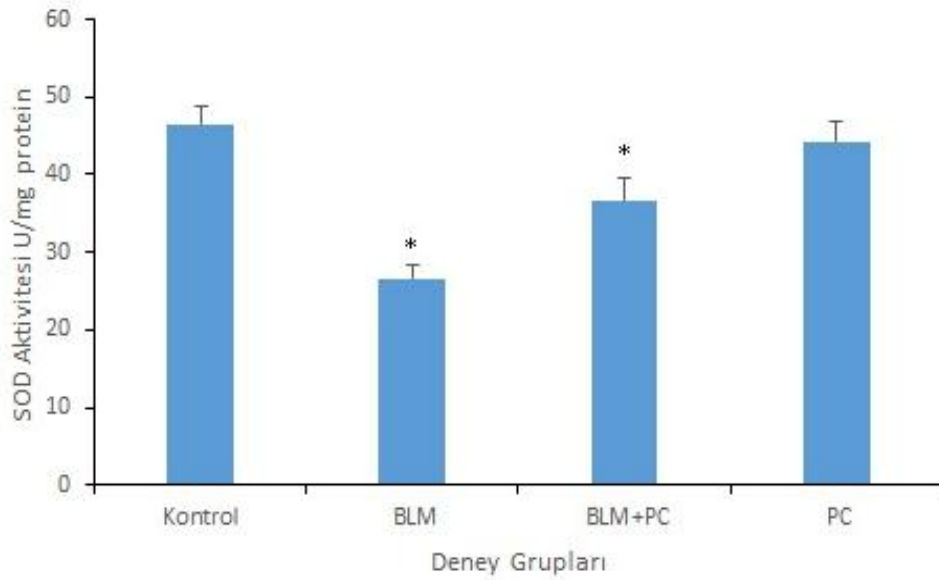
4.2.1. SOD enzim aktivitesi

SOD enzim aktivitesi Nebot ve ark. 1993’e gre belirlenmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar SPSS one-way Anova testi (Post hoc testi olarak Dunnet testi) uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

BLM grubu sıçanların SOD aktivitesi kontrol grubu sıanlarınkı ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (%43). BLM+PC grubu sıçanların SOD aktivitesinde de kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma grlmştir (%21).

Çizelge 4.2. Deney gruplarına göre SOD enzim aktivitesi değerleri (U/mg prt) ve kontrol grubu ile istatistiksel açıdan karşılaştırılmaları (* $P \leq 0.005$ dunnett's T3test)

Deney Grupları	SOD Enzim Aktivitesi U/mg protein $\pm$ SD
Kontrol	46,47 $\pm$ 2,48
BLM	26,58 $\pm$ 1,84 *
BLM+PC	36,7 $\pm$ 2,77 *
PC	44,27 $\pm$ 2,66



Şekil 4.1. SOD aktivitesi sonuçları grafiği (* kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılık)

4.2.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi

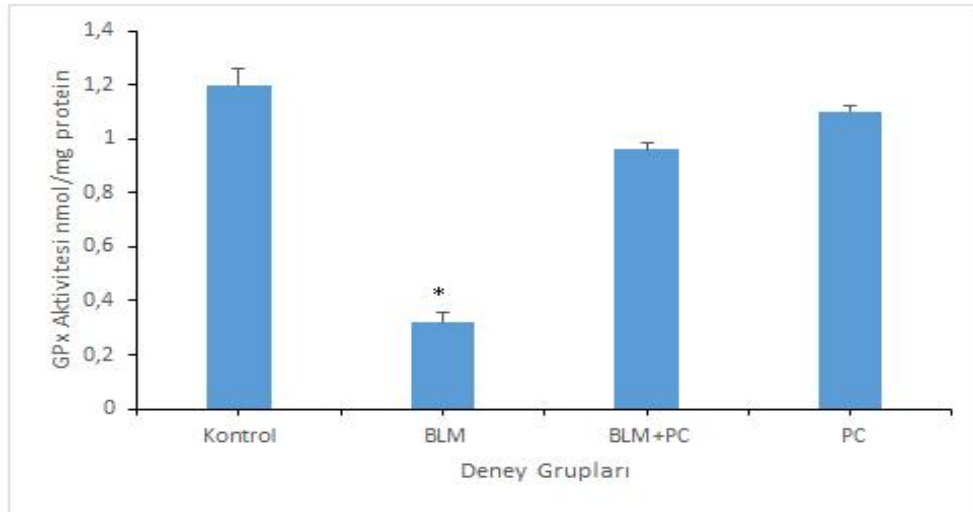
Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi Lawrence ve Burk (1976)'ya göre belirlenmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar SPSS one-way Anova testi (Post hoc testi olarak Dunnett's T3 testi) uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

BLM uygulanan sıçanlarda GPx aktivitesi kontrole göre anlamlı azalmıştır(%68) . BLM+PC grubunda GPx aktivitesinde bir düşme söz konusu

olmasına rağmen anlamlı değildir. Sadece PC uygulanan grupta ise GPx aktivitesi kontrol ile hemen hemen aynı çıkmıştır.

Çizelge 4.3. Deney gruplarına göre glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi değerleri (nmol/mg protein) ve kontrol grubu ile istatistiksel açıdan karşılaştırılmaları (* $P \leq 0.05$ dunnett's T3-test)

Deney Grupları	Glutatyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesi nmol/mg protein $\pm$ SD
Kontrol	1,10 $\pm$ 0,06
BLM	0,36 $\pm$ 0,036 *
BLM+PC	0,944 $\pm$ 0,02
PC	1,08 $\pm$ 0,021



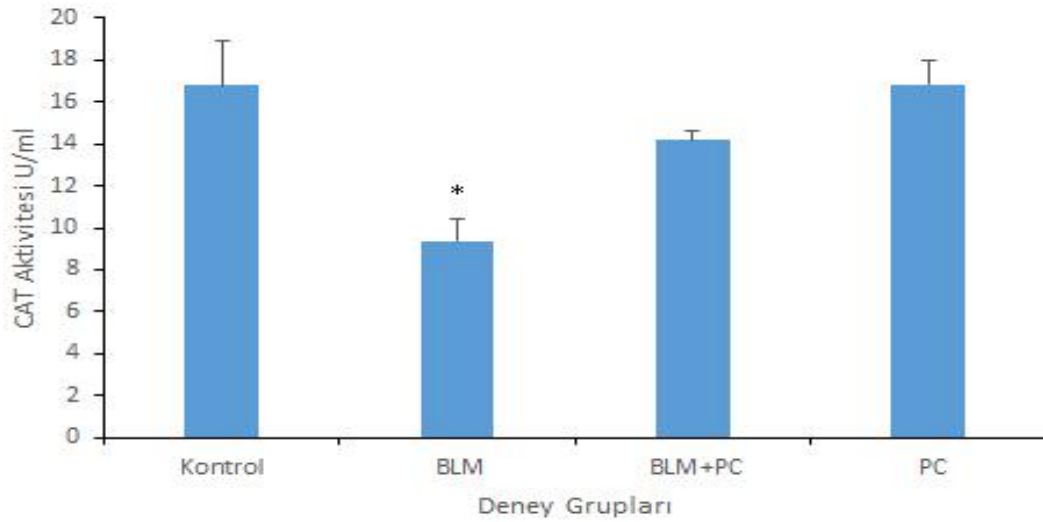
Şekil 4.2. GPx aktivitesi sonuçları grafiği (* kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılık)

