

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GABA ANTAGONİSTİ SİPROFLOKSAZİN'İN SİTOTOKSİSİTE VE
OKSİDAN STRES İNDÜKLEYİCİ ETKİLERİ ÜZERİNDE
ÇALIŞMALAR

TC. FARMASÖTİK ENSTİTÜSÜ
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Uzm. Ecz. Aylin GÜRBAY

T. 01566

Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetmeliğinin Farmasötik Toksikoloji Programı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ Olarak Hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Filiz HINCAL
ORTAK DANIŞMAN
Prof. Dr. Alain FAVIER

ANKARA

2000



Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanarak üniversitemizde başlatılmış ve T.C.'nin 2547 sayılı Y.Ö.K. Yasası'na dayalı Yönetmeliklere uygun bir Doktora tezi olarak hazırlanmıştır. Bu tez aynı zamanda, Fransız Yüksek Eğitim Yasalarına dayalı 18.01.1994 tarihli "Fransız ve Yabancı Yüksek Eğitim Kurumları Arasında Yapılacak Bilimsel Araştırmalara İlişkin Yönetmelik" çerçevesinde Hacettepe, Ankara-Türkiye ve Joseph Fourier, Grenoble-Fransa Üniversiteleri Rektörlerinin "Convention de Cotutelle de These" anlaşmasını imzalamalarını takiben, bir "Cotutelle de These-Ortak Denetimli Tez" olarak, söz konusu iki üniversitenin ilgili bölümlerinde (Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı ve Joseph Fourier Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Bölümü Oksidatif Stres Araştırma Laboratuvarlarında) hazırlanarak tamamlanmıştır.

Söz konusu üniversitelerarası anlaşma, gerekli koşulların yerine getirilmesini takiben, Hacettepe Üniversitesi ile birlikte Joseph Fourier Üniversitesince onaylanan bir "Doktora" unvanının verilmesini öngörmektedir.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Farmasötik Toksikoloji Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı


: Prof. Dr. Filiz Hıncal
(Hacettepe Üniversitesi)

Ortak Danışman


: Prof. Dr. Alain Favier
(Joseph Fourier Üniversitesi)

Üye


: Prof. Dr. Luc Barret
(Joseph Fourier Üniversitesi)

Üye


: Prof. Dr. Gönül Şahin
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye


: Prof. Dr. Nevin Vural
(Ankara Üniversitesi)

ONAY

:

Bu tez Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Yönetim Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. N. Sezgin İlgi
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında beni destekleyen ve değerli yardımlarını esirgemeyen danışman hocam *Sayın Prof. Dr. Filiz Hıncal'a*,

Tez çalışmalarımın pratik kısmını gerçekleştirdiğim Grenoble Joseph Fourier Üniversitesi'ne gitmek için bana maddi destek sağlayan *TÜBİTAK Bilim Adamı Yetiştirme Grubuna ve Fransız Hükümeti'ne*,

Fransa'daki çalışmalarımı gerçekleştirebilmek için beni laboratuvarına kabul eden, gerekli tüm olanakları sağlayan, değerli deneyim ve desteklerini esirgemeyen *Sayın Prof. Dr. Alain Favier'e*,

Fransa'da bulunduğum süre boyunca bana yakın ilgi gösteren ve destek olan *Sayın Arlette Alcaraz'a*,

Biyokimya Laboratuvarındaki çalışmalarım süresince gerekli bazı teknikleri öğrenmem sırasında bilimsel veya teknik yönden bana verdikleri destekten dolayı *Sayın Marie-Jeanne Richard'a, Anne-Marie Monjo'ya, Angel Krawiec'e ve tüm çalışma arkadaşlarıma*,

Araştırmalarım sırasında laboratuvarında bana çalışma olanağı sağlayan *Sayın Prof. Dr. Luc Barret'e*

ve bana çalışmalarım sırasında yakın ilgi gösteren ve destek olan başta *Sayın Brigitte Gonthier* olmak üzere *Hélène Eysseric'e, Arian Soubeyran'a ve Toksikoloji Laboratuvarı'nın tüm çalışanlarına*,

Bana laboratuvarında çalışma olanağı sağlayan, bilimsel ve teknik yönden büyük destek olan *Sayın Denis Daveloose'a*,

Ayrıca aynı laboratuvarında LC/MS tekniğinin uygulanması sırasında desteklerini esirgemeyen *Sayın Bernard Brasme'a ve Askeri Sağlık ve Araştırma Merkezi Biyofizik Laboratuvarı'nın tüm çalışanlarına*,

Tez çalışmalarım sırasında sağladığı değerli destekler için *Sayın Prof. Dr. A. Atilla Hıncal'a*,

Sağladıkları değerli desteklerden dolayı *Sayın Prof. Dr. Sevim Dalkara'ya, Sayın Doç Dr. Bekir Salih'e ve Sayın Prof. Dr. Mustafa Korkmaz'a*,

Anabilim Dalı Başkanımız *Sayın Prof. Dr. Gönül Şahin* başta olmak üzere tüm *Anabilim Dalı öğretim üyelerimize*

ve bana destek olan *Sayın Gözde Girgin, Hande Gürer, Belma Giray, Ayşe Başak Engin ve Hilmi Orhan* başta olmak *araştırma görevlisi arkadaşlarıma*, ayrıca *idari personelimize* gösterdikleri yakın ilgiden dolayı teşekkür ederim.

Hacettepe ve Joseph Fourier Üniversiteleri arasındaki anlaşma gereği her iki üniversite tarafından onaylanan bir doktora derecesine sahip olma olanağını bana sağlayan her iki üniversitenin ilgili *kurul ve şahıslarına* teşekkür ve şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Tüm yaşamım boyunca olduğu gibi tez çalışmalarım süresince de beni her yönden destekleyen ve yalnız bırakmayan *sevgili anneme ve kardeşime* tüm kalbimle teşekkür ederim.

ÖZET

Gürbay, A., GABA antagonisti Siprofloksazin'in sitotoksikite ve oksidan stres indükleyici etkileri üzerinde çalışmalar, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2000. Bu çalışmada, SSS'ndeki zıt etkileri GABA antagonistik aktivitesi ile izah edilegelen fluorokinolon grubu antibiyotik siprofloksazin (CPR)'in oksidatif stres ve lipit peroksidasyonu indüklemeye potansiyeli ve mekanizmaları *in vitro* koşullarda araştırılmıştır. CPR'in insan normal cilt fibroblast hücresi kültürlerinde ve sıçan primer astrosit hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik olduğu ve lipit peroksidasyonunu indüklediği; hücrelerin E vitamini (α -tokoferol) ile ön inkübasyonunun bu etkileri önlediği gözlenmiştir. CPR'in sıçan beyin ve karaciğer mikrozomlarında da lipit peroksidasyonunu arttırdığı ve total tiyol düzeylerinde önemli kayıplara neden olduğu gösterilmiş; 4-POBN spin tuzağı varlığında 6-çizgili ve $a_N = 15.44$ G, $a_H^{\beta} = 2.86$ G aşırı ince yapı sabiteleriyle karakterize bir ESR spektrumuna sahip bir radikal adduct oluşturduğu saptanmıştır. CPR'in indüklediği radikal oluşumunun doza ve zamana bağımlı olarak arttığı; SKF 525A ve $ZnCl_2$ ile gösterildiği üzere sitokrom P-450 ve NADPH'ya gereksinim gösterdiği ve demir bağımlı olduğu saptanmış; E vitamini ve analogu troloks'un, desferrioksamin ve dietilentriamin pentaasetik asit gibi demir şelatörlerinin radikal oluşumunu önlediği gösterilmiştir. ESR spektrumunun karakteristikleri nedeniyle karbon merkezli ve lipit türevi bir radikal olduğu düşünülen radikal adduct'ının 4-POBN/pentenil radikal adductı olduğu, on-line HPLC-ESI MS analizi ile gösterilmiştir. ESI MS spektrumu ayrıca, 4' N konumunda azot radikali yapısına sahip okso türevi bir CPR metabolitinin karaciğer mikrozomal ortamında oluştuğunu düşündüren bir molekülün varlığına işaret eder niteliktedir. Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen veriler CPR'in hücresel ve mikrozomal düzeyde oksidatif stres indüklediğini ve neden olduğu mikrozomal lipit peroksidasyonunun muhtemelen hem başlatma hem genişleme fazlarında rol aldığını göstermektedir. Bu etki muhtemelen demir şelate edici etkisiyle, dolayısıyla mikrozomal membranlardaki endojen *non-hem* demiri mobilize etmesi ile ilgilidir. Ancak tetikleyici ajan ana molekül olmayıp metabolizasyonla oluşan bir ara üründür.

Anahtar Kelimeler: Siprofloksazin, sitotoksikite, oksidatif stres, karbon merkezli lipit türevi radikal, ESR, HPLC/MS.

Destekleyen Kurumlar: TÜBİTAK-NATO A2, Fransız Hükümeti

SUMMARY

Gürbay, A., Studies on the cytotoxicity and oxidative stress inducing effects of the GABA antagonist Ciprofloxacin, Hacettepe University Health Sciences Institute PhD Thesis in Pharmaceutical Toxicology, Ankara, 2000. In this study, *in vitro* oxidative stress and lipid peroxidation inducing effects of the fluoroquinolone antibiotic, ciprofloxacin (CPR), the adverse effects of which has been attributed to its GABA antagonistic activity were investigated. CPR was found to be cytotoxic at high concentrations and induced significant lipid peroxidation in normal human dermal fibroblast cell cultures, and primary cultures of rat astrocyte cells. Preincubation of both cell cultures with vitamin E (α -tocopherol) provided significant protection against both cytotoxicity and induction of lipid peroxidation. Incubation of rat cerebral or liver microsomes with CPR induced significant level of lipid peroxidation and caused significant loss of total cellular thiols, in addition to the production of radicals as shown by ESR-spin trapping with 4-POBN. The ESR analysis revealed a spectrum of a characteristic six-line and signal corresponding to a carbon-centered 4-POBN/lipid-derived radical ($a_N = 15.44$ G, $a_H^B = 2.86$ G). The ESR signal intensity was dependent on the concentration of CPR and incubation time; radical generation required the presence of CYP450 activity and NADPH as shown with the inhibition caused by SKF 525A and $ZnCl_2$, and seemed to be dependent on iron. chelators such as desferrioxamine and diethylenetriamine pentaacetic acid, and vitamin E and its hydrosoluble analog trolox inhibited the radical production, whereas the addition of iron increased the signal intensity. The on-line HPLC-ESI MS analysis of microsomal incubation mixture showed that the mass spectra contained ions consistent with the trapping of the “pentenyl radical” by 4-POBN. Further analysis of the mass spectra suggested that a 4' N radical form of the oxo metabolite of CPR might have been produced in the microsomal mixture. In conclusion, the data generated in three types of *in vitro* system suggested that CPR acts as an oxidative stress inducer at cellular and microsomal level and seems to involve in both initiation and propagation steps of lipid peroxidation. This effect is possibly related to its iron chelating activity, hence the mobilization of the endogen *non-hem* iron in microsomal membranes. However, a metabolically derived intermediate, not the parent molecule, is the triggering agent.

Key words: Ciprofloxacin, cytotoxicity, oxidative stress, carbon-centered lipid derived radical, ESR, HPLC/MS.

Supported by TÜBİTAK NATOA2, French Government.

İÇİNDEKİLER

	Syf. No:
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	ix
ÇİZELGELER.....	x
GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
1. GENEL BİLGİLER	4
1.1. Fluorokinolon Grubu Antibiyotikler	4
1.1.1. Siprofloksazin	5
1.1.1.1. Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri	5
1.1.1.2. Farmakokinetik Özellikleri	6
1.1.1.2.1. Absorpsiyon	7
1.1.1.2.2. Dağılım	7
1.1.1.2.3. Metabolizma ve İtira	8
1.1.1.3. Etki Mekanizması	13
1.1.1.4. Uygulama Şekli ve Dozu	13
1.1.1.4.1. Böbrek ve Karaciğer Yetmezliği Olan Hastalarda Kullanımı	14
1.1.1.4.2. CPR'in Çocuklarda ve Yaşlılarda Kullanımı	15
1.1.1.5. CPR ve Kinolon Toksisitesi	15
1.1.1.5.1. Kondrotoksisite	15
1.1.1.5.2. Renal Toksisite	17
1.1.1.5.3. Kardiyovasküler Toksisite	17
1.1.1.5.4. SSS Toksisitesi	18
1.1.1.5.5. Üreme Sistemi Toksisitesi ve Gelişimsel Toksisite	19
1.1.1.5.6. Genotoksisite	19
1.1.1.6. CPR'in İnsanda Gözlenen Zıt Etkileri	20
1.1.1.6.1. Gastrointestinal Yan Etkiler	20
1.1.1.6.2. Artropati	20
1.1.1.6.3. Renal Yan Etkiler	22
1.1.1.6.4. İnsanda SSS Zıt Etkileri-Nörotoksisite	22
1.1.1.6.5. Fototoksisite	25
1.1.1.6.6. Hepatotoksisite	27
1.1.1.6.7. İmmün Sistem Üzerindeki Etkileri	27
1.1.1.7. İlaç Etkileşimleri	27
1.2. Oksidatif Stres, Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma	29
1.2.1. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Bileşikleri	29
1.2.1.1. Serbest Radikallerin Endojen Kaynakları	31
1.2.1.2. Serbest Radikallerin Eksojen Kaynakları	32
1.2.1.3. Serbest Radikallerin Reaktiviteleri-Biyolojik Aktiviteleri	33
1.2.1.3.1. Süperoksit Anyonu	33
1.2.1.3.2. Hidrojen Peroksit	34
1.2.1.3.3. Hidroksil Radikali	35
1.2.1.4. Geçiş Metal İyonları ve Serbest Radikal Reaksiyonları	36
1.2.1.5. Serbest Radikal Hasarı-Oksidatif Stresin Sonuçları	38
1.2.1.5.1. Lipid peroksidasyonu	39
1.2.1.5.1.1. Lipid Peroksidasyonunun Sonuçları	41

1.2.2.	Organizmanın Antioksidan Sistemleri	42
1.2.2.1.	Süperoksit Dismutaz	45
1.2.2.1.1.	Süperoksit Dismutazın Biyolojik Önemi	46
1.2.2.2.	Glutasyon Peroksidaz	49
1.2.2.3.	Katalaz	51
1.2.2.4.	Glutasyon	52
1.2.2.4.1.	Glutasyon Redoks Döngüsü	53
1.2.2.4.2.	Glutasyonla Konjugasyon	54
1.2.2.5.	E Vitamini	55
1.2.3.	Oksidatif Stres ve Serbest Radikal Ölçüm Yöntemleri	59
1.2.3.1.	Elektron Spin Rezonans veya Elektron Paramanyetik Rezonans Spektroskopisi	61
1.2.3.1.1.	Hızlı dondurma	62
1.2.3.1.2.	Liyofilizasyon	62
1.2.3.1.3.	Sürekli Akım	62
1.2.3.1.4.	Spin Tuzaklama	62
1.2.3.1.4.1.	Nitrozo Spin Tuzakları	65
1.2.3.1.4.2.	Nitron Spin Tuzakları	66
1.2.3.1.4.2.1.	4-POBN	68
1.2.3.2.	Lipid Peroksidasyonunun Ölçümü	70
1.2.3.3.	Enzimatik ve Nonenzimatik Antioksidan Düzeylerinin Ölçümü	71
1.2.3.3.1.	SOD Enzim Aktivitesinin Tayini	71
1.2.3.3.2.	GSHPx Aktivitesi Tayini	72
1.2.3.3.3.	CAT Aktivitesinin Tayini	73
1.2.3.3.4.	İndirgenmiş ve/veya Okside Glutasyon Düzeylerinin Tayini	73
1.2.3.3.5.	Total Antioksidan Kapasitenin Tayini	74
1.3.	Hücre Kültürleri	75
1.3.1.	Hücre Kültürlerinin Hazırlanışı	76
1.3.2.	Kültür Hücrelerinin Büyümesi	78
1.3.2.1.	Oyalanma Fazı	78
1.3.2.2.	Büyüme Fazı	78
1.3.2.3.	Stasyonier Faz	78
1.3.2.4.	İniş Fazı ve Hücre Ölümü	78
1.3.3.	Hücre Ölümü	79
1.3.4.	Hücre Proliferasyonu ve Sitotoksitenin Ölçümü	80
1.3.4.1.	MTT Testi (Tetrazolyum Testi)	81
1.3.4.2.	Nötral Kırmızı Testi-NR Testi	81
1.3.5.	Fibroblastlar	82
1.3.6.	Astrositler	84
1.4.	Çinko	86
1.5.	SKF 525A	87
1.6.	Desferrioksamin	88
1.7.	Dietilentriamin-pentaasetik asit	89
1.8.	Troloks	89
1.9.	Kütle Spektrometrisi	90
1.9.1.	İyonizasyon ve Fragmentasyon	90
1.9.2.	MS'nin Ana Bileşenleri	92
1.9.3.	İyon Kaynakları	92
1.9.3.1.	Elektron İyonizasyonu	92
1.9.3.2.	Kimyasal İyonizasyon	92
1.9.3.3.	Elektrosprey İyonizasyon	93
1.9.4.	Kütle Spektrumunun Yorumu	94
1.9.5.	Metod Seçimi	95

1.10.	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	95
1.10.1.	Detektörler	96
2.	DENEYSEL KISIM	97
2.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	97
2.2.	Kullanılan Araç ve Gereçler	98
2.3.	Kullanılan Çözelti ve Reaktifler	99
2.3.1.	Fibroblast Hücre Kültürlerinin Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler	99
2.3.2.	Sitotoksiste Testlerinde Kullanılan Çözeltiler	99
2.3.3.	Fibroblast ve Astrosit Kültür Hücrelerinde Lipid Peroksidasyonu ve GSH Düzeyi Tayininde Kullanılan Çözeltiler	100
2.3.4.	Fibroblast ve Astrosit Kültür Hücrelerinde Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Tayininde Kullanılan Çözeltiler	100
2.3.5.	Primer Astrosit Hücre Kültürlerinin Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler	101
2.3.6.	Mikrozomların Hazırlanması ve ESR Tekniği ile Yapılan Ölçümlerde Kullanılan Çözeltiler	102
2.3.7.	Protein Tayinlerinde Kullanılan Çözeltiler	103
2.4.	Hücre Kültürü Çalışmaları	104
2.4.1.	Normal İnsan Dermal Fibroblast Hücre Kültürlerinde Yapılan Çalışmalar	104
2.4.1.1.	CPR'e Maruz Bırakılan Fibroblast Kültürlerinde Hücre Proliferasyonu ve Sitotoksik Etkinin İncelenmesi	104
2.4.1.1.1.	Fibroblast Kültürlerinin CPR ile İnkübasyonu	104
2.4.1.1.2.	Fibroblast Hücrelerinin E Vitamini ile Ön-İnkübasyonu	105
2.4.1.1.3.	Sitotoksiste Ölçümü	105
2.4.1.1.3.1.	NR Testinin Uygulanışı	105
2.4.1.2.	CPR'e Maruz Bırakılan Fibroblast Kültürlerinde Lipid Peroksidasyonu, GSH Düzeyi ve Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	106
2.4.1.2.1.	Lipid Peroksidasyonunun Ölçülmesi	107
2.4.1.2.1.1.	TBARS Ölçüm Yönteminin Uygulanışı	107
2.4.1.2.2.	Total GSH Düzeyinin Ölçülmesi	107
2.4.1.2.2.1.	Total GSH Tayini Yönteminin Uygulanışı	108
2.4.1.2.3.	Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Ölçümü	108
2.4.1.2.3.1.	SOD Aktivitesinin Ölçümü	108
2.4.1.2.3.1.1.	Total SOD Ölçüm Yönteminin Uygulanışı	109
2.4.1.2.3.1.1.1.	SOD Aktivitesinin Hesaplanması	109
2.4.1.2.3.1.2.	Mn SOD Aktivitesi Ölçüm Yönteminin Uygulanışı	110
2.4.1.2.3.1.2.1.	Mn SOD Aktivitesinin Hesaplanması	110
2.4.1.2.3.1.3.	CuZn SOD Aktivitesinin Hesaplanması	111
2.4.1.2.3.2.	GSHPx Aktivitesinin Ölçülmesi	111
2.4.1.2.3.2.1.	GSHPx Aktivitesi Ölçüm Yönteminin Uygulanışı	111
2.4.1.2.3.2.1.1.	GSHPx Aktivitesinin Hesaplanması	111
2.4.1.2.3.3.	CAT Aktivitesinin Ölçülmesi	112
2.4.1.2.3.3.1.	CAT Aktivitesinin Ölçüm Yönteminin Uygulanışı	112
2.4.1.2.3.3.2.	CAT Aktivitesinin Hesaplanması	112
2.4.2.	Primer Astrosit Kültürlerinde Yapılan Çalışmalar	113
2.4.2.1.	Primer Astrosit Hücre Kültürlerinin Hazırlanması	113
2.4.2.2.	CPR'e Maruz Bırakılan Primer Astrosit Kültürlerinde Hücre Proliferasyonu ve Sitotoksitenin Araştırılması	114
2.4.2.2.1.	Primer Astrosit Kültürlerinin E Vitamini ile Ön-İnkübasyonu	115
2.4.2.2.2.	Primer Astrosit Kültürlerinin SOD ile Ön-İnkübasyonu	115

2.4.2.2.3.	Primer Astrosit Kültürlerinin CAT ile Ön-İnkübasyonu	115
2.4.2.2.4.	Primer Astrosit Kültürlerinin 'SOD + CAT' ile Ön-İnkübasyonu	115
2.4.2.2.5.	Sitotoksikite Ölçümü	116
2.4.2.2.5.1.	NR Testinin Uygulanması	116
2.4.2.2.5.2.	MTT Testi	116
2.4.2.2.5.2.1.	MTT Testinin Uygulanması	116
2.4.2.3.	CPR'e Maruz Bırakılan Primer Astrosit Kültürlerinde Lipid Peroksidasyonu ve GSH Düzeyleri ile CAT Aktivitesinin Ölçülmesi ..	117
2.4.2.3.1.	Lipid Peroksidasyonunun Ölçülmesi	117
2.4.2.3.2.	Total GSH Düzeyinin Ölçülmesi	117
2.4.2.3.3.	CAT Aktivitesinin Ölçülmesi	118
2.4.2.	CPR'e Maruz Bırakılan Fibroblast ve Astrosit Hücrelerinde ESR- Spin Tuzağı	118
2.5.	Mikrozomal Çalışmalar	118
2.5.1.	Sıçan Karaciğer ve Beyin Mikrozomlarının Hazırlanması	118
2.5.2.	CPR ile İnkübe Edilen Beyin ve Karaciğer Mikrozomlarında Radikal Oluşumunun ESR Spin Tuzağı Tekniği ile Ölçülmesi	119
2.5.2.1.	Mikrozomal Sistemde CPR ile İnkübasyon ve Radikal Ölçüm Yönteminin Uygulanması	121
2.5.2.2.	ESR Spektrometresinde Ölçüm ve Değerlendirme	122
2.5.2.3.	CPR'in Karaciğer veya Beyin Mikrozomal Ortamlarında Radikal İndükleyici Etkilerinin Enzim İnhibitörleri, Metal Şelatörleri, Demir ve Antioksidanlarla Değiştirilmesi	122
2.5.2.3.1.	SKF 525A	122
2.5.2.3.2.	ZnCl ₂	122
2.5.2.3.3.	E Vitamini	123
2.5.2.3.4.	Troloks	123
2.5.2.3.5.	SOD	123
2.5.2.3.6.	FeSO ₄	124
2.5.2.3.7.	DFO	124
2.5.2.3.8.	DTPA	124
2.5.2.3.9.	Fe ⁺⁺ /DTPA	124
2.5.2.4.	Fenton Reaksiyonu ve CPR'in Etkisi	125
2.5.2.5.	CPR'in Mikrozomal Ortamda İndüklediği Radikalın, DMPO Spin Tuzağı Kullanarak ESR ile Belirlenmesi	126
2.5.2.6.	Mikrozomal Sistemlerde Lipid Peroksidasyonu Ölçümü	126
2.5.2.7.	Mikrozomal Tiyoil Gruplarının Tayini	126
2.5.2.8.	Hepatik Mikrozomlarda Oluşan 4-POBN/radikal Adduct'ının HPLC/MS Sistemiyle Analizi	127
2.5.2.8.1.	HPLC/MS'e İlişkin Koşullar	128
2.6.	Protein Tayinleri	128
2.6.1.	Modifiye Lowry Yöntemi ile Protein (Çözünmüş Protein) Tayini	129
2.6.2.	Total Protein Tayini Yöntemi	129
2.7.	İstatistiksel Değerlendirme	129
3.	BULGULAR	130
3.1.	Hücre Kültürü Çalışmalarının Sonuçları	130
3.1.1.	CPR'in Fibroblast Kültürlerindeki Etkileri	130
3.1.1.1.	Fibroblast Kültürlerinde E Vitamininin Etkisi	130
3.1.1.2.	CPR ve 'CPR + E Vitamini' ile İnkübe Edilen Fibroblastlarda Lipid Peroksidasyonu ve GSH Düzeyleri ile Antioksidan Enzim Aktiviteleri	134
3.1.2.	CPR'in Primer Astrosit Kültürlerindeki Etkileri	138

3.1.2.1.	CPR'in Primer Astrosit Kültürlerindeki Sitotoksik Etkisinin Antioksidanlarla Değiştirilmesi	138
3.1.2.1.1.	Primer Astrosit Kültürlerinde E Vitamininin Etkisi	138
3.1.2.1.2.	Primer Astrosit Kültürlerinde SOD'ın Etkisi	143
3.1.2.1.3.	Primer Astrosit Kültürlerinde CAT'ın Etkisi	143
3.1.2.2.	CPR'e Maruz Bırakılan Primer Astrosit Hücrelerinde Lipid Peroksidasyonu, GSH Düzeyleri ve CAT Aktivitesi	143
3.1.3.	Hücre Kültürlerinde ESR Ölçümleri	146
3.2.	Mikrozomal Çalışmaların Sonuçları	146
3.2.1.	CPR ile İnkübe Edilen Mikrozomlarda Radikal Oluşumu	146
3.2.2.	Radikal Oluşumunun Kinetiği	149
3.2.3.	Mikrozomlarda CPR ile İndüklenen Radikal Oluşumunun Sitokrom P-450 İnhibitörleri ile Önlenmesi	152
3.2.4.	Mikrozomlarda CPR ile İndüklenen Radikal Oluşumuna E Vitamini ve Troloksun Etkisi	152
3.2.5.	Mikrozomlarda CPR ile İndüklenen Radikal Oluşumuna SOD'ın Etkisi	154
3.2.6.	Mikrozomlarda CPR ile İndüklenen Radikal Oluşumuna Demir ve Demir Şelatörlerinin Etkileri	155
3.2.7.	Fenton Reaksiyonu ile 4-POBN/OH ⁻ Radikal Adduct'ı Oluşturulması	158
3.2.8.	Karaciğer Mikrozomlarında CPR ile İndüklenen Radikalin DMPO Spin Tuzağı Kullanılarak İncelenmesi	158
3.2.9.	Mikrozomlarda CPR ile İndüklenen Lipid Peroksidasyonu ve Tiyol Düzeyi Kayıpları	159
3.2.10.	Karaciğer Mikrozomlarında CPR ile İndüklenen Radikalin 4-POBN Adduct'ının HPLC/MS Tekniği ile Analizine İlişkin Bulgular	160
4.	TARTIŞMA	173
4.1.	CPR'in Fibroblast Hücre Kültürlerindeki Etkileri	174
4.2.	CPR'in Primer Astrosit Hücre Kültürlerindeki Etkileri	178
4.3.	CPR'in Mikrozomal İnkübasyonu ve ESR Sonuçları	181
4.4.	HPLC-ESI MS Sonuçlarının Yorumu	188
	KAYNAKLAR	193

SİMGELER ve KISALTMALAR

$^1\Delta_g$	Singlet oksijen
a_N, a_H^β	Aşırı ince yapı sabiteleri
A/A^-	Askorbat
ADR	Adriyamisin
AH^-	Askorbil radikali
ALT	Alanin amino transferaz veya alanin transaminaz
AST	Aspartat aminotransferaz veya aspartat transaminaz
AÜ	Alete özgü ünite
ATP	Adenozin trifosfat
BFAA	Bifenil asetik asit
BHT	Bütil hidroksi tolüen
bp	Baz çifti
CAT	Katalaz
cGSHPX	Sitozolik-çözünür form glutatyon peroksidaz
CI	Kimyasal iyonizasyon
C_{maks}	Maksimum plazma konsantrasyonu
CO	Karbon monoksit
CPR	Siprofloksazin
CYP	Sitokrom
DBNBS	3,5-dibromo-4-nitrobenzensülfonat
DEPMPO	5-(dietoksi fosforil)-5-metil-1-pirolin-N-oksit
DETAPAC	Dietilentriamin-pentaasetik asit
DFO	Desferrioksamin
DIP	Doğrudan giriş probu
DMPO	5,5-dimetil-1-prolin-N-oksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTNB	Ellman Reaktifi, 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)
DTPA	Dietilentriamin-pentaasetik asit
E Vit	E vitamini
EAA	Konsantrasyon-zaman eğrisinin altında kalan alan
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EEG	Elektroensefalogram
EI	Elektron iyonizasyon
EPR	Elektron paramanyetik rezonans
ESI	Elektro spre yonizasyon
ESR	Elektron spin rezonans
FT-ICR	Fourier Transform-İyon Siklotron Rezonans
G	Gauss
GABA	γ -Aminobütirik asit
GC	Gaz kromatografisi
GCs	γ -glutamil sistein sentetaz
GFH	Glomerüler filtrasyon hızı
GGT	γ -glutamil transpeptidaz
GI	Gastrointestinal
GLC	Gaz sıvı kromatografisi

GR	Glutatyon redüktaz
GSH	Glutatyon, indirgenmiş
GSHPx	Glutatyon peroksidaz
GSSG	Glutatyon, okside
GST	Glutatyon S-transferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HOCl	Hipoklorik asit
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
IÜ	İnternasyonal Ünite
Kl	Klerens
Kl _R	Renal klerens
LC	Sıvı kromatografisi
LDH	Laktat dehidrojenaz
LDL	Düşük dansiteli lipitler
LTB ₄	Lökotrien B ₄
m/z	Kütle/yük (oranı)
MDA	Malondialdehit
MEM	Minimum esansiyel medium
MNP	2-Metil-2-nitrozopropan
MOPS	Morfolinopropan sülfonik asit
MPO	Miyeloperoksidaz
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
MS	Kütle spektrometrisi
mT	Militesla
MTD	Maksimum tolere edilebilir doz
mtDNA	Mitokondriyal DNA
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NADPH	β-Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, redükte form
NEM	N-etil maleimid
NMDA	N-metil-D-aspartat
NMR	Nüklear manyetik rezonans
NR	Nötral red, nötral kırmızı
NSAİD	Nonsteroidal antiienflamatuvar ilaç
O ₂ ⁻	Süperoksit anyonu
OH [•]	Hidroksil radikali
O ₃	Ozon
4-POBN	α-(4-pridil-1-oksit)-N-tert-butil nitron
PBN	α-fenil N-t-butil-nitron
PBS	Fosfat tamponlu tuzlu su çözeltisi
pGSHPx	Plazma çözünür form glutatyon peroksidaz
PHGSHPx	Fosfolipit hidroperoksit glutatyon peroksidaz
PUFA	Çoklu doymamış yağ asiti
SCE	Kardeş kromozom değişimi
SDI	Süksinat dehidrogenaz inhibisyonu
Se	Selenyum
SIM	Seçici iyon izleme
SKF 525A	β-dietilamino etil-difenilpropil asetat, proadifen
SOD	Süperoksit dismutaz

SSS	Santral sinir sistemi
ST	Spin tuzadı
ST-R	Spin adduct
TBA	Tiyobarbitürük asit
TBARS	Tiyobarbitürük asit reaktif materyal
TEP	Tetra etoksi propan
$t_{1/2\beta}$	Eliminasyon yarı ömrü
t_{maks}	C_{maks} 'a erişmek için geçen zaman
TNB	3-karboksi 4-nitrobenzentiolat
UDS	Programlanmamış DNA sentezi
V_d	Dağılım hacmi



ŞEKİLLER

Şekil	Syf No
1.1. 4-kinolon, kinolon karboksilik asit ve CPR'in kimyasal yapıları.....	5
1.2. CPR'in tanımlanmış metabolitleri.....	9
1.3. Hücrelerdeki serbest radikal oluşum ve savunma mekanizmaları.....	44
1.4. Ökaryotik hücrede oksijen bileşiklerinin metabolizması.....	48
1.5. Tokoferol ve tokotrienollerin kimyasal yapıları.....	55
1.6. E vitamini, GSH, C vitamini ve GSHPx'lar arasındaki ilişki.....	57
1.7. 4-POBN ile tuzaklanan bir radikale ait ESR spektrumu ve a_N , a_H^β yarılmaları..	65
1.8. Yaygın olarak kullanılan spin tuzaklarının kimyasal yapıları.....	66
1.9. DFO'nun kimyasal yapısı.....	88
1.10. DTPA'nın kimyasal yapısı.....	89
1.11. Kütle spektrometrisi ile buhar fazının genel işleyiş şeması.....	93
3.1. CPR ile inkübe edilen (24-72 saat) fibroblast kültürlerinde gözlenen hücre büyümesi	131
3.2. Normal insan fibroblast hücre kültürlerinde 75 mg/l CPR'e 48 saat süreyle maruziyeti takiben hücre sayısının azalması	132
3.3. Fibroblast kültürlerinde CPR'in indüklediği sitotoksik etkiye karşı E vitamininin koruyucu etkisi	133
3.4. CPR ile inkübe edilen (7-96 saat) primer astrosit kültürlerinde gözlenen hücre büyümesi	139
3.5. CPR ile inkübe edilen (7-96 saat) primer astrosit kültürlerinde gözlenen hücre büyümesi	140
3.6. Primer astrosit kültürlerinde 300 mg/l CPR ile 24-96 saat inkübasyonu takiben gözlenen hücre sayısı azalması	141
3.7. Primer astrosit kültürlerinde CPR'in indüklediği sitotoksik etkiye karşı E vitamini, SOD, CAT veya 'SOD + CAT'ın etkisi	144
3.8. Primer astrosit kültürlerinde CPR'in indüklediği sitotoksik etkiye karşı E vitamini, SOD, CAT veya 'SOD + CAT'ın etkisi	144
3.9. Beyin ve karaciğer mikrozomlarında CPR ile indüklenen 4-POBN/radikal adduct'larının ESR spektrumları	147
3.10. Karaciğer mikrozomlarında CPR ile indüklenen 4-POBN/radikal adduct'larının oluşumunun optimum mikrozomal sistem bileşenlerine bağımlılığı	148
3.11. Beyin mikrozomlarında CPR ile indüklenen 4-POBN/radikal adduct'larının oluşumunun optimum mikrozomal sistem bileşenlerine bağımlılığı	149
3.12. Karaciğer mikrozomlarında CPR ile indüklenen radikal oluşumunun doz ve zamanla ilişkisi	150
3.13. Beyin mikrozomlarında CPR ile indüklenen radikal oluşumunun doz ve zamanla ilişkisi	151
3.14. Karaciğer ve beyin mikrozomlarında CPR ile indüklenen 4-POBN/radikal adduct oluşumuna SKF 525A ve $ZnCl_2$ 'ün etkisi	153
3.15. Karaciğer ve beyin mikrozomlarında CPR ile indüklenen 4-POBN/radikal adduct oluşumuna SOD'nin etkisi	155
3.16. Karaciğer mikrozomlarında 0.1 mM $FeSO_4$ ile indüklenen 4-POBN/radikal adduct'ının ESR spektrumu	156
3.17. Fenton reaksiyonu ile oluşan hidroksil radikalının 4-POBN adduct'ının ESR spektrumu ve CPR'in etkisi	158
3.18. Karaciğer mikrozomal inkübasyon karışımından hazırlanan $100000 \times g$ süpernatana ait ESR spektrumu	163
3.19. CPR'in 4-POBN varlığında oluşan mikrozomal inkübasyon ürünlerinin total	

iyon akımı olarak ölçülen HPLC-ESI MS analizi sonuçları	164
3.20. CPR ve 4-POBN varlığında oluşan mikrozomal reaksiyon ürünlerinin HPLC-ESI MS analiziyle elde edilen m/z 601,503, 346 ve 211 piklerini gösteren kromatogramlar	165
3.21. CPR ile inkübe edilen mikrozomal karışımın $t_R = 8.60$ dk'da elüe olan HPLC fraksiyonunun ESI MS spektrumu (m/z 150-500)	166
3.22. CPR ile inkübe edilen mikrozomal karışımın $t_R = 8.60$ dk'da elüe olan HPLC fraksiyonunun ESI MS spektrumu (m/z 150-650)	167
3.23. m/z 346 pikinin fragmentasyonunu gösteren ESI MS spektrumu	168
3.24. m/z 211 pikinin fragmentasyonunu gösteren ESI MS spektrumu	169
3.25. CPR ile inkübe edilen mikrozomal karışımın $t_R = 4.19$ dk'da elüe olan HPLC fraksiyonunun ESI MS spektrumu (m/z 150-650)	170
3.26. CPR ile inkübe edilen mikrozomal karışımın $t_R = 4.19$ dk'da elüe olan HPLC fraksiyonunun ESI MS spektrumu (m/z 150-440)	171
3.27. 4-POBN'in pentenil radikal adduct'ının yapısı ve fragmentasyon kalıbı	172



TABLolar

Tablolar	Sayfa
1.1. CPR'in farmakokinetik özellikleri	6
1.2. CPR'in vücut sıvı ve dokularındaki dağılımı	8
1.3. Farklı doz ve verilış yollarıyla uygulanan CPR'in insanda ölçülen değişmemiş ilaç ve metabolitlerinin oranları	11
1.4. 250 mg oral CPR uygulamasını takiben idrarla atılan değişmemiş ilaç ve metabolitlerin oranları	11
1.5. 250 mg oral CPR uygulamasını takiben idrarda ölçülen metabolitlerin oranları	12
1.6. Biyolojik öneme sahip bazı serbest radikaller	30
1.7. Düşük reaktiviteye sahip bileşiklerin reaktif bileşiklere dönüşümünde demir ve diğer metallerin rolü	38
1.8. Antioksidan savunma sisteminin enzimatik ve nonenzimatik bileşenleri ..	43
1.9. 4-POBN ile çeşitli sistemlerde elde edilen radikal adduct'larına ait aşırı ince yapı sabite değerleri	69
2.1. ESR-Spin Tuzağı çalışmalarında kullanılan optimum karaciğer mikrozomal sistem bileşimi	120
2.2. ESR-Spin Tuzağı çalışmalarında kullanılan optimum beyin mikrozomal sistem bileşimi	120
2.3. Karaciğer ve beyin mikrozomları ile yapılan ölçümlerde ESR spektrometresine ilişkin aletsel ayarlar	121
2.4. Fenton reaksiyonu ölçümlerinde ESR spektrometresine ilişkin aletsel ayarlar	125
2.5. ESR-Spin Tuzağı çalışmalarında karaciğer mikrozom sistemi için DMPO ile kullanılan sistemin bileşenleri	126
3.1. CPR ve E vitamininin normal insan fibroblast hücrelerinde TBARS ve total GSH düzeyleri üzerine etkileri	135
3.2. CPR ve E vitamininin normal insan fibroblast hücrelerinde GSHPx ve CAT enzim aktiviteleri üzerine etkileri	136
3.3. CPR ve E vitamininin normal insan fibroblast hücrelerinde total SOD, CuZn SOD ve MnSOD düzeyleri üzerine etkileri	137
3.4. CPR'in primer astrosit kültürlerinde TBARS, total GSH düzeyleri ile CAT enzim aktiviteleri üzerine etkileri	145
3.5. CPR'in karaciğer mikrozomlarında meydana getirdiği radikal oluşumuna E vitamini ve Troloksun etkisi	154
3.6. Karaciğer mikrozomlarında demir ve demir şelatörlerinin; beyin mikrozomlarında DFO'nin CPR'in meydana getirdiği radikal oluşumuna etkisi	157
3.7. CPR ile inkübe edilen mikrozomlarda lipid peroksidasyonu düzeyleri	159
3.8. CPR ile inkübe edilen mikrozomlarda total tiyol düzeyleri	160

GİRİŞ VE AMAÇ

Siprofloksazin (CPR)'in bir üyesi olduğu fluorokinolonlar, Gram-pozitif ve Gram-negatif çok sayıda bakteriye karşı etkili geniş spektrumlu bir antibiyotik grubu olup, günümüzde idrar yolları, solunum sistemi ve gastrointestinal sistem ve eklem enfeksiyonları başta olmak üzere çeşitli enfeksiyonların ve cinsel yolla bulaşan hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılırlar. Antibakteriyel etkilerini bir Tip II topoizomeras olan “bakteriyel DNA girazı” inhibe ederek gösterirler. Memeli DNA topoizomerası üzerindeki etkilerinin, prokaryot topoizomeras II'ye kıyasla birkaç yüz kez daha düşük olduğu bildirilmiştir.