4.2.3. Katalaz enzim aktivitesi

Katalaz enzim aktivitesi ölçümü Beers and Sizer (1952) metoduna göre gerçekleştirilmiştir. BLM uygulanan sıçanlarda kontrole göre anlamlı bir azalış göstermiştir (%45). BLM+PC grubunda azalma olmasına rağmen bu azalış anlamlı değildir.

Çizelge 4.4. Deney gruplarına göre katalaz enzim aktivitesi değerleri (U/ml) ve kontrol grubu ile istatistiksel açıdan karşılaştırmaları (* $P \leq 0.05$ dunnett's T3-test)

Deney Grupları	Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi U/ml $\pm$ SD
Kontrol	16,81 $\pm$ 2,07
BLM	9,37 $\pm$ 1,08 *
BLM+PC	14,16 $\pm$ 0,5
PC	16,84 $\pm$ 1,12



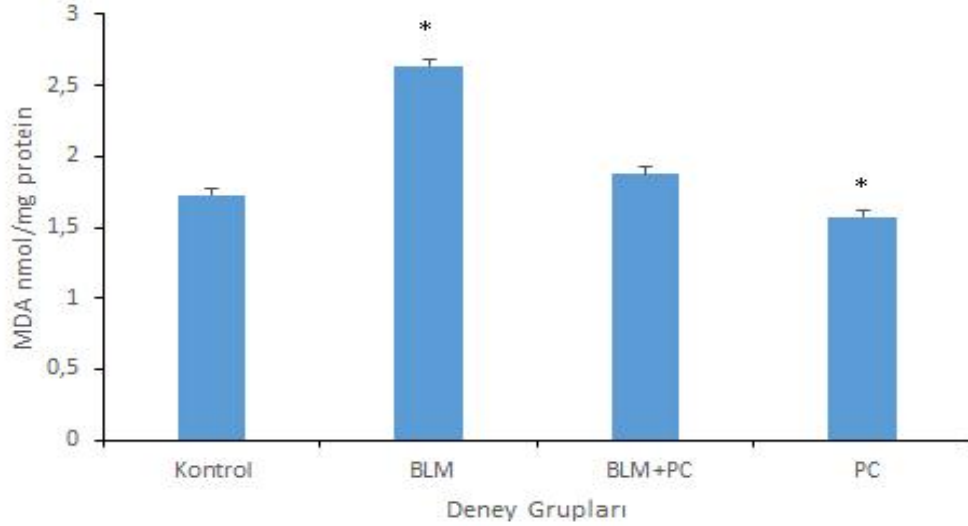
Şekil 4.3. Cat aktivitesi sonuçları grafiği (* kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılık)

4.2.4. MDA düzeyleri

BLM grubu sıçanlarda MDA düzeyi kontrol grubuna oranla anlamlı olarak artış göstermiştir (%52). BLM+PC grubu sıçanlarda MDA düzeyi BLM grubuna göre anlamlı bir şekilde düştüğü gözlenmiş ancak kontrole kıyaslandığında çok az bir artış göstermiştir. PC grubunda ise MDA düzeyi kontrole göre anlamlı şekilde azalmıştır.

Çizelge 4.5. Deney gruplarına göre MDA değerleri (nmol/mg protein) ve kontrol grubu ile istatistiksel açıdan karşılaştırılmaları (* $P \leq 005$ dunnett's T3-test)

Deney Grupları	MDA düzeyleri (nmol/mg protein) $\pm$ SD
Kontrol	1,728 $\pm$ 0,04
BLM	2,638 $\pm$ 0,05*
BLM+PC	1,871 $\pm$ 0,05
PC	1,574 $\pm$ 0,04*



Şekil.4.4. MDA düzeyi sonuçları grafiği (* kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılık)

5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Kanser hastalığı Dünya’da ve ülkemizde en önemli ölüm sebebidir. Ancak tedavi edilebilir bir hastalıktır. Kanser tedavisinde, tümör hücrelerinin yok edilmesi ve bunu yaparken de normal hücrelerin yapılan tedaviden zarar görmemesi hedeflenmektedir.

Kemoterapi kanser tedavisinde en sıklıkla uygulanan tedavi türüdür. Kimyasal tedavide kullanılan bleomisin ise dünyada en çok kullanılan antineoplastik ajanlardan biridir. Tedavide kullanılan çoğu ajanda olduğu bleomisinde de çeşitli yan etkilerle karşılaşılmaktadır.

Bleomisin bazı lenfoma türleri, germ hücreleri, baş boyun kanserleri deri kanserleri, baş boyun kanserleri, uterus kanseri, serviks kanseri, hodgkin hastalığı, retikülosarkom, lenfosarkom, embriyonel hücreli koriokarsinom ve teratokarsinomun tedavisinde kullanılır. Bleomisinin en çok karşılaşılan yan etkisi pulmoner fibrozistir. BLM, bleomisin-demir kompleksi oluşturarak moleküler oksijeni, süperoksit ve hidroksil radikallerine dönüştürür. Bu da DNA’da iplikcik kırılmalarına ve DNA-RNA-protein sentezinde (transkripsiyon ve translasyon basamakları) hasara sebep olarak anti-neoplastik etki gösterir. Bleomisini inaktive eden hidrolaz enziminin akciğer dokusunda diğer dokulara oranla çok düşük düzeyde bulunmasından dolayı yan etki olarak özellikle akciğerlerde yaygın fibrozis ve interstisyel pnömoni oluşturur ve BLM kullanılan hastalarda akciğer hasarı gelişme oranı %3-40 oranında değişmektedir [56]. Bu durumda gelişen akciğer fibrozisinde serbest oksijen radikallerinin önemli faktörlerden biri olduğu iddia edilmektedir. Bu aktive olmuş oksijen türleri DNA kırıklarının yanı sıra ilave olarak lipid peroksidasyonuna da sebep olduğu gösterilmiştir [55].