Genellikle iyi tolere edilirler. Ana yan etkileri gastrointestinal bozukluklar, fototoksik cilt reaksiyonları, büyüme çağında gözlenen eklem toksisitesi ve düşük sıklıkta gözlenmesine karşın konvülsiyon dahil santral sinir sistemi (SSS) zıt etkileridir. CPR'ın SSS zıt etkileri, esas itibariyle, GABA antagonistik etkilerine bağlanmaktadır. Ancak öngörülen çeşitli mekanizmalara ilave olarak, son yıllarda yapılan çalışmalarda NMDA antagonistlerinin CPR ile indüklenen konvülsiyonları önlediğinin gözlenmesi nedeniyle bir eksitator mekanizmanın, dolayısıyla, eksitotoksik bir etkinin varlığı görüşü de olası bir mekanizma olarak düşünülmektedir.

Diğer taraftan, kinolonların insan karsinoma hücre kültürleri dahil çeşitli hücre kültürlerinde hücre büyümesi ve hücre işlevlerini inhibe etme kapasitesine sahip oldukları gözlenmiştir, ancak mekanizmalar tam olarak anlaşılmış değildir. Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda *de novo* pirimidin sentezini bozmak suretiyle etkili oldukları üzerinde durulmuştur. Daha sonra yapılan çalışmalarda izole karaciğer mitokondrilerinde gözlenen inhibitör etkileri nedeniyle enerji metabolizmasıyla ilgili enzimlerle etkileştikleri düşünülmüş, mitokondriyal DNA'da selektif bir kayba neden oldukları ve bunun mitokondriyal işlevlerde gecikmeli bir kayıpla sonuçlandığı ileri sürülmüştür.

Daha önce yaptığımız *in vivo* çalışmalarda CPR'ın sıçan beyin ve karaciğer doku homojenatlarında önemli ölçüde lipid peroksidasyonuna neden olduğu, GSH statüsünü ise önemli ölçüde etkilediği gösterilmiş^{1,2}; bu etkilerin E vitamini ve

allopurinol ile önlendiği saptanmıştır. Ayrıca CPR'nın farelerdeki konvülsif etkisinin çeşitli antioksidanlarla önemli ölçüde önlenebildiği gösterilmiştir².

Bu bilgi ve verilerden hareket eden bu çalışmada, çeşitli *in vitro* modellerle CPR varlığında meydana gelmesi olası sitotoksisitenin ve oksidatif stresin çeşitli yöntemlerle araştırılması ve olası serbest radikal(ler)in saptanıp belirlenmesi amaçlanmıştır, araştırma aşağıdaki plan çerçevesinde gerçekleştirilmiştir:

i- CPR'in normal insan dermal fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisinin araştırılması ve oksidatif stresin olası rolünün incelenmesi amacıyla hücrelerde lipid peroksidasyonu, total GSH düzeyleri ve antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi; bu olası etkilerin antioksidan E vitamini ile önlenebilirliğinin araştırılması,

ii- CPR'in, sıçan beyin dokusundan hazırlanan primer astrosit kültürlerinde hücre canlılığı üzerindeki etkisinin iki ayrı sitotoksisite testi ile araştırılması; E vitamini, SOD ve/veya katalazın, meydana gelmesi olası sitotoksik etkiyi önleyebilirliğinin araştırılması; sitotoksik etkide oksidatif stresin olası rolünün belirlenmesi için primer astrosit hücre kültürlerinde lipid peroksidasyonu, ve total GSH düzeyleri ve antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi,

iii- CPR'ın sıçan beyin ve karaciğer mikrozomlarıyla inkübasyonu sonucu meydana gelmesi olası radikal indükleyici etkinin elektron spin rezonans (ESR)-Spin tuzağı tekniği ile incelenmesi; radikal(ler)in tanımlanabilmesi ve/veya meydana geliş mekanizmasının belirlenebilmesi için sitokrom P-450 ve NADPH inhibitörleri, antioksidanlar, demir ve demir şelatörlerinin etkilerinin araştırılması,

iv- CPR'ın sıçan beyin ve karaciğer doku mikrozomlarında olası lipid ve protein hasarı yapıcı etkilerinin lipid peroksidasyonu ve total tiyol grubu ölçümleri ile araştırılması,

v- CPR'in mikrozomal sistemde indüklemesi olası radikal(lerin) HPLC- ESI MS teknikleriyle analizi suretiyle tanımlanması.

¹ Gürbay, A. Sıçanda serebral ve hepatik dokuların okside glutatyon ve total glutatyon düzeylerinin ölçümü ve oksidatif stres indükleyen ajanların glutatyon sistemine etkileri. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Programı Bilim Uzmanlığı Tezi, 1993.

² Taşkın, T. Fluorokinolon grubu antibiyotik siprofloksazin'in epileptojenik nörotoksitesinin mekanizması ve sıçanlarda öğrenme fonksiyonlarına etkisi üzerinde çalışmalar. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Programı Doktora Tezi, 1994.

Bu çalışmadan elde edilecek sonuçların CPR'nin yan etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına ve klinik kullanımda gözlenen yan etkilerin en aza indirilmesi veya nlenmesine katkıda bulunması beklenmektedir.



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Fluorokinolon Grubu Antibiyotikler

"4-kinolon" veya "kinolon karboksilik asit" (Şekil 1.1.) grubu antibiyotikler olarak da adlandırılan "kinolon"lar, prototipleri 1962 yılında geliştirilen "nalidiksik asit" olan bir antibiyotik grubudur. Daha sonraki yıllarda, kinolin çekirdeğinin 7 numaralı karbonuna piperazin halkasının ve 6 numaralı karbonuna bir fluor atomunun ilavesiyle antibakteriyel aktivitesi çok daha yüksek ve antibakteriyel spektrumu çok geniş olan "fluorokinolon" grubu antibiyotikler geliştirilmiştir (1, 2). Siprofloksazin (CPR), norfloksazin, ofloksazin, enoksazin, pefloksazin gibi üyeleri başta olmak üzere fluorokinolonlar, farmakokinetik özelliklerinin üstünlüğü ve diğer birçok antibiyotiğe rezistan olanları da kapsayan çok sayıda Gram-pozitif bakteriye ve *P. aeruginosa* dahil Gram-negatif basil ve stafilokoklara karşı bakterisit etkili olmaları nedeniyle günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Solunum sistemi enfeksiyonları, tifo, şigellozis, otitis, yumuşak doku enfeksiyonları ve osteomyelitte ve özellikle de üriner bölge enfeksiyonları, gonore ve bakteriyel enteritte etkindirler (2, 3).

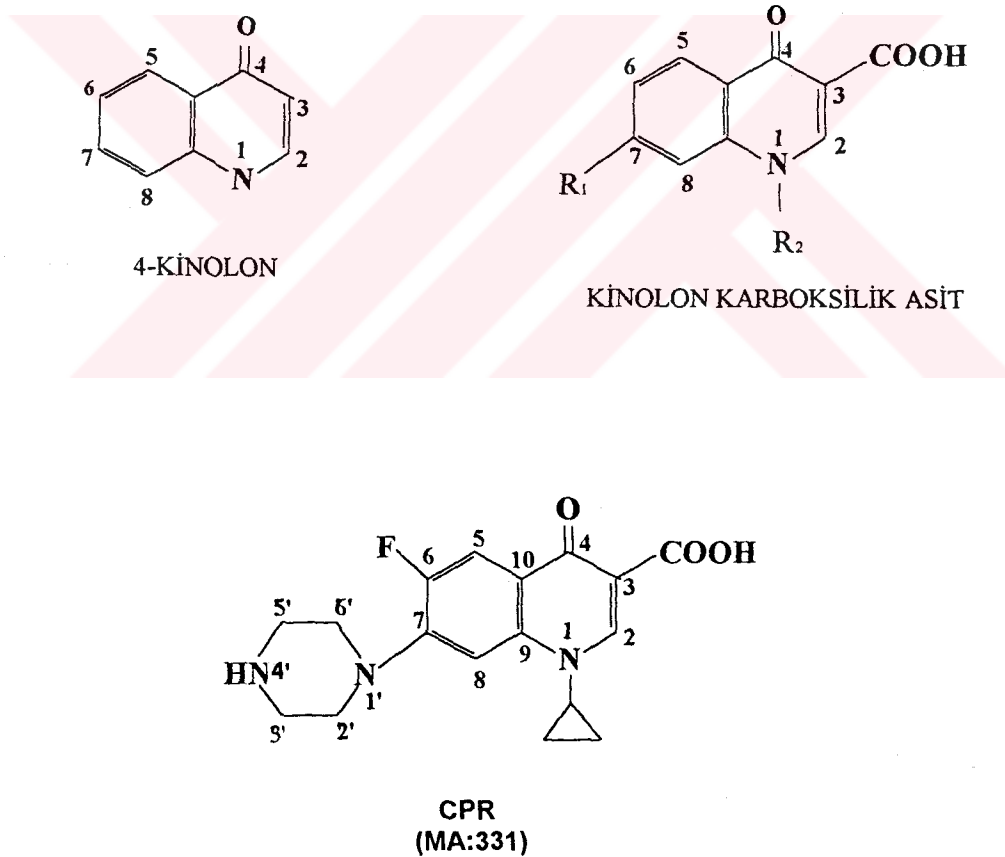
Mutlak biyoyararlanımlarının (% 50-100) ve eliminasyon yarı ömürlerinin nisbi olarak yüksek ve dokuya penetrasyonlarının iyi olması nedeniyle günde 1-2 doz kullanımları yeterlidir (2). Plazma proteinlerine bağlanma oranları (enoksazin hariç-% 18-54) düşüktür (% 14-25); dağılım hacimleri ise total vücut sıvı hacminden çok yüksektir. Dolayısıyla tüm vücut dokularına dağılma ve yüksek konsantrasyonda bulunma özelliği gösterirler. İdrar ve feçesteki konsantrasyonları çok yüksektir. Böbrek ve prostat dokusunda yüksek konsantrasyonda bulunurlar; akciğer dokusundaki konsantrasyonları da plazmadakinden yüksektir. Beyin omurilik sıvısına penetrasyonları, pefloksazin (% 40) ve ofloksazin (% 90) hariç nisbi olarak düşüktür. Makrofajlar ve polimorfonükleer lökositlerde konsantre olurlar (2).

CPR dahil çoğu fluorokinolon antibiyotiğin eliminasyonu hem renal yolla, hem de nonrenal yollarla olur. Genel olarak, idrarla atılan antibiyotik fraksiyonunun % 20'sinden daha az bir kısmını biyotransformasyon ürünleri oluşturur. Renal işlev bozukluğu olan bireylerde eliminasyon yarı ömürleri yaklaşık iki kez artar.

1.1.1. Siprofloksazin

1.1.1.1. Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri

CPR (1-Siklopropil-6-floro-1.4-dihidro-4-okso-7-(1-piperazinil) 3-kinolon-karboksilik asit hidroklorür, Bay o 9867, Ciprobay) (Şekil 1.1.) ikinci kuşak bir fluorokinolondur. Diğer fluorokinolonlarda olduğu gibi 4-kinolon çekirdeğinin 7 numaralı karbonunda, antipseudomonal aktiviteden sorumlu bir piperazin halkası taşır. 1 numaralı karbona bağlı siklopropil grubu antibakteriyel aktivitesini arttırmaktadır (4). Molekölün taşıdığı karboksil grubu ve keto grubunun (muhtemelen enol şekline geçerek) Ca^{++} ile bağlanmaya girdiği ve böylece Gram-negatif bakteri hücresinin dış duvarından geçişinin kolaylaştığı bildirilmiştir (5).



Şekil 1.1. 4-Kinolon, kinolon karboksilik asit ve CPR'in kimyasal yapıları.

CPR, monoklorür monohidrat ve laktat tuzları halinde kullanılır. CPR-HCl'in sudaki çözünürlüğü 30 mg/ml'dir. pKa değerlerinin 6 ve 8.8 olduğu bildirilmektedir. Sulu çözeltileri, ışıktan korunduğu takdirde oda sıcaklığında en az 14 gün dayanıklıdır (6).

1.1.1.2. Farmakokinetik Özellikleri

CPR non-lineer bir farmakokinetik kalıp gösterir. CPR'in farmakokinetik özellikleri Tablo 1.1'de özetlenmiştir (7). Aşağıda bu özelliklere kısaca değinilmiştir:

Tablo 1.1. CPR'in Farmakokinetik Özellikleri (9).

Farmakokinetik Özellik	Ölçülen Değer
t_{maks}	1-2 saat
Biyoyararlanım	$\approx$ % 70
C_{maks}	
Oral	
250 mg	0.8-2.0 (1.4 ^a) mg/l
500 mg	1.5-2.9 (2.3-3.5 ^a) mg/l
750 mg	2.0-3.9 (3.6 ^a) mg/l
iv ^b	
200 mg	2.8-3.8 mg/l
400 mg	3.4-6.7 mg/l
V_d (oral ve iv dozun ardından)	2.1-5.0 l/kg
$t_{1/2\beta}$	$\approx$ 3-5 saat
Kl	$\approx$ 25-86 l/saat
Kl _R	$\approx$ 15-30 l/saat
EAA	
Oral	
250 mg	3.0-8.6 mg/l saat
500 mg	7.0-12.7 mg/l saat
750 mg	8.8-19.2 mg/l saat
iv ^b	
200 mg	3.0-7.7 mg/l saat
400 mg	8.1-14.2 mg/l saat
Proteine bağlanma	$\approx$ % 30

^a 7 ve üzerindeki dozlar 12 saatte bir uygulanmıştır.

^b 200 ve 400 mg'lık dozlar sırasıyla 30 ve 60 dakika süreyle infüzyon şeklinde uygulanmıştır.

t_{maks} = C_{maks} 'a erişmek için geçen zaman, C_{maks} = maksimum plazma konsantrasyonu, V_d = dağılım hacmi, $t_{1/2\beta}$ = eliminasyon yarı ömrü, Kl = klerens, Kl_R = renal klerens, EAA = konsantrasyon-zaman eğrisinin altındaki alan.

1.1.1.2.1. Absorpsiyon

Absorpsiyonu hızlıdır. Besinlerle birlikte alımı pik plazma konsantrasyonuna ulaşma zamanını uzatır, ancak klinik yönden biyoyararlanımını önemli ölçüde etkilemediği bildirilmiştir. Oral yoldan mutlak biyoyararlanımı, tablet şeklinde uygulamalar dahil % 70-80 civarındadır (8, 9)

1.1.1.2.2. Dağılım

Dağılım hacmi yüksektir. Plazma proteinlerine düşük oranda bağlanır (% 30-35) ve bağlanma serum ilaç düzeylerinden bağımsızdır (10, 11, 12). Çeşitli dokulardaki konsantrasyonu genellikle plazma konsantrasyonundan yüksektir (Tablo 1.2) (7, 13).

En yüksek konsantrasyona eriştiği dokular akciğer, karaciğer, böbrek, prostat, seminal sıvı, uterus, overler ve tonsiller olup, bu dokuların çoğundaki konsantrasyonları serum konsantrasyonunu belirgin ölçüde geçer (13, 14). CPR aynı zamanda, artiküler kıkırdak dokusu dahil kemik dokusuna, göz sıvısına, tükürük, plevral sıvı ve lenfatik sıvıya geçer ve nötrofillerde konsantre olur. Bu hücrelerdeki konsantrasyonu ekstraselüler sıvıdan 2-7 kez daha yüksektir. Kan-beyin engelini aşan miktarlarının, serum konsantrasyonunun % 5-40'ı arasında değiştiği (15); oral 500 mg ve iv 200 mg CPR ile maksimum beyin-omurilik sıvısı konsantrasyonunun 0.14 ve 0.27 µg/ml (0.42 ve 0.81 µM) olduğu, bu konsantrasyonların menenjitli hastalarda, sırasıyla 0.35 µg/ml (1.05 µM) ve 0.56 µg/ml (1.69 µM)'e yükseldiği bildirilmiştir (16).

Farede 10 mg/kg'lık iv uygulamadan sonra serum, beyin ve beyin-omurilik sıvısındaki pik konsantrasyonları, sırasıyla ~ 7 µg/ml, ~ 3 µg/ml ve ~ 2 µg/ml ölçülmüştür. CPR konsantrasyonunun her üç dokuda da hızla yükseldiği, takiben serumdaki azalmaya paralel bir şekilde beyin ve beyin omurilik sıvısında da zamanla azaldığı gösterilmiştir (11).

Son yıllarda sıçanlarda yapılan kinetik çalışmalar, kinolonların SSS'ne aktif transportla taşındığını ortaya koymuştur (17, 18, 19).

Tablo 1.2. CPR'in Vücut Sıvı ve Dokularındaki Dağılımı (7)

Doku/vücut sıvısı	Plazma konsantrasyonu %'si
Akciğer	200-1000
Böbrek	1000-5000
Bronşiyal sekresyon	100-150
BSO* (enflamasyonlu meninj)	30-50
BSO (enflamasyonsuz meninj)	5-10
Deri	50-100
Endometrium	300-500
Gözyaşı	20-50
Kas dokusu	200-400
Kemik	50-200
Lenf düğümü	60-120
Lenf, periferik	70
Nazal sekresyon	75-100
Pankreas sıvısı	10-40
Peritonyum	100
Prostat	300-1000
Safra	100-1000
Seminal sıvı	110-120
Serviks	50-400
Sinüs mukozası	160
Tonsil	90-300
Uterus	100-150
Yağ dokusu	50-100
Yumurtalıklar	50-250

* BSO =Beyin-omurilik sıvısı

1.1.1.2.3. Metabolizma ve İtira

CPR kısmen böbrek, kısmen de böbrek dışı mekanizmalarla elimine edilir. Renal klerensi, total serum klerensinin yaklaşık 2/3'si kadardır, dolayısıyla ilacın en az 1/3'ü böbrek dışındaki yollarla elimine edilir (20). Hepatik metabolik transformasyon CPR eliminasyonunun ikincil ana yolağıdır. Üçüncü eliminasyon yolağı ise transintestinal eliminasyondur (21).

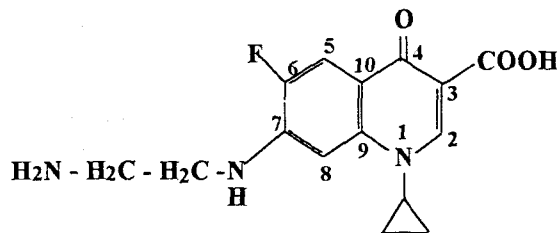
CPR'in serum, idrar veya feçeste gözlenen 4 metaboliti tanımlanmıştır (Şekil 1.2) (22, 23, 24).

M1 metaboliti: Desetilen siprofloksazin

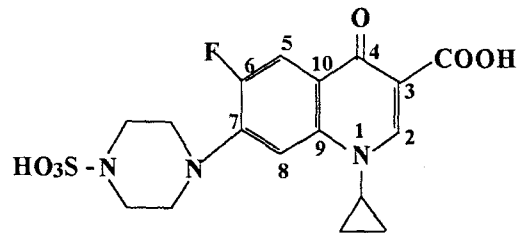
M2 metaboliti: Sülfo siprofloksazin

M3 metaboliti: Okso siprofloksazin

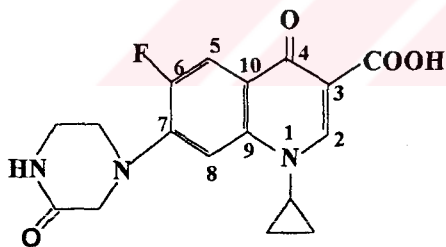
M4 metaboliti: Formil siprofloksazin



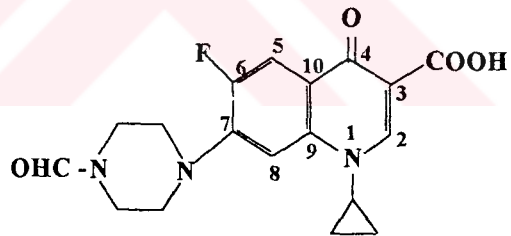
**Desetilen-CPR
(MA:305)**



Sülfo-CPR
(MA:409)



**Okso-CPR
(MA:345)**



**Formil-CPR
(MA:359)**

Şekil 1.2. CPR'in tanımlanmış metabolitleri

Tüm florokinolonlarda olduğu gibi, CPR molekülünde metabolizma için en önemli bölge 7 numaralı pozisyondaki piperazin süstitüentidir.

M1 metaboliti bu heterosiklik halkanın açılması ile meydana gelir. Bu halka açılışının mekanizması ayrıntılı olarak incelenmemiştir ve açılmaya yol açan ara kademe ve ürünlerin mevcut olup olmadığı bilinmemektedir. M1 metabolitinin fizikokimyasal özellikleri ana maddeden önemli ölçüde farklıdır; lipofilisitenin göstergesi olarak ölçülen log k' değerinin, CPR'da 1.344 iken metabolitinde 1.086 olduğu saptanmıştır (25, 26).

M3 metaboliti, oksosiprofloksazin, piperazinil süstitüentinde oksidatif bir dönüşümle meydana gelir. Bu metabolitin fizikokimyasal özellikleri de büyük ölçüde farklıdır. Moleküldeki bazik merkezin kaybı okso metabolitine asidik özellik kazandırır ve doku penetrasyonu yeteneğini azaltır (23).

M2 metaboliti, piperazin halkasındaki sekonder amin grubunda sülfatla-konjugasyon sonucu meydana gelen bir metabolittir. CPR'in en yüksek oranda oluşan metabolitidir. İnsanda safra içinde ölçülen M1 metabolitinin miktarı ana molekülün % 13'ü iken, M2 metabolitinin konsantrasyonu CPR'dan daha yüksektir (27).

M4 metaboliti 4' N pozisyonunda formilasyonla oluşan bir metabolit olup, idrarda çok düşük oranda bulunur. Feçeste saptanmamıştır.

CPR'ın N1 pozisyonundaki siklopropil süstituenti metabolik olarak stabildir. C3 pozisyonundaki karboksil grubu ise glukuronid konjugasyonuna uğrar. Ancak bu metabolitin idrarda gözlenmediği, safraya salgılandığı, bağırsakta hızla hidrolize uğrayıp ana moleküle dönüştüğü ve takiben enterohepatik sirkülasyona girdiği bildirilmiştir (23). Ancak enterohepatik sirkülasyona giren bu miktar son derece düşüktür (12).

CPR metabolizmasının nicel yönlerine ilişkin literatür verilerinde tam bir uyum ve kararlılık yoktur. Bu muhtemelen, tüm farmakokinetik veriler için olduğu gibi, kullanılan ölçüm yöntemi, dozaj, veriliş yolu, farklı kompartıman modelleri ve benzeri farklılardan kaynaklanmaktadır. En çok refere edilen veriler aşağıdaki çizelgelerde özetlenmiştir (Tablo 1.3-1.5).

Tablo 1.3. Farklı doz ve veriliş yollarıyla uygulanan CPR'in insanda ölçülen değişmemiş ilaç ve metabolitlerinin oranları (27).

<u>200 mg, iv</u>	<u>Dozun %'si</u>
İdrarla atılan değişmemiş CPR	61.5
Feçesle atılan değişmemiş CPR	15.2
İdrarla atılan toplam metabolit	9.5
Feçesle atılan toplam metabolit	2.6
İdrarda M1 metaboliti	2.1
İdrarda M3 metaboliti	4.7
 <u>100 mg, iv</u>	
İdrarda M1 metaboliti	1.3
İdrarda M3 metaboliti	5.6
 <u>500 mg, oral</u>	
İdrarda M1 metaboliti	1.5
İdrarda M3 metaboliti	3.9

Tablo 1.4. 250 mg oral CPR uygulamasını takiben idrarla atılan değişmemiş ilaç ve metabolitlerin oranları (22)

	<u>Dozun %'si</u>
CPR	36.4
Toplam metabolit	16.5
M1	1.8
M2	5.0
M3	9.6
M4	0.1

Tablo 1.5. 250 mg oral CPR uygulamasını takiben idrarda ölçülen metabolitlerin oranları (24).

	<u>Dozun %'si</u>
Toplam metabolit	11.3
M1	1.4
M2	3.7
M3	6.2
M4	0.8

Görüldüğü gibi CPR'in % 75'den fazlası idrar ya da feçesle değişmeden atılır. % 15 oranında feçeste gözlenen değişmemiş CPR, intestinal duvardan eliminasyonun göstergesidir (28). Metabolitlerin toplam itrah düzeyi % 10-15 kadardır (9, 13, 24). Tanımlanmış 4 metabolitin idrardaki oranları azalan sıraya göre M3 (okso) > M2 (sülfo) > M1 (desetilen) > M4 (formil) şeklindedir.

Oral uygulamada oluşan M2 metabolitinin iv yola kıyasla biraz daha yüksek oranda olduğu, bunun da CPR'in sınırlı düzeyde ilk geçiş metabolizmasına uğradığını gösterdiği bildirilmiştir (28). Renal işlev bozukluklarında gerek CPR'in, gerekse metabolitlerinin yarılanma ömrünün uzadığı, serum konsantrasyonlarının yükseldiği saptanmıştır (29).

CPR metabolitlerinin antibakteriyel aktivitesi ana maddeden düşüktür. M1 metaboliti, prototipi kinolon olan nalidiksik asitle kıyaslanabilir düzeyde bir aktiviteye sahiptir. M2 metabolitinin aktivitesi ise önemli ölçüde düşüktür. Ana metabolit olan M3 geniş antibakteriyel spektruma sahiptir, ancak aktivitesi CPR'den ve norfloksazinden düşüktür. M4 metaboliti ise çok düşük konsantrasyonda bulunan bir metabolit olmasına karşılık en yüksek aktiviteye sahip olmandır. Aktivite düzeyi bakterinin cinsine göre CPR veya norfloksazinle kıyaslanabilecek düzeydedir. Özetle M1 ve M2 metabolitleri CPR'den ~ 100 kez, M3 ve M4 metabolitleri ise 6-8 kez daha düşük aktiviteye sahiptir (30, 31).

Böbreklerden ana itrah mekanizması glomerüler filtrasyondur. Ancak tüm kinolonlarla birlikte, CPR için de tübüler sekresyonun söz konusu olduğu, asit formda salgılandığı ve bu prosesin probenesit ile inhibe edildiği bildirilmiştir (27).

CPR için transiintestinal eliminasyonun mekanizması bir metabolit transformasyonu olmayıp, genel dolaşımdan barsak lümenine geçen ilaç ve metabolitlerin barsak duvarından salgılanmasıdır.

1.1.1.3. Etki Mekanizması

Bütün kinolonlarda olduğu gibi CPR'in etki mekanizması, esansiyel bir adenozin trifosfat hidrolize edici Tip II topoizomeraaz enzimi olan "DNA giraz"ı inhibe etmek şeklindedir. Bu inhibisyon sonucunda kinolonlar bakteriyel DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu bozarak hızlı hücre ölümüne yol açarlar (32). Son yıllarda topoizomeraaz IV enziminin de kinolonların ikinci bir hedefi olduğu ortaya konmuştur (33, 34).

CPR ve diğer kinolonlar, topoizomeraaz-DNA kompleksine bağlanıp, kompleksin stabilize olmasına neden olurlar. Sonuçta bakteriyel DNA sentezi bozulur, hücre bölünmesi durur ve hücre ölür (35).

Belirli bir bakterideki bu iki enzimatik hedefin kinolonlara nisbi duyarlılığı farklıdır. Genel olarak Gram-negatif bakterilerde DNA giraz, Gram-pozitif bakterilerde ise topoizomeraaz IV daha duyarlıdır ve daha duyarlı olan enzim antibiyotiğin primer hedefini oluşturur (36).

Kinolonların hücresel hedeflerinin bu "*dual*" tabiatı rezistans gelişmesi yönünden de öneme sahiptir. Birincil hedef enzimdeki mutasyonlarla gelişen rezistansın, ikincil hedef enzimin duyarlılığı ile sınırlanması olasılığı vardır (35).

1.1.1.4. Uygulama Şekli ve Dozu

Yetişkinlerde CPR için önerilen oral dozlar, enfeksiyonun türüne ve derecesine göre, günde iki kez 250-750 mg civarındadır. Yaygın uygulama günde iki kez 500 mg'lık dozlar şeklindedir (37).

İntravenöz kullanım için önerilen dozlar ise 12 saatte bir 100-400 mg'dır. Örneğin, orta/ağır üriner enfeksiyonlarda genellikle, günde iki kez 200 mg'lık doz uygulaması önerilirken, bazı inatçı enfeksiyonlarda 8 saatte bir 400 mg'lık iv dozlar uygulanabilmektedir (38).

1.1.1.4.1. Böbrek ve Karaciğer Yetmezliği Olan Hastalarda Kullanımı

CPR'in normal renal fonksiyonlu kişilerde 3-6 saat olan serum yarılanma ömrü, ağır renal yetmezlikte 6-9 saate kadar uzar. Böyle hastalarda pik serum düzeyleri ve pike ulaşma zamanlarında önemli bir yükselme olmamakla birlikte eğri altındaki alan 2 kez artar. Bu nedenle, genel olarak orta derecede böbrek yetmezliğinde (GFH 10-50 ml/dk) mutlak dozun % 25-50 oranında, ağır yetmezlikte ise (GFH 10 ml/dk) % 50 oranında azaltılması önerilmektedir (39, 30).

CPR'in eliminasyonunun önemli bir bölümünün hepatik biyotransformasyon yoluyla olması nedeniyle, renal yetmezlikte olduğu gibi hepatik yetmezlikte de, CPR kinetiği etkilenir. Hafif veya orta derecede yetmezlik hallerinde CPR klerensinin önemli ölçüde değişmediği, ancak ağır siroz olgularında serum konsantrasyonlarının yükseldiği, eliminasyon yarı ömrünün % 35 oranında arttığı gözlenmiştir (40). Bu nedenle ağır hepatik yetmezliği olan hastalarda doz ayarlaması gereklidir.

Sıçanlarda yapılan yeni bir çalışmada, serum total ve serbest CPR konsantrasyonlarının renal işlev bozukluğunda ~ 4 kez, hepatik işlev bozukluğunda ~ 2 kez arttığı saptanmıştır. Bu artışın sadece eliminasyon yarı ömründeki uzamaya bağlı olmadığı; plazma albümin düzeylerinde meydana gelen azalma nedeniyle CPR'in proteine bağlanma oranının azalması sonucu meydana geldiği gösterilmiştir (17). Ayrıca beyin CPR düzeylerinde de artış olduğu saptanmış (17), dolayısıyla renal ve hepatik bozukluklarda, CPR'in SSS konsantrasyonlarının artması ile uykusuzluk, sersemlik ve konvülsiyon gibi nörotoksik etkilerinin riskinin artacağı bildirilmiştir. Bu çalışmalarla ortaya konan diğer bir önemli bulgu ise beyin CPR konsantrasyonu/serum serbest ilaç konsantrasyonu oranının azalmasıdır. Bu bulgunun yorumu, hepatik ve renal bozukluk hallerinde CPR'in beyne penetrasyonunun azaldığı, bunun da muhtemelen beynin kapiller endotelyumundaki

aktif transport sistemlerinde meydana gelen bozukluklara bağılı olduğu şeklinde yapılmıştır (17).

1.1.1.4.2. CPR'in Çocuklarda ve Yaşlılarda Kullanımı

CPR'in çocuklarda kullanımından artropati riski nedeniyle genellikle kaçınılır. Ancak mutlak gerekli hallerde uygulanan günlük dozlar oral yoldan günde 7.5-15 mg/kg ve iv yoldan 5-10 mg/kg'dır (38). CPR'in 1-5 yaş grubu çocuklardaki eliminasyon hızının (trimetoprim'de de görüldüğü gibi) bebeklerden, daha büyük çocuklardan ve yetişkinlerden fazla olduğu gösterilmiştir (39).

Yaşlılarda pik serum konsantrasyonuna ulaşma zamanı değişmemekle birlikte, pik serum düzeyleri ve eğri altındaki alan değerleri (yaklaşık 2 kez) daha yüksektir. Ancak renal fonksiyonları normal olan yaşlılarda, zıt reaksiyonları dikkatle izlemek koşulu ile, doz ayarlaması yapılmaksızın CPR kullanımının, yaygın uygulama olduğu gözlenmektedir (39).

1.1.1.5. CPR ve Kinolon Toksisitesi

CPR'in sıçandaki oral LD₅₀ değeri > 5 g/kg, iv LD₅₀ değeri ise 140-200 mg/kg'dır (41). Sıçanda, 3 ay süreli-subkronik oral uygulama ile ölçülen "Maksimum Tolere Edilebilir Doz"u (MTD) 500 mg/kg'dır; 4 hafta süreli-subakut, ip, MTD değeri ise 20 mg/kg olarak ölçülmüştür (6). Kinolonların deney hayvanlarındaki toksisitelerinin olası hedefleri juvenil eklemler, böbrekler, SSS ve kardiyovasküler sistem olarak bildirilmektedir (42).

1.1.1.5.1. Kondrotoksisite

İlk kez pipemidik asit ile juvenil köpeklerde gözlenen kondrotoksisitenin (43) tüm kinolonlar için söz konusu olduğu bildirilmektedir (44). Çeşitli türlerden (sıçan, tavşan, kobay, köpek, bazı maymun türleri) genç hayvanlarda, CPR dahil kinolon uygulanması ile ağırlığın yüklendiği büyük eklemlerde artropati saptanmıştır. Histopatolojik incelemelerde tüm diartroidal eklem kıkırdaklarında erozyon, fisür ve

blister şeklinde lezyonların ve enflamatuvar olmayan eklem tahribatının meydana geldiği ve kıkırdak gelişiminin inhibe edildiği gözlenmiştir (42, 44). Etki doza, kullanım süresine, türe ve kinolonun cinsine bağımlılık gösterir. Köpek kondrotoksik etkiye en duyarlı türdür. Ağır klinik belirtiler, kinolon uygulamasından kısa süre sonra gelişen fasyal ve oküler ödemle başlar; giderek eklemlerde şişme, ağrı, yürürken sendeleme gelişir, hayvan ayakta durmak ve yürümek istemez. 3-4 aylık köpeklerde, 7-28 gün süreyle 20-30 mg/kg/gün CPR verilmesi ile bu etkiler gözlenirken, 4-5 haftalık sıçanlarda aynı etki için 100-500 mg/kg/gün CPR'a ihtiyaç vardır (42).

Kondrotoksisitenin, kinolonların kinetiği ile yakından ilişkili olduğu, kıkırdak dokusunda yüksek konsantrasyonda birikmelerinin (serum ve sinoviyal sıvı düzeylerinden önemli ölçüde yüksek derecede), proteoglikan ve kollojen sentezini inhibe etmelerinin başlatıcı faktörler olduğu bildirilmiştir (45). İnsanın kondrotoksik etkiye duyarlılığın az olmasının muhtemel nedeninin, kinolonların insandaki C_{maks} ve EAA değerlerinin sıçan, tavşan ve fareden düşük olması olduğu sanılmaktadır (44).

Ancak kinolon kondrotoksisitesinin mekanizması tam olarak aydınlatılmış değildir. Yukarıda sözü edilen proteoglikan ve kollajen sentezinin inhibe edilmesi hipotezinin yanında, çeşitli başka hipotezler ve bu hipotezleri destekleyen veriler de vardır: Kinolonların topoizomerez II'yi bozmak suretiyle artiküler kıkırdaktaki mitokondrial DNA sentezini bozmaları (46); mitokondrial bütünlüğün bozulması (47); kondrositlerde erken hücrel solunum patlamasını (*respiratory burst*) stimüle edip kıkırdak matriksinde yüksek toksisiteye sahip reaktif oksijen bileşikleri oluşturmaları (48); Mg^{++} ile stabil şelat kompleksleri yapmak suretiyle kıkırdaktaki Mg^{++} 'a bağımlı integrinlerin fonksiyonlarını bozmaları (49) bu hipotezlerin bazılarıdır. Kinolon verilenlerde gözlenenlere benzer eklem kıkırdağı lezyonlarının Mg^{++} 'ca eksik diyetle beslenen juvenil sıçanlarda da gözlenmesi son hipotezi desteklemektedir (50). Aynı araştırmacılar 600 mg/kg CPR verilen sıçanlarda gözlenen lezyonların Mg^{++} ve/veya tokoferol suplementasyonu ile % 50'den fazla oranda azaltıldığını da göstermişlerdir (51).

Diğer taraftan, kinolonların sıçanda eklem kıkırdak dokusundan başka kaslarda, tendonlarda ve sinoviyal membranlarda da toksik etki potansiyeline sahip oldukları; hasara uğrayan kıkırdaktaki bozunma ürünlerinin eklem boşluğuna

saliverilmesiyle sinoviyal membranda vasküler permeabilitenin arttığı ve bu aşırı geçirgenliğin lezyon gelişmesine katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür (52). Bu etkinin Mg^{++} 'ca eksik diyetle beslenen hayvanlarda daha şiddetli olarak gözleendiği, dolayısıyla tendonopati patofizyolojisinin de artropatiye benzediği bildirilmiştir (53).