Dünyada ve ülkemizde özellikle kanser hastalarının hastalığı yenmek veya kemoterapinin yan etkilerini azaltmak amacıyla denediği bir çok alternative tıp ürünü bitkisel materyaller mevcuttur. Bunların içerisinde de en sık başvurulana ise bazı etkilere sahip bitkilerin kullanılmasıdır. Ülkemizde sıklıkla kullanılan adaçayı, kekik, ısırgan otu, ıhlamur vb. bitkilerin kullanıldığı tesbit edilmiştir [111].

Bizim çalışmamızda da bleomisinin neden olduğu oksidatif strese karşı hücre

hasarını önlemesi amacıyla piceatannol (PC) kullanılmıştır.

Piceatannol (PC), ravent, dutgiller, fıstık, şeker pancarı, şarap, beyaz çay ve kırmızı üzüm gibi birçok bitkide doğal olarak bulunan bir polifenol'dür. Bitkilerde fungal enfeksiyonu ve diğer çevresel stres faktörlerinin etkilerini önlemek amacıyla sentezlenmektedir. Memeli sistemlerde ise, antioksidan, antiinflamatuvar, antikarsinojenik, antimetastatik, antiproliferatif ve antimutajenik etkiler göstermektedir [5,96,97]. Antikanser özellikleri sıklıkla çalışılmış doğal bir stilben bileşiği olan resveratrol'ün 3' pozisyonunda ilave bir fenolik gruba sahip olan analogudur. Yapısındaki farklılık nedeniyle, piceatannol, serbest radikallerle daha kolay etkileşime girebilmekte ve daha kararlı reaksiyon ürünleri oluşturmaktadır. Piceatannol'ün süperoksit radikalini ($O_2^{\cdot-}$) temizlemek için kullanılması gereken konsantrasyonu resveratrol ile karşılaştırıldığında daha düşüktür. Bununla birlikte, piceatannolün, lipid peroksil radikali ($LOO^{\cdot}$) için de resveratrol'den çok daha güçlü bir süpürücü olduğu bilinmektedir [5,97]. Ancak piceatannolün etkileri ve resveratrol'e göre etkinliği nisbeten yeni elde edilmiş bulgular olduğundan, piceatannol resveratrol ile karşılaştırıldığında çok daha az çalışmaya konu olmuş bir moleküldür [5,6].

PC'ün antioksidan özelliklerine dair yapılmış çeşitli çalışmalarda $O_2^{\cdot-}$ radikalini ve $LOO^{\cdot}$ radikalini süpürücü etkilerinin resveratrole göre çok daha etkili olduğu belirtilmiştir [98]. Hücre kültürü'nde yapılan çalışmalar, PC'ün moleküler ortho-dihydroxy yapısının ve katekol grubunun, lösemi hücrelerinde hidroksil radikale bağlı DNA hasarını önlediğini göstermiştir [91]. *Salmonella* TA 102 test suşu ile yapılan antimutajenite çalışmalarında PC'ün orta seviyede bir antimutajenik etki gösterdiği belirtilmiştir [92]. PC'ün, deri, prostat, pankreas ve meme kanseri hücrelerinde proapoptotik etkileri gösterilmiş olsada, anti-apoptotik aktivitesine dair bulgular da mevcuttur.

Sıçan sinir hücrelerinde deneysel olarak oluşturulan Alzheimer modelinde hücre içi ROS birikiminden kaynaklanan apoptoz indüksiyonu, PC uygulaması ile azaltılmıştır [83]. Kültürdeki sinir hücreleri üzerinde yapılan bir başka çalışma, hidrojen peroksit ve peroksinitrit toksisitesinin indüklediği apoptozun PC uygulaması ile önlenileceği rapor edilmiştir [83,97]. PC büyük ölçüde karaciğerde metabolize olmakta ve bir glukuronid konjugat'a dönüşmektedir.

Bununla birlikte molekülün sülfatlandığına dair bulgular da mevcuttur [90].

Çalışmamızda BLM'nin oluşturduğu oksidatif strese karşı picetannolun koruyucu etkisi akciğer dokusunda antioksidan enzim düzeylerindeki değişiklikler ve lipid peroksidasyonu seviyeleri ölçülerek incelenmiştir.

Deneyssel çalışmalar sonunda BLM ile indüklenmiş sıçanlarda kontrole göre kıyaslandığında SOD, GPx ve CAT enzim aktivitelerinde anlamlı bir düşüş gözlenmiş, lipid peroksidasyon seviyesinde ise anlamlı artış gözlenmiştir.

BLM+PC verilmiş sıçanlar, BLM ile indüklenmiş sıçanlar karşılaştırıldığında ise enzim aktivitelerinde anlamlı olarak yükselme görülmüş ve lipid seviyelerinde ise BLM'ye göre anlamlı düşüş göstermiştir.

Süperoksit dismutaz enzimi aerobik tüm hücrelerde bulunur. Hem sitozol, hem de mitokondrilerde bulunan bu enzim superoksit radikallerini, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürerek ortadan kaldırır. Hidrojen peroksit ise, kendi başına hücreler üzerinde toksik etkilere sahiptir, çünkü hidrojen peroksit hücrelerle inkübe edildiğinde deoksiribonükleik asit (DNA) harabiyeti, membran yıkımı ve hücre içinde kalsiyuma bağımlı proteaz ve nükleazların aktivasyonuna yol açan kalsiyum iyon salınımına neden olur. Bu harabiyetin bir kısmı hidrojen peroksit ile superoksit radikali arasında demir yada bakır iyonları varlığında gelişen bir reaksiyon sonucu açığa çıkabilir [102].

Söz konusu reaksiyonun ürünlerinden biri ise oldukça yüksek reaktiviteye sahip radikallerden hidroksil radikalidir (OH). Gerek hidrojen peroksidin ortadan kaldırılmasında gerekse hidroksil radikali oluşumunun indirekt olarak önlenmesinde katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri rol oynar. Bu nedenle süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz ile birlikte insan organizmasında hücre içinde oluşan reaktif oksijen metabolitlerinin değişime uğramasını sağlayarak hücre dışına atar, yani antioksidan savunmanın ilk basamağını oluşturur [99].

Antioksidan savunmanın oluşturulmasında superoksit dismutazın dışındaki iki enzimden glutatyon peroksidazın önemi, katalazın öneminden daha büyük olabilir, çünkü bu enzim de superoksit dismutaz gibi, aynı subsellüler kompartımanlarda, yani sitozol ve mitokondriada yer almaktadır. Glutatyon peroksidaz, redükte glutatyonun, okside glutatyonla dönüştüğü reaksiyonda

hidrojen peroksiti kullanır ve böylece hücre içinde hidrojen peroksit birikimine engel olur [99,100].

Çalışmamızda BLM ile indüklenmiş sıçanlarda superoksit dismutaz enzimi kontrole göre %43 oranında anlamlı bir azalma görülmüştür[104]. Chrysinin bleomisin ile indüklenmiş pulmoner fibrosisi koruyucu etkisini incelediklerinde benzer sonuçlar elde etmişler ve onlarda da SOD enzimi anlamlı bir düşüş göstermiştir. Bu sonuç bleomisin ile yapılmış diğer çalışmalarda da aynı çıkmıştır [99,101]. SOD enzim aktivitesindeki bu azalmanın Cu-Zn SOD'ın bir metalloenzim olması ve SOD enziminin kofaktörleri olan Zn ve Cu iyonlarının serbest radikallerle bağ yapması ve enzim aktivitesini inhibe etmesinden kaynaklanmaktadır [55]. Yine bu azalmanın sebebi, BLM' nin direkt olarak enzimlerin protein yapılarının üzerine etkisi sonucu veya indirekt bazı mekanizmaları harekete geçirmesi ile meydana gelmiş olabilir. Örneğin BLM akciğer dokusunda aşırı düzeyde birikerek ROS üretimini arttırdığında, bu antioksidan enzimler bu oksidatif stresi giderebilmek için aşırı bir aktivite gösterip sonunda yıkılmış olabilirler [59].

Glutasyon, peroksit radikaline elektron transfer etmek yoluyla lipidleri peroksidasyona karşı korumaktadır. GSH, kendi başına hücrede bir antioksidan savunma mekanizması oluşturmanın yanı sıra, GPx enziminin de substratı olarak görev yapmaktadır. Çalışmamızda BLM uygulanan sıçanlarda GPx aktivitesi anlamlı olarak ve önemli düzeyde (% 68) azalmıştır. GPx, redükte glutasyonun, okside glutatyona dönüştüğü reaksiyonda hidrojen peroksiti kullanır ve böylece hücre içinde hidrojen peroksit birikimine engel olur. Hücre içi bir antioksidan olan glutasyon, çok önemli bir antioksidan olmasının yanında ksenobiyotiklerin zehirsizleştirilmesinde de görev alan bir maddedir.

Glutasyon ve glutasyon peroksidazın yeterli aktivitelere sahip olmaları durumunda, bu hücrelerin ksenobiyotiklere ve oluşabilecek olası serbest radikallere karşı dirençleri artmaktadır. Eğer hücre içi aktivasyonlarında bir zayıflık var ise, hücre membranlarındaki poliansature yağ asitleri, serbest yağ asitleri tarafından daha kolay oksitlenip patolojik değişmelere maruz kalabileceklerdir. Glutasyon antioksidan aktivitesini ortamdaki mevcut serbest radikallerle birleşip hücrenin oksidatif hasarını engelleyerek gösterirken diğer

tarafından ise proteinlerdeki sülfidril gruplarını redükte halde tutarak, protein ve enzimlerde oluşabilecek inaktivasyonu engelleyerek göstermektedir. Ancak GSH düzeyindeki azalma da başlı başına GSH-Px aktivitesindeki azalmanın sebeplerinden biri olabilir [70,72].

Sonuç olarak BLM hem aktif merkezde bulunan sisteini etkileyerek, hem de toplam GSH seviyesini azaltarak GSH-Px enziminin aktivitesini baskılamaktadır. Piceatannol uygulanmış BLM gruplarında ise GPx seviyesi, BLM grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir. Bu da Piceatannolun serbest radikal toplayıcısı olduğunu ortaya koymuştur. Piceatannol ile yapılmış çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. PC'nin antioksidan özelliklerine dair yapılmış çeşitli çalışmalarda $O_2^{\cdot-}$ radikalini ve $LOO^{\cdot}$ radikalini süpürücü etkilerinin resveratrole göre çok daha etkili olduğu belirtilmiştir [98].

Katalaz enzimi hücrede oluşan hidrojen peroksiti su ve oksijene dönüştürerek zararsız hale getiren bir antioksidan enzimdir. SOD enzimi hücrede oluşan süperoksit radikalini hidrojen peroksite dönüştürür. Çalışmamızda BLM verilen grupta kontrole göre %45 lik bir azalma göstermiştir. Katalaz enzimi yapısında bulunan demir iyonları fenton reaksiyonu ile hidrojen peroksitin ayrışmasını başlatır. Ancak bu işlemi yapmak için de electron vericisi olarak GSH'ı kullanır. Ortamdaki GSH'ın azalması Katalaz enziminin aktivitesini azaltmaktadır. Ortama bir antioksidan molekül eklendiğinde ise oksidan temizleyici olarak görev yapacak ve GSH düzeyi azalmayacaktır ve katalaz aktivitesinde de düşme gözlenmeyecektir. Bu çalışmamızda da antioksidan olarak piceatannol kullanılmıştır. Deney sonuçları göstermiştir ki PC+BLM grubunda BLM grubuna göre katalaz enzim aktivitesi bakımından anlamlı artış olmuştur. Benzer sonuçlar bleomisin ile beraber denenmiş bir antioksidan olan dexpanthenolde de gözlenmiştir [101].

Serbest oksijen radikallerinin hücre ve dokularda yol açtığı hasarlardan başlıcası lipid peroksidasyonudur ve bunun sonucunda hücre zarının yapısı ve fonksiyonu değişir. Lipid peroksidasyonu, lipid peroksitlerin aktif aldehid ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile sona erer. MDA, alkoller, etan, pentan, 4-hidroksinonetal oluşan son ürünlerden bazılarıdır [103].