1.1.1.5.2. Renal Toksisite

Kinolonlar muhtemelen primer nefrotoksik ajanlar değildir. Ancak deney hayvanlarında, kristal çökmesine bağlı olarak gelişen yabancı cisim reaksiyonunun, renal fonksiyonları ikincil olarak etkilediği gösterilmiştir (42, 54). Kinolonların nefrotoksisite potansiyeli sıçan, köpek ya da maymundan farklıdır. Olası etkiler hafif interstisyel nefrit, kristalüri, idrarda gizli kan, renal fonksiyon azalması ve böbrek ağırlığında artış şeklinde olabilir.

Sıçanda 20-30 mg/kg'lık iv dozlarla ya da 500-1000 mg/kg'lık oral dozlarla nefropati gözlenirken, köpekte 50-100 mg/kg'lık oral dozlar nefropatiye neden olabilir. Renal intoleransın, kinolonların pH'ya bağımlı çözünürlükleri (pH 6-9'da minimumdur) ile ilişkili olduğu; insanda da normalde görülmeyen alkalin idrar koşullarında kristalürinin meydana geldiği bildirilmiştir (42). Dolayısıyla kinolon nefropatisi insanda nadir görülür, ancak yine de, özellikle yüksek doz CPR alanların iyi hidrate edilmesi önerilmektedir (42).

1.1.1.5.3. Kardiyovasküler Toksisite

Klinik öncesi toksikolojik değerlendirmelerde, düşük iv dozlarda kinolon uygulamasını takiben köpek ve kedide önemli ölçüde hipotansiyon ve taşikardi gözlenmiştir (53). Bu etkilerin histamin salımıyla ilişkili ve doza bağımlı olduğu, oral uygulama ile de gözleendiği bildirilmiştir (42). Kinolonların kardiyak ritmi doğrudan değiştirme potansiyeline de sahip oldukları, CPR'ın çok yüksek dozlarda (300 mg/kg) ventriküler taşikardiye neden olduğu saptanmıştır (55). Diğer taraftan CPR alan kişilerde beyin kan akımının azaldığı bildirilmiştir (56).

Ancak CPR ve diğer kinolonların kullanımı ile insanda kardiyovasküler zıt etki gelişmesi riski çok düşüktür. Bu nedenle hayvanlarda gözlenen hipotansif etkinin (özellikle kedi ve köpekte) türe özgü olduğu düşünülmektedir (44).

1.1.1.5.4. SSS Toksisitesi

CPR ve diğer kinolonların düşük dozlarının deney hayvanlarındaki SSS toksisitesi düşük düzeydedir ve genel davranış, lokomotor aktivite ve roto-rod performansında ufak değişikliklerle sınırlıdır. Ancak doza bağlı olarak EEG değişikliklerine, prokonvülsan etkiye ve çok yüksek dozlarda konvülsan aktiviteye neden olduklarını gösteren yayınlar bulunmaktadır (16, 41, 42, 44).

Başlangıçtaki araştırmalar nalidiksik asitin sıçanda sadece hafif eksitator bir EEG değişikliğine neden olduğunu, kedide ise nöbetlere sebep olduğunu göstermiştir (57). Enoksazin ve sparfloksazinin kedide generalize nöbetlere neden olduğu (58, 59); CPR, enoksazin, levofloksazinin iv yoldan eşdeğer dozlarının kedide EEG değişikliklerine ve generalize nöbetlere sebep olduğu (60); ofloksazin, tusofloksazin ise kedide sersemlik yaptığı ve EEG'de inhibitör bir kalıbın gözlendiği bildirilmiştir (44). Nozaki (61) CPR, ofloksazin ve lemofloksazinin ip yüksek dozlarının farede konvülsiyonlara neden olduğunu, oral uygulamayla konvülsiyon görülmediğini bildirmiş, dolayısıyla kinolonların birincil etkisinin SSS eksitasyonu olduğunu ileri sürmüştür. Tüm bu çalışmalar kinolonların SSS'de hem eksitator, hem de inhibitör aktiviteleri olduğunu göstermektedir. 1.1.6.4.'de sözü edilen insandaki zıt etkilerin de aynı mekanizmalara dayandığı sanılmaktadır.

Diğer taraftan, hemen tüm kinolonların yüksek dozda spontan motor aktiviteyi inhibe ettikleri, örneğin nalidiksik asidin yüksek dozda azaltıcı etkisine karşılık düşük dozda arttırıcı etkisinin gözlendiği (57), bu artışın da SSS üzerindeki eksitator etkiye bağlı olabileceği ileri sürülmüştür (44).

Kinolonların SSS etkilerine ilişkin mekanizmalar 1.1.1.6.4.'de anlatılmıştır.

1.1.1.5.5. Üreme Sistemi Toksisitesi ve Gelişimsel Toksisite

Sıçan ve köpekte bazı kinolonlarla (norfloksazin, pefloksazin) uzun dönem toksisite çalışmalarında spermatogenezde bozukluklar ve/veya testiküler hasar saptanmıştır (44).

Sıçan ve tavşanlarda yapılan çalışmalarda, fetal büyüme inhibisyonu; düşük ve ölü doğum sıklığında artış gibi bazı etkiler gözlenmiş ise de teratojen etki saptanmamıştır. Bu ilaçların insanda teratojen olduklarına ilişkin belirgin bir kanıt da bulunmamaktadır (44).

1.1.1.5.6. Genotoksisite

CPR'in yüksek dozlarıyla in vitro koşullarda sıçan hepatositlerinde UDS indüksiyonu saptanırken, in vivo uygulamalarda bu etki gözlenmemiştir (62). Bu bulgular, CPR'in genotoksik etkisinin DNA ile doğrudan etkileşmek şeklinde olmayıp indirekt bir mekanizma ile olduğunu düşündürmektedir (44). Diğer taraftan tampon kapasitesinin zayıf olmasına ve test maddesinin konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak ortamın iyonik gücünde meydana gelebilen değişimler, in vitro testlerde yanlış-pozitif sonuçların elde edilmesine neden olabilmektedir (63).

Düşük doz (0.15-6 mg/kg) CPR uygulamasının fare kemik iliğinde doza bağlı kardeş kromozom değişimi (SCE) artışına neden olduğu (64), ancak klinik çalışmalarda periferik lenfositlerde kromozom hasarı gözlenmediği (65) bildirilmiştir.

Hernekadar ilk çalışmalar kinolonların memeli topoizomera II'sine olan afinitelerinin bakteriyel giraza olan afinitelerinden binlerce kez düşük olduğunu göstermiş ise de, yenilerde yapılan in vivo ve in vitro sitogenetik çalışmalar kinolonların ökaryotik sistemlerde de genotoksik olduğunu kanıtlamaktadır. Bu nedenle, bu ilaçların kromozomal aberasyonları indüklemeye potansiyellerinin kısmen topoizomera II'ye olan afinitelerine bağlı olduğu ileri sürülmüştür (44).

1.1.1.6. CPR'in İnsanda Gözlenen Zıt Etkileri

Klinik araştırmalar ve *postmarketing* veriler, CPR'nin yaşlılar (>65 yaş) ve genç hastalar dahil tüm kullanıcılarda genellikle iyi tolere edilen bir antibiyotik olduğunu göstermektedir. CPR kullanımı ile ilişkili zıt etkilerin hastaların % 9'unda gözleendiği (7, 66); ilacın kesilmesini gerektiren zıt etkilerin ise hastaların sadece % 1.5'unda görüldüğü bildirilmiştir (7).

1.1.1.6.1. Gastrointestinal Yan Etkiler

Diğer tüm antimikrobiyal ajanlarla olduğu gibi, kinolonlarla tedavide en sık rastlanan yan etkiler gastrointestinal (GI) semptomlardır. CPR kullanan hastaların % 5'inde bulantı, kusma, diyare, abdominal ağrı, iştahsızlık, dispepsi ve mide yanması gibi semptomlar gözlenir (9, 7). Ağız kuruluğu, disfaji, gastrik irritasyon, GI kanama, pankreatitis gibi etkilerin görölme sıklığı ise % 1'den azdır (7). Yakınlarda yapılan çift kör düzenli bir çalışmada günde 2 kez 500 mg/kg CPR kullanımıyla % 13 oranında bulantı şikayetinin olduğu belirlenmiştir (67).

Kinolonlarla indüklenen kusma köpeklerde iv uygulama ile de gözlenmiştir. Bu nedenle bu etkinin GI kanal irritasyonundan ziyade, merkezi bir etki ile meydana geldiği sanılmaktadır (44).

1.1.1.6.2. Artropati

1.1.1.5.1.'de anlatıldığı şekilde, genç hayvanlarda artiküler hasara sebep olduğu gösterilen CPR dahil tüm kinolonların bebeklerde, çocuklarda, adolesanda, gebelerde ve emzikli annelerde kullanımı, genel olarak kontrendike kabul edilir. Örneğin FDA pediatrik kullanıma izin vermemektedir (39).

Ancak kullanımın sınırlı olması nedeniyle az sayıda olmakla birlikte, mevcut veriler kinolonların genç hayvanlarda neden olduğu irreversible kıkırdak toksisitesinin, ağır infeksiyonlar için CPR veya diğer kinolonların kullanıldığı çocuklarda gözlenmediğini göstermektedir (68-71).

CPR'in antipseudomonal aktivitesi nedeniyle kistik fibrozisli çocuklarda kullanımına ilişkin çok sayıda veri, hayvanlarda gözlenen etkileri doğrulamamaktadır. Ayrıca, bu hastalarda hastalığın kendisinden kaynaklanan ve kistik fibrozis artraljisi adıyla adlandırılan artralji olasılığı da vardır (68). Schaad ve ark. (69) tarafından çeşitli yaş gruplarında yapılan çalışmalar, zıt reaksiyonların sadece *post-pubertal* hastalarda artralji (2/42 hasta) ve sırt ağrısı (1/42 hasta) şeklinde gözlemlendiğini, ancak iskelet ve kıkırdak hasarına ilişkin klinik ve laboratuvar bulgusunun olmadığını göstermiştir.

Aynı araştırmacıların 13 *pre-pubertal*, 15 *post-pubertal* çocukta yaptıkları prospektif bir çalışmada, 30 mg/kg/gün, oral CPR'in 3 ay süreli kullanımı ve 2 yıllık izleme periyodunda, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) tekniği ile yapılan incelemeler de dahil, zıt etki gösterilmemiştir (70). Lang ve ark. (72) 30 mg/kg/gün dozda 14-21 gün süreli CPR verilen ortalama 4 yaşlarında 21 çocukta yaptıkları 1 yıl süreli izleme çalışmalarında artralji gözlememişlerdir.

Cheesbrough ve ark. (73), invasif salmonellozis için günde 2 kez 10 mg/kg CPR verilen 62 çocuktan sadece 1'inde diz eklemine şişme gözlemişler, ilacın kesilmesi ile 48 saatte semptomların ortadan kalktığını bildirmişlerdir. Ancak bu etkinin septik artrite bağlı olabileceği de düşünülmüştür.

Kinolon kullanımına ilişkin artropatinin yetişkinlerde de gözlemlendiğine ilişkin bazı veriler vardır. Kistik fibrozisli 25 yaşında bir erkekte CPR kullanımı ile her iki dizde kızarma, şişme ve sertleşme gözlenmiş, ilacın kesilmesini takiben 2 hafta içinde geçen semptomlar, CPR'in tekrarlanması ile tekrarlamıştır (74).

Sonuç olarak, mevcut veriler CPR'in ve diğer kinolonların çocuklarda sadece geçici artraljiye neden olduğunu ve etkinin doza ve süreye bağlı olduğunu göstermektedir. Artraljinin daima reversibl olduğu gözlenmiş ve patolojik bir anomali saptanmamıştır. Pediatrik hastalarda CPR ile ilişkili olarak tüm dünyada gözlenen artralji sıklığının % 1.3 olduğu (75); kistik fibrozisli hastaların değerlendirme dışı bırakılması halinde bu sıklığın % 0.06'a düştüğü (68) hesaplanmıştır.

Tüm bu veriler, irreversibl kinolon artropatisinin türe özgü bir toksisite şekli olduğu ve insan duyarlılığının çok düşük olduğu yönündeki görüşlerin güçlenmesine neden olmuştur. Bu konunun uygun araştırmalarla incelenmesinin gerekli olduğu,

hayatı tehdit eden veya konvansiyonel mikrobiyal tedaviye rezistan olan pediatrik infeksiyonlarda kullanımın sağlayacağı yararlar dikkate alındığında, zayıf olduğu görülen kinolon artropatisi riskinin göze alınabileceği tartışılır olmuştur (73). Nitekim FDA'nın, bebeklerde ve çocuklar üzerinde uygun protokollere dayalı araştırmaların yapılmasına olumlu yaklaştığı bildirilmiştir (71).

1.1.1.6.3. Renal Yan Etkiler

CPR kullanan hastaların ≤ 1 'inde serum kreatinin düzeylerinde artış, interstisyel nefrit, disüri, poliüri ve albüminüri gözleendiği bildirilmiştir (75). CPR tedavisinin en ağır renal yan etkisi akut interstisyel nefrittir (76). Bu etki yalnız başına görülebildiği gibi, lenfosit ve/veya renal interstisyumun eosinofil infiltrasyonu ile birlikte, jeneralize bir alerjik reaksiyon tabiatında gözlenebilir (77). İleri yaş (≥ 60 yaş); birlikte veya yakınlarda diğer bir nefrotoksik ilaç alımı ve dehidratasyon predispozisyon faktörleridir (78). İdrarın alkali olması halinde yüksek doz CPR'ın kristalüriye neden olduğu saptanmıştır (14, 79). Diğer taraftan 21 g CPR tableti alan bir hastada (80) ve yüksek doz CPR uygulanan kanser hastalarında (81) akut böbrek yetmezliği geliştiği gözlenmiştir.

1.1.1.6.4. İnsanda SSS Zıt Etkileri-Nörotoksisite

SSS zıt etkileri kinolonların iyi bilinen bir komplikasyonudur. Bu etkilerin görülme sıklığı nispeten düşüktür, çeşitli kaynakların verdiği oranlar % 2 ila 7.4 arasında değişmektedir (41, 54, 82). Hafif nörotoksik etkiler başağrısı, başdönmesi, yorgunluk, uykusuzluk, huzursuzluk ve görme bozukluğunu kapsar. Daha ağır nörotoksik etkiler psikotik reaksiyonlar, halüsinasyonlar, kabus görme, depresyon, ajitasyon, kraniyal hipertansiyon, epileptojenik konvülsif nöbetler olarak tanımlanmıştır, ancak nadir görülürler ($< \% 0.5$).

Bu etkiler daha ziyade, CPR'in dahil birçok kinolonun aşırı doz alımlarında ortaya çıkar. Ancak kısa süreli ve hatta tek doz normal terapötik kullanımda da gözlenir. Özellikle yaşlılarda ve ayrıca çocuklarda görülme sıklığının yükseldiği; epilepsi mevcudiyeti ve/veya konvülsiyon eşiğinde bir düşme, Parkinsonizm,

serebrovasküler kan akımının azalması veya beyinde yapısal bozukluklar gibi predispozisyon faktörlerinin görülme sıklığını arttırdığı; ancak bilinen bir epilepsi hikayesi, psikiyatrik bir bozukluğu veya serebral fonksiyon bozukluğu olmayanlarda da görülebildiği bildirilmiştir (41, 82, 83).

Diğer taraftan, nonsteroidal antienflamatuvar ilaçlarla (NSAİD) birlikte kullanıldıklarında, CPR'in ve diğer birçok kinolon antibiyotığın (ofloksazin, enoksazin gibi), yalnız başına uygulamada konvülsiyon oluşturmeyen dozları ile ağır ve hatta fatal bir konvülsif nöbet tablosunu indükledikleri, bu etkinin insanlarda da gözlemlendiği bildirilmiştir (11, 41, 84).

Benzer etkilerin, genetik olarak epileptik yatkınlığı olan sıçanlarda CPR ve diğer bazı kinolonlarla (norfloksazin, enoksazin gibi) birlikte, aminofilin uygulaması ile de gözlemlendiği bildirilmiştir (85).

CPR'in ve kinolonların yukarıda sözü edilen SSS etkilerinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak genel olarak üzerinde durulan mekanizma, in vitro reseptör bağlama çalışmalarıyla varlığı gösterilen γ -amino bütirik asit (GABA) antagonistik aktiviteleriyle ilişkilidir. Kinolonlar GABA'nın postsinaptik membranlardaki GABA-benzodiazepin reseptörlerine bağlanmasını kompetitif olarak inhibe ederler (86, 87). Ancak son yıllarda, bu mekanizmanın kinolonlarla indüklenen epileptojenik konvülsiyonlardan yalnız başına sorumlu olamayacağı üzerinde durulmuş; dopamin, opioidler, adenosin ve eksitator amino asit reseptörlerinin de rolünün olabileceğini dikkate alan araştırmalar yapılmıştır. Adenosin ve özellikle GABA reseptörlerinde radyoaktif ligandlar kullanılarak yapılan bağlama çalışmaları, bu mekanizmaların kinolonlarla tedavi esnasında karşılaşılan SSS zıt etkilerini öngörme ve açıklama için yeterli olmadığını; ^3H [GABA]'nın reseptöre bağlanması üzerinde kinolon etkisinin zayıf olduğunu ve bunun epileptojenik etkiyi izah etmediğini göstermiştir (86, 88).

NSAİD ilaçlarla kinolon etkileşmelerinin ve dolayısıyla konvülsiyon indüksiyonunun en tipik örneği, fenbufen'le ve onun ana metaboliti olan bifenilasetik asit (BFAA) ile görülür. Bu etkileşmenin kinolonların yaptığı GABA_A reseptör blokajının arttırılması ile ilişkili olduğu yaygın bir görüştür. Nitekim, sıçan vagus sinir preparatlarında GABA_A reseptörü inhibisyonu 250 μM CPR ile mümkün olurken, BFAA varlığında CPR'in IC₅₀ değeri 0.6 μM 'a iner (89). Ancak SSS zıt

etkilerine sahip olmasına karşılık, nalidiksik asidin GABA_A reseptörü için IC₅₀ değeri, BFAA varlığında değişmez (90). Bu da bu etkileşmenin temelinde yatan mekanizmanın sadece GABA inhibisyonu olmadığını göstermektedir.

Florokinolonlar yapısal olarak kinürenik aside ve glutamat reseptörünün diğer endojen ligandlarına benzerlik gösterirler. Bu nedenle ligand-kapılı glutamat reseptörleri ile de etkileşebilecekleri düşünülmüştür. N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptörünün glutamat bağlayıcı bölgesinin selektif antagonisti olan AP-5 veya AP-7'nin kinolonların prokonvülsif etkilerini antagonize etmeleri bu görüşle uyumludur (91). Ancak reseptör bağlanma çalışmalarında ne iyon, ne de ligand-kapılı glutamat reseptörlerine spesifik afinite saptanmamıştır (88, 92).

Dolayısıyla kinolonların SSS etkilerinin ve özellikle konvülsif potenslerinin moleküler hedefi veya nöronal reseptör tipi tam olarak belirlenebilmiş değildir. Ancak yakın yıllarda yapılan bir çalışmada fizyolojik olarak intakt bir model olarak sıçan hipokampus kesitleri kullanılmış, CPR ve diğer çeşitli kinolonların eksitator potansiyelleri NMDA reseptörlerince zengin CA1 bölgesinde yapılan elektrofizyolojik saha potansiyeli ölçümleri ile belirlenmiştir (93). Kinolonların beyindeki terapötik konsantrasyonlarına uygun bir doz aralığında (0.5 ve 4 µmol/L) yapılan ölçümlerde, incelenen tüm kinolonların popülasyon spike amplitüdünü konsantrasyona bağımlı bir şekilde arttırdıkları; CPR'in potensinin orta derecede olduğu, yeni kuşak kinolonların aktivitelerinin ise daha yüksek olduğu gözlenmiştir. NMDA reseptörü iyon kanalının, selektif bir antagonist, MK-801 ile bloke edilmesi halinde kinolon toksisitesinin doza bağlı olarak azaldığı gözlenmiş, bu nedenle de kinolonların eksitator etkilerinde NMDA-kapılı iyon kanallarının muhtemel hedef olduğu ileri sürülmüştür (93).

Aynı çalışmada, inkübasyon ortamındaki Mg⁺⁺ konsantrasyonlarında yapılan ufak değişikliklerin kinolon etkisini önemli ölçüde amplifiye ettiği saptanmıştır. Araştırmacılar, Mg⁺⁺'la şelasyon yapma özelliğinin kinolonların kıkırdak üzerindeki toksik etkileri için de bir mekanizma olarak düşünüldüğünü dikkate alarak (55), kinolonların eksitator potenslerinin NMDA reseptörü iyon kanalındaki Mg⁺⁺ bloğunu ortadan kaldırmak suretiyle NMDA aktivasyonuna neden olmak esasına dayandığını ileri sürmüşlerdir.

1.1.1.6.5. Fototoksisite

Eritem, kaşıntı, ürtiker, döküntü şeklinde kütanöz aşırı duyarlık reaksiyonlarının görülme sıklığı CPR dahil tüm kinolonlar için % 1-4 olarak bildirilmektedir (7, 51, 54). Bu zıt etkilerin çoğunun hafif veya orta şiddette olduğu, anafilaktik reaksiyon ve anjiyonörotik ödem gibi ağır zıt etkilerin % 0.1'den daha az oranda gözlemlendiği bildirilmiştir (7, 39).

Kinolon grubu antibiyotiklerin prototipi olan nalidiksik asit, başlangıçtan beri fototoksik bir madde olarak tanımlanmıştır. Daha sonra CPR, enoksazin ve bilinen tüm kinolonların da fototoksisite reaksiyonlarına neden olduğu, ancak reaksiyon sıklığı ve şiddetinin, ilacın cinsine bağlı olarak 100 keze varan farklar gösterdiği saptanmıştır (94). Klinik belirtiler, güneş gören cilt bölgelerinde hafif eritem gelişmesinden ağır büllü erüpsiyonlara kadar gidebilmektedir.

Kinolon fototoksisitesinin patofizyolojisi sürekli ilgi konusu olmuştur, ancak tam olarak aydınlatılmış değildir. Halen en geçerli hipotez, kinolonların fotodegradasyon ürünleri ve/veya reaktif oksijen bileşikleri vermek üzere ışıkla etkileşmeleridir (51, 95). Sonuçta meydana gelen bu iki ürün grubundan birinin veya her ikisinin doku hasarına neden olduğu sanılmaktadır. Yapı-aktivite çalışmaları fotoreaktiviteyi ve dolayısıyla fototoksisiteyi en çok etkileyen moleküler yapının kinolin çekirdeğinin C8 pozisyonundaki süstitüent olduğunu, bu pozisyonda CPR'de olduğu gibi hidrojen bulunmasının veya fleroksazin, lemfloksazinde olduğu gibi fluor bulunmasının fototoksisiteyi arttırdığını (96); moksifloksazinde olduğu gibi metoksi grubu mevcudiyetinin ise UVA ışığına stabiliteyi artırıp fototoksisiteyi azalttığını göstermiştir (97). Ayrıca ilacın hidrofobisitesine, dolayısıyla hücrel membranları geçme yeteneğine bağlı olarak, farklı hücrel hedeflerde lokalizasyonun da fototoksisite potansiyelini etkilediği; örneğin nalidiksik asidin fototoksisitesinin membrana bağlı reaksiyonlarla indüklenebildiği, CPR'in bu etkisinin ise bilinmeyen bir hücre içi hedef (belki DNA) aracılığında meydana geldiği ileri sürülmüştür (98).

Wagai ve ark. (99-101) bir fare kütanöz fototoksisite modeli üzerinde, CPR ve çeşitli diğer kinolonların oral uygulanması ile yaptıkları çalışmalarda, hayvanlara allopurinol, katalaz, β -karoten, butil hidroksi tolüen (BHT) gibi antioksidanların

önceden verilmesinin koruyucu etki gösterdiğini bulmuşlardır. Gözlenen fototoksisitenin ksantin oksidaz yolağında oluşan reaktif oksijen bileşiklerine bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Aynı araştırmacılar fare 3T3 fibroblast hücrelerini CPR ve diğer kinolon çözeltileri ve UVA'ya maruz bıraktıklarında sitotoksisite gözlemişler; bu fototoksisitenin katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) ile önlendiğini bildirmişler ve kinolonların UVA ile etkileşimleri sonucunda süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^\cdot$) oluştuğunu ileri sürmüşlerdir (102, 103).

CPR çözeltilerinin farklı dalga boylarında UV ve görünür ışıkla iradyasyonu ile yapılan çalışmalarda, ilacın antimikrobiyal aktivitesinin görünür ışıktan etkilenmediği, fakat ~ 320 nm dalga boyunda UV radyasyonu ile maksimum düzeyde aktivite kaybı olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada daha uzun dalga boylu UV (UVA) radyasyonu ile gözlenen aktivite kaybı üzerinden yapılan hesaplamalar, insanın pencere camından geçen gün ışığına (> 320 nm) temasıyla veya güneşlenerek UVA'ya maruz kalması ile cilt dokusundaki ve dolaşımdaki CPR düzeylerinin fotodegradasyona uğrayıp, önemli ölçüde düşebileceğini göstermektedir (104). Yaz aylarında gün ortasında 4 saat güneşe maruz kalmanın antibiyotik aktivitesini % 50 oranında düşüreceği hesaplanmıştır (104).

UVA'ya maruz bırakılan CPR (ve diğer bazı kinolon) çözeltileri ile yapılan yeni bir çalışmada, singlet oksijen ve O_2^- oluşumu gösterilmiş, ancak kinolonların fototoksisite potansiyellerinin singlet oksijen verileri ile korele olmadığı, O_2^- verileri ile daha iyi bir uyum gösterdiği saptanmıştır. C8'de fluor taşıyan kinolonların fototoksisite mekanizmasının ise daha büyük bir olasılıkla, ışık etkisiyle oluşan F atomunun kaybını takiben, yüksek reaktiviteye sahip karben oluşumuna dayandığı; hatta bunun fotokarsinojenik potansiyel ile de ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (94).

Klinik öncesi çalışmalar kinolonların karsinojenik potansiyelinin olmadığını göstermiştir. Ancak özel bir fare türünde bazı kinolonların (nalidiksik asit, lomefloksazin, fleroksazin, ofloksazin) fotomutajenik ve fotokarsinojenik potansiyellerinin olduğu gözlenmiştir (51, 94). UVA'ya 78 hafta kronik temasla gözlenen bu cilt tümörlerinin, lomefloksazinle olanlar dışında, iyicil olduğu bildirilmiştir. Ancak bu çalışma metodoloji yönünden tartışmalıdır (44).

1.1.1.6.6. Hepatotoksisite

CPR alanların % 2'sinde ALT ve AST'de artış, < % 1'inde alkalen fosfataz ve diğer enzimlerde artış olduğu; nadir olmakla birlikte ağır ve ani ve bazen fatal hepatik yetmezlik olgularının; kolestazisin gözlemlendiği bildirilmiştir (105, 106).

1.1.1.6.7. İmmün Sistem Üzerindeki Etkileri

Fluorokinolonların terapötik dozlarda immün sistemde etkili olmadıkları, ancak çok yüksek dozlarda deney hayvanlarında immünosüpressif etkiler gösterdikleri bildirilmiştir (39). İn vitro doğrudan bir etkilerinin olduğu gözlenmemekle birlikte, in vivo uygulamada kemik iliği graftları reddini arttırdıkları saptanmıştır (107). Diğer taraftan CPR'in stres cevabı ile sitokin süperindüksiyonu arasındaki ilişkiyi tetiklediği bildirilmiştir (108).

1.1.1.7. İlaç Etkileşmeleri

Fluorokinolonlar ve CPR çeşitli ilaçlar ve besin öğeleri ile farmakokinetik veya farmakodinamik tipte çeşitli etkileşmelere girerler.

Alüminyum, kalsiyum veya magnezyum içeren antiasitler; bizmut subasetat ve sükralfat; demir sülfat ve çinko içeren multivitaminler CPR'in absorpsiyonunu klinik olarak önemli düzeyde azaltırlar (109). CPR biyoyararlanımının, kalsiyum karbonat ile birlikte uygulandığında ~ % 60 oranında, alüminyum hidroksit ile birlikte ise ~ % 15 oranında azaldığı bildirilmiştir (110). CPR'den 2 saat önce alınan CaCO_3 , H_2 antagonistleri, simetidin ve ranitidin ilacın biyoyararlanımını etkilemez. Besinlerle birlikte CPR alımı absorpsiyonu genel olarak etkilemez. Ancak süt, yoğurt gibi kalsiyumca zengin besinlerle birlikte alındığında CPR'in biyoyararlanımı % 30-36 azalır (111, 112).

CPR ksantin türevi ilaçlarla, özellikle kafein ve teofilin ile birlikte alındığında, ksantinlerin klerensinde azalmaya ve eliminasyon yarı ömründe uzamaya neden olur. Bu etkileşmeler, diğer bazı kinolonlara, özellikle de enoksazine kıyasla düşük olmakla birlikte klinik olarak önemli düzeydedir (113, 114). Gerek

insan gerekse sıçan hepatik mikrozomlarında veya gen transferi yapılmış hücre kültürlerinde yapılan in vitro çalışmalar, CPR dahil çok sayıda kinolonun sitokrom P-450'nin CYP1A2 izozimini kompetitif olarak inhibe ettiğini göstermiştir (115, 116). Oysa kafein ve teofilinin hepatik metabolizmasının ilk kademesini oluşturan demetilasyon yolağından bu izozim sorumludur (117, 118). Nitekim kafein, ilaç metabolizması için hepatik kapasitenin ölçümünde ve CYP1A2'nin indikatörü olarak kullanılmaktadır (119).

CPR'in ve çeşitli diğer florokinolon türevi antibiyotiklerin sıçan hepatik mikrozomlarında CYP3A2 ve insan hepatik mikrozomlarında CYP3A4 izozimlerini de inhibe ettiği gösterilmiştir (120). Esas olarak CYP3A tarafından metabolize edilen siklosporin A ile (121) özellikle pediatrik renal transplantasyon hastalarında gözlenen fluorokinolon etkileşmesinin bu inhibitör etkiden kaynaklandığı anlaşılmaktadır (120, 122). Dolayısıyla CPR'in CYP3A- ve CYP1A-aracılığında metabolize olan ilaçlarla etkileşmesi olasılığı yüksektir ve bu etkileşmelerin, yüksek doz uygulamalarında klinik olarak önemli sonuçlara yol açması söz konusudur (114, 120).

CPR ve çeşitli diğer fluorokinolonlar, seyrek görülmekle birlikte, varfarin ile etkileşerek protrombin zamanının uzamasına neden olurlar (123). Olası mekanizmalar varfarin eliminasyonunun inhibisyonu, proteine bağlanmasının azalması ve K vitamininin sentezlendiği barsak florasının inhibisyonudur (112).

1.2. Oksidatif Stres, Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma

Oksidatif stres, organizmanın prooksidanları ile antioksidan sistemleri arasındaki dengenin prooksidanlar yönünde bozulması olayı olarak tanımlanır (124). Oksidatif stresi meydana getiren üç ana kaynaktan söz edilebilir (125): (1) Endojen ve/veya eksojen kaynakların aşırı aktivitesi sonucu hücredeki oksidan yükün aşırı artması; (2) Antioksidanların diyetle alımında önemli düzeyde azalma olması; veya (3) Hücredeki radikal oluşum oranı ile hücrenin antioksidan düzeyleri 'normal' sınırlarında olmasına rağmen, aradaki dengenin radikaller lehinde bozulması.

Hücreler, karşı karşıya kaldıkları orta düzeyde oksidatif hasarı, antioksidan savunma sistemlerinin kapasitesini arttırarak tolere edebilirler. Yüksek düzeyde oksidatif stres karşısında ise DNA hasarı, hücre içi serbest Ca^{++} ve demir düzeyinde artma, proteinlerde (membranal iyon taşıyıcı proteinler de dahil) hasar ve lipid peroksidasyonu meydana gelir. Böylece oksidatif stres, hücre hasarı ve hücre ölümüyle sonuçlanabilir (126). Oksidatif stresin farklı moleküler hedeflerde meydana getirdiği hasarın nisbi önemi, oluşan oksidatif stresin büyüklüğüne, hangi mekanizma ile meydana geldiğine, süresine ve bu olaya maruz kalan sistemin karakterine de bağlıdır (127).

1.2.1. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Bileşikleri

Serbest radikal, bir veya birden çok eşlenmemiş elektron içeren ve bağımsız hareket eden herhangi bir yapı (atom, iyon veya molekül) olarak tanımlanır (126). Serbest radikaller bu yapısal özellikleri nedeniyle eşlenmemiş elektronlarını diğer bir moleküle verebilen veya kendi elektronlarını eşlemek üzere başka bir molekülden elektron çalan çok reaktif bileşiklerdir. (126).

Radikallerin radikal olmayan bileşiklerle reaksiyonları aşağıdaki şekillerde olabilir. Radikal,

- i) Eşlenmemiş elektronunu radikal olmayan bir bileşiğe verebilir (redükleyici radikal),
- ii) Eşlenmemiş elektronunu eşlemek üzere bir başka molekülden elektron alabilir (okside edici radikal),

iii) Radikal olmayan bileşiğe katılabilir.

Bu reaksiyonların sonunda radikal olmayan bileşik de radikal haline gelir. Bu nedenle serbest radikallerin radikal olmayan bileşiklerle reaksiyonları, birbirini izleyen 'zincir reaksiyonlar' şeklinde yürür (128).

Biyolojik sistemlerdeki serbest radikaller oksijen, karbon veya kükürt atomu merkezlidir. Ancak ilgi ve araştırmaların büyük çoğunluğu oksijen merkezli radikaller üzerinde yoğunlaşmıştır. 'Reaktif oksijen bileşikleri' terimi, O_2^- ve $OH^\bullet$ radikali gibi oksijen merkezli radikallerin yanısıra, zarar potansiyeline sahip singlet oksijen ($^1\Delta_g$), H_2O_2 , hipoklorik asit ($HOCl$) ve ozon (O_3) gibi radikal olmayan oksijen türevi grupları tanımlamak için kullanılır (127). Tablo 1.6.'da biyolojik öneme sahip bazı serbest radikal tipleri görülmektedir.

Tablo 1.6. Biyolojik öneme sahip bazı serbest radikaller.

Radikalın Tipi	Genel Yapısı
C-merkezli radikaller	$R-\dot{C}H-R$
O-merkezli radikaller	O_2^- ve $OH^\bullet$
H-merkezli radikaller	$H^\bullet$
N-merkezli radikaller	$R_2\dot{N}$
S-merkezli radikaller	$R-\dot{S}$
Aromatik radikaller	Fenoksil radikali

Reaktif oksijen bileşikleri insan vücudunda endojen ve eksojen kaynaklı olarak sürekli meydana gelir. Ancak organizmalar, sahip oldukları savunma sistemleri sayesinde bu bileşiklere karşı korunurken, onarım sistemleri yardımıyla da oksidatif hasara uğramış moleküllerin birikmesini önlerler (127).

1.2.1.1. Serbest Radikallerin Endojen Kaynakları

Serbest radikallerin *in vivo* ana oluşum kaynakları şu şekilde sıralanabilir:

(i) Normal aerobik solunum: Reaktif oksijen bileşiklerinin *in vivo* koşullarda ana oluşum kaynağı, adenozin trifosfat (ATP) sentezinin olduğu oksidatif metabolizma esnasında, mitokondriyal solunum zincirinden elektron sızıntısıdır. Bu olay sonucunda O_2^- anyonu ve bunun dismutasyonu ile H_2O_2 meydana gelir. Toplam elektron sızıntısının % 3-5'inin reaktif oksijen bileşiklerinin oluşumu ile sonuçlandığı bildirilmiştir (129).

(ii) Fagosit aktivasyonu: Organizmanın nötrofiller, monositler, eosinofiller ve makrofajlar aracılığı ile mikroorganizmalara ve diğer uygun stimuluslara karşı kullandığı en güçlü silah NADPH-aracılığında oluşturduğu serbest radikallerdir. Uygun stimulusla birkaç saniyede aktive olan fagositler anormal derecede yüksek oksijen kullanırlar (solunum patlaması=respiratory burst) ve sonuçta O_2^- , H_2O_2 , HOCl ve nitrik oksit (NO^*) meydana gelir. Ancak aşırı fagosit aktivasyonu (romatoit artritte olduğu gibi) reaktif oksijen bileşiklerine bağlı doku hasarı ile sonuçlanır.(130, 131)

(iii) Peroksizomlar: Eter lipid biyosentezi, kolesterol ve dolikol metabolizmasında önemli rol oynayan ve çeşitli katabolik ve anabolik yollar için elzem enzimleri taşıyan peroksizomlar, sahip oldukları yüksek konsantrasyondaki oksidazlar nedeniyle önemli miktarda H_2O_2 üretirler (132).

(iv) Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri: Doymamış yağ asitlerinin ve ksenobiyotiklerin oksidasyonundan sorumlu sitokrom P-450'ler aracılığı ile oluşan serbest radikaller hem organel içinde, hem de organel dışında sitozolik reaksiyonlara girebilirler. Nükleer kaynaklı radikallere DNA'nın duyarlılığı yüksektir (133).

(v) Pürin, katekolamin ve prostanoid gibi endojen maddelerin ksantin oksidaz, monoamin oksidaz, lipooksijenaz gibi spesifik enzimlerle, özellikle de oksidazlar aracılığında yürüyen metabolizmaları esnasında serbest radikaller meydana gelir. Ayrıca ksenobiyotiklerin sitokrom P-450 aracılığında yürüyen metabolizmaları esnasında serbest radikaller oluşur (134, 135).

(vi) Plazma membranları: Fosfolipid içerikleri nedeniyle hem serbest radikal oluşturma, hem de serbest radikallere hedef olup sonuçta gelişen zincir reaksiyonlarının ve lipid peroksidasyonunun yeri olma özelliğine sahiptirler. Serbest radikal oluşumu, araşidonik asidin lipooksijenaz ve siklooksijenazlarla oksidasyonu esnasında gerçekleşir (136).

(vii) Hücre içi küçük moleküllerin oksidasyonu: Tiyoller, hidroksikinonlar, katekolaminler, tetrahidropteridinler, flavinler gibi bazı bileşiklerin sulu ortamda uğradıkları oksido-redüksiyon reaksiyonlarında serbest radikaller oluşur (137).

(v) Vasküler tonusun regülasyonunda kullanılan NO^* , endotelial hücrelerde L-arjininden nitrik oksit sentaz aracılığıyla sentez edilir. Çeşitli başka hücre tiplerinde de NO^* sentezi yapılır ve NO^* hücre membranlarını kolayca aşarak ikincil ulak rolü oynar. Ancak fazla NO^* sitotoksiktir. Aşırı NO^* kronik enflamasyon, inme ve septik şok gibi koşullarda doku hasarının nedenidir (126).

(vi) Süperoksit dismutazın veya amino asit oksidazlar gibi çeşitli oksidaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlar sonucunda O_2^- anyonundan, dismutasyon ile, H_2O_2 meydana gelir (138).

(vii) H_2O_2 'in, Fe^{++} ve Cu^{++} gibi geçiş metalleri ile katalizlenen bir reaksiyon sonucu O_2^- anyonu ile etkileşmesiyle (Haber-Weiss reaksiyonu) OH^* meydana gelir (139).

(viii) Fibroblastlar ve lenfositler ekstraselüler ortama, fagositlere oranla daha düşük düzeyde olmak üzere, O_2^- anyonu ve H_2O_2 salıverirler (140, 141).

1.2.1.2. Serbest Radikallerin Eksojen Kaynakları

Serbest radikallerin eksojen kaynaklarını radyasyon (x-ışınları, γ -ışınları ultraviyole), sigara dumanı, pestisitler, organik solvanlar gibi çevresel kirleticiler, çeşitli ilaçlar, ısı ve hiperoksik çevreyi de kapsayan etmenler oluşturur. Başta bazı ilaçlar olmak üzere bu bileşiklerin bir kısmı, hedef dokularda oksidatif hasara neden olduğu gösterilmiş olan serbest radikal ara ürünlerine metabolize olurlar (127).

Ksenobiyotiklerin oksidatif stresi indüklemesi çeşitli şekillerde olabilir (124, 133). Bazı ksenobiyotikler;

(i) Kendileri serbest radikal yapısındadırlar veya serbest radikal içerirler (NO, NO₂, sigara dumanı, is, katran gibi).

(ii) Kendileri serbest radikal değildir, fakat yüksek reaktiviteye sahiptir ve organizmada serbest radikal oluştururlar (O₃, ¹Δg, H₂O₂)

(iii) Oksidatif yollarla metabolize edilirler. Bu sırada meydana gelen epoksit metabolitlerinin uğradığı siklik oksido-redüksiyon yolağında serbest radikaller oluşur (benz(a)piren ve diğer polisiklik aromatik hidrokarbonlar).

(iv) Redoks siklusuna girerler. Tek elektron transferi ile enzimatik olarak redüklenmeyi takiben oluşan radikal yapısındaki ara ürünler (örneğin, semikinonlar) ootoksidasyona uğrar. Bu esnada bu ilave elektronlarını moleküler oksijene aktararak O₂⁻ anyonu oluştururlar ve diğer reaktif oksijen bileşiklerinin meydana gelmesine yol açan reaksiyonları indüklerler (kinonlar, adriamisin, mitomisin C, parakuat, aromatik nitro bileşikler gibi).

1.2.1.3. Serbest Radikallerin Reaktiviteleri-Biyolojik Aktiviteleri

Serbest radikaller yüksek reaktiviteleri nedeniyle, organizmada hücresel oksidatif hasara yol açan maddelerdir. Ancak belirli bir dengeyi sürdürmek koşulu ile, bazılarının yararlı fizyolojik aktiviteleri vardır: Fagositik hücrelerin işlevlerini O₂⁻, H₂O₂ ve HOCl aracılığında yerine getirmeleri; NO[•] 'in vasküler tonusu regüle etmesi gibi (142).

1.2.1.3.1. Süperoksit Anyonu

Oksijenin bir elektron alarak redüksiyona uğraması sonucu meydana gelir (Eşitlik 1.1). O₂⁻ anyonu çok güçlü bir oksidan değildir, ancak daha potent oksidanların oluşumuna neden olacak reaksiyonlar zincirini başlatabilme potansiyeline sahiptir.



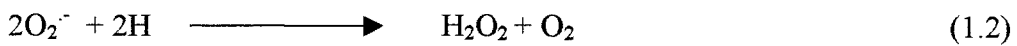
O_2^- anyonu insan vücudunda adrenalin, dopamin, tetrahidrofolat gibi bileşiklerin ve mitokondrial ve sitokrom P-450 elektron transport zincirinin bazı bileşenlerinin O_2 ile reaksiyonu sonucu kaçınılmaz olarak meydana gelir. Ayrıca organizma kasıtlı olarak da O_2^- anyonu yapar. Örneğin fagositler (nötrofiller, makrofajlar, eosinofiller) savunma mekanizmalarının bir parçası olarak önemli miktarlarda O_2^- anyonu üretirler (126).

O_2^- anyonu $OH^\bullet$ radikalinden daha az reaktif olmasına rağmen, çeşitli moleküllerle reaksiyona girebilir ve genellikle redükleyici bir ajandır. Örneğin, O_2^- anyonu $NO^\bullet$ radikali ile hızla reaksiyona girerek peroksinitrit ($ONOO^-$) meydana getirir. Bu reaksiyonla $NO^\bullet$ radikalini uzaklaştırması nedeniyle, O_2^- anyonunun bir vasokonstriktör olarak da etki yapabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle, vasküler ortamda fazla miktarda meydana gelen O_2^- anyonunun hipertansiyon ve vazospazm oluşumuna neden olabileceği ileri sürülmüştür (127).

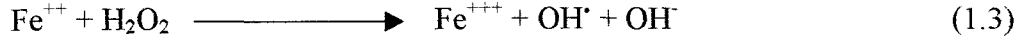
O_2^- anyonu *in vivo* ortamda oksidan olarak da etki eder. O_2^- anyonunun, dihidroksiasit dehidrataz, akonitaz ve 6-fosfoglukonat dehidrataz gibi demir-sülfür $[4Fe-4S]$ grubu taşıyan bazı bakteriyal enzimleri inaktive edebildiği gösterilmiştir (143, 144). $[4Fe-4S]$ grubundan salıverilen demir, H_2O_2 ile $OH^\bullet$ meydana getirmek üzere reaksiyona girebilir veya H_2O_2 ile reaksiyona girmeden önce DNA'ya bağlanarak mutasyona ve bazların hidroksilasyonuna neden olabilir (145).

1.2.1.3.2. Hidrojen Peroksit

In vivo ortamda oluşan O_2^- anyonunun büyük bir kısmı, nonenzimatik yollarla veya SOD'ın katalizlediği reaksiyon ile radikal yapısında olmayan H_2O_2 'e dönüşür (Eşitlik 1.2). H_2O_2 , monoamin ve amino asit oksidazlar gibi çeşitli oksidaz enzimleri tarafından da doğrudan üretilebilir. Ksantin oksidazın, hipoksantini ksantine ve ksantini ürata dönüştürmesi sırasında da oksijen, O_2^- 'e ve H_2O_2 'e indirgenir (126).



O_2 ve H_2O_2 , Fe^{++} ve Cu^{++} gibi geçiş metallerinin varlığında $OH^\bullet$ radikali meydana getirebilir. Bu reaksiyon *Fenton Reaksiyonu* (Eşitlik 1.3) olarak adlandırılır:



H_2O_2 , suya benzer şekilde, hücre içine veya hücreler arasında kolaylıkla difüze olur. Reaktivitesi azdır. Fakat yüksek konsantrasyonda ($> 50 \mu M$) H_2O_2 , çeşitli hücresel hedeflerle reaksiyona girip bakteri, bitki ve hayvan hücrelerinin hasarına ve ölümüne neden olur (146). H_2O_2 , proteinlerdeki sülfidril ve metionil yapılarını oksitleyebilir ve lipid peroksidasyonuna neden olabilir (147). Çeşitli mekanizmalarla, örneğin glikolitik enzim, gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenazın esansiyel bir -SH grubunu okside ederek inaktive etmek suretiyle ATP yapımını bozar (148).

O_2^- ve H_2O_2 'in toksisitelerinin büyük kısmı $OH^\bullet$ oluşturmalarından kaynaklanır. Örneğin memeli hücresinin fazla H_2O_2 'e maruz kalması DNA sarmal kırıklarına ve baz modifikasyonlarına neden olur. Bu etkilerin temelinde $OH^\bullet$ 'nin DNA ile etkileşmesi yatar (131, 138).

1.2.1.3.3. Hidroksil Radikali

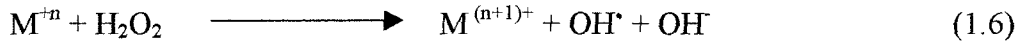
Bilinen en reaktif ve sitotoksik oksijen radikali $OH^\bullet$ 'dir. $OH^\bullet$ güçlü bir oksidan olup, hücrenin hemen tüm bileşenleri ile reaksiyona girebilir ve sonuçta serbest radikal zincir reaksiyonlarının sürekli çoğalıp ilerlemesine (*propagation*) neden olur (149). $OH^\bullet$ 'nin ana oluşum mekanizması hidrojen peroksitin redüktif olarak yıkımlanmasıdır (Eşitlik 1.4). 1.2.1.3.2.'de ayrıntılı olarak anlatılan *Fenton reaksiyonu* (Eşitlik 1.3) ile; ayrıca O_2^- 'in $HOCl$ ile reaksiyonu ile (Eşitlik 1.5) ve $ONOO^-$ 'in yıkımlanması ile de $OH^\bullet$ oluşur.





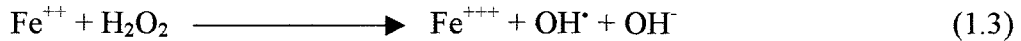
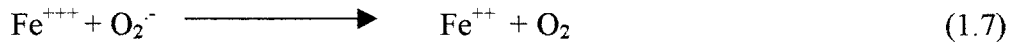
1.2.1.4. Geçiş Metal İyonları ve Serbest Radikal Reaksiyonları

Geçiş metal kimyasının en önemli özelliği bu metallerin farklı oksidasyon sayılarına sahip olmalarıdır. Örneğin, demir (Fe^{++} veya Fe^{+++}) ve bakır (Cu^+ veya Cu^{++}) iki ayrı değeriğe sahiptir. Bu özellikleri nedeniyle geçiş metalleri tek elektron transfer reaksiyonlarına katılarak serbest radikal reaksiyonlarını kolaylaştırabilirler (127). Dolayısıyla geçiş metalleri H_2O_2 'i tek elektron reaksiyonu ile indirgeyip $\text{OH}^{\cdot}$ oluşturabilirler (Eşitlik 1.6).



Yukarıdaki reaksiyonda M^{+n} bir metal iyonudur, Ti^{+++} , Cu^+ , Fe^{++} , Co^{++} veya Ni^{++} olabilir. Bu reaksiyonların hepsi metal toksisitesi yönünden önemli olmakla birlikte, normal *in vivo* koşullarda sadece ve Fe^{++} ve Cu^+ 'a bağımlı reaksiyonlar önem taşır. Bu nedenle organizmada düşük reaktiviteli radikallerin daha reaktif olanlara dönüşümünde, demirin ve son yıllarda önemi anlaşılmaya başlanmış olmakla birlikte bakırın önemli rolü vardır.

Fe^{+++} $\text{O}_2^{\cdot-}$ ile reaksiyona girerek Fe^{++} 'ye indirgenir (Eşitlik 1.7). Meydana gelen Fe^{++} , *Fenton Reaksiyonu*yla (Eşitlik 1.3) H_2O_2 'i yıkımlayarak $\text{OH}^{\cdot}$ oluşturur.



1.8 numaralı eşitlik 'Haber-Weiss Reaksiyonu' veya 'Süperoksit Aracılı Fenton Reaksiyonu' adıyla anılır ve hücrelerde, özellikle bazı patolojik koşullarda (örneğin iskemik-perfüzyon hasarında) oluşan $\text{OH}^\bullet$ 'lerinin ana kaynağıdır (139).

In vivo $\text{OH}^\bullet$ oluşumunun en güçlü indükleyicisi demirdir. Ancak bakır iyonları da H_2O_2 ve $\text{O}_2^{\bullet -}$ 'den $\text{OH}^\bullet$ oluşturabilirler (139). Ayrıca bakır ve demirin hasar yapıcı etkileri sadece $\text{OH}^\bullet$ oluşturmaları ile ilgili değildir. Bu iki geçiş metali otooksidasyon reaksiyonlarını ve lipid peroksidasyonunu da hızlandırabilirler; lipid hidroperoksitlerini peroksil ve alkoksil radikallerine yıkımlayabilirler ve böylece peroksidasyon döngüsüne yeni yağ asidi zincirlerinin girmesini sağlayabilirler (126). Bakırın, özellikle aterosklerotik lezyonlardaki, düşük dansiteli lipoprotein (LDL)lerin oksidasyonunu hızlandırdığı bildirilmiştir (150).

Ancak organizmada bakır ve demir iyonlarının bu reaktif formları düşük düzeyde bulunur. Çünkü organizma demir ve bakır katalitik olmayan formlarda güvenle taşıyıp saklayan transport (transferin gibi) ve depo (demir için ferritin ve hemosiderin, bakır için serüloplazmin gibi) proteinlere sahiptir (139). Dolayısıyla bu tutulma (sekestrasyon) mekanizmaları antioksidan savunmaya önemli katkıda bulunurlar. Ancak $\text{O}_2^{\bullet -}$ ve H_2O_2 katalitik metal iyonlarını serbestleştirebilme yeteneğine sahiptirler (139). $\text{O}_2^{\bullet -}$, ferritinden az da olsa demir iyonlarının serbestleşmesini sağlayabilir (151); demir-sülfür proteinlerine saldırarak demir açığa çıkarabilir (152). H_2O_2 miyoglobinin, sitokrom c'nin ve hemoglobinin *hem* halkalarından, demir salımını sağlayabilir (153). ONOO^- ise serüloplazminden bakır çıkarabilir (154). Ayrıca hücreler düşük miktarda demir taşırlar. Bu intraselüler demirin hücrenin lizisi ile çevresel dokulara yayılması oksidatif hasarı hızlandırabilir. Tablo 1.7'de, düşük reaktif özelliğe sahip bileşiklerden yüksek reaktiviteye sahip bileşiklerin meydana gelişinde, demir ve diğer metallerin katalitik etkileri özetlenmiştir.

Tablo 1.7. Düşük Reaktiviteye Sahip Bileşiklerin Reaktif Bileşiklere Dönüşümünde Demir ve Diğer Metallerin Rolü (139).

$O_2^- + H_2O_2$	$\xrightarrow{Fe^a}$	$OH^\bullet$
Lipid peroksitler (ROOH)	$\xrightarrow{Cu/Fe^b}$	$RO^\bullet$ (alkoksil), $RO_2^\bullet$ (peroksil), sitotoksik aldehitler
Tiyoller (RSH)	$\xrightarrow{Fe/Cu + O_2^c}$	O_2^- , H_2O_2 , $OH^\bullet$, $RS^\bullet$ $\xrightarrow{O_2}$ $RSO_2^\bullet$, $RSO^\bullet$ ^d
NAD(P)H	$\xrightarrow{Fe/Cu + O_2^c}$	$NAD(P)^\bullet$, O_2^- , H_2O_2 , $OH^\bullet$
Askorbik asit	$\xrightarrow{Cu/Fe^e}$	semidehidroaskorbat radikali, $OH^\bullet$, H_2O_2 , askorbatın bozunma ürünleri
Katekolaminler, otookside olabilen diğer moleküller	$\xrightarrow{Cu/Fe/Mn + O_2^c}$	O_2^- , H_2O_2 , $OH^\bullet$, semikinonlar (veya oksitleyici bileşiklerden türeyen diğer radikaller)

^a Demirin katalizlediği Haber-Weiss reaksiyonu.

^b Lipid peroksitlerin dekompozisyonu metal iyonlarına bağlıdır ve sonuçta 4-hidroksi-2,3-trans-nonenal gibi yüksek ölçüde sitotoksik veya malondialdehit gibi daha az toksik ürünler meydana gelir.

^c Otooksidasyon reaksiyonları da denilen bu reaksiyonların bir çoğu eser miktarda geçiş metal iyonu tarafından stimüle edilir ve serbest radikal reaksiyonlar ile devam eder.

^d Tiyil ($RS^\bullet$) radikalleri oksijen ile sülfenil ($RSO^\bullet$) veya tiyil peroksil ($RSO_2^\bullet$) gibi reaktif oksisülfür radikalleri oluşturmak üzere reaksiyona girebilir.

^e Askorbik asitin yıkımında özellikle bakır iyonları etkilidir ve askorbat-bakır ve askorbat-demir karışımları sitotoksiktir. Bu toksisitede $OH^\bullet$ de rol alır.

1.2.1.5. Serbest Radikal Hasarı-Oksidatif Stresin Sonuçları

Serbest radikaller protein, lipid, karbonhidratlar, nükleik asitler ve nükleotidler üzerinde hasar yapma kapasitesine sahiptir (155). Organizmada antioksidan savunma mekanizmasının kapasitesini aşacak düzeyde oluştuklarında hücrel bileşenlerle reaksiyona girip, metabolik ve hücrel bozukluklara neden olurlar.

Ağır oksidatif stres hücre metabolizmasında ağır bozukluk ve değişikliklere neden olur: DNA zincir kırıkları, mutasyonlar, baz modifikasyonları, intraselüler kalsiyum yükselmesi, membranal iyon taşıyıcılarının ve/veya diğer spesifik proteinlerin hasarı ve lipid peroksidasyonu meydana gelir (127). DNA hasarının Fenton sistemini ve nükleaz aktivasyonunu içeren iki mekanizmayla olduğu ileri sürülmektedir (127, 156). Fenton mekanizmasında, oksidatif stres hücrede metalik bakır veya demirin açığa çıkmasına ve DNA'ya bağlanmasına neden olur. Bakır veya

demir bağlanmış DNA H_2O_2 ile karşı karşıya kaldığında $OH^\bullet$ oluşumu artar. Bu da zincir kırıklarına, baz modifikasyonlarına ve deoksiriboz fragmentasyonuna neden olur (127).

Nükleaz aktivasyonunda ise oksidatif stres endoplazmik retikulumun Ca^{++} -bağlanmasını inaktive eder ve mitokondrilerden Ca^{++} salıverilmesine neden olur, hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonu artar. Tüm bu olaylar dizisi endonükleaz aktivasyonu ile ve sonuçta Fenton mekanizmasında gözlenen baz modifikasyonları olmaksızın DNA fragmentasyonuna yol açar (127).

Protein kinazların, tiyoredoksin gibi tiyol içeren proteinlerin ve hücre yüzey reseptörlerinin oksidatif strese yanıtı da hücre metabolizmasının bozulması yönünde olur (127). Bu nedenle reaktif oksijen bileşiklerinin fizyolojik yararlı nitelikleri ile hasar yapıcı özellikleri arasında hassas bir denge vardır. Bu denge reaktif oksijen bileşiklerinin oluşum derecesine, hücresel hedefe, antioksidan savunmanın boyutlarına, geçiş metal iyonlarına bağımlılık gösterir.

Hücre hasarının farklı moleküler hedefler için önemi oksidatif stresin derecesine, hangi mekanizma ile oluştuğuna, ne kadar sürdüğüne ve stres altına giren sistemin tabiatına bağımlıdır. Örneğin aterosklerotik hastalıklarda oksidatif stresin önemli bir sonucu lipid peroksidasyonudur (157), ama diğer bazı durumlarda DNA veya protein hasarı daha önemli olur (131).

1.2.1.5.1. Lipid peroksidasyonu

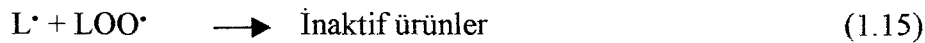
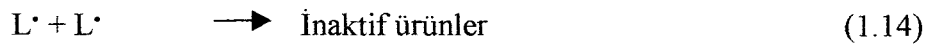
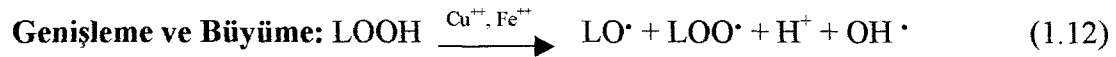
Membran lipidlerinin oksidatif hasarla bozunması olayına lipid peroksidasyonu denir (158).

Hayati hücresel fonksiyonlar için elzem olan membran bütünlüğü ve akışkanlığı, ökaryotlarda membran lipidleri içinde yer alan çoklu doymamış yağ asit (PUFA) zincirleri ile sağlanır. PUFA yapısında bulunan iki çifte bağ arasındaki karbon atomlarına bağlı allilik hidrojenler, serbest radikaller tarafından çıkarılmaya kısmen hazır durumdadır. Bu nedenle PUFA'lar peroksidasyona çok duyarlıdır (159).

Lipid peroksidasyonu üç basamakta meydana gelen zincirleme bir reaksiyondur. Başlangıç basamağı (Eşitlik 1.9), PUFA zincirindeki (LH) bir metilen

grubundan bir hidrojen atomu koparmaya yetecek reaktivitesi olan herhangi bir kimyasal yapı tarafından başlatılabilir. Özellikle membran yakınında oluşan $\text{OH}^\bullet$ tercihan PUFA'lara saldırır. Sonuçta, karbon-merkezli bir radikal, $\text{L}^\bullet$, oluşur. Fizyolojik koşullarda, bu radikal yapı içinde oluşan moleküler bir düzenleme ile bir konjuge dien yapısı meydana gelir. İlerleme basamağında (Eşitlik 1.10 ve 1.11) bu karbon merkezli radikal, diğer PUFA molekülleri ile reaksiyona girebilecek bir radikal oluşturmak üzere moleküler oksijen ile hızla reaksiyona girer. Sonuçta bir peroksil radikali ($\text{LOO}^\bullet$) oluşur. Meydana gelen $\text{LOO}^\bullet$ bitişiğindeki yağ asidi yan zinciri ile reaksiyona girerek hidrojen çeker ve sonuçta lipid hidroperoksid (LOOH) oluşur (Eşitlik 1.11). Bu reaksiyonda meydana gelen karbon merkezli bir radikal ($\text{L}^\bullet$), zincir reaksiyonunun devamına neden olur. Böylece tek bir başlatıcı olay, yüzlerce yağ asidi zincirinin lipid hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşümüne yol açar (160).

Cu^{++} ve Fe^{++} gibi metal iyonları da lipid hidroperoksitleri yıkımlayarak lipid peroksidasyonunu hızlandırırlar (Eşitlik 1.12). Bu zincirleme olay, reaksiyonun devamını sağlayan peroksil radikali ($\text{LOO}^\bullet$) veya alkolsil ($\text{LO}^\bullet$) radikalinin diğer bir peroksil ve/veya alkoksil radikali ile inaktif ürünler oluşturuncaya kadar sürer (Eşitlik 13-15) (160).



1.2.1.5.1.1. Lipid Peroksidasyonunun Sonuçları

Lipid peroksidasyonunun zararlı etkileri, meydana gelen lipid hidroperoksitlerin ve yıkım ürünlerinin toksisitesinden ve membran yapısında meydana gelen değişikliklerden kaynaklanır (161).

Biyolojik membranlarda meydana gelen yaygın lipid peroksidasyonu, membran akışkanlığında değişikliklere, membran potansiyelinde azalmaya, H^+ ve diğer iyonlara karşı geçirgenlikte artışa neden olur ve giderek hücre zarının yırtılmasıyla lizozomal hidrolitik enzimler gibi, hücre ve organel içeriğinin dışarı salınmasına yol açar (139).

PUFA'lardan meydana gelen serbest radikaller, membran proteinleri ve özellikle sülfidrilli enzimlerden hidrojen çekebilir. Bu olay sonucunda oluşan amino asit radikalleri disülfid köprüleri, protein-lipid ve protein-protein kovalan bağları oluşturabilirler (158). Oluşan LOOH'ler çeşitli metal komplekslerin varlığında çok az miktarları ile sitotoksik olan aldehitleri ve radikalleri oluşturabilirler (162).

Lipid peroksitler ve/veya onlardan türeyen sitotoksik aldehitlerin makrofajların hareketini engelleyebildikleri, protein sentezini inhibe ettikleri, bakteri ölümüne ve enzim inhibisyonuna neden oldukları, fagositler için kemotaksin olarak etki yapabildikleri bildirilmiştir (163, 164).

Perokside olan sistemlerde meydana gelen birçok karbonil bileşiğinden biri olan malondialdehit (MDA) kısa zincirli bifonksiyonel bir aldehittir. Diğer toksik aldehitler 4,5-dihidroksidesenal ve 4-hidroksinonenaldir. Az miktarda 4,5-dihidroksidekanal ve benzerleri de oluşur (163). Bu bileşikler MDA ile birlikte, membrandaki lipid peroksidasyonunun etkilerini tüm hücreye yayabilme özelliğine sahiptir.

MDA membran bileşenlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyonuna neden olarak (133) deformasyona, iyon transportunun bozulmasına, enzim aktivitelerinde ve hücre yüzey belirleyicilerinin yapısında agregasyon gibi membranal özelliklerinin değişmesine neden olabilir. MDA ayrıca DNA bazları ile reaksiyona girer ve mutajenik, genotoksik ve karsinojenik etkilere neden olabilir (165, 166).

Lipid peroksidasyonu bazı durumlarda hücre hasarının nedeni değil, hücre hasarı veya ölümünün bir sonucudur. Antioksidan düzeylerinde azalma, metal iyonlarının depo yerlerinden salınması veya hasarlı lizozomlardan sızan enzimlerin etkisiyle hidrolize olan metaloproteinlerden salıverilmesi nedeniyle, hasarlı dokular sağlıklı dokulara göre lipid peroksidasyonuna daha duyarlıdır (160). Bu olaylar sonucunda hastalık veya toksik ajanın hücre hasarı veya ölümüne neden olması ve takiben lipid peroksidasyonunun artması şeklinde devam eden bir olaylar zinciri ortaya çıkar. Hücresel hasarın birincil nedeni olmasa da peroksidasyon olayı, nihai ürünlerin sitotoksitesi ve hasarın ilerlemesini indüklemesi açısından biyolojik öneme sahiptir (133).

1.2.2. Organizmanın Antioksidan Sistemleri

'Antioksidan' terimi, okside olabilen bir substratın oksidasyonunu, düşük konsantrasyonlarda geciktirebilen veya önleyebilen maddeler için kullanılır (128). 'Okside olabilen substrat' terimi ise canlı hücredeki protein, lipid, karbonhidrat, DNA ve diğer tüm biyomolekülleri kapsar (128).

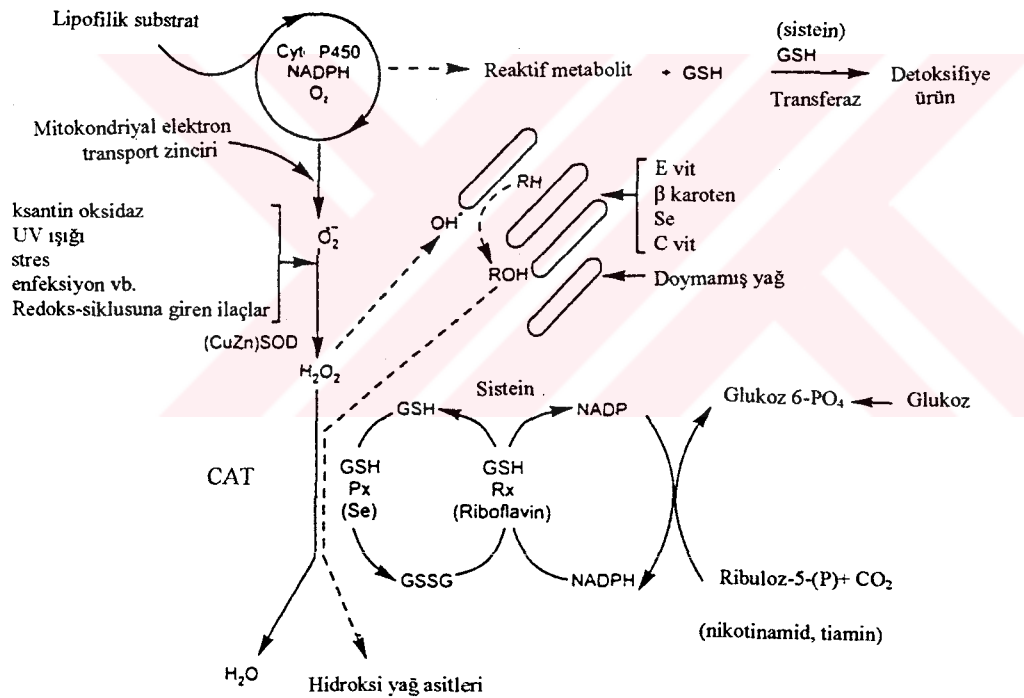
Hücrelerin serbest radikallerce ve özellikle de reaktif oksijen bileşikleriyle indüklenen hasardan korunması aerobik yaşamın ön koşullarından birisidir. Canlı organizmalarda bu reaktif bileşiklerin oluşumunun önlenmesi; DNA, lipidler, proteinler ve diğer biyomoleküllerde yaptıkları hasarın durdurulması ve hasarın onarımına yönelik bir antioksidan savunma sistemi bulunur. Evrimleşme sürecinde, öncelikle genetik ve fizyolojik hasara karşı organizmanın korunması amacıyla gelişen bu sistem, farklı zamanlarda, farklı yerlerde görev yapan çok bileşenli bir sistemdir. Ancak bu sistemin enzimatik ve nonenzimatik nitelikli çok sayıda bileşeni birbirinden bağımsız bir şekilde değil, bir bütün halinde birlikte (kooperatif) çalışarak işlevlerini yerine getirirler.

Çok sayıda enzim ve endojen maddeden oluşan bu sistemin önemli bileşenleri ve etki mekanizmaları Tablo 1.8'de özetlenmiştir.

Tablo 1.8. Antioksidan savunma sisteminin enzimatik ve nonenzimatik bileşenleri (127).

Etki bölgesi/ İsmi	Etki mekanizması
Ekstraselüler antioksidanlar	
Transferrin	Fe^{+++} iyonlarını bağlar
Laktoferrin	Fagositik hücreler tarafından salıverilir, Fe^{+++} iyonlarını bağlar
Haptoglobinler	Hemoglobini bağlar
Albumin	Bakır, hem ve demir iyonlarını bağlar. $HOCl$ 'ü temizler
Serüloplazmin	Bakır iyonlarını nonspesifik olarak bağlar ve bakıra bağımlı radikal reaksiyonları inhibe eder. Ferroksidaz I aktivitesine sahiptir
Ekstraselüler süperoksit dismutazlar (EC-SOD)	Büyük molekül ağırlığına sahip bir glikoproteindir. Katalitik olarak $O_2^{\cdot-}$ i endotelial hücre yüzeyinden uzaklaştırır
Ekstraselüler glutatyon peroksidaz (EC-GPx)	Büyük molekül ağırlığına sahip Se içeren bir glikoproteindir. H_2O_2 ve lipid peroksitleri uzaklaştırır
Ürik asit (ürat)	Organik ve inorganik oksijen radikallerini temizler. Demir ve bakır iyonlarını bağlayabilir ve serbest radikal reaksiyonlarını katalizlemesini önler veya yavaşlatır
Glukoz	$OH^{\cdot}$ ile reaksiyon hız sabiti $1.0 \cdot 10^9 M^{-1} s^{-1}$ 'dir
Biluribin	Peroxi radikallerini temizler, albümine bağlı yağ asidi moleküllerini oksidasyondan koruyabilir
Müsinler	$OH^{\cdot}$ radikalini temizler ve metal iyonlarını bağlar
Membranda yer alan antioksidanlar	
E vitamini	Yağda çözünür zincir kırıcı antioksidandır
β -karoten	Singlet oksijen ve $OH^{\cdot}$ radikal temizleyicidir. Bazı koşullarda lipid peroksidasyonu inhibe eder
Koenzim Q	Enerji metabolizmasındaki önemli görevinin yanısıra redükte halde antioksidan olarak görev yapabilir
İntraselüler antioksidanlar	
Süperoksit dismutazlar (Cu ve Mn SOD)	Hücrelerden $O_2^{\cdot-}$ i katalitik olarak uzaklaştırırlar
Katalaz	Yüksek konsantrasyonlarda H_2O_2 'i katalitik olarak uzaklaştırır
Glutatyon peroksidaz (Selenyuma bağımlı)	H_2O_2 'i ve lipid hidroperoksitleri katalitik olarak uzaklaştırır

Görüldüğü gibi hücreler serbest radikal hasarından çok çeşitli koruyucu enzim, endojen radikal tutucu protein ve suda ya da yağda eriyen antioksidan kimyasal madde tarafından korunur. Örneğin, transferin ve seruloplazmin metal iyonlarını (sırasıyla Fe^{++} ve Cu^{++}) tutan proteinlerdir; SOD, katalaz ve GSHPx reaktif oksijen bileşiklerini metabolize edici enzimlerdir. Diğer önemli antioksidan maddeler içinde α -tokoferol, askorbik asit, ürik asit ile GSH gibi tiyoller bulunur. Ayrıca nükleik asit ve proteinlerdeki oksidatif hasarının önlemesi ve onarımını sağlayan çok sayıda enzimatik mekanizma mevcuttur (Şekil 1.3.) (127).



Şekil 1.3. Hücrelerdeki serbest radikal oluşum ve savunma mekanizmaları (125).

Radikal tutucu enzimler ve antioksidanlar serbest radikal oluşumunu dört şekilde inhibe edebilirler:

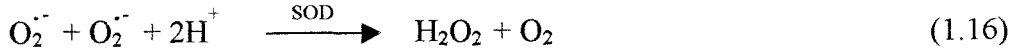
- (i) Geçiş metallerini şelate ederek. Örneğin, transferrin.
- (ii) Zincir reaksiyonlarını kırarak. Örneğin, α -tokoferol.
- (iii) Reaktif oksijen bileşiklerinin konsantrasyonunu azaltarak. Örneğin, glutatyon.
- (iv) Başlatıcı radikali tutarak. Örneğin, süperoksit dismutaz (127).

Antioksidan enzimler hücrelerin hem hidrofilik, hem de hidrofobik bölgelerinde lokalize olmuşlardır. Antioksidanlar da hem hücre içinde hem de ekstraselüler bölgelerde yer alırlar (139). Aerobik hücrelerin serbest radikal hasarına karşı korunmasında ilk savunma hattını 3 antioksidan enzim oluşturur: SOD, glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve CAT. Bu enzimler organizmanın antioksidan yükü arttığında up-regüle edilir, indüklenirler. Antioksidan savunmada 2. hat ise E vitamini (E Vit), selenyum (Se), β -karoten, C vitamini gibi mikronütrientlerin işlevleri ile sağlanır.

1.2.2.1. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz (SOD)'lar aerobik hücrelerdeki ana intraselüler (hücreiçi) antioksidan enzimlerdir. SOD aktivitesi ilk kez 1969'da McCord ve Fridovich tarafından tanımlanmış ve bu enzimlerin aerobik koşullarda yaşamın sürdürülmesi için gerekli oldukları bulunmuştur (167). SOD'ların, aktif merkezde yer alan metale göre 3 farklı formu vardır. Bakır ve çinko (CuZn SOD) içeren form ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında ve kloroplastlarda bulunur (168). Manganez (Mn SOD) içeren form prokaryotik hücrelerde ve ökaryotik hücrelerin mitokondriyal matriksinde yer alır (168). Demir (Fe SOD) içeren form ise sadece prokaryotlarda bulunur. Ayrıca memelilerde klasik sitozolik CuZn SOD'den immünolojik olarak farklı bir ekstraselüler CuZn SOD'ın varlığı saptanmıştır (167). Bazı prokaryotlarda da periplazmik bir CuZn SOD varlığı gösterilmiştir (169).

SOD'ların farklı formları aynı kinetik özellikleri gösterirler. $O_2^{\bullet -}$ anyonunu, bir dismutasyon reaksiyonunu katalizleyerek, hızlı ve spesifik bir şekilde H_2O_2 'e indirgerler (168) (Eşitlik 1.16). SOD eksikliğinde $O_2^{\bullet -}$ 'in dismutasyonu nonenzimatik olarak da yürütülür (169).



Ökaryotlardaki 3 farklı SOD, farklı protein yapılarına ve metal kofaktörlere sahip farklı gen ürünleridir. Ana form olan CuZn SOD, 32.500 Dalton molekül ağırlığında bir homodimerdir. Hem Cu^{++} , hem de Zn^{++} taşır ve hemen tüm hücrelerin sitozolünde yer alır (170). Çinko iyonunun katalitik aktivitede işlevi yoktur, ancak enzimi stabilize eder. Bakır iyonu ise enzimatik reaksiyonda işlev gösterir. CuZn SOD siyanür ve daha düşük güçte olmak üzere azit tarafından reversibl olarak inhibe edilir. H_2O_2 , CuZn SOD'ın irreversibl inhibitörüdür ve her iki alt ünitenin bir histidin grubunda modifikasyona neden olarak enzimi inaktive eder (171). Bakır şelate edici ajan dietilditiyokarbamat (DDC) da enzimdeki bakırı bağlayıp uzaklaştırarak enzimi inhibe eder.

Memeli ekstraselüler CuZn SOD'ı tetramerik yapıda 135.000 Dalton'luk bir glikoproteindir. Heparin ve asidik glikozaminoglikan'a yüksek afinitesi vardır (170).

Mn SOD 95.000 Dalton'luk bir homotetramerdir. Aktif bölgesinde Mn taşır. Bakteriyal formu ~ 40.000 Dalton molekül ağırlığında bir dimerik enzimdir (171). Siyanür, H_2O_2 ve dietilditiyokarbamata rezistandır. Fakat $CHCl_3$ ve etanol ile yapısı bozulur (126).

Fe-SOD'ın H_2O_2 ile irreversibl olarak inaktive olduğu, bunun aktif bölgedeki demir ile etkileşme suretiyle geliştiği, sonuçta meydana gelen $OH^{\bullet}$ 'nin veya eşdeğer bir oksidanın triptofan bakiyelerini yıkımladığı ileri sürülmüştür (172).

1.2.2.1.1. Süperoksit Dismutazın Biyolojik Önemi

Oksijenin tek elektronla redüksiyon ürünü olan $O_2^{\bullet -}$ kuvvetli bir oksidan olmamakla birlikte daha potent oksidanları oluşturan bir reaksiyonlar kaskatını

başlatabilme yeteneğine sahiptir. Ancak $O_2^{\cdot -}$ 'in kendisinin de lokal olarak hasar yapma potansiyeli vardır, çünkü kritik bölgelerde oluşabilir. Örneğin mitokondriler $O_2^{\cdot -}$ oluşumunun önemli bir kaynağıdır. Mitokondriyal $O_2^{\cdot -}$ 'in hücrel enerji oluşumu için gerekli mitokondriyal bileşenleri hasara uğratması büyük önem taşır. Membrana bağlı çeşitli enzimler de $O_2^{\cdot -}$ oluştururlar. Örneğin NADH dehidrojenaz ve peroksizomların $O_2^{\cdot -}$ oluşturmaları gibi (173). Nitekim SOD'lar genel olarak $O_2^{\cdot -}$ 'in oluştuğu bölgelerin yakınına stratejik olarak lokalize olmuşlardır ve oksidan strese maruziyetle hemen indüklenirler. Böylece hem $O_2^{\cdot -}$ 'in lokal hasarını önlerler, hem de daha güçlü oksidanların oluşumunu önleyici işlev görürler. Dolayısıyla SOD'ların gerek prokaryotik organizmalarda, gerekse ökaryotlarda önemli fizyolojik işlevleri vardır. SOD'ları olmayan mutantların yaşama şanslarının az olduğu, DNA'larında, sitoplazmik membranlarında ve hücrel proteinlerinde oksidatif hasar meydana geldiği bildirilmiştir (174). Örneğin, $O_2^{\cdot -}$ 'in toksik ve mutajenik olması nedeniyle sitozolik SOD'ı olmayan *E. coli*'nin aerobik ortamda hipermutajenik olduğu, bu etkinin demir şelatörleri ile azaltıldığı veya elimine edildiği gösterilmiştir (174).