Bu yüzden MDA lipid peroksidasyonunun indirekt göstergesi olarak

kullanılmaktadır. MDA doymamış yağ asitlerinin oksidatif olarak parçalanması (peroksidasyonu) sonucu ortaya çıkan bir lipid ürünüdür. Yüksek olarak bulunması o ortamda lipid peroksidasyonu olduğunu gösterir. Hücre membranı ve organel membranlarında akışkanlığı sağlayan oldukça fazla miktarda fosfolipid, dolayısı ile bunun yapısında yer alan doymamış yağ asitleri mevcuttur. Oksidan-antioksidan dengesinin bozulması ile detoksifiye edilemeyen ROS ilk olarak membran lipidlerini okside etmekte ve başta hücrenin bütünlüğü olmak üzere bütün hücresel fonksiyonları direkt veya indirekt olarak etkilemektedir [102]. İnflamasyonu başlattığı düşünülen ROS, BLM-Fe(II) kompleksinin oksidasyonu sonrası BLM tarafından üretilirler. Demir eksikliği; BLM'nin indüklediği akciğer hasarı ve lipid peroksidasyonunu, demirin katalize ettiği oksijen radikallerinin sunumu ilk hasar cevabına neden olabilir. İnflamatuvar hücrelerin aktivasyonu oksidatif strese neden olabilir [105]. Birçok ciddi hastalık patogeneğinde lipid oksidasyonu veya peroksidasyonu sorumlu basamak olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu vücutta doğal olarak çok küçük miktarlarda gelişir ve ana olarak çeşitli reaktif oksijen türlerinin etkisiyle gerçekleşir. Aynı zamanda çeşitli fagositlerin aksiyonu yoluyla da oluşabilir. Bu reaktif oksijen türleri hızlı bir şekilde yağ asidi membranlardaki çoklu doymamış yağ asitlerine saldırır ve kendini yok eden bir zincir reaksiyonunu başlatır. Membran lipidlerinin hasarı ve lipid peroksidasyon reaksiyonlarının bu son ürünleri hücrelerin hatta dokuların hayatiyeti için oldukça tehlikelidir [105, 106].

Sayman ve ark'ları tavşanlarda hidroklorik asidin i.t uygulanmasıyla oluşturdukları akut akciğer hasarında MDA düzeyinin anlamlı derecede yükseldiğini göstermişlerdir. Özaras ve ark'ları astım'lı hastalarda lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeylerinin belirgin yüksek olduğunu ve tedavi sonrası MDA düzeylerinin tedavi öncesine göre belirgin olarak düştüğünü bildirmişlerdir [108]. Meyancı ve ark'ları i.t. hidroklorik asidin tavşanlara verilmesiyle lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyini anlamlı düzeyde arttırdığını göstermişlerdir [107,108].

Malondialdehit lipid peroksidasyonu sonucunda açığa çıkan mutajenik ve karsinojenik bir bileşiktir. Yaygın olarak kullanılan tiobarbitürik asit metodu (TBARS) ile dokudaki serbest MDA ölçülebilmektedir. MDA ölçümünde yüksek

performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) de kullanılmakla birlikte, Ohkawa ve Ohishi (1979)'nin TBARS yöntemi ile HPLC metodlarının karşılaştırıldığı Durfinova ve ark. (2007)'nin çalışmalarında, MDA düzeyini ölçmede bu iki yöntem arasında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. PUFA'nın peroksidatif olarak yıkımı membranın yapısı ve çeşitli membran parametrelerini değiştirdiği gibi, membrana bağımlı pek çok enziminde aktivitesini etkilemektedir [109].

Çalışmamızda BLM ile indüklenen grup kontrol ile karşılaştırıldığında %52 oranında artış gözlenmiştir. Serbest radikal düzeyinin hücrenin antioksidan kapasitesini aştığı durumlarda membrane lipidlerinde peroksidasyon meydana gelmektedir [110]. Piceatannol uygulanmış olan bleomisin grubunda MDA düzeyi BLM grubuna göre anlamlı düzeyde azalma görülmüştür. Bu piceatannolun serbest radikal temizleyicisi olarak görev yaptığını ortaya koymuştur.

Yapılan çalışmada sıçanlara uygulanan bleomisinin bildirilen komplikasyonları ortaya koyulmuş ve piceatannolun bleomisin ile indüklenmiş sıçanlarda antioksidan enzim düzeylerini kontrol seviyesine getirdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada piceatannolun pulmonar fibroziste koruyucu görev yaptığı ortaya koyulmuş ve bir serbest radikal temizleyicisi olduğu gösterilmiştir.

KAYNAKÇA

- [1] Deby C., Pincemail J., "Oxygen toxicity, free radicals and defense mechanisms. In: Rökkan (Ginkgo Biloba)." (Ed: Fünfgeld EW.), Springer-Verlag, Berlin pp:57-70, 1988.
- [2] Murray RK. et al. "Harper's Biochemistry" 13:110-5, 23 th ed. Appleton and Lange, Q, 1990.
- [3] Akkuş İ., *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri.*, s. 3-10, 1. Baskı, Mimoza Yayınları, Konya, 1995
- [4] Cheeseman KH., Slater TF., "An introduction to free radical biochemistry." Br Med Bull. 49(3):481-93, Review, 1993.
- [5] Kwon G.T., Jung J.I., Song H.R., Woo E.Y., Jun J.G., Kim J.K., Her S., Park J.H., "Piceatannol inhibits migration and invasion of prostate cancer cells, possible mediation by decreased interleukin-6 signaling." Journal of Nutritional Biochemistry, 23: 228-238, 2012.
- [6] Frombaum M., Therond P., Djeldi R., BeauDeux J.J., Bonnefont-Rousselot D., Borderie D., "Piceatannol is more effective than resveratrol in restoring endothelial cell dimethylarginine dimethylaminohydrolase expression and activity after high-glucose oxidative stress." Free Radical Research, 45:293-302, 2011.
- [7] Janssen YMW, Houten BV, Borm PJA, Mossman BT., "Biology of disease, cell and tissue responses to oxidative damage," Lab. Invest., 69: 261-274, 1993.
- [8] Özdem SS, Sadan G, "Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve klinik açıdan önemi." Akdeniz Ü. Tıp Fak. Derg., 11: 63-71, 1994.
- [9] Sinclair AJ, Barnett AH, Junec J, "Free radicals and antioxidant systems in health and disease." British J. Hosp. Med., 43: 334-344, 1990.
- [10] Yagi K, "Lipid peroxidase and related radicals in clinical medicine. (in) Free Radicals in Diagnostic Medicine." D Armstrong (Editor), pp. 17-27, Plenum Press, New York, 1994.
- [11] Abdollahi M, Bahreini-Moghadam A, Emmami B, Fooladian F, Zafarier K, "Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced

oxidative stress in rat submandibular saliva,” *Comp. Biochem. Physiol. C*, 135: 331-336, 2013.