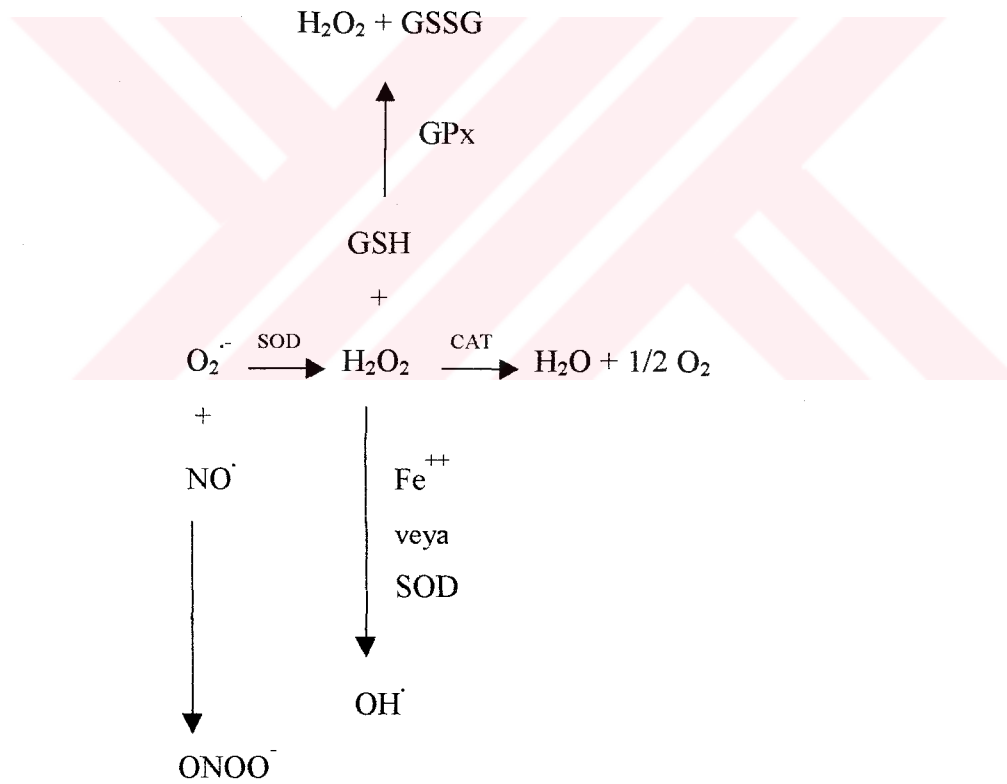
Diğer taraftan redoks siklusu ile $O_2^{\cdot -}$ oluşturan maddelerin Mn SOD ve endonükleaz IV'ü indüklediklerinin gözlenmesi, antioksidan enzim indüksiyonu ile DNA onarım enzimlerinin eşgüdümlü olarak regüle edildiğini gösterir, böylece hücrenin maksimum ölçüde korunması sağlanmaktadır (169, 175).

Endojen SOD'nın katarakt (176), kanser (177) ve kardiyovasküler hastalıklar gibi oksidatif hasarla ilişkili hastalıkların (177) önlenmesinde önemli role sahip olduğu bildirilmiştir. Fenkoni anemisi, Duchene kas distrofisi ve romatoid artritte eritrosit SOD aktivitesinin düşük bulunduğu (177); serbest radikal oluşumunun anahtar rol oynadığı kabul edilen iskemi-reperfüzyon hasarında SOD'nın koruyucu rol oynadığı ve terapötik olarak SOD kullanımının yararlı olabileceği bildirilmiştir (178).

Diğer taraftan, hücrenin $O_2^{\cdot -}$ düzeyini azaltmaya ihtiyacı olmakla birlikte, bütünüyle elimine etme ihtiyacının olmadığı, oksidan ve antioksidanlar arasındaki hassas dengenin devamının önemli olduğu vurgulanmaktadır (169). Nitekim CuZn SOD fazlasının serbest radikal oluşum dengesini bozduğu, buna bağlı olarak peroksidatif beyin hasarının gözlenebileceği, bu artışın yaşlanma ve yaşa bağlı

nöropatolojilere katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (169). Ayrıca CuZn SOD'ın, H_2O_2 'in Fe gibi geçiş metalleri varlığında nonenzimatik olarak $OH^\cdot$ 'ne dönüşümü reaksiyonunu katalize ettiği gösterilmiştir (168).

SOD, insan hücrelerinde H_2O_2 'i uzaklaştıran iki enzim ile birlikte kooperatif olarak çalışır, hatta sinerjik etki gösterir: GSHPx ve CAT. Aralarındaki denge, özellikle CuZn SOD ile 'GSHPx + CAT' arasındaki denge çok önemlidir. SOD düzeyinde herhangi bir artışın CAT ve GSHPx'de de aynı derecede artışlarla birlikte olmasının, H_2O_2 'in aşırı miktarda birikmemesi yönünden önemi büyüktür. Bu üç enzimden potansi en yüksek olan GSHPx'dir (167). Fakat dejeneratif hastalıklar ve yaşam süresi üzerindeki etkileri itibariyle SOD'ın önemi de büyüktür (169). Tablo 1.4'de ökaryotik hücrede oksijen bileşiklerinin metabolizmaları özetlenmiştir.



Şekil 1.4. Ökaryotik hücrede oksijen bileşiklerinin metabolizması (179).

1.2.2.2. Glutasyon Peroksidaz

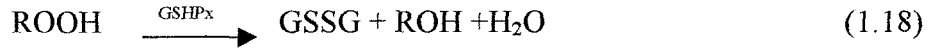
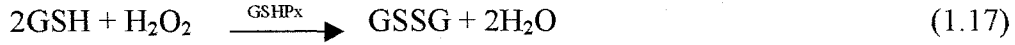
Hidroksil radikali güçlü bir oksidan olup her türlü hücresel bileşenle reaksiyona girme yeteneğine sahiptir. Bu reaksiyonlar oksidan hasara sebep olur ve kendi kendine çoğalan oksidan reaksiyonlar kaskatını başlatır. Ancak ökaryotik hücrelerin OH[•] 'ni doğrudan elimine etme mekanizmaları yoktur. İki bağımsız mekanizma H₂O₂'i uzaklaştırarak OH[•] oluşumunu önlemeye çalışır: Selenyuma bağımlı glutasyon peroksidazlar (GSHPx) ve CAT. Memeli hücresinde H₂O₂ uzaklaştırıcı ana enzim GSHPx'dır (168).

Selenyuma bağımlı glutasyon peroksidazlar, aktif bölgesinde kovalan bağlı selenosistein formunda selenyum içeren bir enzim ailesidir. Herbir alt ünitesinde 1 tane olmak üzere 4 atom selenyum taşıyan enzim, diğer peroksidazların aksine *hem* ve flavin gibi prostetik gruplar ve diğer metalleri içermez (180).

GSHPx 85.000 Dalton molekül ağırlığında 4 alt formu bulunan bir proteindir. Farklı izozimlerinin doku dağılımları ve substrat spesifiteleri farklıdır. Enzimin % 60-75'i ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında, % 25-40'ı mitokondrilerde bulunur. Farklı GSHPx formlarından intraselüler form, sitozolik-çözünür form (cGSHPx) adıyla da anılır. Bu form ekstraselüler form ve plazma-çözünür form (pGSHPx) ile birlikte H₂O₂ ve lipid hidroperoksitlerin metabolizmasından sorumludur. Üçüncü form olan hücre membranına bağlı form, fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PHGSHPx) ise biyomembranlardaki, intraselüler ve ekstraselüler GSHPx tarafından metabolize edilemeyen, esterifiye fosfolipid hidroperoksitleri ve kolesterolü metabolize eder (181). Böylece GSHPx'ın farklı formları organizmanın farklı kompartmanlarını oksidan strese korurlar. Yakınlarda gastrointestinal bölgede belirgin derecede prevalan olan yeni bir GSHPx formu (giGSHPx) tanımlanmıştır (182).

GSHPx, organik hidroperoksitler ve H₂O₂'e karşı aktiftir. İndirgenmiş glutasyon (GSH)un oksidasyonunu katalize ederek H₂O₂'i suya indirger (Eşitlik 1.17). Aynı şekilde bir molekül GSH kullanarak, biyomembranların oksidasyonu ile oluşan lipid hidroperoksitleri indirger (Eşitlik 1.18). Bu esnada meydana gelen okside glutasyon (GSSG), NADPH-bağımlı glutasyon redüktaz (GR) ile tekrar

(Eşitlik 1.19) indirgenir. GSHPx'ların farklı formları fonksiyonel açıdan büyük benzerlik gösterirler ve katalizlenen reaksiyon prensip olarak aynıdır:



Katalitik mekanizma bir ping-pong mekanizmasıdır: reaksiyon hızı substrat konsantrasyonu ile lineer olarak artar ve enzim GSH ile doyurulamaz. Bu kinetik çok yüksek hızda peroksit redüksiyonu yapma kapasitesine sahiptir. Bu kinetik mekanizma tüm GSHPx'lar için söz konusu olup, katalizleme işleminde selenyum kullanılır (183).

H_2O_2 , esas olarak peroksizomlarda lokalize olmuş bir enzim olan CAT tarafından da yıkılır. Selenyuma bağımlı GSHPx'lar sitozol ve mitokondriyal matrikste lokalize oldukları için CAT ile aralarında kompetisyon olasılığı düşüktür. Bununla birlikte, peroksidasyona karşı hücrelerin korunmasında birbirlerinin etkilerini tamamlayıcı özelliğe sahiptirler (184).

GSHPx'ler selenyuma bağımlılıkları nedeniyle *in vivo* ve *in vitro* selenyum eksikliğinden büyük ölçüde etkilenirler. Biyosentezleri bütünüyle selenyuma bağımlıdır. Karaciğer dokusu GSHPx'in en zengin kaynağıdır. Hepatositlerde yapılan çalışmalar GSHPx'in esas olarak sitozolde ve mitokondriyal matrikste lokalize olduğunu göstermiştir (185).

GSHPx enzimi antioksidan rolüne ek olarak, prostaglandin hidroperoksitler gibi bazı hidroperoksitlerin metabolizmasında da spesifik işlevlere sahiptir.

Glutasyon peroksidaz aktivitesi, selenyuma bağımlı olmayan proteinlerden oluşan glutasyon-S-transferaz (GST) enzimleri tarafından da gösterilir. Ancak GST'ların H_2O_2 'e karşı afiniteleri ihmal edilecek düzeydedir. Organik hidroperoksitlerin ve elektrofilik bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu katalize eden proteinler olarak tanımlanırlar (186).

1.2.2.3. Katalaz

H_2O_2 'in eliminasyonundan sorumlu ikinci enzim katalazdır (CAT, H_2O_2 : H_2O_2 oksidoredüktaz). Tüm aerobik mikroorganizmalarda, bitki ve hayvan hücrelerinde yaygın olarak bulunur. Fakat fizyolojik işlevi ve regülasyonu halen tam olarak aydınlatılmış değildir (187). CAT, 240.000 Dalton'luk homotetramerik bir protein olup, bir *hem*-demir aktif bölgesi bulunur ve 4 benzer alt üniteden oluşur. Her alt ünite bir ferriprotoporfirin halkası içerir ve ferriprotoporfirin grubu % 1.1 protohem ve % 0.09 demir taşır. Sıçan karaciğerinde ve insan eritrositlerindeki CAT'ın sıkı bağlarla bağlı 4 molekül NADPH içerdiği saptanmıştır. Bu indirgenmiş dinükleotid, katalaz aktivitesi için esansiyel değildir, fakat enzimi kendi substratı H_2O_2 tarafından inaktive edilmesine karşı korumaktadır (188).

CAT, H_2O_2 'i su ve oksijene yıkımlar (Eşitlik 1.20), fakat daha büyük lipid hidroperoksitlere karşı etkisizdir.



CAT primer olarak peroksizomlarda bulunur. Peroksizomlar ise hücreiçi H_2O_2 'in ana yapım yeridir. CAT'ın işlevinin, hücreleri mitokondriyal oksidan hasardan korumak ve peroksizomal H_2O_2 'in hasar yapmasını önlemek olduğu sanılmaktadır. İnsan eritrositlerinde de GSHPx ile birlikte H_2O_2 'i yıkımlayarak çalışır (188). Dolayısıyla H_2O_2 'in uzaklaştırılmasında GSHPx ile birlikte dual bir sistem oluşturur. Her iki enzim farklı intraselüler bölgelerde konsantre olmuşlardır ve farklı kimyasal özellik ve substrat spesifitesi gösterirler. Peroksit hasarına karşı primer koruma GSHPx ile sağlanır. GSHPx yüksek afiniteli, düşük kapasiteli bir enzim olup, hücrede yaygın olarak bulunur ve çeşitli peroksitlerle reaksiyona girebilir. Katalaz ise H_2O_2 'e karşı daha düşük aktivite gösterir ve diğer peroksitlerle reaksiyona girmez. CAT'ın H_2O_2 'in peroksizomlar, mitokondri gibi yüksek miktarda olduğu yerlerden elimine etme sorumluluğu olduğu anlaşılmaktadır (168).

1.2.2.4. Glutasyon

Memeli hücresinin evrimi esnasında, ksenobiyotiklerin biyotransformasyon ürünlerinin ve hücreyel metabolizmanın normal oksidatif ürünlerinin zararlı etkilerine karşı gelişen antioksidan savunma sistemi, glutatyonla büyük ölçüde bağımlılık gösterir. Düşük molekül ağırlıklı bir tripeptit bileşiği olan indirgenmiş glutatyon (GSH) glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan (L- γ -glutamil-L-sisteinil glisin) ve organizmada en yaygın olarak bulunan bir hücreiçi tiyol bileşiğidir (189). Hücrenin tipine bağlı olarak hücreiçi konsantrasyonu 0.5-10 mM'dır. Plazmada ise μ mol ranjında bulunur. Karaciğerdeki konsantrasyonu 4-8 mM olup, hemen tamamı indirgenmiş GSH halindedir. Okside glutatyon, glutatyon disülfid (GSSG), oranı % 5'in altındadır. Beyindeki GSH düzeyi ise 1-1.5 mM olarak bildirilmektedir (189, 190). GSH tüm organ ve dokulardaki protein olmayan tiyollerin % 90'ını oluşturur, dolayısıyla hücre içindeki anahtar redükleyici ajan konumundadır (189).

GSH, karaciğerde sistationin yolağıyla metioninden sağlanan sistein ile sentez edilir. Sentez iki basamaklıdır. İlk basamakta glutamik asit ve sistein, γ -glutamil sistein sentetaz aracılığıyla birleşir. Hız kısıtlayıcı kademe sistein varlığıdır. İkinci kademe glutatyon sentetaz aracılığıyla glisin ilavesi ile olur. Bu reaksiyonlardan ilki üzerinde GSH'nin negatif feedback kontrolü söz konusudur. Böylece GSH havuzu sıkı bir kontrol altında sürdürülür (191).

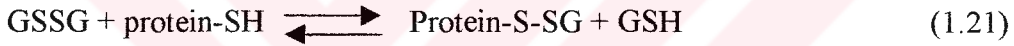
GSH'un antioksidan savunmada, ksenobiyotik ve eikozanoid metabolizmasında, hücre siklusu ve gen ekspresyonunun regülasyonunda önemli işlevleri vardır (190, 191). Dört ana grupta toplanan bu işlevler aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- i) Serbest radikallerin temizlenmesi: Bir hidrojen atomu verip GSSG'ye dönüşmek suretiyle serbest radikalleri doğrudan temizleyebilirler.
- ii) Kosubstrat işlevi: H_2O_2 'in ve diğer hidroperoksitlerin GSHPx ile redüksiyonunda kosubstrat işlevi görür (Eşitlik 1.17 ve 1.18).
- iii) Konjugasyon: Reaktif sülfür bağı ile bağlanmak suretiyle nonenzimatik olarak veya GST'ler aracılığı ile enzimatik olarak çeşitli elektrofilik bileşiklerle konjugasyona girer.

- iv) Çeşitli metabolik yollarda majör rol: Çeşitli lökotrienlerin sentezinde, proteinlerde disülfid bağlarının redüksiyonunda ve DNA prekürsörlerini de kapsayan çok sayıda metabolik yolda rol alır.

1.2.2.4.1. Glutasyon Redoks Döngüsü

Glutasyon redoks döngüsü Şekil 1.3’de gösterilmiştir. Görüldüğü gibi GSH’nin hücre içi konsantrasyonunu, sentez ve yıkımının yanı sıra oksidasyonu ve indirgenmesi belirler. Normal koşullarda GSSG dengesi total glutasyon düzeyinin % 1’inden azdır. Ağır oksidatif stres varlığı dışında, GSSG’deki artışlar geçicidir, çünkü GR ile indirgenmesi hızlıdır. GSSG bir ATP-bağımlı transport yolağı ile hücreden itrah edilebilir. Ancak oluşan GSSG’nin protein sülfidrilleriyle reaksiyona girip protein-glutasyon karışık disülfidlerini oluşturması da olasıdır (Eşitlik 1.21) (192).



Eğer bu reaksiyon kritik protein sülfidril gruplarında olursa hücre yapısı, metabolizması veya fonksiyonları değişebilir. Karışık disülfidlerin yarı ömrü GSSG’den uzundur, yüksek bir bazal düzeyin varlığı bazal oksidatif stresin göstergesi olarak kabul edilir (193). Dolayısıyla oksidatif stresin göstergesi olarak doku ve hücrelerde GSH, GSSG ve karışık disülfidlerin ölçümü yapılabilir (190).

Hücre içi GSH’un oksidatif stresle tüketilmesinin temel mekanizması hidroperoksitlerle oksidasyonu ile başlar (Eşitlik 1.17 ve 1.18). Eğer GSH’un oksidasyon hızı GSSG’nin redüksiyon hızını aşarsa veya GR’ın aktivitesi (Eşitlik 1.19) inhibe edilirse GSSG hücrede birikebilir (194). Yukarıda da değinildiği gibi GSSG hücreden atılabileceği gibi proteinlerle karışık disülfidler yapabilir. Sonuçta GSSG oluşumu, hücre içi GSH’da net bir kayıpla ve sülfidril içeren enzimlerin potansiyel inaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (192).

1.2.2.4.2. Glutasyonla Konjugasyon

Her ne kadar GSH önemli bir antioksidan molekül ise de, konjugat oluşturmak suretiyle bazı bileşiklerden biyolojik olarak reaktif ara ürünler oluşturması da söz konusudur (195). Çok sayıda elektrofilik yapıli ksenobiyotik, GSH konjugatı oluşturabilmektedir. Ayrıca lipid peroksidasyonu esnasında meydana gelen 4-hidroksinonenal gibi bazı elektrofilik bileşikler de GSH konjugatları oluşturabilirler (196). Bazı kuvvetli elektrofilik bileşikler GSH ile hızla nonenzimatik olarak konjugasyona uğrarlar. Bazı maddelerde ise, konjugasyon GST ile katalize edilir. Ayrıca birçok madde redoks döngüsüne girip H_2O_2 oluşturur ve ayrıca GSH ile konjugasyona uğrarlar (190). Bu durumların hepsinde konjugat oluşumu GSH tüketimi ile sonuçlanır. Dolayısıyla kendisi oksidan olmayan bir madde, konjugat oluşumu yolu ile GSH deplesyonuna neden olarak oksidatif stres yaratabilir.

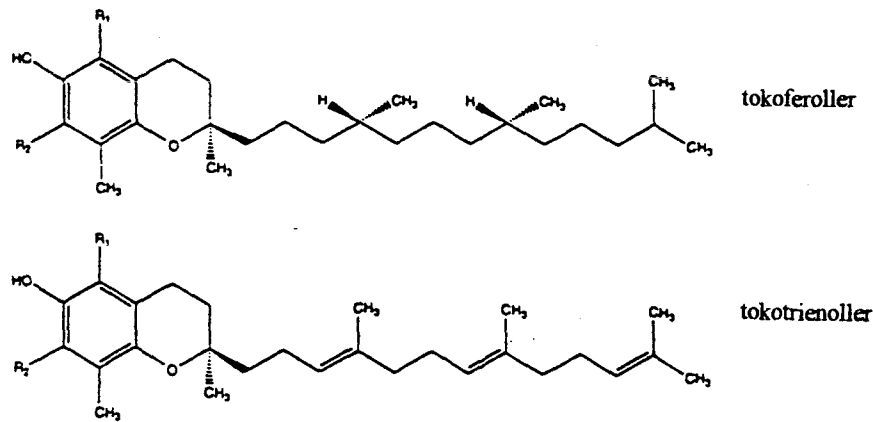
Diğer taraftan GSH konjugatlarının oluşumu itrah edilebilir bir forma dönüşmeyi sağladığı için ekseriya bir detoksifikasyon mekanizması olarak kabul edilir. Ancak bazı heksaklorobutadien, triklorotrifluoroetilen gibi haloalkan ve haloalkenler, 2-bromohidrokinon gibi bazı maddeler için bu konjugasyon mekanizmasının bir biyoaktivasyon reaksiyonu olduğu ve böbreğe özgü toksisiteye neden olabilecekleri gözlenmiştir (195). Diğer dokuların aksine böbrekte γ -glutamil transpeptidaz (GGT) aktivitesi yüksektir ve buna bağlı olarak glutasyon konjugatları merkaptürik aside yıkımlanır ve proksimal tübüllerden atılabilirler. Ancak bu yolla γ -transpeptidaz + dipeptidaz sistein ile oluşan sistein konjugatları doğrudan nefrotoksik olabileceği gibi (örneğin dikromoetanol), β -liyaz yolağı ile biyoaktif edilip reaktif ara ürünlere dönüşerek nefrotoksik de olabilirler (189, 191). Dolayısıyla GGT ekstraselüler GSH'ı kullanmak suretiyle *de novo* GSH sentezi için sistein kaynağı sağlamakla birlikte her zaman hücresel savunmadan yana işlev görmemektedir.

Oksidatif strese karşı akut başlangıç cevabı GSH'da azalma şeklinde ortaya çıkmakla birlikte kronik oksidatif streste GSH'un arttığına ilişkin kanıtlar fazladır (190). Bir adaptasyon olayı olarak da düşünülen bu olayın mekanizması şu şekilde özetlenebilir: Hidroperoksitler ve diamid gibi oksidanlara subletal

konsantrasyonlarda temas esnasında GSH'da önce bir azalma olur, bunu hücre içi GSH içeriğinde başlangıç düzeyini aşan bir artış izler (197). Ancak bazı oksidanlarla başlangıçta bir azalma olmaksızın da bir artış gözlenebilmektedir (191). Bu artışlar GSH ve prekürsörlerinin transport hızındaki bir artışa; GSH sentezi ile ilişkili enzim aktivitelerinde, özellikle γ -glutamil sistein sentetaz (GCS) artışına veya GGT ve GR gibi diğer enzimlerin aktivitelerinde artışlara bağlı olabilir (190). Oksidatif stresin GGT'nin GCS alt üniteleri ve GST-Ya alt ünitesinin mRNA düzeylerinde artışlara neden olduğu gösterilmiştir (190).

1.2.2.5. E Vitamini

E vitamini ilk kez 1922 yılında, sıçanda fötüs ölümünü ve rezorpsiyonunu önleme yeteneğine sahip, üreme için esansiyel olan ve yağda çözünen bir diyetel faktör olarak tanımlanmıştır (198). E vitamini terimi günümüzde de, nitel olarak α - tokoferolün biyolojik aktivitesine sahip olan tüm tokol ve tokotrienol türevleri için kullanılan jenerik bir isimdir (199). Bu bileşiklerin herbiri bir fenolik ve bir heterosiklik iki halka içeren bir kroman grubuna ve bir fitil kuyruğuna sahiptir. Dört tokoferolün (α , β , γ , δ) fitil kuyrukları doymuş yapıdadır. Dört tokotrienol ise fitil kuyruklarında 3 izole çifte bağ içerirler. Ayrıca tokoferoller serbest fenolik yapıdadır, tokotrienoller ise ester formundadır (200). Şekil 1.5 'de tokoferol ve tokotrienollerin kimyasal yapıları görülmektedir:



Şekil 1.5. Tokoferol ve tokotrienollerin kimyasal yapıları (199)

α -tokoferol için, R₁= R₂= CH₃ ; β -tokoferol için, R₁= CH₃, R₂= H ;

γ -tokoferol için, R₁= H ve R₂= CH₃ ; δ -tokoferol için R₁ ve R₂=H.

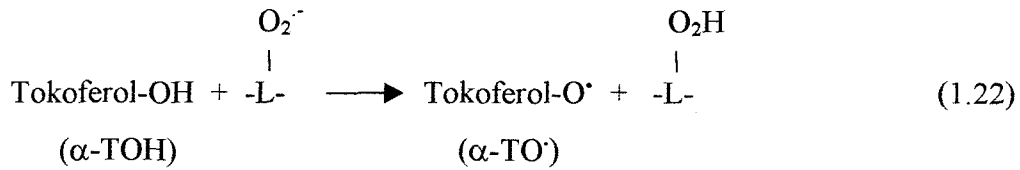
E vitamini sadece bitkiler tarafından sentez edilir. Tokoferoller yağlı tohumlarda ve bitkilerin yapraklarında yeşil kısımlarda bulunur. α -tokoferol en çok bitki hücresi kloroplastlarında, β , γ ve δ - tokoferoller ise diğer organellerde bulunur. Tokotrienoller ise bitkinin yeşil kısımlarında bulunmazlar, bazı tohumların ve tahılların embriyolarında ve kepek kısmında bulunurlar (200).

Ticari olarak mevcut E vitamini suplemanları ya esterleşmemiş formda, çoğunlukla da asetat, süksinat veya nikotinat esterleri halinde α -tokoferol içerirler. Bu α -tokoferol ya doğal RRR-formundadır, ya da sentetiktir (*all rac*). *all rac* α -tokoferol, 3 kiral merkezin mevcudiyetinden kaynaklanan 8 stereoizomerik formun herbirinden yaklaşık eşit miktarda içeren bir karışımdır. Pratik nedenlerle 1 internasyonal ünite E vitamini, 1 mg sentetik formda rasemik α -tokoferil asetata eşdeğer olarak kabul edilir. Doğal RRR- α -tokoferol ise 1,49 İÜ E vitamininin biyopotensine eşdeğerdir (201, 202).

Tokoferol ve tokotrienollerin antioksidan aktivitesi fenolik hidrojeni lipid radikallerine verebilme yeteneklerinden kaynaklanır (203).

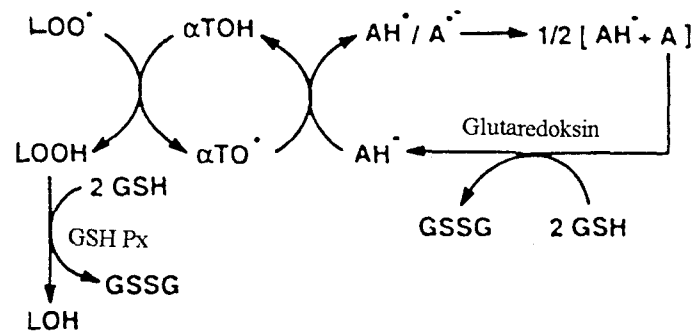
Doğal RRR- α -tokoferolün aktivitesi sentetik *all rac* α -tokoferolden ve diğer doğal E vitamini formlarından daha yüksektir. α -tokoferolün stereoizomerlerinin aktivitesi RRR>RRS>RSS>SSS>RSR>SRS>SRR>SSR sırasını izler (202).

α -tokoferol, lipofilik karakteri nedeniyle büyük ölçüde hücre membranlarının fosfolipid tabakasında ve plazmadaki lipoproteinlerde (özellikle LDL'lerde) bulunur. Organizmanın en etkin, yağda çözünen, zincir kırıcı antioksidanıdır. Singlet oksijen, süperoksit anyonu ve lipid peroksil radikallerinin etkin bir süpürücüsüdür (201). Peroksil radikaline bir hidrojen verip, komşu yağ asitleri ile birleşmesini önlemek suretiyle zincir reaksiyonlarını sonlandırıcı bir etki gösterir (Eşitlik 1.22):



Bu esnada oluşan tokoferol radikalinin (kromanoksil veya α -tokoferoksil radikali) reaktivitesi azdır ve bu nedenle zincir reaksiyonu durur (199). Kromanoksil

radikalinin hücrenin "sulu fazına" geçip C vitamini (askorbat, AH) ile reaksiyona girmesiyle E vitamini rejenere edilir. Bu rejenerasyonda selenyum ve GSH'nun da önemli rolü vardır: C vitamininin rejenerasyonunda GSH rol alırken, lipid hidroperoksitleri selenyuma bağımlı GSHPx'lar tarafından süpürülür. Bu nedenle selenyum, hücrenin E vitaminine olan ihtiyacını azaltır (204). Şekil 1.6'da bu ilişkiler şematize edilerek gösterilmiştir.



Şekil 1.6. E vitamini, GSH, C vitamini ve GSHPx' lar arasındaki ilişki (205).

Askorbat, $AH^\bullet$; askorbil radikali ($AH^\bullet / A^{\bullet}$).

E vitamininin bu zincir kırıcı antioksidan etkinliği, hücre membranlarının çoklu doymamış fosfolipidlerinin peroksidasyonunu önler. Dolayısıyla E vitamini, biyolojik membranların lipid peroksidasyonuna karşı korunmasında; biyomembranların stabilizasyonunda ve akışkanlığın sağlanıp sürdürülmesinde; membranal enzimlerin modülasyonunda ve kritik hücre yapısının reaktif oksijen radikallerinden ve lipid peroksidasyonunun reaktif ürünlerinden korunmasında önemli işlevlere sahiptir (206).

E vitamininin, demirle indüklenen lipid peroksidasyonunu da önlediği, deneysel hayvan modellerinde post-travmatik omurilik ve beyin hasarının E vitamini uygulaması ile önlenemediği gösterilmiştir (207). Demir tuzlarının sıçanda hipokampusu enjeksiyonuyla lipid peroksidasyonu, fokal ödem, nekroz ve epileptojenik nöbetler geliştiği, önceden α -tokoferol uygulanmasının histopatolojiyi düzelttiği, lipid peroksidasyonunu ve konvülsiyonları önlediği saptanmıştır (208).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, α -tokoferolün membran lipidlerinin korunmasının yanı sıra enerji metabolizmasının sürdürülmesinde (209) ve membran proteinlerinin korunmasında önemli işlevleri olduğunu, oksidatif stres altındaki hücrelerde protein tiyollerini oksidasyona karşı koruduğunu, özellikle de aktin molekülündeki tiyol gruplarının yapısının modülasyonunda çok önemli role sahip olduğunu ortaya koymuştur (210). Nitekim hücre kültürlerinde oksidatif stresle meydana gelen 'bleb' oluşumu esnasında hücre iskeleti proteinlerinin ve biyomembranların değiştiği, kültürle önceden α -tokoferol veya tiyol indirgeyici bir ajan uygulamasının bleb oluşumunu azalttığı gösterilmiştir.

Yine son yıllarda, E vitamininin, oksidan strese karşı hücresel cevabı, sinyal iletim yollarını modüle etmek suretiyle etkilediği gösterilmiştir (211). Bu etki antioksidan işlevinden bağımsızdır. α -tokoferolün düz kas hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği, protein kinaz C aktivitesini azalttığı, fosfoprotein lipaz 2A aktivitesini arttırdığı bulunmuştur (202, 211). Hücre kültürü çalışmalarının sonuçları hücre büyümesinin lipid peroksidasyonu ile inhibe edilmesi halinde d- α -tokoferolün inhibitör etkeni uzaklaştırarak büyümeyi yeniden stimüle ettiği ve hücre proliferasyonunu indüklediğini göstermektedir (211). Bunun aksine olarak E vitamininin hücre büyümesini inhibe ettiği de gözlenmiştir (201). Bu etkinin yine antioksidan etkisinin dışında bir etki olduğu, d- α -tokoferolün hücre proliferasyonunu regüle edebilen bir sinyal elementi olan protein kinaz C aktivitesini inhibe etmesi sonucu meydana geldiği sanılmaktadır. d- α -tokoferolün bu spesifik inhibitör etkisi diğer tokoferollerde yoktur ve hücre tipine ve kullanılan stimülüse bağımlılık gösterir. Fizyolojik koşullarda düz kas hücre kültürlerinin proliferasyonu inhibe edici etkisinin altında yatan mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Ancak, oksidatif stres koşullarında düz kas hücrelerindeki d- α -tokoferol düzeyinin azalması, bu hücrelerin büyümesine ve proliferasyonuna yol açar ve aterosklerozun gelişmesine katkıda bulunur. Sinyal iletiminin modülasyonu üzerindeki bu etkilerin, antikanser ve immünstimulan etkilerine de katkısı olduğu sanılmaktadır (201, 211).

Araşidonik asit kaskatı alanındaki yeni gelişmeler, α -tokoferolün bu yolları da regüle edebildiğini ve bu etkinin diğer E vitamini formlarında bulunmadığını göstermiştir (212). E vitamini sitozolik fosfolipaz A2'nin ve siklooksijenazın aktivitelerini upregüle eder (213). Potent bir vazodilatör ve platelet agregasyon

inhibitörü olan prostasiklin salımını doza bağımlı olarak arttırmasının temelindeki mekanizmanın da araşidonik asit kaskatındaki bu iki hız-kısıtlayıcı enzimin aktivitelerini arttırması olduğu sanılmaktadır (202).

E vitamini prostaglandinlerin ve lipid peroksidasyonu ürünlerinin oluşumunu modüle ederek immün cevabı ve hücrel immüniteyi regüle eder; mikrozomal enzim aktivitelerini etkileyerek ksenobiyotik metabolizmasını modüle eder; A vitamini kullanımını arttırır; steroid metabolizmasında esansiyel bir kofaktörün stimülasyonunu sağlar (201).

Diğer taraftan yakın zamana kadar yapılan temel araştırmaların ve epidemiyolojik çalışmaların sonuçları, RDA değerleri üzerindeki dozlarda E vitamini alımının, sağlığın optimum düzeyde sürdürülmesi için yararlı olduğu görüşünü gündemde tutmuştur. Ancak son yıllarda yapılan iyi düzenlenmiş prospektif çalışmalar bu görüşü bütünüyle desteklememekte, E vitamininin ve diğer diyetel antioksidanların, kardiyovasküler hastalıklar ve kanserdeki etkinliklerinin büyük ölçekli araştırmalarla kanıtlanması gerektiğini ortaya koymaktadır (201). E vitamini suplemantasyonunun, sadece E vitamini eksikliği olan çocuklarda ve malabsorbsiyonlu yetişkinlerde nörolojik semptomları önleyici ve azaltıcı etkisi olduğuna ilişkin yeterli destekleyici data olduğu bildirilmektedir (214). Klinik araştırmaların sonuçlarının da RDA'nin üzerinde E vitamini alımının veya suplemantasyonun immün cevabı arttırabileceğini ve dolayısıyla kansere ve infeksiyon hastalıklarına karşı koruyucu olabileceğini gösterdiği ileri sürülmektedir (201).

1.2.3. Oksidatif Stres ve Serbest Radikal Ölçüm Yöntemleri

Biyolojik sistemlerde meydana gelen serbest radikallerin ve oluşan oksidatif stresin ölçümü doğrudan veya dolaylı çeşitli yöntemlerle yapılır. Ancak reaktif oksijen bileşiklerinin direkt yöntemlerle analizi, yüksek reaktiviteleri (ikinci dereceden hız sabiteleri yaklaşık olarak 10^6 - 10^9 $M^{-1}s^{-1}$) ve çok kısa yarı ömürleri (10^{-9} - 10^{-4} saniye) nedeniyle son derece güçtür (215). Düşük konsantrasyonda reaktif oksijen bileşiklerinin doğrudan ölçümünün yapılabildiği yegane teknik elektron spin rezonans (ESR) tekniğidir (216). Kemilüminesans tekniği ile de doğrudan veya

dolaylı olarak serbest radikal tayinleri yapılabildiği bildirilmektedir (215). Ayrıca bazı spesifik radikal tutucu ajanlar kullanılarak serbest radikal ölçümleri yapılabilmekte ise de bu ajanların spesifiteleri düşüktür (139).

Dolaylı ölçüm yöntemleri hücrelerdeki nükleik asit, lipid ve proteinlere oksidatif saldırı sonucunda oluşan hasar ürünlerinin ölçümü esasına dayanır.

Oksidatif DNA hasarının ölçümü genel olarak, tek zincir kırıklarının, çift zincir kırıklarının, kromozomal hasarların belirlenmesi veya DNA bazlarında hidroksil radikalının oluşturduğu yoğun hasara bağlı olarak meydana gelen pirimidin veya pürin türevi ürünlerin kanda veya idrarda gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi/*selected-ion monitoring* (GC/MS/SIM), elektrokimyasal detektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve benzeri tekniklerle saptanması ile yapılır (216).

Proteinlerdeki oksidatif hasar çeşitli yapısal değişikliklere (primer, sekonder veya tersiyer yapıda değişme; amino asit kaybı; spontan veya indüklenmiş protein agregasyonu ve fragmentasyonda artma gibi) neden olur. Bunlara bağlı olarak enzimatik ve nonenzimatik aktivitede değişiklik olur, immünolojik reaktivitede değişiklikler meydana gelir (217). Protein agregasyonu ve/veya protein fragmentasyonu protein elektroforezi ile saptanabilir. Sekonder ve tersiyer yapı değişiklikleri, protein çözünürlüğünde değişikliklerden saptanır. Serbest radikal saldırısına bağlı konformasyonel değişiklikler, X-ray difraksiyon teknikleri ile saptanır (215). Klinik yönden de en çok kullanılan tekniklerden biri aminoasit bakiyelerinde (özellikle prolin, arjinin, lizin ve treoninde) karbonil grupları oluşumunun analizidir. Kolorimetrik assay yöntemi ile total protein oksidasyonunun ölçümü yapılırken (218), monoklonal antikorlar kullanılarak yapılan immunoblotting analizi ile (217) bireysel proteinler üzerindeki oksidatif hasarlar ölçülebilmektedir. Lipidlerdeki oksidatif hasar 1.2.3.2.'de sözü edilen dolaylı ve dolaysız çeşitli lipid peroksidasyonu ölçüm yöntemleri ile saptanır (127).

Serbest radikal araştırmalarında kullanılan diğer bir dolaylı ölçüm yaklaşımı ise antioksidan enzim aktivitelerinin tek tek ölçümü veya organizmanın antioksidan kapasitesinin ölçümüdür (134).

1.2.3.1. Elektron Spin Rezonans veya Elektron Paramanyetik Rezonans Spektroskopisi

Elektron spin rezonans (ESR) veya elektron paramanyetik rezonans (EPR) spektroskopisi biyolojik sistemlerde meydana gelen radikal türlerinin doğrudan belirlenmesini sağlayan bir yöntemdir (219). Eşlenmemiş elektrona sahip olan bir yapı olarak tanımlanan serbest radikal, bu özelliği nedeniyle paramanyetikdir. Bu özellik serbest radikallerin ESR spektroskopisi yoluyla tanımlanmalarının temelini oluşturur ve eşlenmemiş elektronun sahip olduğu manyetik moment bu yöntemle doğrudan ölçülebilir (220). Dolayısıyla paramanyetik olmayan yapıların bu yöntemle incelenmesi olanaksızdır. Bu özelliği ESR'a kompleks biyolojik sistemlerde selektif ölçüm olanağı sağlayarak bu yöntemi değerli bir teknik haline getirir. ESR tekniğinin temelinde, değişken bir manyetik alana konulan örneğin içinde mevcut olan eşlenmemiş elektronların mikrodalga enerjisini absorbe etmeleri ve dolayısıyla bu elektronların yüksek bir enerji düzeyine geçmesi olayı yatmaktadır (219). Bu absorpsiyonun manyetik alan içindeki konumu (g faktörü) ve rezonans çizgileri arasındaki uzaklık (*hyperfine splitting* [aşırı ince yapı] sabiteleri) ve rezonans çizgilerinin yapısı ve yarılmalar (*splitting*) örnekte mevcut radikallerin yapısı ve tabiatı hakkında değerli bilgiler verir (219). Kantitatif tayinler sinyal şiddetinin (rezonans çizgilerinin yüksekliği) değerlendirilmesi ile yapılır.

ESR tekniğinin duyarlılığı oldukça yüksektir (deteksiyon limiti 10^{-8} M). Ancak pratikte, aşırı ince yapının gözlenebilmesi için deteksiyon limiti 10^{-6} olarak kabul edilmektedir (221). Bu yöntemle sadece ölçülebilir konsantrasyonda birikebilen dayanıklı radikaller veya dayanıklı olmamakla birlikte yeterince yüksek kararlı hal konsantrasyonlarına ulaşabilen serbest radikaller ölçülebilir. Biyolojik sistemlerde doğrudan ölçülebilen böyle radikallere örnek olarak flavin (222), kinon (223), ariloksil (224) ve nitroksit radikalleri (225) verilebilir.

Bununla birlikte, biyolojik yönden önemli serbest radikallerin çoğu son derece reaktiftir ve ESR ile ölçüm için yeterli konsantrasyona asla erişemezler. Örneğin $\text{OH}^\bullet$ difüzyonla kontrollü hızlarda bir çok organik molekülle ve kendi molekülleri ile reaksiyona girer (226). Bu nedenle de biyolojik bir sistemde $\text{OH}^\bullet$ 'nin ESR ile doğrudan analizi hemen hemen olanaksızdır.

Hidroksil radikaline oranla daha az reaktif olan kısa ömürlü radikallerin ESR tekniği ile ölçümü için hızlı dondurma, liyofilizasyon, sürekli akım ve spin tuzaklama gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.

1.2.3.1.1. Hızlı dondurma

Örneğin hızla dondurulmasıyla radikallerin reaksiyon hızının yavaşlatılması esasına dayanır. Ancak çeşitli dezavantajları vardır. Radikalin sıvı bir ortamda bulunmaması ve meydana gelen anizotropik etkilerin radikalin tanımlanmasını güçleştirmesi bunların en önemlileridir. Ayrıca dondurmadan önceki başlangıç radikal konsantrasyonu ve dondurma süresi (yaklaşık 5-10 milisaniye) önemli sınırlayıcı faktörlerdir (221).

1.2.3.1.2. Liyofilizasyon

Duyarlık artırıcı bir yöntemdir. Liyofilizasyonla, suyun yaptığı mikrodalga absorpsiyonu azaltılarak sinyal şiddeti artırılır ve örnek hacmi azaltılarak radikallerin kararlı hal konsantrasyonu yükseltilir. Ancak istenmeyen bazı radikallerin (askorbil radikali gibi) oluşma olasılığı fazla olup, bunlar analizde önemli sorunlar yaratır (219).

1.2.3.1.3. Sürekli Akım

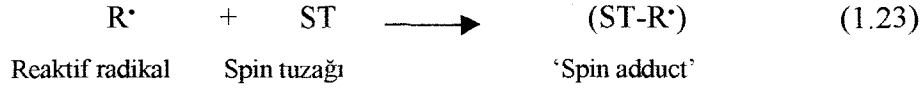
Yüksek konsantrasyonda reaktif radikal meydana getiren hızlı karışan sistemlerin kullanımı bir diğer seçenektir (227). Ancak bu teknik zaman alıcıdır ve fazla miktarda örnek kullanımını gerektirir (220)

1.2.3.1.4. Spin Tuzaklama

ESR spektroskopisi uygulamalarında karşılaşılan ve yukarıda sözü edilen güçlüklerin çoğu spin tuzaklaması tekniği ile ortadan kaldırılabilmektedir. İlk kez Boer ve ark. (228) tarafından tanımlanan bu teknikte, stabil olmayan bir radikalle

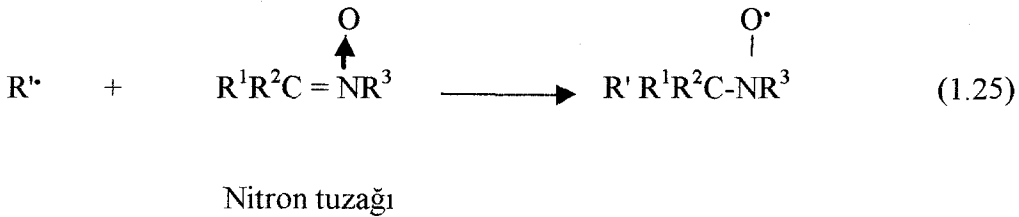
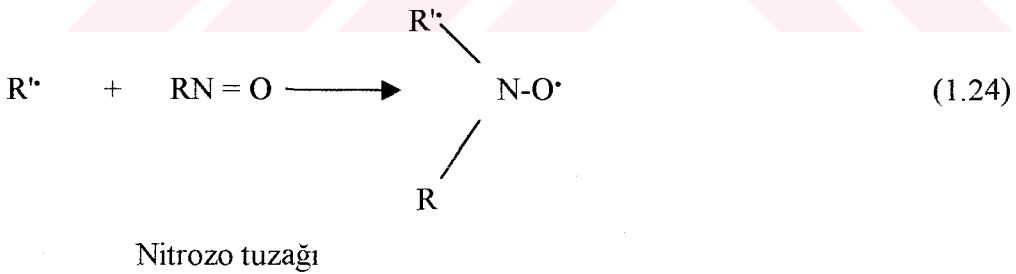
kovalan olarak reaksiyona girerek stabil bir serbest radikal oluşturan bir madde, bir ‘*spin trap*’ (spin tuzağı) kullanılır (220).

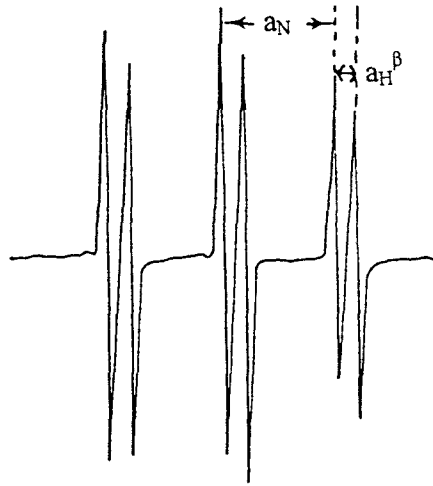
Yöntemin dayandığı temel reaksiyon Eşitlik 1.23’de görülmektedir (216).



Böylece meydana gelen radikal tuzaklanarak ‘uzun ömürlü bir şekil’de kalması sağlanır ve konsantrasyonu kolayca ölçülebilen düzeylere yükseltilmiş durumdadır ($\sim \geq 10^{-6} - 10^{-7} \text{ M}$). Dolayısıyla oluşan ‘spin-adduct’ oda sıcaklığında konvansiyonel ESR aletleri kullanılarak ölçülebilir. Spin adduct’ın aşırı ince yapı profili orijinal radikalın tayin ve teşhisine yarayacak bilgiyi sağlar. Stabil serbest radikal birikebildiği için, spin tuzaklaması bir integratif ölçüm yöntemidir. Bu nedenle de serbest radikallerin oluşumunu anında ölçen ya da kararlı hal düzeylerini ölçen yöntemlere kıyasla daha yüksek duyarlılığa sahiptir (216, 220).

Spin tuzağı olarak en çok kullanılan maddeler nitronlar ve nitrozo bileşikleridir. Orijinal radikal, her iki grup maddeyle de, nitroksit yapısında daha stabil bir adduct oluşturur (Eşitlik 1.24 ve 1.25) (216).





Şekil 1.7. 4-POBN ile tuzaklanan bir radikale ait ESR spektrumu ve a_N , a_H^β yarılmaları.

a_N ve a_H^β değerleri, çeşitli spin tuzaklar ve bunlarla tuzaklanan radikaller için belirli deney koşullarında sabittir. Bu özellikten yararlanılarak oluşturulan tablolar yardımıyla tutulan radikalın tanımlanmasına ilişkin bilgiler elde edilebilir.

Aşırı ince yapı yarılmaları manyetik alan birimleriyle ifade edilir. Bu büyüklük 4-30 G arasında değişir ve sıklıkla 15 G civarındadır (G= Gauss veya militesla, 10 G= 1 mT).

a_N 'ın kesin değeri azot üzerindeki süstitüentlerin yapısına ve nitroksitin çözündürüldüğü ortama bağlıdır. Dolayısıyla ideal bir spin tuzağı, yalnızca tuzaklanan radikalın nükleer spinine bağlı nitroksit aşırı ince yapı etkileşmesi oluşturan bir ajandır (216).

Spin tuzağı seçiminde bir taraftan ajanın kendine ait nitelikler gözönüne alınırken, bir taraftan da oluşturduğu spin adduct'ın niteliği dikkate alınır. Spin tuzağının çözünürlüğü fazla olmalı, radikal tuzaklama reaksiyonu dışında kimyasal ve fotokimyasal olarak inert olmalı ve radikal tuzaklama reaksiyonunun hızı yüksek olmalı, dolayısıyla düşük konsantrasyonlarda kullanılabilmelidir (216).

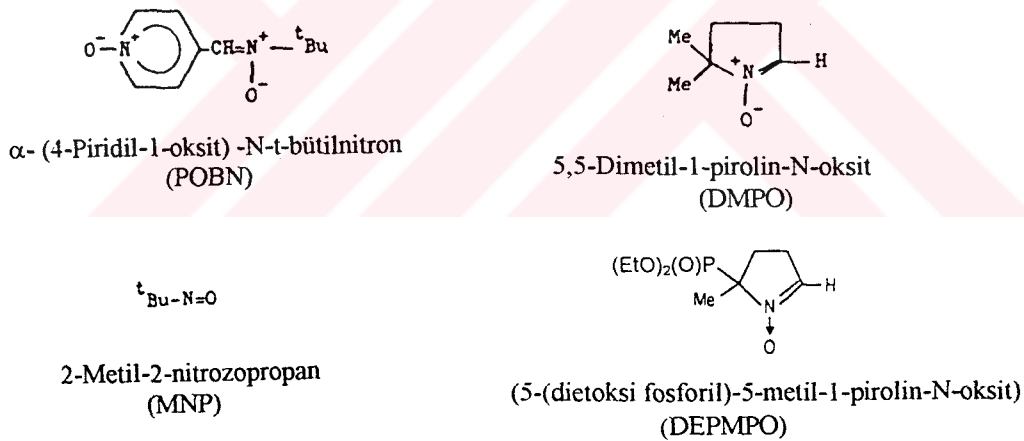
1.2.3.1.4.1. Nitrozo Spin Tuzakları

C-nitrozo türevi spin tuzakların kullanımında en büyük avantaj, tutuklu radikalın spin adduct'daki nitroksit azotuna doğrudan bağlanmasıdır (Eşitlik 1.24). Bu nedenle nitrozo spin tuzağı adductlarının aşırı ince yapı sabiteleri nisbeten

büyüktür ve tuzaklanan radikalın manyetik çekirdeğindeki yarılmaları daha iyi ortaya koyan, dolayısıyla daha iyi çözümlenebilen niteliktedir. Ayrıca nitron spin tuzaklarına kıyasla daha seçicidirler. Esas itibarıyla karbon merkezli radikalleri, daha düşük oranda da azot ve oksijen merkezli radikalleri tuzaklarlar (230).

Ana dezavantajları ise termal ve fotokimyasal olarak labil olmaları ve oksijen merkezli radikallerle yaptıkları adduct'ların oldukça dayanıksız olmasıdır. Nitekim hidroksil radikali ile yaptıkları adduct'ların dayanıksızlığı en büyük dezavantajlarıdır. Alkoksil ve hidroperoksil radikalleri ile yaptıkları adductlar ise oda sıcaklığında dayanıklıdır (220). Ayrıca dimerize olmaya yatkın olmaları nedeniyle çözünürlükleri azdır. Oda sıcaklığındaki çözeltilerinin ancak belirli bir fraksiyonu etkindir. Örneğin organik çözücüde çözüldürülen 2-metil-2-nitrozo propan (MNP)'ın % 90'ı tuzaklama yapabilir (220).

Bu gruptan en çok kullanılan spin tuzaklara örnek olarak yukarıda sözü edilen MNP'den başka 3,5-dibromo-4-nitrozobenzensulfonat (DBNBS) verilebilir (Şekil 1.18) (231).



Şekil 1.8. Yaygın olarak kullanılan spin tuzakların kimyasal yapıları.

1.2.3.1.4.2. Nitron Spin Tuzaklar

Nitronlar, *in vivo*, *ex vivo* ve *in vitro* birçok biyolojik sisteme kolay uygulanabilmeleri nedeniyle en popüler spin tuzaklar olarak tanımlanırlar. Yeterli derecede hidrofiliktirler, ışıktan etkilenmezler, toksisiteleri yüksek değildir ve

tekrarlanabilir sonuçlar verirler. Ayrıca oluşturdıkları adduct'lar, özellikle de karbon-merkezli adduct'ların bazıları yıllarca olmak üzere, stabildir.

Nitron grubu spin tuzaklar karbon, hidrojen, oksijen ve halojen merkezli de kapsayan çok sayıda farklı radikali tutabilirler (230). Eşitlik 1.25'de görüldüğü gibi nitron spin tuzaklar ile tutulan radikal, α -karbon atomuna bağlanır. Bu nedenle tuzaklanan radikalın manyetik çekirdekleri nitroksit azotunun uzağında kalır. Sonuçta ESR yarılmalarına katkıları az olur, tuzaklanan radikalın yapısı ve karakteri spektrumdan kolaylıkla okunamaz, iyi ve doğru tanımlama için özellikle de bir 'adduct karışımı' oluşmuşsa ileri uzmanlık ve deneyim gerekir (216, 220). Böyle durumlarda çözüm, eşdeğer koşullarda referans bir nitroksit oluşturarak elde edilen yarılmaları karşılaştırılmak yoluyla sağlanır (216).

Diğer taraftan bir β -hidrojeni taşıyan spin tuzaklar, örneğin 5,5-dimetil-1-prolin-N-oksit (DMPO), hem β -hidrojene, hem de nitroksit azotuna bağlı aşırı ince yapı yarılmaları olan adduct'lar oluştururlar. Böyle adduct'larda a_N ve a_H 'ın büyüklüğü fazla olduğu için duyarlık artar ve tuzaklanan radikalın tayini kolaylaşır (232).

Nitron tuzaklar okside edilebilir ve indirgenebilirler; hidroksilamin, oksim, imin, hidroksamik asit, nitroksit ve nitrozo bileşiklerine dönüşebilirler (220). Bu reaksiyonları demir, bakır gibi metal iyonları katalize edebilir. Örneğin DMPO'nun ve benzerlerinin $FeCl_3$ ile oksitlenmesi ile karşılık gelen hidroksamik asitler oluşur. Hidroksamik asitlerin oksidasyonu ile de nitroksitler artifakt olarak oluşabilir (220). Şelate edilmiş demir de nitronlarla reaksiyona girip ESR sinyali veren radikaller oluşturabilir (220).

Karşı karşıya kalınan tüm zorluklara karşın nitron grubu spin tuzakların önemli bir avantajı oksijen merkezli radikallerle oldukça dayanıklı spin adduct'lar yapmalarıdır. Bu nedenle biyolojik sistemlerdeki okside edici radikallerin araştırılmasında oldukça geniş bir kullanıma sahiptirler. Özellikle $OH^\bullet$ ve $O_2^{\bullet-}$ radikallerinin belirlenmesi için en uygun spin tuzaklar nitron yapısındadır. Ancak mevcut nitron tuzakların kendi aralarında da avantaj ve dezavantaj farkları bulunur. Genel olarak DMPO gibi siklik nitron tuzaklar $O_2^{\bullet-}$ ve $OH^\bullet$ 'ne karşı yüksek reaktivite gösterirler ve nispeten zor hidrolize olurlar. Fakat oksijen ve ışığa duyarlılıkları fazladır. Bu nedenle de raf ömürleri kısadır (220, 231). 4-POBN (α (4-

piridil-1-oksit)-N-*t*-butil nitron) ve PBN (α -fenil N-*t*-butil-nitron) gibi aril nitronların $O_2^{\cdot-}$ ve $OH^{\cdot}$ 'ne karşı reaktiviteleri daha düşüktür, daha kolay hidrolize olurlar, fakat raf ömürleri daha uzundur (220, 233).

Yakın yıllarda geliştirilen DEPMPO (5-(dietoksi fosforil)-5-metil-1-pirolin-N-oksit)'nun kimyasal/biyokimyasal/hücrel sistemlerde süperoksit taylorleri için DMPO'dan çok daha duyarlı ölçüm olanağı sağladığı ve oluşan adduct'ların DMPO'nunkinden 15 kez daha uzun ömürlü olduğu gösterilmiştir (234).

Ayrıca nitronlar sulu ortamda pH'ya bağılı hidroliz reaksiyonlarına uğrayabilirler ve reaksiyon ürünleri hidroksil radikallerinin tuzaklandığı şekilde yanlış sonuçlara götürebilir. Nitronlar nükleofilik saldırılara da duyarlıdır ve bu radikal ürünlerinin oluşumuna yol açar (220). Tüm bu artifaktlar nedeniyle bir spin tuzaklama deneyinde bir nitroksitin belirlenmesi, mutlaka bir radikalın tuzaklandığı anlamına gelmez. Doğrulayıcı işlemlerle elde edilecek daha ileri kanıtlara ihtiyaç vardır. Örneğin, tuzaklanan radikalın $OH^{\cdot}$ veya $O_2^{\cdot-}$ olduğunu göstermek için SOD veya CAT gibi antioksidan enzimler kullanılabilir (235). Spektrumda ayırıcı bilgi elde etmek için radyoaktif işaretli maddeler de kullanılabilir (219, 229).

Diğer bir yaklaşım ise oluşan radikal adduct'ın sistemden doğrudan izolasyonunu takiben kütle spektrometrisi (MS) ile tayini veya yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC) gibi sistemlerde izolasyonu ve tayinidir. Ayrıca ESR'la kombine HPLC-MS, GC-MS sistemleri kullanılabilir (219, 229).

1.2.3.1.4.2.1. 4-POBN

4-POBN, PBN'in suda çözünen bir analogudur. Yüksek hidrofilisitesi ve hücre membranlarından geçebilmesi nedeniyle özellikle hücrel sistemlerde spin tuzacı olarak tercih edilen bir nitron türevidir (236). Işık ve oksijen varlığına nisbi olarak dayanıklıdır. Biyolojik sistemlerde, oksijen ve karbon merkezli radikallerle ve lipid hidroperoksi radikalleri ile adduct oluşturmak üzere yaygın olarak kullanılır. Hidroksil radikali ile β -hidroksi nitroksit adduct'ı yapar (220). Azot ve β -hidrojen bağlaşımı (coupling) nedeniyle daima herbiri ikiye yarılmış bir triplet şeklinde

spektrum verir (Şekil 1.17). Tablo 1.9'da 4-POBN ile çeşitli sistemlerde elde edilen radikal adduct'lara ait aşırı ince yapı sabiteleri görülmektedir.

Tablo 1.9. 4-POBN ile çeşitli sistemlerde elde edilen radikal adduct'larına ait aşırı ince yapı sabite değerleri.

Spin adduct	Sistem	a_N	a_N^β	a_N^γ	Kaynak
POBN/HOO $\cdot$	Sodyum persülfat-gümüş nitrat	14.18 14.46	1.72 1.75	-	238
POBN/OH $\cdot$	Sodyum persülfat-gümüş nitrat	15.10 14.97	1.66 1.68	-	238
POBN/pentil	Linoleik asit	15.80	2.60	-	239, 240
POBN/pentenil	Linolenik asit	15.80	2.60	-	240
POBN/etil	Lipooksijenaz-linoleat	15.78	2.50	0.30 ^b 0.34	241
POBN/fenil etil	Lipooksijenaz-linoleat	15.73	2.75	-	241
POBN/fenil etil	Mikrozomal-NADPH	15.73	2.73	-	242
POBN/etanol (hidroksi etil)	Mikrozomal-NADPH	14.97	3.48	-	243
POBN/[¹³ C]etanol (hidroksi etil)	Mikrozomal-NADPH	14.97	3.47	-	243
POBN/2-propanol (2-hidroksi propil)	Mikrozomal-NADPH	14.98	2.67	-	243
POBN/2-butanol (2-hidroksi butil)	Mikrozomal-NADPH	15.10	2.56	-	243

^b Hidroksil hidrojeni nedeniyle meydana gelen bölünme

POBN'in $\text{OH}^\bullet$ ve $\text{O}_2^{\bullet-}$ radikal adduct'larının dayanıklılığı çok yüksek değildir. $\text{O}_2^{\bullet-}$ adduct'larının kuvvetli oksidan türevlere, muhtemelen de hidroksil radikaline yıkımlandığı bildirilmiştir (231).

POBN'in ve PBN'in sitokrom P-450'lerin substratı olduğu, monooksijenaz enzim aktivitelerini kompetitif bir mekanizma ile inhibe ettikleri gözlenmiştir ancak POBN'in yaptığı inhibisyonun düşük olduğu ve konsantrasyona bağlı olduğu bildirilmiştir (237). Bu etkileşme, POBN (ve PBN)'in biyolojik sistemde serbest radikallerin olduğu bölgeye kadar ulaşabildiğini ve bu nedenle kısa ömürlü radikalleri de tuzaklayabilen etkin bir spin tuzağı olduğunu gösterir. Ancak bir ESR analizinde spin tuzaklama sonuçlarının negatif olması halinde, serbest radikal bulunmadığı şeklinde bir karara varmadan önce, POBN'in (veya kullanılan spin tuzağının) enzim inhibisyonu yapma olasılığının elimine edilmiş olması gerekir.

1.2.3.2. Lipid Peroksidasyonunun Ölçümü

Lipid peroksidasyonu serbest radikallerin biyolojik sistemlerdeki lipid bileşenlerini yıkımladığı invazif bir prosestir. Çok sayıda ürün oluşumu ile sonuçlanır ve bu ürünler lipid peroksidasyonunun nicel ve nitel olarak belirlenmesinde kullanılabilirler. Bu yöntemlerden sıklıkla kullanılanlar aşağıda özetlenmiştir:

- PUFA kaybının GC ve HPLC ile ölçümü (127)
- Karbon merkezli radikallerin oksijen tutmasının ve peroksit yıkım reaksiyonları esnasında oksijen tutulmasının oksijen elektrodu ile ölçümü (127)
- Lipid peroksitlerin iyodürleri oksitleyerek açığa çıkardığı iyodun tiyosülfatla titre edilmesi suretiyle ölçümü (217)
- Lipid peroksidasyonu esnasında oluşan radikal ara ürünlerin ESR-spin tuzağı teknikleri ile analizi (219)
- Lipid peroksit yıkımlanması esnasında oluşan pentan ve etanın GC ile ölçümü (127)
- Lipid peroksidasyonu esnasında oluşan 4-hidroksinonenal gibi sitotoksik hidroksialkanların GC, HPLC veya antikör teknikleriyle ölçümü (127)

- PUFA'ların oksidasyonu esnasında oluşan dien konjugasyonunun ikinci-türev spektrası üzerinden spektrofotometrik olarak tayini (127)
- Lipid peroksidasyonunun son ürünleri olan MDA gibi aldehitlerin, amino grupları ile asit pH'da Schiff bazı vermek üzere reaksiyona girmelerini takiben spektrofotometrik olarak ölçümü (244)
- MDA'nın tiyobarbitürik asitle verdiği renkli (pembe) kromoforun spektrofotometrik veya spektrofotometrik ölçümü (127)

Son yöntem tiyobarbitürik asit reaktif materyal (TBARS) ölçüm yöntemi adı ile de adlandırılır. Çünkü bu yöntemle ölçülen materyal sadece lipid peroksidasyonu esnasında oluşan MDA'yı değil, test esnasında oluşanları da kapsar. Özgül bir yöntem olmamak gibi dezavantajlara karşın kolay ve hızlı bir yöntem olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (127).

1.2.3.3. Enzimatik ve Nonenzimatik Antioksidan Düzeylerinin Ölçümü

1.2.3.3.1. SOD Enzim Aktivitesinin Tayini

Süperoksit dismutaz enzim aktivitesini, enzimatik ortamda substrat tüketiminin veya ürün oluşumunun ölçümüne dayalı doğrudan yöntemlerle tayin çok güçtür. Çünkü SOD'ların substratı olan O_2^- 'in de, enzimin bu substratla reaksiyonu sonucunda oluşan ürünlerin de stabilitesi çok azdır. Bu nedenle SOD aktivitesi tayini için kullanılan rutin yöntemler O_2^- ile reaksiyona giren ve kolay ölçülebilen bir indikatörün bulunduğu bir test ortamında, O_2^- 'in enzimatik veya nonenzimatik olarak oluşturulması esasına dayanan 'dolaylı' ölçüm yöntemleridir. Bu esasa dayanan çeşitli yöntemlerde SOD miktarı, indikatör reaksiyonundaki değişiklikten hesaplanır. Genellikle indikatör ile O_2^- arasındaki reaksiyonu % 50 oranında inhibe eden enzim miktarı '1 Ünite SOD enzim aktivitesi' olarak tanımlanır (178).

SOD ölçüm yöntemlerinde en çok kullanılan O_2^- oluşturuçu sistem, ksantin/ksantin oksidaz sistemidir. O_2^- indikatörü olarak (O_2^- ile indirgenen) sitokrom c veya nitroblutetrazolyum kullanılır. O_2^- oluşturuçu diğer kaynaklar olarak

pirogallol, epinefrin, 6-OH dopamin veya hidroksilamin otooksidasyonu; potasyum O_2^- ve oksijenin elektrokimyasal yolla redüksiyonu kullanılmaktadır (178, 245).

Süperoksit indikatörü olarak ise epinefrin, tetranidrometan, pirogallol otooksidasyonları; 2-etil 1-hidroksi-2,5,5,-trimetil-3-oksazolidin oksidasyonu ve luminolün kemiluminesansı kullanılabilir (245).

Bu yöntemlerin uygulaması esnasında ortamda bulunan süperoksidi süpürücü bir ajan ve/veya indikatör ile reaksiyona giren veya O_2^- 'in oluşum hızını değiştiren herhangi bir faktör SOD aktivitesinin hatalı tayinine yol açabilir. Böyle problemlerin giderilmesinde SOD'ın organik solvanlarla ekstraksiyonu, sitokrom c'nin asetilasyonu, siyanür ilavesi ve diyaliz gibi ilave yöntemler uygulanır (178).

Diğer taraftan otooksidasyon yöntemlerinin bir dezavantajı Mn SOD ve Fe SOD aktivitesinin düşük olduğu yüksek pH değerlerinde çalışılmasının gerekli oluşudur (245).

Süperoksit anyonunun doğrudan izlenmesine dayanan SOD ölçümleri, 'puls radyoliz' tekniği, polagrofik teknikler, hızlı dondurma ESR tekniği ve ^{19}F NMR spektroskopisi ile yapılabilir. Ancak bu yöntemler, örneğin çok yüksek saflıkta olmasını gerektiren sofistike tekniklerdir (178).

Ayrıca enzimatik yöntemlere kıyasla güvenilir ve tekrarlanabilir olan ve yüksek spesifiteye sahip immünokimyasal yöntemlerle SOD tayinleri de olanaklıdır (178).

1.2.3.3.2. GSHPx Aktivitesi Tayini

GSHPx aktivitesi tayininde en çok kullanılan yöntemler GSHPx'ın, H_2O_2 'i veya hidroperoksitleri substrat olarak kullanırken, GSH'un oksidasyonunu katalize etmesi ve bu esnada oluşan NADPH oksidasyonunun (Eşitlik 1.17) spektrofotometrik veya fluorometrik olarak izlenmesi esasına dayanır (246). Çeşitli modifikasyonlarla uygulanan bu yöntemlerde substrat olarak H_2O_2 , kümenhidroperoksit veya tersiyer butil hidroperoksit kullanılır. Enzim aktivitesi, dakikada okside olan μmol NADPH üzerinden ifade edilir (187, 246, 247).

Diğer bir yaklaşım, GSHPx'ın katalizlediği reaksiyondaki hidroperoksitlerin veya GSH tüketiminin ölçülmesi esasına dayalı yöntemlerin kullanılmasıdır (246,

247). Bu amaçla H_2O_2 ile GSH arasındaki reaksiyon, güçlü bir asit ilavesiyle belli bir zaman aralığında durdurulur, reaksiyon ortamında kalan GSH miktarı polarografik olarak (246) veya ditiyonitrobenzoik asit yöntemi ile ölçülür (248). Ortamda kalan H_2O_2 'in tayini esasına dayalı yöntemde ise reaksiyon yine kuvvetli asit ilavesiyle belli bir zaman aralığında durdurulur ve kullanılmış GSH civa tuzları ile uzaklaştırıldıktan sonra H_2O_2 ölçümü yapılır (247).

1.2.3.3.3. CAT Aktivitesinin Tayini

CAT aktivitesi, H_2O_2 yıkımlanmasının veya O_2 oluşumunun izlenmesi yoluyla ölçülür. H_2O_2 'in yıkımlanması, reaksiyonun belirli bir anında, kullanılmamış substrat miktarının spektrofotometrik veya titrimetrik yöntemlerle ölçülmesi suretiyle yapılabilir (249). Reaksiyon sonucunda meydana gelen O_2 miktarının polagrofi veya oksijen elektrodu ile ölçülmesine dayanan yöntemler de bulunmaktadır. Alternatif bir yöntem olarak immünopresipitasyonla ölçüm gösterilmektedir. Ancak biyolojik örneklerde CAT aktivitesi için önerilen ve en sık kullanılan yöntem, H_2O_2 yıkımlanmasının spektrofotometrik yöntemle ölçülmesidir (250).

1.2.3.3.4. İndirgenmiş ve/veya Okside Glutasyon Düzeylerinin Tayini

Biyolojik örneklerde glutasyon tayinleri enzimatik veya kimyasal ölçüm yöntemleri ile yapılır. Kullanılan yöntem ne olursa olsun reaksiyon için ilk basamak, GSH gibi protein olmayan tiyollerin, protein tiyollerinden ayrılmasıdır. Bu amaçla trikloroasetik asit, metafosforik asit, 5-sülfosalisilik asit, perklorik asit ve pikrik asit gibi protein çöktürücüleri kullanılır (251).

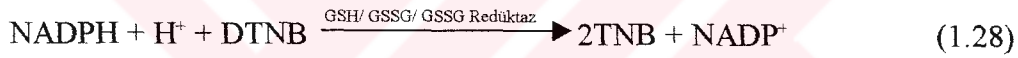
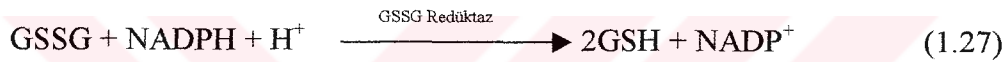
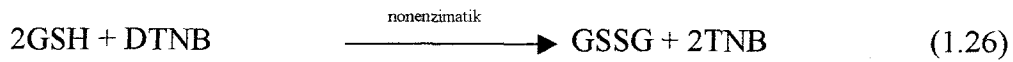
1935'lerden bu yana tanımlanmış olan glioksalaz, alloksan, sülfürik asit ve iyodometrik titrasyon gibi çeşitli yöntemlerden (252, 253) halen kullanılmakta olan glioksalaz yöntemi (251) dışında, bu metodların özgüllüğü ve duyarlılığı düşüktür ve sadece total GSH tayini için uygundur.

Ellman (253, 254) tarafından 1958'de sentezlenen ve tiyol değişim reaksiyonları ile yüksek kromojenik türevler veren bir aromatik disülfid bileşiği, 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB, Ellman reaktifi), alifatik tiyol bileşiklerinin ve

dolayısıyla GSH'un tayinine büyük ölçüde kolaylık getirmiştir. DTNB suda kolay çözünür, tiyollerle reaksiyonu kolaydır. Bir molekül tiyole karşılık 2 molekül 3-karboksi 4-nitrobenzentiolat (TNB) anyonu meydana gelir. Total GSH tayini için yakın yıllara kadar bu yöntem en çok kullanılan kimyasal yöntem olmuştur.

1966'lerden sonra geliştirilen çeşitli florometrik veya spektrofotometrik yöntemlerle indirgenmiş ve okside GSH düzeylerinin belirlenebilmesi mümkün hale gelmiştir (251).

Owens ve Belcher (255) tarafından geliştirilen ve Tietze (256) tarafından büyük ölçüde modifiye edilen enzimatik döngü yönteminde, GSH veya GSSG ile GSH redüktazın katalitik miktarları, DTNB'nin NADPH ile sürekli redüklenmesine neden olur ve olay aşağıdaki reaksiyonlara göre yürür (Eşitlik 1.26-1.28) :



Kullanıldığı her laboratuvar da az ya da çok modifiye edilen bu yöntem, halen en çok kullanılan enzimatik yöntem olma özelliğine sahiptir. Bu yöntem, ortamdaki GSH'un N-etilmaleimid (NEM) (251) veya 2-vinilpiridin (257) ile maskelenmesiyle GSSG ölçümleri için de özgül hale getirilebilmektedir.

GSH ve GSSG'nin HPLC yöntemleri ile de nicel ve nitel tayinleri yapılabilmektedir (258).

Benzer yöntemler protein tiyol gruplarının ve total tiyol düzeylerinin tayininde de kullanılır (258, 259).

1.2.3.3.5. Total Antioksidan Kapasitenin Tayini

Plazma, serum veya serum lipoprotein fraksiyonu gibi biyolojik sıvılardaki enzimatik ve nonenzimatik antioksidan düzeylerini tek tek ölçmek yerine 'total antioksidan kapasite' olarak ölçmek, biyolojik sistemin oksidatif strese karşı koyma gücünü öngörmek yönünden faydalıdır. Bu amaçla kullanılan çeşitli yöntemlerin

dayandığı temel ilke, test ortamında bilinen bir hızda serbest radikal oluşturmak ve örneğin bu radikal oluşumunu inhibe etmesini ölçmektir.

Radikal oluşturuıcı sistemler olarak radyoliz, fotoliz, elektroliz gibi fiziksel sistemler (260); azot bileşiklerinin termal dekompozisyonu, fotoindüksiyon gibi fizikokimyasal sistemler (261); Fe^{++} veya Cu^{++}/H_2O_2 , Cu^{++} /kümen hidroperoksit ve çeşitli bileşiklerin otooksidasyonu gibi kimyasal sistemler (260, 262); ksantin oksidaz veya *horseradish* peroksidaz (HRP)/ H_2O_2 gibi enzimatik sistemler (260); beyin homojenatlarında lipoperoksitler (262) gibi doku homojenatları veya NADPH-tüketen mikrozomlar gibi subselüler fraksiyonlar (260) kullanılır. Ölçüm sistemi olarak fluoresan inhibisyonu, kemiluminesans, oksijen alımı, absorbans değişikliği, TBARS, hücre morfolojisi gibi çeşitli yöntemler kullanılır (262).

1.3. Hücre Kültürleri

Hayvansal bir dokudan veya tam/intakt bir hayvandan alınan hücreler, eğer beslenme ve büyüme faktörleri sağlanırsa in vitro büyümeye devam ederler. Bu prosese hücre kültürü denir (263). Kültür işlemi tek tek hücrelerin aynen bir mikroorganizma, bakteri veya fungus gibi bağımsız bir birim olarak davranmasına olanak verir. Mitozla bölünme kapasitesi olan hücreler ve hücre popülasyonları, besin öğelerinin tükenmesi gibi, bazı parametrelerde sınırlama olmadığı sürece büyümeye devam ederler. Hücre kültürleri normal olarak tek bir tip hücre taşırlar (örneğin fibroblast kültürleri). Kültür hücreleri genetik olarak aynı olabilir (homojen popülasyon) veya bazı genetik değişkenlikler gösterebilirler.

Günümüzde hücre kültürleri metabolik ve toksikolojik çalışmalar başta olmak üzere çok çeşitli amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır. Tercih nedenlerinin başında hücre büyümesinin kararlı ve tekrarlanabilir olması gelir. Ayrıca hücre kültürü çalışmaları tam hayvan çalışmalarına kıyasla çok daha ekonomiktir.

Ana dezavantajı ise belirli bir büyüme periyodundan sonra hücrelerin karakteristiklerinin değişmesi ve kaynaklandığı hayvan hücrelerinden oldukça farklı hale gelmesidir. Hücreler farklı besin öğelerine adapte olabilirler, ancak bu adaptasyon hücre içi enzimlerin aktivitelerinde değişimleri de beraberinde getirir (263).

1.3.1. Hücre Kültürlerinin Hazırlanışı

Bir hücre kültürü doğrudan hayvan dokusundan hazırlanabileceği gibi kültür koleksiyonlarından da hazırlanabilir. Doğrudan dokudan izole edilen hücrelerle hazırlanan kültürlere ‘primer kültür’ adı verilir. Primer kültürler in vivo koşullardaki durumlarına yakın hücrelerle çalışma olanağı sağlar. Ancak izolasyon işleminin güçlüğü, hücre kültürünün kültür koleksiyonlarından alınan bir hücre örneği ile hazırlanmasını daha yaygın hale getirmiştir (264).

Bir primer kültürdeki hücrelerin büyümeleri durduğunda, hücrelerden bazıları taze bir büyüme ortamına alınıp ekilmek (inokülasyon) suretiyle yeni bir kültür hazırlanabilir. Bu işleme alt-kültür (*sub-culture*) hazırlama veya pasaj yapma denir. Böylece bir primer kültürün ilk pasajının yapılması ile ‘sekonder kültürler’ hazırlanmış olur. ‘Cell line’ terimi çok sayıda alt kültürler yoluyla sürekli büyümeye devam eden hücre popülasyonlarına verilen addır (265).

Hücreler genellikle alındıkları dokuya göre tanımlanırlar ve ışık mikroskobu altında karakteristik şekillerde görülürler. Hücre kültürlerinde en çok kullanılan hücre tipleri epitel hücreleri, bağ dokusu hücreleri, kas dokusu hücreleri, sinir dokusu hücreleri ve kan ve lenf hücreleri olarak sayılabilir.

Sinir dokusu hücreleri karakteristik şekilli nöronlar ve glial hücreler gibi destekleyici hücreler içerirler. Nöronlar ileri düzeyde farklılaşmış hücrelerdir ve kültürde bölünmeye uğramazlar (125).