- [12] Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A, “Pesticides and oxidative stress” *Med. Sci. Monit.*, 10: 141-147, 1991.
- [13] Cochran CG, “Cellular injury by oxidants.” *Am. J. Med.*, 92: 235-305, 1991.
- [14] Grisham MB, McCord JM. “Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen Metabolites,” (Ed: Taylor AE, Malton S, Ward PA. American Physiology Society,) Bethesda, Maryland, USA, pp: 1-18, 1986.
- [15] McCord J.M. “Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance.” *Clin. Biochem.*, 26(5): 351-357, 1993.
- [16] Berger M.M. “Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clinical Nutrition*,” 24: 172-183, 2005.
- [17] Halliwell B. “Drug antioxidant effects. *Drugs*”, 42(4): 569-605, 1991.
- [18] McCord J. “Human disease, free radicals and the oxidant /antioxidant balance.” *Clin Biochem*; 26: 351-357, 1993.
- [19] Henderson W., “The role of leukotrienes in inflammation.” *Ann Intern Med*; 121:684-697, 1994.
- [20] Natanson C., “Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis.” *Ann Intern Med*; 120(9): 771-778, 1994.
- [21] Saran M, Michel C, Bors W., “Reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res*; 10: 221-226, 1990.
- [22] Grozdanovic Z, Briining G, Baumgarten H. “Nitric Oxide: A novel autonomic neurotransmitter.” *Acta Anat*; 150: 16-24, 1994.
- [23] Dawn BM, Allan DM, Colleen MS. “*Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach*. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore,” Maryland, 1996.
- [24] Burtis CA, Ashwood ER. “*Tietz Textbook of Clinical Chemistry*.” W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania., 1999.
- [25] Williams, R.J., Spencer, J.P.E., Rice-Evans, C., “Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules,” *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 838-849, 2004.
- [26] Heim, K.E., Tagliaferro, R., Bobilya, D.J., “Flavonoid antioxidants, Chemistry, metabolism and structure-activity relationships,” *The Journal of*

Nutritional Biochemistry, 13, 572-584, 2002.

- [27] Keskin, H., Erkmen G., *Besin Kimyası*, Güryay Matbaacılık, Beşinci basım, İstanbul, 1987.
- [28] Tomasi, A., *Free Radicals, Nitric Oxide and Inflammation. Molecular, Biochemical and Clinical Aspects.*, IOS Press, Amsterdam, Hollanda, 2003.
- [29] Cheeseman, K.H., *Mechanism and effects of lipid peroxidation, Molecular Aspects Med.*, 14: 191-197, 1993.
- [30] Bottje, W., Enkvetchakul, B. and Wideman, R.F., *Antioxidants, hypoxia and lipid peroxidation involvement in pulmonary hypertension syndrom (Ascites)*, Nutrition Update, August: 35-45 s., 1995.
- [31] Girotti, A.W., *Lipid hydroperoxide generation turnover and effector action in biological systems*, Journal of Lipid Research, 39: 1529-1542 s., 1998.
- [32] Mates, J.M., Gomez, C., and De Castro, I.N., *Antioxidant enzymes and human diseases*, Clinical Biochemistry, 32 (8): 595-603 s., 1998.
- [33] Halliwell, B., *Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human*, The American Journal of Medicine, 91: 14-22 s., 1991.
- [34] Plaa, G.L. ve Hewitt, W.R., *Toxicology of the Liver*, Taylor and Francis, Washington, A.B.D, 1998.
- [35] Aldırmaz, N., *Kurşun asetatin bir decapoda türü olan Palaemonetes turcorum'un hepatopankreatik seka hücreleri üzerindeki ince yapı değişiklikleri*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2004.
- [36] Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York, A.B.D, 2007.
- [37] Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L., "The liver and biliary tract.", *Robbins Basic Pathology*, Elsevier Saunders, Philadelphia, A.B.D., 592-633, 2003.
- [38] Haschek, W.M., Rousseaux, C.G., *Fundamentals of Toxicologic Pathology*, Academic Press, Londra, B.K, 1998.
- [39] Damjanow, I., *Histopathology, A color Atlas and Textbook*, Williams and Wilkins Maryland, A.B.D, 1996.

- [40] Onat, T. ve Emerk, K., Temel Biyokimya I, Saray Medikal Yayıncılık, 1997.
- [41] Yüksel M, Kalaycı G N, *Parapnömonik ampiyem, Göğüs cerrahi kitabı*, İstanbul, Bil medya grup, 381–396, 2001
- [42] Sharp, P.F., Gemmell, H.G., Murray, A.D., Practical Nuclear Medicine, 179-204. Yayınlayan: Birkhauser, 2005.
- [43] Zitnik RJ.: Drug-induced lung disease: cancer chemotherapy agents. J Respir Dis., 16: 855-865, 1995.
44. Cunningham ML, Ringrose PS, Lokesh BR.: İnhibition of the genotoxicity of bleomycin by superoxide dismutase. Mutat Res 1984; 135: 199-202.
- [45] S. Powell, T.J. McMillan, DNA damage and repair following treatment with ionising radiation, Radiother. Oncol. 19, 95–108, 1990.
- [46] L.F. Povirk, M.J.F. Austin, Genotoxicity of bleomycin, Mutation Res. 257, 127–143, 1991
- [47] Antje Moeller, Kjetil Ask, David Warburton, Jack Gaulde, Martin Kolb. The Bleomycin Animal Model: A Useful tool to Investigate Treatment Options For Idiopathic Pulmonary Fibrosis. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 40, 362-382, 2008.
- [48] Jung-Yoon Choe, Hyun-Joo Jung, Ki-Yeun Park, Yoon-Seup Kum, Gwan Gyu Song, Dae-Sung Hyun, Sung-Hoon Park, Seong-Kyu Kim., “Anti-fibrotic effect of Thalidomide Through İnhibiting TGF- β –induced ERK 1/2 Pathways in Bleomycin-İnduced Lung Fibrosis İn Mice . İnflammation,” Research, 59, 177-188, 2010.
- [49] Kayaalp O., *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Kanser Kemoterapisinin Esasları ve Antineoplastik İlaçlar*. Pelikan Yayıncılık, İstanbul, 2009: 317-343.
- [50] Claussen, C. A., and Long, E. C., Nucleic Acid recognition by metal complexes of bleomycin, Chem Rev 99, 2797-2816, 1999.
- [51] Sugiyama, M., Kumagai, T., Hayashida, M., Maruyama, M., and Matoba, Y. The 1.6-Å crystal structure of the copper(II)-bound bleomycin complexed with the bleomycin-binding protein from bleomycin-producing *Streptomyces verticillus*, J Biol Chem 277, 2311-2320, 2002.