Bağ dokusu, fibröz matriksi ve kemik kıkırdağı olan canlıların ana yapısal bileşenini oluşturur. Bağ dokusu hücrelerinden olan fibroblastlar büyüme özelliklerinin iyi olması nedeniyle hücre kültürü çalışmalarında en çok kullanılan hücre tiplerinden biridir. Fibroblastlar dokudan tripsinle ayrıldığında yuvarlak şekillidir, daha sonra katı bir yüzeye yapışarak çoğaldıklarında uzayarak karakteristik iğ şeklini alırlar (263).

Hücre kültürleri normal veya transforme hücre kültürleri olabilir. Normal hücre kültürleri diğerlerinin aksine yaşam süresi sınırlı olan diploid kromozom sayısına sahip, yapışma ve büyüme için katı bir desteğe ihtiyaç gösteren ve malign olmayan hücrelerin kültürleridir.

Desteğe bağımlı hücreler ekimi takiben birkaç saat içinde büyüme yüzeyine yapışır ve birbirine bitişik bir hücre tek tabakası oluşturana kadar büyümeye devam ederler. Makul bir büyüme hızı elde etmek için 10^4 - 10^5 hücre/ml yoğunlukta hücrenin ekilmesi gerekir. Bu, 3-4 gün içinde katı bir yüzey üzerinde 10^6 - 10^5 hücre/cm² olacak şekilde bir büyüme sağlar (266).

Hücre kültürlerinde besleyici ortamlar, 'kültür ortamı' veya 'büyüme ortamı' adıyla anılan, kimyasal olarak kompleks yapıda sıvı ortamlardır. Standart kültür ortamlarının ana bileşenlerini enerji kaynağı ve nükleik asit sentezi için gerekli ribozom prekürsörü olarak bulunan glukoz; protein sentezi prekürsörleri olarak çeşitli aminoasitler; tuzlar; vitaminler ve hormonlar oluşturur; pH indikatörü olarak fenol kırmızısı ilave edilir. Ayrıca bu ortamlar serum ve antibiyotiklerle suplemante edilirler (263).

Kültür ortamında hücre büyümesinin durması besin ögesinin tükenmesiyle, metabolik ürünlerin veya toksik bir metabolitin birikmesiyle veya büyüme yüzeyinin eksilmesi, hücrelerin büyüme yüzeyini tamamen örtmesi (hücre-hücre etkileşimi) ile olur. Eğer kültür ortamı 2 gün sonra kısmen veya tamamen değiştirilirse maksimum hücre dansitesi yükselir. Maksimum hücre dansitesine ulaşılan kültürlerde, birkaç gün içinde alt kültürler hazırlanırsa büyümenin yeni bir kültürde devam etmesi sağlanmış olur. Alt kültür hazırlamaksızın uzun süre bırakılan kültürler canlılıklarını kaybederler (265).

Süspansiyon halinde üretilen hücrelerden alt kültür hazırlaması, yüksek dansiteli kültürün taze kültür ortamıyla 1:2-1:10 oranda seyreltilmesi ile yapılır.

Destek bağımlı hücrelerin alt kültürlerinin hazırlanması için önce hücrelerin büyüme yüzeyinden ayrılması (*detachment*) gerekir, sonra yeni kültür kabındaki taze kültür ortamına ekimi yapılır. Hücrelerin destekten ayrılması için proteolitik bir enzim olan tripsin kullanılır, böylece hücreleri destek yüzeyine bağlayan proteinler yıkılır (265).

1.3.2. Kültür Hücrelerinin Büyümesi

Kültürlerdeki büyüme kalıbı bir lag faz (oyalanma fazı)-büyüme fazı-stasyon r faz sırasını izler ve ‘S’ şeklinde bir 'hücre dansitesi $\times$ zaman' grafiği gösterir. Daha sonra ini  (azalma) fazına geçilir (265, 266).

1.3.2.1. Oyalanma Fazı

Hücre konsantrasyonunda görülür bir artışın olmadığı erken fazdır. Bu fazda büyüme faktörlerinin hücresel sentezi yapılır. Bu faktörler kritik bir konsantrasyonu a tıktan sonra büyüme ba lar. Bu fazın süresi kültür ortamının bileşimi ve hücrelerin başlangıçtaki durumu ve konsantrasyonuna bağlıdır. Kültür işlemi yüksek hücre dansitesi ve iyi durumda (viabilite iyi) hücrelerle ba latılırsa, oyalanma fazı tamamen elimine edilebilir (265).

1.3.2.2. Büyüme Fazı

Hücre sayısının eksponansiyel olarak arttığı dönemdir. Bu fazda, hücre siklusunun G1-S-G2-M fazları izlenir (263, 265).

1.3.2.3. Stasyon r Faz

Hücre konsantrasyonunun artık artmadığı, büyüme hızı ile ölüm hızının eşit olduğu fazdır. Yukarıda sözü edilen hücre büyümesinin sınırlayıcı faktörlerinden birinin mevcudiyeti bu faza girilmesine neden olur (263, 265).

1.3.2.4. İniş Fazı ve Hücre  l m 

Bu faz hücre ölümü nedeniyle gelişir. Hücreler lizise uğrayıp hücresel metabolitlerin büyüme ortamına çıkışıyla canlı hücre konsantrasyonu azalır. Ölüm nedeni apoptozis veya nekrozdur (265).

1.3.3. Hücre Ölümü

Apoptozis: Bir hücre intihar mekanizmasıdır. ‘Fizyolojik hücre ölümü’ veya ‘Programlanmış hücre ölümü’ de denilen bu olay normal fizyolojik koşullarda olduğu gibi kültür hücrelerinde de görülür. Bir stimülüsün, hücrenin ölümüyle sonlanan bir metabolik yolağı aktive ettiği endojen bir proses olarak tanımlanan bu kompleks prosesin temelinde endojen nükleazların aktive olup DNA’yı 180 baz çiftlik (bp) fragmanlara ayırması olayı vardır. Apoptotik hücrelerin membranlarında bleb (vezikül) oluşur. Bunu hücrenin büyümesi, çekirdeğin kondanase olması ve takiben hücrenin membranla çevrili apoptotik cisimlere fragmante olması izler (260, 263).

Fizyolojik koşullarda yaşamsal madde eksikliği ile ilişkisi yoktur. Ama hücre kültürlerinde besin ögesi yetersizliği halinde apoptozis erken başlayabilir.

Nekroz: Hücresel hasarı izleyen bir prosestir. Kazai veya patolojik hücre ölümü de denir. Apoptozisde olduğu gibi hücrenin intrinsik faktörleri ile değil, hücrenin iç ve dış çevresindeki önemli değişikliklere, fizyolojik koşullardan büyük ölçüde sapmalara bağlı olarak meydana gelir. Membran transport sistemlerini ve membran permeabilitesini bozan membranal hasarlar ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu bozan etkenler en önemli hücre hasarı nedenleridir. Nekrotik hücre ölümü protein sentezi ile ilgili organellerin ve mikrotübüllerin hasarı ile de meydana gelebilir. Apoptozis olayında gözlenen hücre fragmanları nekroz olayında görülmez ve kültür hücrelerinin canlılığını yitirmeleri nisbeten yavaş olur (263). Hücrelerin aniden ağır strese maruz kalmaları halinde normal olarak meydana gelen pasif bir prosestir. Hücrenin homeostazını sürdürme yeteneğinde bir bozulma ile başlar, bu su ve ekstraselüler sıvının hücreye girmesine yol açar. Hücreiçi organeller özellikle mitokondriler ve hücrenin tamamı şişer ve yırtılır (hücre lizisi). Plazma membran yırtılması ile sitoplazma içeriği, lizozomal enzimler dahil ekstraselüler sıvıya dökülür (266).

1.3.4. Hücre Proliferasyonu ve Sitotoksitenin Ölçümü

Hücre kültürü çalışmaları canlı hücre sayısı ve hücre proliferasyonunun hızlı, doğru ve tekrarlanabilir değerlendirilmesini gerektirir. Sitotoksik etkinin değerlendirilmesi için yapılan hücre kültürü çalışmalarında da benzer nitelikte yöntemlere ihtiyaç vardır.

Canlı hücre sayısının saptanması için en güvenilir yöntem koloni sayımı esasına dayalı klonojenik yöntemler olmakla birlikte, çok zaman alıcı olduğundan tercih edilmez. Direkt sayım için diğer alternatif, vital bir boya ile (Tripın mavisi) boyamayı takiben bir mikroskobik sayım odacığında (hemositometre) hücrelerin sayılmasıdır. Ayrıca hücre süspansiyonlarında elektronik olarak bir partikül sayıcısı ile (Coulter Counter) hücre sayımı yapılabilir (265, 266).

Diğer taraftan, hücrelerin protein ve glukoz içeriklerinin kolorimetrik olarak tayini; DNA sentezinin radyoaktif işaretleme (^3H TdR proliferasyon eseyi) ile, immunoessay veya kemilüminesans yöntemleriyle (BrdU inkorporasyonu eseyi) ölçülmesi esasına dayalı dolaylı yöntemlerle hücre proliferasyonu belirlenebilir (266).

Ayrıca hücrenin canlılığının belirlenmesi amacıyla, metabolik aktivitenin ölçümü esasına dayalı yöntemler (MTT testi gibi) geliştirilmiştir (267).

Sitotoksite, hücre ölümü dahil bazı hücrel kayıpları ve hücre içindeki bazı yapısal ve/veya işlevsel kayıpları ölçen testlerle belirlenir. Sitotoksite ölçümünde yukarıda sözü edilen testlere ilave olarak plazma membran permeabilitesinin ölçümü temeline dayalı yöntemler, örneğin yukarıda sözü edilen diferansiyel boya teknikleri, laktat dehidrojenaz (LDH) salımı eseyi, radyoaktif işaretlenmiş hücrelerden radyoaktivite salımı eseyleri kullanılabilir (265).

Bu yöntemlerin çok önemli bir dezavantajı, çoğu sitotoksik ajanın yaptığı hasarın başlangıç yerinin hücre içinde olmasıdır. Bu nedenle hücre membranı bozulmuş olmamasına karşılık hücre irreversil olarak hasara uğramış ve ölmek üzere olabilir. Böyle durumlarda bu yöntemlerin hücrel hasarı saptama yeteneği sınırlıdır.

Apoptotik hücre ölümü araştırmalarında en çok kullanılan yaklaşım fluorokrom boyama veya enzimatik işaretleme gibi tekniklerle DNA fragmentasyonunun saptanmasıdır (265).

1.3.4.1. MTT Testi (Tetrazolyum Testi)

Canlı hücrenin metabolik aktivitesini ölçen kolorimetrik bir testtir. Tetrazolyum tuzlarının çeşitli dehidrojenaz enzimlerinin aktivitelerinin ölçümünde kullanılıyor olmasından hareketle geliştirilmiştir (267). 'Süksinat dehidrojenaz İnhibisyonu' veya 'SDI testi' adıyla da anılan bu testte, tetrazolyum tuzu olarak 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) kullanılır. Tetrazolyum halkası sadece metabolik olarak aktif hücrelerde mitokondriyal dehidrojenazların aktivitesi sonucu açıldığı için, sadece canlı hücreler tanımlanır (267). Dolayısıyla MTT testi aktif bir oksidatif metabolizma varlığı gösteren, bu nedenle de hücre proliferasyon ve sitotoksitenin nicel olarak ölçümünde kullanılan bir testtir.

Kültür hücreleri MTT ile inkübe edildiğinde (~ 3 saat) sadece canlı hücrelerde aktif olan ve mitokondriyal solunum zincirinde yer alan süksinat tetrazolyum redüktaz sistemi ile boya indirgenir, suda çözünmeyen formazan tuzu oluşur ve renk sarıdan pembeye döner. Bu tuz çözündürülüp 570 nm dalga boyunda kolorimetrik ölçüm yapılır.

Meydana gelen formazan miktarı, canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Yöntem hızlıdır ve tekrarlanabilirliği yüksektir.

1.3.4.2. Nötral Kırmızı Testi-NR Testi

Ölü ve hasarlı hücrelerin nötral kırmızı boyasını hücre içine alamamaları esasına dayanan bir sitotoksite ölçüm yöntemidir (268). Zayıf katyonik özelliğe sahip olan bir boya olan nötral kırmızı boyası canlı hücrelerde selektif olarak lizozomlarda tutulur. Bu tutulma lizozomlarla sitoplazma arasındaki pH farkından kaynaklanır ve hücre içine alınan boya miktarı hücre kültürlerindeki canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır.

Kültür hücrelerinin nötral kırmızı ile inkübasyonunu takiben yapılan bir boya elüsyonu işleminden sonra, 540 nm'de kolorimetrik ölçüm yapmak şeklinde uygulanarak hücre proliferasyonun derecesi ölçülür.

1.3.5. Fibroblastlar

Fibroblastlar, bütün omurgalılarda bulunan mezenşimal kaynaklı hücrelerdir. Embriyonal morfojenizde önemli işlevler üstlenirler; iskelet yapısının oluşması, kas hücrelerinin yerlerine yerleşmesi, sinir liflerinin yolakları ve cildin organizasyonu fibroblastlar tarafından belirlenir. Dolayısıyla embriyoda sadece matriks bileşenlerinin sentezini yapmakla kalmaz, meydana gelen bağ dokusunun şekillenmesinde de ana rolü üstlenirler (269-271).

Fibroblastlar yetişkin hayvansal dokuda da bağ dokusunun matriks elemanlarının (örneğin, kollajenler, fibronektin, proteoglikanlar ve proteinlerin) sentezine ve sürdürülmesine devam ederler. Matriks, fibroblastlar ve salgıladıkları degradatif enzimler (kollajenez, proteoglikanlar ve diğer proteazlar) tarafından devamlı olarak dönüşüme uğrar ve yeniden yapılır. Doku hasarı ve inflamasyon doku onarımı için gerekli fibroblast proliferasyonuna ve kollajen sentezine neden olur (272).

Fibroblast hücre kültürlerinde önemli ölçüde hücre migrasyonu gözlenir. Aynı durum in vivoda da vardır ve fibroblastlar hasarlı dokularda birikirler. Bu olay spesifik kemoatraktanlara (kollajen fragmanları, fibronektin, PDGF, araşidonik asit metaboliti LTB₄ gibi) cevaben gelişir, dolayısıyla fibroblastların kemotaktik migrasyon yapma özellikleri vardır (273, 274). Bazı iyicil ve kötücül tümörlerin fibrotik tabiatının da kısmen bu kemoatraktanlardan ileri geldiği ileri sürülmektedir.

Geleneksel olarak, ekstraselüler matriks bileşenleri sentez edilebilen oval çekirdekli, yassımsı hücreler olarak tanımlanan fibroblastlar üzerinde son yıllarda yapılan çalışmalar, fenotip ve işlevsel olarak büyük ölçüde heterojenite gösterdiklerini ortaya koymuştur (272). Bu çalışmalar fibroblastların dinamik sistemler olduğunu; sitokinler ürettiklerini, immün sistemle etkileştiklerini, dolayısıyla immün sistem için integral bir rol oynadıklarını; lenfositlerde olduğu gibi farklı fenotipleri ve işlevleri olan alt populasyonlar olduklarını göstermektedir (272).

Bu heterojenite 'dokuya özgü fibroblast' kavramını gündeme getirmiştir. Örneğin, cilt dokusu fibroblastları morfoloji, proliferasyon hızı, sitokin sentezleri ve ekstraselüler matriks bileşenleri sentezi itibarıyla akciğer dokusu fibroblastlarından farklıdır (275). Ayrıca aynı anatomik yapıdaki fibroblastların da heterojenite gösterdiği, örneğin sıçan cilt ve akciğer fibroblastlarının morfolojik ve proliferatif karakteristikleri ile yüzey antijenleri farklılıklarının yanı sıra kollajen sentezindeki heterojeniteleri yönünden de 3 ayrı tip (tip I, II, III) olduğu saptanmıştır (276). Benzer farklılıkların insan periodontal dokularında da gözlemlendiği, bu farklılıkların periodontal hastalık patojenezi ve yara iyileşmesi yönünden önemli olduğu bildirilmiştir (277).

Bir enflamatör cevap esnasında normalden daha fazla kollajen yapma potansiyeline sahip fibroblastların görevlendirildiği, fibroblast alt popülasyonlarının enflamasyon yerindeki seçilmiş sitokinler tarafından selektif olarak regüle edildiği bildirilmektedir (272).

Normal cilt fibroblastları ile skleroderma'lı hastaların cilt fibroblastlarıyla yapılan hücre kültürü çalışmaları sklerodermalı hastaların fibroblastlarının daha hızlı proliferasyon gösterdiğini, daha fazla kollajen sentezi yaptığını, dolayısıyla aktive edilmiş durumda olduklarını ve inflamasyon cevabına katılma potansiyellerinin arttığını göstermiştir (278).

Fibroblast heterojenitesinin kardiyak dokuda da gözlemlendiği ve bunun kardiyovasküler hastalıkların gelişmesi yönünden önemli olduğu ileri sürülmüştür (279).

Diğer taraftan fibroblastların, aktive fagositlere, lenfositlere ve endotel hücrelerine benzer şekilde fakat düşük oranda reaktif oksijen bileşikleri, spesifik olarak da süperoksit oluşturdukları saptanmıştır (140, 274, 280). Endojen serbest radikallerin inhibe edilmesi ile fibroblast kültürlerinde hücre proliferasyonunun inhibe edildiği; düşük konsantrasyonda eksojen serbest radikal oluşturan sistemlerle birlikte inkübe edilen fibroblastlarda proliferasyonun stimüle olduğu, yüksek konsantrasyonda H_2O_2 , $OH^\bullet$ veya $O_2^{\bullet-}$ 'e maruz kalma ile proliferasyonun inhibe edildiği gösterilmiştir (140).

Fibroblastlarda oluşan süperoksidin fibroblast kemotaksizinde rol aldığı, nitekim fibroblastların enflamasyonlu hasar bölgesine migrasyonlarının SOD ile inhibe edildiği gösterilmiştir (281).

1.3.6. Astrositler

Beyin dokusunda birçok farklı tipte nöron, glial hücre ve endotelial hücre bulunur. Nöronlar nükleus, dendritler, aksonlar ve akson terminallerinden meydana gelirler. Glial hücreler ise, myelin oluşturun hücreler olup, astrositler ve mikrogliadan oluşurlar (125).

Astrositler yetişkin santral sinir sisteminde (SSS) çok yaygın olarak bulunan bir hücre türüdür. Bu hücreler önceleri beyinde nöronların pasif destekleyici elementleri olarak tanımlanmışlardır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda, astrositlerin birçok açıdan SSS'nin fonksiyon ve disfonksiyonunda hayati önemde fizyolojik bir role sahip oldukları ileri sürülmüştür (282).

Sayıları, bulundukları yer ve tipik morfolojik özellikleri nedeniyle astrositler, nöronları da kapsayan diğer beyin hücre tipleri arasında anahtar bir role sahiptirler. Ayrıca bu hücreler, en çok bilinen sinyal iletim yolları ile ilişkili olan çok çeşitli membran iyonik kanalı, taşıyıcısı ve reseptörünü eksprese etmeleri nedeniyle sinyallerin alınması, kullanımı ve iletimi için gerekli yapısal özellikleri de taşırlar (283). Astrositlerin eksitatör amino asit reseptörlerini eksprese ettikleri, bunun da kainat ve kuiskualat tarafından aktive edilen bir glutamat reseptörü olduğu bildirilmiştir (284).

Astrositlerin, SSS nöronlarının canlı kalmasında destekleyici bir rolleri de vardır (285). Astrositler, nöronlardan farklı olarak, trikarboksilik asit siklusunun devamı için önemli bir enzim olan pirüvat karboksilaz ile glutamatın glutamine dönüşümünü sağlayan glutamin sentaz enzimine sahiptirler. Bu nedenle, sinir terminallerinden salıverilen GABA ve glutamatı ekstraselüler bölgeden alır ve bu bileşikler glutamine dönüştürerek laktat ve diğer bazı amino asitler ile birlikte tekrar nöronlara transfer ederler. Sahip oldukları pirüvat karboksilaz enzimi nedeniyle nöronların trikarboksilik asit siklusunun devamında önemli rol oynarlar. Normal yaşlılık süresince veya daha spesifik olarak Parkinson ve Alzheimer hastalıkları gibi

nörodejeneratif bozukluklarda görüldüğü gibi, beyinde nöronal hücre kaybı, astrositlerin nöronları destekleyici özelliklerinin bozulmasına bağlanmaktadır (286). Beyin dokusu, sahip olduğu yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asidi içeren membran lipidleri ve düşük enzimatik savunma sistemi nedeniyle serbest radikal hasarına karşı çok duyarlıdır (125). Beyin dokusunda meydana gelen serbest radikal hasarın en önemli şeklinin, muhtemelen eksitotoksik mekanizmalarla meydana geldiği ileri sürülmektedir. Glutamaterjik reseptörlerin aktivasyonu ile başlatılan eksitotoksistide, serbest radikal saldırının muhtemelen son hasar meydana getirici basamak olduğuna inanılmaktadır (287).

Çok sayıda çalışmadan elde edilen sonuç, süperoksit, nitrik oksit ve diğer sitotoksik serbest radikallerin (288-290) önemli ölçüde nöronal hasara neden olabileceğini göstermektedir. SSS'de meydana gelen hasar genellikle kalıcı nöronal dejenerasyon ile sonuçlanır. Yukarıda da belirtildiği gibi, SSS bir bütün olarak çok düşük düzeyde endojen radikal süpürücü enzime sahiptir (291). Buna karşılık astrositler, metabolik özellikleri nedeniyle oksijen radikallerine karşı koyma yeteneğine sahiptirler. Astrositlerin oksidatif strese oligodendrositler ve nöronlardan daha dayanıklı oldukları bildirilmiştir. Örneğin astrositler GSH'nu azaltan, mitokondriye hasar veren ve hücre ölümüne neden olan peroksinitritten nöronlara oranla daha az etkilenirler (292). Bu hücrelerin yeterli düzeyde yüksek miktarlarının, nöronlarda oksidatif hasara neden olduğu bilinen hemoglobin ve redükte demire teması da tolere ettiği gösterilmiştir (293). Astrositlerin, glutamatın neden olduğu serbest radikal aracılıklı öldürücü etkiye, oligodendrosit ve kortikal nöronlardan en az 25 kat daha az duyarlı olduğu bildirilmiştir (294).

GSH yetişkin beyin astrosit hücrelerinde nöronlara oranla daha yüksek düzeyde bulunur (295). Hücre kültürlerinde de sitozolik GSH ve GPx aktivitesinin astrositlerde, nöronlardan önemli ölçüde daha yüksek oranda olduğu gösterilmiştir (296). Astrositlerde GSH sentezinde anahtar rol oynayan bir enzim olan γ -glutamilsistein sentaz aktivitesinin nöronlara oranla 8 kat daha yüksek olmasının, bu hücrelerin GSH düzeyinin yüksek oluşunun bir açıklaması olabileceği ileri sürülmüştür (297). Astrositler ayrıca oligodendrositlerden 3 kat fazla oranda GSH, 20 kat daha az miktarda ise demir içerirler (298). Askorbat, beyin dokusunun

hücrel kompartmanında ortalama 2 mM konsantrasyonda yer alırken, astrosit sitozolündeki konsantrasyonu yaklaşık olarak 10 mM'dır.

1.4. Çinko

Çinko, II b grubuna dahil bir elementtir ve negatif yüklü gruplarla kolaylıkla kompleks yapar. Çinko organizmada, pratik olarak, serbest formda bulunmaz, amino asit veya proteinlerin tiyol, amin veya imidazol grupları gibi ligandlarla kovalan bağ oluşturur (304).

Memeli organizmasının esansiyel bir elementi olan çinko çok sayıda fizyolojik işlevde rol alır. SOD dahil yaklaşık 200 enzimin aktivitesi için çinkoya ihtiyaç vardır, ayrıca gen ekspresyonu ile protein ve membran yapısının stabilizasyonunda rol alır (304).

Çinko, koordinasyon kimyası Cu^{++} ve Fe^{+++} 'e benzer olan bir metaldir. Çeşitli *hem* proteinlerinde, Cu^{++} 'ın yer-spesifik bağlanma bölgelerine karşı yarışmaya girer. Mn^{++} , Co^{++} gibi metallerle birlikte Zn^{++} ile de gözlenen lipid peroksidasyonu önleyici etkinin membranlardaki demiri bağlanma yerlerinden çıkarıp yer değiştirmesiyle ilişkili olduğu, bu etkinin ayrıca genel membran stabilizasyon yapıcı etkisine bağlanabileceği ileri sürülmüştür (300). Nitekim diyetel çinko eksikliğinde dokularda lipid peroksidasyonunun arttığı, Fe/askorbat sisteminde oluşan tek ya da çift zincir DNA kırıklarının Zn^{++} ile önlendiği gösterilmiştir (301). Çok sayıda çalışmada çinkonun mikrozomlarda NADPH ile indüklenen lipid peroksidasyonunu önlediği, mikrozomal NADPH oksidasyonu ile NADPH-bağımlı sitokrom c redüktaz aktivitesini inhibe ettiği (302, 303) ve bu etkilerini NADPH ile (NADH ile değil) selektif olarak etkileşip Zn^{++} -NADPH kompleksi oluşturarak ilaç okside edici sistemi inhibe etmesine bağlı olduğu gösterilmiştir (304).

Hepatosit kültürlerinde çinko konsantrasyonunun 1 μM 'dan 48 μM 'a arttırılmasının Fe^{+++} -nitroasetik asit, t-butil peroksit veya 3-metil indolün indüklediği lipid peroksidasyonunu ve serbest radikal oluşumunu önlediği, GSHPx ve metallotionenin sentezini arttırdığı ve NADPH-sitokrom c redüktaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (305).

Metilbenzilitroزامinle indüklenen özefagus karsinomaları üzerinde yapılan bir çalışmada, diyetset çinko eksikliği olan sıçanlarda tümör sıklığının ve karsinojen maddenin sitokrom P-450-bağımlı özefagal ve hepatik mikrozomal metabolizmasının arttığı saptanmıştır. İn vitro Zn^{++} ilavesi ile metabolizmanın azaldığı, dolayısıyla karsinojen aktivasyonunun inhibe edildiği gözlenmiştir (306).

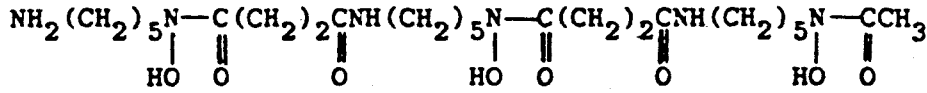
$ZnCl_2$ 'ün tek ya da tekrarlanan doz uygulandığı farelerde hekzobarbital uyuma zamanının tüm uygulamalarda önemli ölçüde azaldığı; akut tek doz $ZnCl_2$ ile sitokrom P-450 miktarındaki azalmanın önemsiz olduğu, fakat 24 saat aralıkla uygulama veya 3 hafta süreli tekrarlanan doz uygulama ile önemli azalma gözlendiği bildirilmiştir (307). Bu sonuçlar, akut aşırı doz uygulama dahil, çinkonun hepatik sitokrom P-450 enzimlerinin sentezi ve işlevleri üzerinde inhibitör bir etkisi olduğunu göstermektedir.

1.5. SKF 525A

SKF 525A (β -Dietilaminoetil-difenilpropilasetat HCl, proadifen) *in vivo* ve *in vitro* koşullarda sitokrom P-450 aktivitesinin güçlü bir inhibitörüdür. Çok çeşitli hepatik mikrozomal biyotransformasyon reaksiyonlarını inhibe eder; ilaçlar dahil çok sayıda ksenobiyotiğin kovalan bağlanmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (308-310). Ayrıca protein (311) ve kolesterol (312) biyosentezlerini inhibe edici özellik gösterir. Enzim inhibisyonu yapıcı etkisi büyük ölçüde nonkompetitif tabiattadır (313). Etki mekanizmasının kenetsizleyici (*uncoupling*) bir ajan olmasına bağlı olduğu ileri sürülmüşse de sadece NADPH'ya bağımlı mikrozomal reaksiyonları değil, nitro redüktaz, glukuronil transferaz gibi NADPH'ya bağımlı olmayan metabolik reaksiyonları da inhibe eder (310). Diğer bir mekanizma olarak mikrozomal membranlarda fizikokimyasal etki ile permeabiliteyi değiştirmesi ileri sürülmüştür. Kabul gören görüş, etkinliğinin redüklenmiş sitokrom ile stabil bir metabolit inhibe edici kompleks oluşturması ile ilişkili olduğudur.

1.6. Desferrioksamin

Streptomyces pilosus'den izole edilmiş bakterial bir siderofor olan desferrioksamin (DFO, Desferal®, deferoksamin) (Şekil 1.9), akut demir zehirlenmelerinde antidot olarak ve kronik demir birikmesi veya demir dekompartmantalizasyonu ile ilgili hastalıkların tedavisinde şelatör olarak kullanılır (314, 315).



Şekil 1.9. DFO'nin kimyasal yapısı

DFO, ferrik demire yüksek afinite gösterir. Klinik uygulamada safra ve idrar ile kolayca itrah edilebilen ve suda çözünür stabil bir demir-kompleksi (ferrioksamin) oluşturur. DFO'nin organizmada serbest demirin yanı sıra hemosiderin ve ferritine bağlı demiri kolaylıkla uzaklaştırdığı, ancak hemoglobin ve transferrin veya sitokromlara bağlı demiri uzaklaştıramadığı bildirilmiştir (314).

DFO, demirden başka diğer geçiş metallerinin de katalitik aktivitelerini inhibe edecek şekilde bağladığı için *in vitro* model ve deneylerde sık olarak kullanılır. Ancak demir şelatının stabilite sabitesi çok yüksek (10^{31}) iken, diğer geçiş metalleriyle olan şelatlarının stabilite sabiteleri düşüktür (316).

DFO'nin şelatör etkisinden başka, serbest radikal süpürücü etkisinin olduğu, peroksil radikallerini süpürdüğü (317), lipid zinciri kırıcı antioksidan gibi davrandığı (318), saflaştırılmış oksidazlara elektron verdiği (315) gözlenmiştir. Ancak bu antioksidan rolüne karşılık, klinik kullanımının bütünüyle zararsız olmadığı, paradoksik olarak yüksek dozlarda lipid peroksidasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (319).

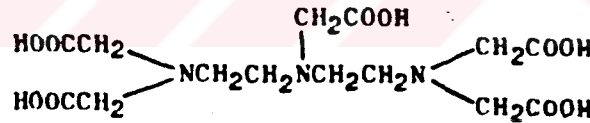
In vitro çalışmalar DFO'nin peroksidaz sistemiyle etkileşmeye girdiğini, hidroksil ve süperoksit oluşturan sistemlerde okside olduğunu ve reaksiyon ürününün tek elektron oksidasyon ürünü olan nitroksit radikali olduğunu göstermiştir (315). Bu nedenle, deneysel çalışmalarda DFO konsantrasyonunun bu reaksiyonları minimize

edecek şekilde düşük tutulması (< 1 mM), peroksidaz sistemlerinde kullanılmaması önerilmektedir (315). SOD varlığında aktive edilmiş nötrofillerde de DFO nitroksit radikalının oluştuğu gösterilmiştir (314). Ayrıca DFO'nin aynı sistemde myeloperoksidaz (MPO)'ı redükleyip inaktif enzimi ferrik-MPO'a çevirdiği; HOCl'in ise DFO radikalının oluşumunu arttırdığı bulunmuştur. Diğer taraftan yüksek molekül ağırlıklı DFO türevlerinde bu etkilerin gözlenmediği bildirilmiştir (314).

Fenton reaktifine ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{FeSO}_4$) maruz bırakılan sarkoplazmik retikulumda DFO'nin $\text{OH}^\bullet$ oluşumunu önlemekle birlikte, kendi nitroksit radikalini oluşturduğu, bu esnada $\text{OH}^\bullet$ 'nin neden olduğu Ca^{++} -ATPaz aktivitesi azalmasının daha da arttırdığı yakınlarda bildirilmiştir (320).

1.7. Dietilentriamin-pentaasetik asit

Dietilentriamin-pentaasetik asit (DTPA, DETAPAC), EDTA'ya benzer şelatör özelliklerine sahip bir bileşiktir (Şekil 1.10). Ağır metaller ve plutonyum gibi radyoaktif metallerle meydana gelen zehirlenmelerinin tedavisinde kullanılır. Kalsiyuma yüksek afinite göstermesi nedeniyle klinikte kullanımda kalsiyum tuzu (CaNa_2 DTPA) önerilmektedir (321).



Şekil 1.10. DTPA'nın kimyasal yapısı

Süperoksit meydana getiren sistemlerde, demirin katalizlediği $\text{OH}^\bullet$ oluşumu DTPA tarafından inhibe edilir (322). DTPA bu inhibisyonu Fenton reaksiyonu inhibe ederek değil, Fe^{+++} 'in Fe^{++} 'ye redüksiyonunu yavaşlatarak sağlar (322).

1.8. Troloks

6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit yapısında olan Troloks, E vitamininin lipide ve suda çözünebilen bir analogudur. Serbest

radikalleri süpürme ve membranal peroksidatif hasarı önleme özelliğine sahiptir (323).

E vitamini ve Troloks ile yapılan *in vitro* çalışmalar bu bileşiklerin koruyucu etkinliklerinin kullanılan deney ortamının özelliklerine bağlı olarak farklı olduğunu göstermiştir. Lipozomlar ve miseller ile yapılan çalışmalarda heriki bileşiğin antioksidan etkinlikleri arasında önemli bir fark olmadığı (324), buna rağmen sıçan karaciğer mikrozomal süspansiyonlarında Troloksun lipid peroksidasyonuna karşı korunmada E vitamininden çok daha etkin olduğu gösterilmiştir (325).

1.9. Kütle Spektrometrisi

Kütle spektrometrisi (MS) iyonize molekülleri, bunların fragmanlarını ve adduct'larını saptayan, organik maddelerin molekül ağırlığının ve yapısının belirlenebilmesini, inorganik maddelerin bileşenlerinin tayin ve teşhis edilebilmesini sağlayan bir mikroanalitik tekniktir.

Kütle spektrometrelerinin çok çeşitli tipleri vardır ancak temel ilkeler ve ortak nitelikler şöyle özetlenebilir:

Örnek spektrometrede buharlaştırılır ve oluşturulan gaz fazı iyonları kütle/yük (m/z) oranlarına göre separe edilip ekseriya elektriksel olarak belirlenir. Farklı yapılara karşılık gelen iyon-akımları amplifiye edilir ve takiben ya bir osiloskop ve kaydedici ile gözlenirler ya da bir bilgisayarda depo edilirler (326-328).

1.9.1. İyonizasyon ve Fragmentasyon

İyonlar, nötral maddelerden farklı olarak elektromanyetik güçlerle manipüle edilebilirler ve dolayısıyla m/z oranına göre bir separasyona uğrayabilirler. Bir kütle spektrometresi, örnek moleküllerinden iyonlar oluşturan ve bunları m/z oranına göre separe edip herbir özel orandaki iyonların sayısını belirleyen bir alettir.

Bir kütle spektrumu m/z oranının bolluğuna (*abundance*) karşı çizilmiş bir grafiğidir ve iyonize olan molekülün ağırlığı ve yapısı hakkında bilgi verir.

İyonlar normal olarak tek yüklü oluşurlar, bu nedenle m/z oranı ana molekülün ve fragmanlarının kütesini doğrudan verir. Basit bir model olarak bir ABC molekülünün iyonizasyonu aşağıdaki şekilde olur:



Bu durumda iyonizasyon işlemi bir ABC^+ moleküler iyonu (ekseriya M^+ olarak anılır) oluşturmaktadır. Bu iyon örnek molekülünün bir elektron uzaklaştırılmış şeklidir. Bu proses esnasında ekseriya yeterli derecede enerji oluşur. Başka bir ifade ile M^+ önemli ölçüde yüksek enerjiye sahiptir ve bunu bazı kimyasal bağlarının fragmantasyonu yoluyla dağıtabilir. Bu nedenle moleküler iyonların bir kısmı yukarıda da gösterildiği gibi çeşitli stabil fragmanlara yıkımlanırlar. Çeşitli kimyasal bağların açılmasıyla oluşan fragmanların kütleleri, fragmantasyon prosesi esnasında pozitif yüklerini muhafaza eden atom gruplarının atomik kütlelerinin toplamına eşittir.

M^+ iyonlarının tamamı fragman iyonlarına yıkımlanmaz. Nisbeten stabil bir M^+ oluşturan bileşikler de yoğun bir moleküler iyon piki gözlenir. Ancak genellikle, M^+ 'ın büyük kısmı fragman iyonlarına yıkımlanır. Böyle durumlarda M^+ sadece ufak bir pik olarak gözlenir. Kütle spektrumu bu fragmanların herbirinin m/z oranını ve bolluğunu gösterir. Spektrum her madde için büyük ölçüde karakteristiktir ve tanımlama amacı için bir "parmak izi" niteliğindedir.

Bilinen yapıların kütle spektrumları sürekli yayınlanır ve spektral veri tabanlarında biriktirilir. Böylece fragmantasyon kalıpları belirlenir ve bilinmeyen maddelerin spektrumlarını yorumlamada kullanılırlar.

Kütle spektrometresinin duyarlılığı çok yüksektir. Güncel aletlerle, 10 ng'dan (veya birkaç pmol'den) az örnek miktarları ile iyi bir spektrum elde etmek mümkündür.

1.9.2. MS'nin Ana Bileşenleri

Kütle spektrometreleri 5 ana kısımdan ve bunların işlevlerinden oluşur: Örneğin uygulanışı, iyon oluşumu, kütle analizi, iyonun deteksiyonu ve tüm bu olayları kayıt ve kontrol eden data sistemi.

İyon kaynağından detektöre kadar olan kısım iyonların kaynaktan detektöre kadar serbest bir yolda gitmeleri için gerekli yüksek bir vakum odacığında bulunur. Örneğin cinsine göre farklı örnek girişleri (*inlet*) vardır. Stabil katı materyal DIP denilen "doğrudan giriş probu" ile uygulanabileceği gibi, probun ısıtılmasıyla örneği buharlaştırmak ve böylece meydana gelen gaz fazında kolayca iyonize olmalarını sağlamak da mümkündür.

1.9.3. İyon Kaynakları

1.9.3.1. Elektron İyonizasyonu

En yaygın kullanılan 'elektron iyonizasyon' (EI) tekniğinde örnek, gaz fazı halinde iyonize edilir ve bir enerjetik (70 eV) elektron demetinden geçirilir (Eşitlik 1.29):

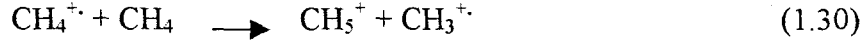


Sonuçta M molekülü iyonize olur ve prosesin enerjisi molekülün fragmente olmasına neden olur.