- [52] Petering, D. H., Byrnes, R. W., and Antholine, W. E., "The role of redox-active metals in the mechanism of action of bleomycin," *Chem Biol Interact* 73, 133-182, 1990.
- [53] Abraham, A. T., Zhou, X., and Hecht, S. M. "Etallobleomycinmediated cleavage of DNA not involving a threading-intercalation mechanism," *J Am Chem Soc* 123, 5167-5175, 2001.
- [54] Tanoue LT. "Pulmonary toxicity associated with chemotherapeutic agents. In: Fishman AP, ed. *Pulmonary Diseases and Disorders*. 3rd ed." New York, cGrawhill _998; Vol (_): 66: _003-_0_6.
- [55] Galvan L, Huang CH, Prestayko AW, et al. Inhibition of bleomycine-induced DNA breakage by superoxide ismutase. *Cancer Res*, 41: 5103-6, 1981.
- [56] Erden Ş. Ve ark., Ratlarda bleomisin ile oluşturulan akciğer fibrozisinde erdosteinin inflamasyon ve fibrozis üzerine etkileri, *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 56(2): 127-138, 2008.
- [57] Day, R. M., Suzuki, Y. J., Lum, J. M., White, A. C., and Fanburg, B. L., "Bleomycin upregulates expression of gamma-glutamylcysteine synthetase in pulmonary artery endothelial cells," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 282, L1349-1357, 2002.
- [58] Sausville, E. A., Stein, R. W., Peisach, J., and Horwitz, S. B., "Properties and products of the degradation of DNA by bleomycin and iron(II)," *Biochemistry* 17, 2746-2754, 1978.
- [59] Söğüt, S., Songur, A., Yılmaz, Y., and Özyurt, H., "İntratrakeal Bleomisin uygulanmış sıçan akciğer dokusunda metabolik enzim aktiviteleri üzerine E vitamini ve erdosisteinin etkisi," *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2, 13-18, 2004.
- [60] Sugiyama, M., Kumagai, T., Hayashida, M., Maruyama, M., and Matoba, Y. The 1.6-Å crystal structure of the copper(II)-bound bleomycincomplexed with the bleomycin-binding protein from bleomycin producing *Streptomyces verticillus*, *J Biol Chem* 277, 2311-2320, 2002.
- [61] Chen, J., and Stubbe, J. "Bleomycins: new methods will allow reinvestigation of old issues," *Curr Opin Chem Biol* 8, 175-181, 2004.
- [62] Chen, H. J., Wu, S. B., and Chang, C. M. (2003) Biological and dietary antioxidants protect against DNA nitration induced by reaction of

hypochlorous acid with nitrite, *Arch Biochem Biophys* 415, 109-116, 2003.

- [63] Cao, G., Prior, R.L., *In vivo* antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods, *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 1173-1181, 1999.
- [64] Goran Bjelakovic et al, Mortality in Randomized Trials of Antioxidant Supplements for Primary and Secondary Prevention Systematic Review and Meta-analysis, *JAMA*, February 28,—Vol 297, No. 8 847-857, 2007.
- [65] Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Kumar, M.N.V.R “Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective,” *Journal of Controlled Release*, 113, 189-207, 2006.
- [66] Shahidi, F., *Natural antioxidants, chemistry, health effects and applications*, AOCS Press, Champaign, Illinois, 0-935315-77-2, 1996.
- [67] Halliwell, B., *Food-derived antioxidants: How to evaluate their importance in food and in vivo, handbook of antioxidants*, Los Angeles, 2001.
- [68] Helle, R.A., Jesper, B.N., Fleming, N., Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes, *Clinical Chemistry*, 43, 562-568, 1997.
- [69] Whitaker, J. R., *Handbook of Food Enzymology*. Marcel Dekker incorporated, New York, A.B.D, 2002.
- [70] Hissin, P.J., Hilf, R., “A fluorometric Method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues” *Analytical Biochemistry*, 74, 214-226, 1976.
- [71] Sheng, L., Zheng, X., Tong, H., Liu, S., Du, J., Liu, Q., “Purification and characterization of cytosolic isoenzyme III of Cu, Zn-superoxide dismutase from tobacco leaves,” *Plant Science*, 167, 1235-1241, 2004.
- [72] Ulakoğlu, Z.E.M., GümüGtaG, K.M., Belce, A., Altuğ, T., Kökoğlu, E., “Strese bağlı mide mukozası hasarında endojen glutatyon tükenişinin enerji metabolizması ile ilişkisi,” *Cerrahpaşa C. Med.*, 29, 127-131, 1998.
- [73] Pompella, A., *Thiol Metabolism and Redox Regulation of Cellular Functions*. IOS Press, Amsterdam, Hollanda, 2002
- [74] Ribarič S. “Diet and ageing. Oxid Med Cell Longev.”, Epub, 2012.
- [75] Raffoul JJ, Heydari AR, Hillman GG., “DNA Repair and Cancer Therapy:

- Targeting APE1/Ref-1 Using Dietary Agents,” *J Oncol.*, 370481. Epub, 2012.
- [76] Thomasset SC, Berry DP, Garcea G, Marczylo T, Steward WP, Gescher AJ. Dietary polyphenolic phytochemicals—promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties. *Int J Cancer.* 120(3):451-8, 2007.
- [77] Kelley MR, Fishel ML. “DNA repair proteins as molecular targets for cancer therapeutics. *Anticancer Agents Med Chem.*,” 8(4):417-25, 2008.
- [78] Landete JM. “Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability metabolism, and health. *Crit Rev Food Sci Nutr.*,” 52(10):936- 48, 2012.
- [79] Mak JC. “Potential role of green tea catechins in various disease therapies: progress and promise,” *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 39(3):265-73, 2012.
- [80] Maier-Salamon A, Hagenauer B, Wirth M, Gabor F, Szekeres T, Jäger W. Increased transport of resveratrol across monolayers of the human intestinal Caco-2 cells is mediated by inhibition and saturation of metabolites. *Pharm Res.*,23(9):2107-15, 2006.
- [81] Murias M, Miksits M, Aust S, Spatzenegger M, Thalhammer T, Szekeres T, Jaeger W. Metabolism of resveratrol in breast cancer cell lines: impact of sulfotransferase 1A1 expression on cell growth inhibition. *Cancer Lett.*261(2):172-82, 2008.
- [82] Zern TL, Wood RJ, Greene C, West KL, Liu Y, Aggarwal D, Shachter NS, Fernandez ML. Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. *J Nutr*,135(8):1911-7, 2005
- [83] Athar M, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL. “Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol.*,” 224(3):274-83,2007.
- [84] Chachay VS, Kirkpatrick CM, Hickman IJ, Ferguson M, Prins JB, Martin JH. “Resveratrol--pills to replace a healthy diet? *Br J Clin Pharmacol.*”72(1):27-38, 2011.
- [85] Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer NK. Resveratrol: French paradox revisited. *Front Pharmacol*, 2012.

- [86] Kimura Y., Okuda H., Arichi S., *Biochim. Biophys. Acta*, 834, 275-278, 1985.
- [87] D.H. Kim, T. Ahn, H.C. Jung, J.G. Pan, C.H. Yun, Generation of the human metabolite piceatannol from the anticancer-preventive agent resveratrol by bacterial cytochrome P450 BM3, *Drug Metab. Dispos.* 37, 932–936, 2009.
- [88] M. Miksits, M. Sulyok, R. Schuhmacher, T. Szekeres, W. Jager, In-vitro sulfation of piceatannol by human liver cytosol and recombinant sulfotransferase, *J. Pharm. Pharmacol.* 61, 185–191.a, 2009.
- [89] M. Rossi, F. Caruso, C. Opazo, J. Saliccioli, Crystal and molecular structure of piceatannol; scavenging features of resveratrol and piceatannol on hydroxyl and peroxy radicals and docking with transthyretin, *J. Agric. Food Chem.* 56, 10557–10566, 2008.
- [90] Piotrowska H., Kucinska M., Murias M. Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 750: 60-82, 2012.
- [91] Ovesna, Z., Kozics, K., Bader, Y., Saiko, P., Handler, N., Erker, T., Szekeres, T., Antioxidant activity of resveratrol, piceatannol and 3,30,4,40,5,50-hexahydroxytrans- stilbene in three leukemia cell lines, *Oncol. Rep.*, 16, 617–624, 2006.
- [92] Makena, P.S., Chung, K.T., Effects of various plant polyphenols on bladder carcinogen benzidine-induced mutagenicity, *Food Chem. Toxicol.* 45, 1899– 1909, 2007.
- [93] S. Kim, Y. Kim, Y. Lee, J.H. Chung, Ceramide accelerates ultraviolet-induced MMP-1 expression through JAK1/STAT-1 pathway in cultured human dermal fibroblasts, *J. Lipid Res.* 49, 2571–2581, 2008.
- [94] Y.M. Lee, d.Y. Lim, H.J. Cho, M.R. Seon, J.K. Kim, B.Y. Lee, J.H. Park, “Piceatannol, a natural stilbene from grapes, induces G1 cell cycle arrest in androgen-insensitive DU145 human prostate cancer cells via the inhibition of CDK activity,” *Cancer Lett.* 285, 166–173, 2009.
- [95] *Farmakoloji Ders Kitabı*, T. Arda Bökesoy, İclal Çakıcı, Mehmet Melli (Eds.), *Türk Farmakoloji Deneği*, 2000.

- [96] Ashikawa, K., Majumdar, S., Banerjee, S., Bharti, A.C., Shishodia, S., Aggarwal, B.B., "Piceatannol inhibits TNF-induced NF-kappaB activation and kappaB-mediated gene expression through suppression of IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation, J. Immunol,"169:6490–6497,2002.
- [97] Wolter F, Clausnitzer A, Akoglu B and Stein J: Piceatannol, a natural analog of resveratrol, inhibits progression through the Sphase of the cell cycle in colorectal cancer cell lines. J Nutr 132:298-302, 2002.
- [98] Rhayem, Y., Therond, P., Camont, L., Couturier, M., Beaudeux, J.L., Legrand, A., Jore, D., Gardes-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Chain-breaking activity of resveratrol and piceatannol in a linoleate micellar model, Chem. Phys. Lipids, 155, 48–56,2008.
- [99] Boyacı H., Maral H., Turan G., Başyigit İ., Dillioğlu M.Ö., Yıldız F., Tugay M., Pala A., Erçin C., Effects of Erdosteine on Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Rats. Molecular and Cellular Biochemistry,281:129-137,2008.
- [100] Camont, L., Collin, F., Marchetti, C., Jore, D., Gardes-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., "Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric identification of the oxidation end-products of trans-resveratrol in aqueous solutions, Rapid Commun. Mass Spectrom,"24: 634–642, 2010.
- [101] Ermiş H., Parlakpınar H., Gülbaş G., Vardı N., Polat A., Çetin A., Kılıç T., Aytemur Z.A., "Protective effect of dexpanthenol on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol," 386:1103-1110, 2013.
- [102] Huang, Y.H., Shih, C.H., Huang, C.J., Lin, C.M., Chou, C.M., Tsai, M.L., Liu, T.S., Chiu, J.F., Chen, C.T., "Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu,Zn-SOD and oxidative status in neural cells." *Journal of Cellular Biochemistry* , 98 (3), 577-589, 2006.
- [103] Kılıç T., Çiftçi O., Çetin A. ve Kahraman H. Preventive Effect of Chrysin on Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Rats. Inflammation., 37:6: 2116-2124, 2004.
- [104] Kim, H.J., Lee, K.W., Lee, H.J., "Protective effects of piceatannol against

beta-amyloid-induced neuronal cell death,” *Ann N Y Acad Sci.*, 1095: 473-82, 2007.

- [105] Kimura, Y., New Anticancer Agents: *In Vitro and In Vivo* Evaluation of the Antitumor and Antimetastatic Actions of Various Compounds Isolated from Medicinal Plants. *In Vivo*, 19: 37-60, 2005.
- [106] Sayman S, Meyancı Köksal G, Erdamar S, Uzan S, Öz H. Tavşanlarda Akut Akciğer Hasarında Nedokromil Sodyumun Tedavideki Yerinin Araştırılması, *GKD Anest. Yoğ. Bak. Dern. Derg.*, 9: 52-55, 2003.
- [107] Meyancı G, Arıcıoğlu F, Oz H, Aydemir A. The effects of intratracheal dexamethasone on lipid peroxidation in acute lung injury. *Cerrahpaşa J Med* 32: 20-24, 2001.
- [108] Özaras R, Tahan V, Turkmen S, Talay F, Besirli K, Aydın S, “Changes in malondialdehyde levels in bronchoalveolar fluid and serum by the treatment of asthma with inhaled steroid and beta2-agonist, *Respirology*” 5: 289-292, 2000.
- [109] Marnett L.J., “Lipid peroxidation–DNA damage by malondialdehyde.” *Mutation Research*, 424, 83–95, 1999.
- [110] Bucak MN, Tekin N, Kulaksız R., “Koç spermasının kısa süreli saklanması antioksidanların etkisi,” *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi* 47, 15-21, 2007.
- [111] Hacıseferoğulları H, Gezer İ, Özcan MM, et al. Post harvest chemical and physical–mechanical properties of some apricot varieties cultivated in turkey. *J Food Process Eng*, 79: 364–73, 2007.