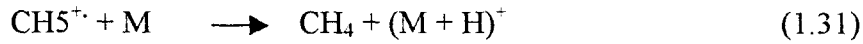
1.9.3.2. Kimyasal İyonizasyon

Bazı hallerde moleküler iyon stabil değildir ve kütle spektrumunda gözlenmez. Bu iyonu zenginleştirebilmek için daha yumuşak iyonizasyon teknikleri kullanılır. Kimyasal iyonizasyon (CI) gaz fazında bir kimyasal reaksiyonla bir moleküler adduct oluşturur. Bu amaçla kullanılan reaktif bir gaz metandır. İyon kaynağı içine nisbeten düşük basınçta verilir ve CI'na maruz bırakılır. Oluşan metan

iyonu aşağıdaki gaz fazı reaksiyonu uyarınca CH_5^+ gibi protonlanmış türevler oluşturur (Eşitlik 1.30):



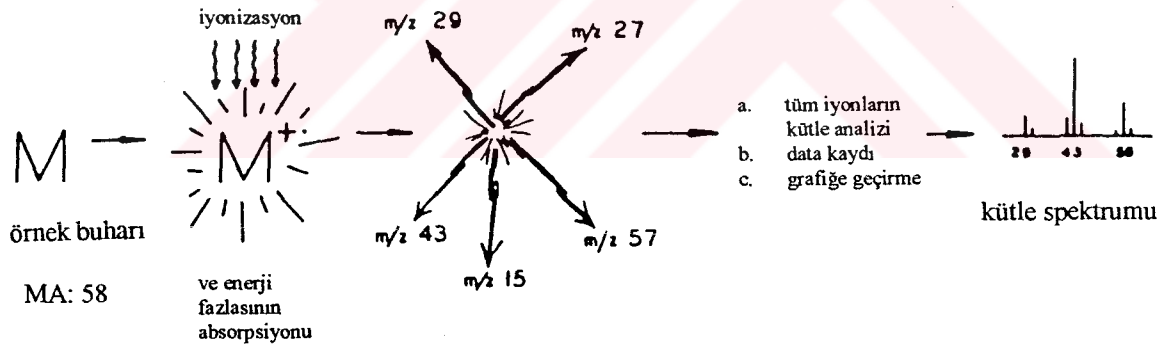
Bu reaktif türevler, CH_5^+ , analit molekülü ile reaksiyona girer ve bir protonunu transfer edip protonlanmış moleküler adduct oluşturur (Eşitlik 1.31).



$(\text{M} + \text{H})^+$ iyonu, maddenin moleküler ağırlığını saptamak için kullanılır.

Ayrıca $\text{M}^{\cdot-}$ oluşturmak veya adduct oluşturmak için negatif iyonlar da kullanılır. Böylece reaktif bir gazdan oluşturulan bir anyon, örneğin Cl^{-1} analit molekülüne bağlanabilir. Genellikle Cl^{-1} 'nin duyarlılığı ve seçiciliği EI'den daha fazladır.

Şekil 1.11'de kütle spektrometrisi ile buhar fazı analizinin genel işleyiş şeması görülmektedir. M gaz fazındaki saf bir moleküldür.



Şekil 1.11. Kütle spektrometrisi ile buhar fazının genel işleyiş şeması.

1.9.3.3. Elektrosprey İyonizasyon

Büyük ve polarize maddeler kolayca uçucu hale getirilemezler ve EI veya CI ile iyonize edilemezler. Böyle maddelerin analizinde sıvı kromatografisi (LC) ile kenetlenmiş olarak kullanılan alternatif yöntemler geliştirilmiştir.

Elektrosprey iyonizasyon (ESI) tekniği bu amaçla kullanılan çok önemli ve güçlü bir yöntem olarak tanımlanmaktadır (328). ESI, atmosferik basınçta bir kapiller tüpten çıkan 1-10 μ l'lik bir sıvı çıktısına, yüksek bir potansiyel (3-6 kV) uygulanması prensibiyle çalışır. Bu elektriksel alan yüksek ölçüde yüklü damlacıklar oluşturur, buradan analit iyonları buharlaşır ve örnek küçük bir delikten kütle spektrometresine verilir. Bu yöntemde iyonizasyon etkinliği yüksektir ve çoklu yük taşıyan moleküller sıklıkla oluşur. Bu, aletin kullanılabilir kütle ranjını artırır ve çok büyük moleküllerin analize edilmesine olanak sağlar. Örneğin molekül ağırlığı 20.000 olan ve 20 pozitif yükü bulunan bir protein gibi büyük bir molekül m/z 1000'de gözlenebilir.

Yüksek iyonizasyon etkinliği duyarlılığı arttırdığı için analiz için gerekli örnek hacmi de çok düşüktür.

1.9.4. Kütle Spektrumunun Yorumu

Kütle spektra kütüphaneleri/veritabanları bilinmeyen yapıların en değerli referans kaynaklarıdır. Yorum, uzmanlık ve deneyim isteyen zor bir iş olmakla birlikte araştırmacının bazı ilkeleri izleyerek kütle spektrumunu tam değilse de doğru yönde yorumlaması olasıdır.

Moleküler iyonu bulmak, ilk ve en önemli kademeyi oluşturur. Çünkü maddenin moleküler ağırlığı ile doğrudan ilişkilidir. Ancak moleküler iyon pikinin maddenin 'nominal' molekül ağırlığına sayısal olarak eşit olduğu, nominal molekül ağırlığı hesaplanmasında ise molekülü oluşturan her bir elementin en hafif izotopunun atomik kütlelerinin toplamının alınması (ortalama atomik kütle değil) gerektiği unutulmamalıdır.

Spektrumdaki fragmentasyon pikleri reorganizmana girmiş ya da girmemiş bir veya daha fazla açılmalardan kaynaklanır. Belirli fragmanların oluşumu, fragmanı molekülün kalan kısmına bağlayan bağların kimyasal tabiatı ve gücü ile ilişkilidir. Bu nedenle fragman iyonun yapısını belirlerken organik reaksiyon mekanizmaları dikkate alınır.

1.9.5. Metod Seçimi

En iyi yaklaşımın seçiminde belirleyici olan, örneğin tabiatıdır. Örnek, örneğin büyük bir protein ise doğrudan giriş probu (DIP) kullanarak veya gaz kromatografisinden (GC)den geçirerek uçucu hale getirmek mümkün değildir.

Diğer bir önemli konu, örneğin saflığıdır. Eğer örnek bir karışım ise MS bir kromatografik teknikle birlikte kullanılmalıdır. Kütle spektrometresi kaynağının, kromatografik seperasyon teknikleri ile (gaz veya sıvı) kenetlenmesi suretiyle hem örneğin saflaştırılması, hem de duyarlı ve tam analiz yapma olanağı yaratılabilmektedir. Bu teknikler özellikle biyokimyasal ve toksikolojik analizlerde büyük başarı ile uygulanmaktadır. Karışım analizlerinde kullanılan diğer bir teknik MS/MS tekniğidir.

Isıya dayanıksız veya uçucu olmayan örnekler termosprey, elektrosprey veya hızlı atom bombardımanı gibi alternatif yöntemlerle iyonize edilebilirler.

Yüksek kütle rezolüsyonunun gerektiği durumlarda ise, kütle analizörünün bir double-focusing sektör aleti olması veya FT-ICR (Fourier transform-İyon Siklotron Rezonans) olması gerekir (327, 328).

1.10. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) örnek bileşenlerinin kontrollü koşullarda bir kolondan seperasyonunu sağlayan bir sıvı kromatografisi yöntemidir (328). Örnek bileşenlerinin GC'deki gibi uçucu olması gerekmez, bu nedenle de ısıya dayanıksız maddelerin ayrılması için uygun bir yöntemdir.

HPLC'de hareketli faz gaz-sıvı kromatografisindeki (GLC) taşıyıcı gazın yerini alan ve yüksek basınç altında kolondan geçirilen bir çözücü veya çözücüler karışımıdır. Örnek bileşenleri bu sıvı fazda partisyona uğrarlar.

Sabit bileşimli bir hareketli fazın kullanıldığı "izokrattik elüsyon" ile yeterli bir rezolüsyonun elde edilemediği durumlarda hareketli faz bileşiminin kademeli olarak değiştirildiği "gradient elüsyon" kullanılır. Bu yöntem, GLC'deki sıcaklık programlanmasının HPLC'deki alternatifi olan bir çözücü programlamasıdır. Bu

yöntemde sıvı faz, farklı iyonik güce sahip çözeltileri karışımlarından veya farklı polaritelerde karışmayan çözücülerden oluşabilir.

"Sıvı-sıvı HPLC"de organik maddelerin seperasyonu katı bir desteğe kimyasal olarak bağlanmış veya adsorbe ettirilmiş sıvı sabit bir faz ile sıvı bir mobil faz arasında olur. Fazların birbiri ile karışmaması, dolayısıyla önemli ölçüde farklı polaritede olmaları gerekir.

"Normal Faz HPLC"de sabit faz olarak, bir poröz silika veya alumina destek materyale bağlı polar ve ekseriya hidrofilik bir sıvı, örneğin bir alkol kullanılır. Mobil faz ise hekzan, CCl₄ gibi nonpolar (ekseriya hidrofobik) bir sıvıdır.

En sık kullanılan şekil olan "Reverse Phase-Zıt Faz HPLC"de ise fazların polariteleri normal faz HPLC'dekinin tersinedir. Mobil faz polardır, sabit faz ise destek materyale bağlanmış bir nonpolar hidrofobik çözücüdür. Maddeler sabit sıvı fazda polaritelerinin fonksiyonu olarak tutulurlar. Örneğin, nonpolar hidrokarbonlar kolonda daha yavaş ilerlerler.

1.10.1. Detektörler

HPLC analizlerinde en çok kullanılan detektörler 254 veya 280 nm UV detektörleridir. Ayrıca floresans, elektrokimyasal ve refraktif indeks detektörleri ile MS detektörleri de kullanılır. HPLC'de separe olan bileşenlerin kütle detektörüne verilmesi elle toplama veya enjeksiyondan başlayıp, hareketli kuşak interfazları ve atmosferik basınç iyonizasyonu tekniklerinden, termospreye dayalı elektrosprey iyonizasyon yöntemlerine kadar değişen çeşitli tekniklerle olmaktadır.

Yukarıda sözü edilen LC-MS kenetli sistemlerde kullanılan ESI yöntemi, son yılların en gelişmiş ve avantajlı yöntemi olarak kabul edilmektedir.

2. DENEYSEL KISIM

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Chelex-100 Reçinesi	(Bio-Rad)
DFO	(Ciba)
Dimetil sülfoksit	(Sigma)
DMPO	(Aldrich)
DNAaz I	(Sigma)
DTNB	(Sigma)
DTPA	(Aldrich)
E vitamini (dl- α -tokoferol)	(Sigma)
Fötal Dana Serumu	(Biological Industries)
Fungizon	(Squibb)
Glutasyon redüktaz	(Sigma)
Glutasyon, indirgenmiş	(Sigma)
Kanamisin	(Boehringer)
Katalaz	(Sigma)
Metafosforik Asit	(Merck)
Minimum Essential Medium	(Gibco)
MTT	(Sigma)
NADPH	(Sigma)
Nötral Kırmızı Çözeltisi	(Sigma)
PBS	(Gibco)
Penisilin/Streptomisin	(Boehringer)
4-POBN	(Aldrich)
Poli-L-lizin	(Sigma)
Puck Saline A	(Gibco)
RPMI 1640 Medium (NaHCO ₃ 'lı)	(Biological Industries)
Siprofloksazin Hidroklorür Monohidrat	(Deva)
SKF 525A	(Sigma)
SOD (sığır eritrosit)	(Sigma)
Sodyum Bikarbonat, % 7.5	(Gibco)
Tersiyer Butil Hidroperoksit	(Sigma)
Tripsin	(Gibco)
Tripsin İnhibitörü	(Sigma)
Tris	(Aldrich)
Trolox	(Aldrich)

2.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Derin dondurucu (-20°C)	(Faure)
Derin dondurucu (-80°C)	(Forma Scientific)
ESR Spektrometresi	(Bruker ESP 380)
Fluorometre	(Perkin-Elmer Model LS 50)
Homojenizatör, teflon başlıklı	(Thomas Scientific)
Hücre kültür kapları, 25 cm ² ve 75 cm ²	(Nunc, Poly Labo)
Hücre kültür kapları, 96 kuyucuklu plak	(Nunc, Poly Labo)
Isıticılı-mekanik karıştırıcı	(Pierce, Reacti Therm, Heating/Stirring Module Sobiada)
Kalibre edilmiş kılcal tüp	(PolyLabo)
İnkübatör, CO ₂ Dönüşümlü	(Forma Scientific)
Mekanik karıştırıcı	(Ikamag RH)
Mikropipet (20, 100, 200, 1000)	(Gilson, Finn Pipette)
Mikroskop, Axiovert 135	(Zeiss)
Otomatik Hitachi 904 Spektrometresi	(Hitachi)
Petri kutusu, 3.5 ve 60 cm ²	(Nunc, Poly Labo)
pH metre	(NEL pH 890)
Polipropilen, vida kapaklı tüp	(Sobiada)
Santrifüj	(Heareaus)
Spektrofotometre	(Uvicon 860, Kontron Instrument)
Terazi, hassas dijital	(Mettler M3)
Termostatlı su banyosu	(Kotterman)
Ultrasantrifüj	(Beckman)
Vorteks	(Bioblock)
HPLC	
Pompa	(Waters, L.C. G16)
Kontrol Sistemi	(Waters, 600 S)
Enjektör	(Rhéodyne, 7125)
Loop	(Inox 20 µl)
Kolon	(Interchrom, HypersilM5C18-25F, 250 mm)
Detektör	(Waters, 486 MS, 260 nm (UV))
İntegratör	(Merck, D 2500)
Kütle Spektrometrisi	(Mikromass, V G QUATTRO II-ESI MS)
Pompa	(Turbo pompa)
Bilgisayar ve integrasyon sistemi	(MASS-LYNX Versiyon 3.2)

2.3. Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

Stok CPR Çözeltisi (20 mg/ml): CPR'in distile sudaki çözeltisidir ve her deney günü taze olarak hazırlanır. Çözelti kullanım süresince ışıktan korunur.

2.3.1. Fibroblast Hücre Kültürlerinin Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

L-Glutamin Çözeltisi (200 mM): Liyofilize L-glutaminin 20 ml distile sudaki çözeltisidir. 2 ml'lik fraksiyonlara ayrılarak kullanıma kadar -20°C 'de saklanır.

Penisilin (50000 İÜ)-Streptomisin (50 mg/ml) Çözeltisi: Liyofilize formda penisilin-streptomisinin 20 ml distile sudaki çözeltisidir. 50000 İÜ penisilin + 50 mg/ml streptomisin içerir. 2 ml'lik fraksiyonlara ayrılarak kullanıma kadar -20°C 'de saklanır.

Hücre Kültürü Ortamı: L-Glutamin (1.8 mM), penisilin (180 Ü/ml), streptomisin (180 mg/ml), kanamisin (56 mg/ml), fungizon (0.5 mg/ml) ve % 10 fetal dana serumu içerecek şekilde hazırlanan NaHCO_3 'lu RPMI 1640 kültür ortamıdır.

Seyreltilmiş Puck's Saline A Çözeltisi: 50 ml Puck's Saline A'nın 1 ml % 7.5'luk NaHCO_3 çözeltisi ve 100 ml distile su ile seyreltilmesi ile hazırlanır. 4°C 'de birkaç gün dayanıklıdır.

Trypsin Çözeltisi (% 3, h/h): Trypsinin seyreltilmiş Puck's Saline A çözeltisi içinde çözülmesi ile hazırlanan % 3'lük çözeltisidir. Kullanımdan hemen önce hazırlanır.

2.3.2. Sitotoksikite Testlerinde Kullanılan Çözeltiler

Asetik Asit-Etanol Çözeltisi (% 1, h/h): 50 ml mutlak alkol ve 1 ml glacial asetik asidin 100 ml'ye distile su ile tamamlanmasıyla hazırlanır.

E Vitamini (DL- α -tokoferol) Çözeltisi (5 mM): E vitamininin absölu etanoldeki çözeltisidir. Kullanımdan hemen önce hazırlanır.

Formol-Kalsiyum Çözeltisi (% 4, h/h): 1.325 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 ml distile suda çözülür. Çözeltiye 10.81 ml % 37'lik formaldehit eklenir ve 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

Katalaz Çözeltisi (10000 Ü/ml): Katalazın hücre kültür ortamındaki çözeltisidir. Kullanımdan hemen önce hazırlanır.

MTT Çözeltisi (5 mg/ml): MTT'nin, PBS içinde çözülmesi ile hazırlanır. Çözelti 0.2 μm por çapındaki membran filtreden geçirilir ve ışıktan korunarak -20°C 'de saklanır.

SOD Çözeltisi (2000 Ü/ml): SOD'ın hücre kültür ortamındaki çözeltisidir. Kullanımdan hemen önce hazırlanır.

NR Çözeltisi (50 µg/ml) (NR'li Kültür Ortamı): Nihai NR konsantrasyonu 50 µg/ml olacak şekilde, hücre kültürü ortamına 15 µl/ml nötral kırmızı çözeltisi (% 0.33 NR çözeltisi-Sigma) ilavesiyle steril koşullarda hazırlanır. Çözelti kullanımdan önce 37°C'lik inkübatörde 16 veya 24 saat boyunca inkübe edilir. 0.2 µm por çapındaki membran filtreden geçirilerek kullanılır.

2.3.3. Fibroblast ve Astrosit Kültür Hücrelerinde Lipid Peroksidasyonu ve GSH Düzeyi Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Bütıl Hidroksi Toluen (BHT) Çözeltisi (20 g/l): BHT'nin mutlak alkoldeki çözeltisidir.

DTNB Çözeltisi (1.5 mg/ml): 15 mg DTNB'nin, 10 ml % 0.5'lik NaHCO₃ çözeltisinde çözülmesi ile hazırlanır. Çözelti ışıktan korunarak saklanır.

GSH Redüktaz Çözeltisi (5 Ü/ml): Enzimin, MOPS/EDTA Tamponunda çözülmesi ile her deney günü taze olarak hazırlanır.

Metafosforik Asit Çözeltisi (% 6, a/h): 6 g metafosforik asit, 100 ml deiyonize suda çözülerek hazırlanır. Çözelti -20°C'de birkaç ay dayanıklıdır.

Morfolinopropan sülfonik asit (MOPS) (0.4 M)/ EDTA (2 mM) Tamponu, pH 6.75: 83.8 g MOPS ve 744.4 mg EDTA suda çözülür ve çözeltinin pH'sı 5 M KOH ile 6.75'e ayarlanır. Çözelti hacmi 1000 ml'ye distile su ile tamamlanır.

NADPH Çözeltisi (4 mg/ml): 16 mg NADPH'ın, 4 ml % 0.5'lik NaHCO₃ çözeltisinde çözülmesi ile hazırlanır. Çözelti çalışma süresince ışıktan korunmalıdır.

Stok Tetra Etoksi Propan (TEP) Çözeltisi (20 mM): TEP reaktifinin etanoldeki çözeltisidir. Çözelti -20°C'de 3 ay süreyle dayanıklıdır.

Tiyobarbitürik Asit (TBA) Çözeltisi (% 0.8, a/h): TBA 10 N NaOH yardımı ile distile suda çözünür. Çözeltinin pH'sı perklorik asit ile 7.4'e ayarlanır. Çözelti 4°C'de 1-2 hafta dayanıklıdır.

TBA/ Perklorik Asit Çözeltisi: Yukarıdaki TBA çözeltisinin % 7'lik perklorik asit ile 2:1 (h/h) oranında karıştırılması ile kullanımdan hemen önce hazırlanır.

2.3.4. Fibroblast ve Astrosit Kültür Hücrelerinde Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Tayininde Kullanılan Çözeltiler

DTPA (1 mM)-Tris (50 mM)-Kakodilik Asit (1 mM) Tamponu (pH 8.4): Tris HCl ve DTPA'nın distile suda hazırlanan çözeltisinin pH'sının kakodilik asit ile pH 8.4'e ayarlanması ile her deney günü taze olarak hazırlanır.

Fosfat Tamponu (0.05 M, pH 7.0): 1.79 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 100 ml distile suda çözülür. 0.69 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 100 ml distile suda çözülür. Çözeltinin pH değeri Na_2HPO_4 çözeltisinin NaH_2PO_4 çözeltisine eklenmesiyle pH 7.0'ye ayarlanır.

GSH Redüktaz Çözeltisi (208 Ü/ml): 0.068 ml enzimin, 1.1 ml Tris tamponunda çözülmesi ile hazırlanır.

KCN Çözeltisi (54 mM): KCN'ün distile sudaki çözeltisidir.

NADPH Çözeltisi (8.4 mM): 0.007 g NADPH'ın 1 ml Tris tamponunda çözülmesiyle hazırlanır.

Pirogallol Çözeltisi (10 mM): 0.252 g pirogallolün, 200 ml 0.01 N HCl içinde çözülmesiyle hazırlanır. Çözelti 4°C'de 1 ay boyunca dayanıklıdır.

GSH Çözeltisi (0.15 M): 0.046 g indirgenmiş GSH'un, 1 ml Tris tamponunda çözülmesiyle hazırlanır.

SOD Çözeltisi (90 µg/ml): SOD'ın, DTPA içeren Tris-Kakodilik asit tamponu içinde çözülmesiyle hazırlanır.

t-Bütil Hidroperoksit Çözeltisi (30 mM): 0.2 ml % 70'lik t-bütil hidroperoksit çözeltisinin, deiyonize su ile 50 ml'ye tamamlanması ile hazırlanır.

Tris Tamponu (50 mM, pH 7.6): Tris HCl, Na_2EDTA ve sodyum azidin distile sudaki çözeltisidir. Çözeltinin pH'sı 7.6'ya ayarlanır. 4°C'de 1-2 ay dayanıklıdır.

2.3.5. Primer Astrosit Hücre Kültürlerinin Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

D-(+) Glukoz Çözeltisi (1.65 M): D-(+) Glukozun, steril distile sudaki çözeltisidir. Filtre edildikten sonra 4°C'de saklanır.

DNAaz Çözeltisi (1363 Ü/ml): DNAaz'ın steril PBS ile hazırlanan çözeltisidir. Filtre edildikten sonra -20 °C'de saklanır.

L-Glutamin Çözeltisi (200 mM): Liyofilize L-glutaminin 20 ml distile sudaki çözeltisidir, -20 °C'de saklanır.

Hepes Çözeltisi (1 M): Hepes'in steril distile suda çözülmesiyle hazırlanır. Çözeltinin pH'sı 20 N NaOH ile 7.3'e ayarlanır. Çözelti filtre edildikten sonra 4°C'de saklanır.

Minimum Essential Medium (MEM)/ F-12 (Nutrient) Çözeltisi: MEM ve F-12'nin distile sudaki çözeltisidir. Çözelti filtre edildikten sonra 4°C'de en çok 15 gün süreyle saklanır.

M1 Kùltür Ortamı: MEM/F-12 (nutrient) çözeltilisi, glutamin (0.29 g/l), glukoz (6 g/l), NaHCO_3 (1.125 g/l), Hepes (1.19 g/l), penisilin (100 Ü/ml), streptomisin (100 µg/ml), amfoterisin (2.5 µg/ml) ve % 10 fòtal dana serumu içerecek şekilde hazırlanan kùltür ortamıdır. Filtre edildikten sonra kullanılır.

PBS/Glukoz Çözeltilisi: D-Glukozun, PBS (fosfat tamponlu tuzlu su çözeltilisi) içinde çözümlenmesiyle deneyden 1 gün önce hazırlanır ve filtre edilerek 4°C'de saklanır.

Poli-L-Lizin Substrat Çözeltilisi (1 g/ml): Liyofilize formdaki poli-L-lizinin 5 ml distile suda steril olarak hazırlanan çözeltilisidir. -20 °C'de saklanır. Kullanımdan önce 1/100 oranında steril distile su ile seyreltilir.

Tripsin Çözeltilisi (% 0.4, h/h): Tripsinin PBS/glukoz çözeltilisinde seyreltilmesiyle deney günü taze olarak hazırlanır. Filtre edildikten sonra kullanılır.

Tripsin İnhibitörü (% 0.2, h/h): Liyofilize tripsin inhibitörünün, MEM, glukoz, Hepes ve glutamin çözeltileri ile deney günü taze olarak hazırlanan çözeltilisidir. Filtre edilerek kullanıma kadar 4°C'de saklanır.

2.3.6. Mikrozomların Hazırlanması ve ESR Tekniğı ile Yapılan Ölçümlerde Kullanılan Çözeltiler

Tamponlar ve Distile Suyun Chelex-100 Reçinesi ile Muamele Edilmesi (% 2.5, a/h): ESR deneylerinde kullanılan distile su, fosfat tamponu ve sukroz içeren fosfat tamponu, Chelex-100 reçinesi ile muamele edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla, 2.5 g Chelex-100 reçinesi, 100 ml çözeltili ile 1 saat süreyle karıştırılır, takiben 1500×g'de santrifüje edilir. Çözeltilinin pH'sı kontrol edilir ve gerektiğinde HCl ile istenen pH'ya ayarlanır. Çözeltili 0.2 µm por çapındaki membran filtreden geçirilerek kullanılır.

CPR Çözeltilisi (5 mM): CPR'in "Chelex-100 reçinesi ile muamele edilmiş" distile sudaki çözeltilisidir ve her deney günü taze olarak hazırlanır. Çözeltili kullanım süresince ışıktan korunur.

FeSO₄ Çözeltilisi (0.1 mM): FeSO₄'ın distile sudaki çözeltilisidir.

Fe⁺⁺ (10 µM) /DTPA (20 µM) Çözeltilisi: FeSO₄ ve DTPA'nın distile sudaki çözeltilisidir. 10 µM Fe⁺⁺ + 20 µM DTPA içerir. Kullanımdan hemen önce hazırlanır.

DFO Çözeltilisi (0.4 mM): DFO'in "Chelex-100 reçinesi ile muamele edilmiş" distile sudaki çözeltilisidir. Her deney günü taze olarak hazırlanır.

DMPO Çözeltilisi: Ticari DMPO'nun distilasyon ile saflaştırılmasının ardından kullanılır. Çözeltili -20°C'de fraksiyonlara ayrılarak saklanır.

DTPA Çözeltilisi (5 mM): DTPA'nın "Chelex-100 reçinesi ile muamele edilmiş" distile sudaki çözeltilisidir. Kullanımdan 1 gün önce hazırlanır.

E Vitamini Çözeltisi (10 mM): E vitamininin mutlak alkoldeki çözeltisidir. Her deney günü taze olarak hazırlanır.

Fosfat Tamponu (20 mM, pH 7.4): 1.6 g K_2HPO_4 500 ml distile suda çözülür. 1.2 g KH_2PO_4 500 ml distile suda çözülür. Çözeltinin pH değeri KH_2PO_4 çözeltisinin K_2HPO_4 çözeltisine eklenmesiyle 7.4'e ayarlanır.

NADPH (40 mM): NADPH'ın "Chelex-100 reçinesi ile muamele edilmiş" fosfat tamponunda çözülmesi ile her deney günü taze olarak hazırlanır.

4-POBN Çözeltisi (1000 mM): 4-POBN'in "Chelex-100 reçinesi ile muamele edilmiş" fosfat tamponunda çözülmesi ile her deney günü taze olarak hazırlanır.

SKF 525A Çözeltisi (10 mM): SKF 525A'nın "Chelex-100 reçinesi ile muamele edilmiş" fosfat tamponundaki çözeltisidir. Her deney günü taze olarak hazırlanır.

SOD Çözeltisi (15.000 Ü/ml): SOD'ın "Chelex-100 reçinesi ile muamele edilmiş" fosfat tamponundaki çözeltisidir. Kullanımdan hemen önce hazırlanır.

Sukroz (0.25 M) İçeren Fosfat Tamponu (10 mM, pH 7.4): 43 g sukrozun 500 ml, yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan, fosfat tamponundaki çözeltisidir. Kullanımdan hemen önce hazırlanır ve çözeltinin pH'sı HCl ile 7.4'e ayarlanır.

Troloks çözeltisi (2 mM): Troloksun "Chelex-100 reçinesi ile muamele edilmiş" distile sudaki çözeltisidir. Her deney günü taze olarak hazırlanır.

ZnCl₂ Çözeltisi (7.5 mM): ZnCl₂'ün "Chelex-100 reçinesi ile muamele edilmiş" distile sudaki çözeltisidir. Her deney günü taze olarak hazırlanır.

2.3.7. Protein Tayinlerinde Kullanılan Çözeltiler

Sığır Serum Albümini Stok Çözeltisi (2 g/l): Sığır serum albümininin distile sudaki çözeltisidir. Her deney günü taze olarak hazırlanan çözelti kullanımdan önce 1 N NaOH ile ½ oranında seyreltilir.

Sığır Serum Albümini Standart Çözeltileri (0.05-0.5 g/l): Stok sığır serum albümin çözeltisinden hareketle 0.5 N NaOH çözeltisiyle seyreltilerek her deney günü taze olarak hazırlanırlar.

Folin-Fenol Çözeltisi (1N): Folin-Ciocalteu's Fenol reaktifinin distile su ile ½ oranında seyreltilmesi ile hazırlanır. Kullanım sırasında ışıktan korunmalıdır.

CuSO₄ - Na-Sitrat Çözeltisi: 0.5 g CuSO₄ ve 1 g Na-sitratın 100 ml distile sudaki çözeltisidir.

Na₂CO₃/ NaOH Çözeltisi (% 2, a/h): Na₂CO₃'ün 0.1 N NaOH'deki % 2'lik çözeltisidir.

Bakır Reaktifi (I): 10 ml% 2'lik Na_2CO_3 / NaOH çözeltisi ile 0.2 ml CuSO_4 -Na-sitrat çözeltisinin kullanımdan hemen önce karıştırılması ile hazırlanır.

Na_2CO_3 Çözeltisi (% 4, a/h): Na_2CO_3 'ın distile sudaki çözeltisidir.

NaK-Tartarat Çözeltisi (% , a/h): NaK-Tartaratın distile sudaki çözeltisidir.

CuSO_4 Çözeltisi (% 1, a/h): CuSO_4 'ın distile sudaki çözeltisidir.

Bakır Reaktifi (II) Reaktifi: 500 μl NaK-tartarat, 500 μl CuSO_4 ve 24 ml Na_2CO_3 çözeltilerinin kullanımdan hemen önce karıştırılması ile hazırlanır. Işıktan korunarak saklanır.

2. 4. Hücre Kültürü Çalışmaları

2.4.1. Normal İnsan Dermal Fibroblast Hücresi Kültürlerinde Yapılan Çalışmalar

20-40 yaşlarında normal yetişkin insanlardan alınan deri biyopsi materyalinden elde edilen fibroblast hücreleri, 2.3.1.'de tanımlandığı şekilde hazırlanan hücre kültürü ortamında, % 5 CO_2 ve % 95 O_2 içeren nemli atmosferde 37°C 'de, 75 cm^2 'lik plastik hücre kültür kaplarında üretilmiştir. Hücreler kültür kaplarına ~ 130.000 hücre/ cm^2 olacak şekilde ekilmiştir. Kültür ortamı her 4 günde bir değiştirilmiş ve kültürler haftada bir kez tripsinlenip alt kültürlerle ayrılarak çoğaltılmıştır. Deneylerde 5-10. alt kültürler kullanılmıştır.

2.4.1.1. CPR'e Maruz Bırakılan Fibroblast Kültürlerinde Hücre Proliferasyonu ve Sitotoksik Etkinin İncelenmesi

2.4.1.1.1. Fibroblast Kültürlerinin CPR ile İnkübasyonu

Ana kültür kaplarından tripsinlenerek ayrılan hücreler taze kültür ortamı ile bir kez yıkandıktan sonra süspende edilmiş, 3.5 cm^2 yüzey alanına sahip petri kaplarına ~ 130.000 hücre/ cm^2 olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler, 24 saat süreyle 37°C 'lik inkübatörde inkübe edildikten sonra, CPR standart çözeltileri nihai ilaç konsantrasyonu 5-150 mg/l olacak şekilde kültür ortamına eklenmiştir. Bu işlemi

takiben hücreler 24, 48 veya 72 saat süreyle 37°C'de inkübe edilmiştir. 8 ayrı CPR konsantrasyonu kullanılmış, her konsantrasyon *triplike* çalışılmıştır. Ayrıca CPR içermeyen “kontrol kültürleri” ve hücre içermeyen “kör deney” aynı koşullarda çalışılmıştır. Deney süresince CPR çözeltileri ve kültür kapları alüminyum folyo ile kapatılarak ışıktan korunmuştur.

2.4.1.1.2. Fibroblast Hücrelerinin E Vitamini ile Ön-İnkübasyonu

Bölüm 2.4.1.1.1.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan fibroblast kültürleri CPR uygulanmasından önce 4 saat süreyle 50 (veya 100) µM konsantrasyonda E vitamini ile ön inkübasyona bırakılmıştır. Takiben 75 mg/l konsantrasyonda CPR ile 48 saat inkübasyon yapılmıştır.

2.4.1.1.3. Sitotoksikite Ölçümü

CPR veya 'Vit E + CPR'e maruz bırakılan hücrelerdeki canlı hücre yüzdesi, dolayısıyla sitotoksik etki, Borenfreund ve Puerner (268) tarafından tanımlanan ve Bölüm 1.3.4.2.'de anlatılan NR testi ile ölçülmüştür.

2.4.1.1.3.1. NR Testinin Uygulanışı

1. CPR veya 'Vit E + CPR' ile inkübasyon sürelerinin sonunda, hücre kültürlerinden (kontrol kültürleri ve kör deney dahil) kültür ortamı uzaklaştırılır ve NR'li kültür ortamı ilave edilir.
2. Hücreler, NR boyasının canlı-intact hücrelerin lizozomlarına girişine olanak sağlamak üzere, 3 saat süre ile 37°C'de inkübasyona bırakılır.
3. NR içeren kültür ortamı uzaklaştırılır ve hücreler 2 ml formol-kalsiyum çözeltisiyle ve ardından Ca^{++} ve Mg^{++} içermeyen PBS ile yıkanır.
4. Hücrelere penetre olan boyanın ekstraksiyonunu sağlamak için petri kaplarına 3 ml asetik asit-etanol çözeltisi eklenir ve kaplar 20 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletilir.

5. Sıvı faz homojeniteyi sağlayacak şekilde karıştırılarak dikkatle spektrofotometre kuvvetlerine alınır ve 540 nm’de absorbans ölçümü yapılır.

Kontrol kültürleri ve CPR (veya 'Vit E + CPR') içeren kültürler için ölçülen absorbans değerinden kör deney için ölçülen absorbans değeri çıkarılır. CPR içeren kültürlerdeki canlılık yüzdesi kontrol kültürlerinin yüzdesi olarak, aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

$$\text{Canlılık Yüzdesi} = \frac{A \text{ ilaç} - A \text{ kontrol}}{A \text{ kontrol}} \times 100$$

2.4.1.2. CPR'e Maruz Bırakılan Fibroblast Kültürlerinde Lipid Peroksidasyonu, GSH Düzeyi ve Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Bölüm 2.4.1.1.1. ve 2.4.1.1.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan fibroblast hücre kültürlerine, 75 mg/l CPR ile 48 saat inkübasyonu takiben aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

1. Tripsinlenme işlemiyle hücrelerin kültür kaplarından ayrılması sağlanır. Taze kültür ortamı ilave edilerek hazırlanan hücre süspansiyonları 800 × g’de 3 dk santrifüje edilir.
2. Elde edilen pellet, 3 kez izotonik Tris-HCl (0.2 mM, pH 7.3) tamponu ile yıkandıktan sonra, hipotonik Tris-HCl (0.2 mM, pH 7.3) tamponunda yeniden süspande edilir.
3. Süspansiyon, teflon başlıklı bir homojenizatör kullanılarak 80 × g’de, 5 dakika süre ile homojenize edilir.

Elde edilen lizat lipid peroksidasyonu, total hücre içi GSH düzeyi ve antioksidan enzim aktivitelerinin tayininde kullanılmıştır.

2.4.1.2.1. Lipid Peroksidasyonunun Ölçülmesi

Lipid peroksidasyonu, Richard ve ark. (329) tarafından tanımlanan ve tiyobarbitürik asit reaktif materyal (TBARS) oluşumu esasına dayalı fluorometrik bir yöntem ile belirlenmiştir. Yöntem, çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif bozunma ürünü olan malondialdehit (MDA) molekülündeki aldehit gruplarının tiyobarbitürik asit (TBA) ile meydana getirdiği pembe renkli kompleksin verdiği floresansın eksitasyon dalga boyu: 532 nm, emisyon dalga boyu: 553 nm’de ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

2.4.1.2.1.1. TBARS Ölçüm Yönteminin Uygulanışı

1. Bölüm 2.4.1.2.'de tanımlandığı şekilde hazırlanan hücre lizatının 100 µl'sine 10 µl BHT çözeltisi ve 750 µl TBA/ perklorik asit çözeltisi eklenip vorteks ile karıştırılır.
2. Örnekler 95°C'lik su banyosunda 60 dk süreyle inkübasyona bırakılır.
3. Su banyosundan çıkartılan örnekler buz içine alınıp 10 dk süreyle soğutulur.
4. 2 ml n-butanol eklenir, 2 dk süreyle vortekslenir ve 8 dk 2665 × g'de santrifüje edilir.
5. Üst fazın verdiği floresans butanol körüne karşı okunur.
6. 100 µl hücre lizatı yerine distile su kullanılarak her deney günü paralel bir kör deney yapılır.
7. Her deney günü standart TEP çözeltileri kullanılarak hazırlanan standart eğrilerden hareketle örneklerin TBARS düzeyleri hesaplanır. Sonuçlar *nmol/mg protein* olarak ifade edilir.

2.4.1.2.2. Total GSH Düzeyinin Ölçülmesi

Total GSH düzeyi, Akerboom ve Sies (251) tarafından tanımlanmış olan ve hücre kültürleri için Emonet ve ark. (330) tarafından modifiye edilen bir enzimatik döngü yöntemi kullanılarak ölçülmüştür.

Yöntem, DTNB'nin GSH veya GSSG varlığında ve GSH redüktazla katalizlenen bir reaksiyonla, NADPH tarafından sürekli olarak indirgenmesi esasına

dayanır. 412 nm'de spektrofotometrik olarak reaksiyon kinetiğinin izlenmesi suretiyle, ortamdaki total GSH miktarı saptanır.

2.4.1.2.2.1. Total GSH Tayini Yönteminin Uygulanışı

1. Bölüm 2.4.1.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan hücre lizatı, % 6'lık metafosforik asit çözeltisi [(lizat: metafosforik asit, 5:1, h/h)] ile seyreltilir.
2. Örnek 4°C'de, 2665 × g'de 10 dk santrifüje edilir ve süpernatant ayrılır.
3. 1 ml MOPS/EDTA tampon çözeltisinin üzerine sırasıyla, 100 µl süpernatant, 20 µl DTNB, 20 µl GSH redüktaz ve 50 µl NADPH eklenip, karıştırılır.
4. Kör deney için, örnek yerine MOPS/EDTA tamponu kullanılır.
5. Elde edilen karışımın absorbansı 412 nm'de köre karşı spektrofotometrenin kinetik modu kullanılarak okunur.
6. Her deney günü, standart GSH çözeltileri kullanılarak hazırlanan standart eğriler yardımıyla örneklerin GSH düzeyleri hesaplanır. Sonuçlar *nmol/mg protein* olarak ifade edilir.

2.4.1.2.3. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Ölçümü

Bölüm 2.4.1.2.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan hücre lizatı 2665 × g'de, 4°C'de, 10 dk süreyle santrifüje edilir ve elde edilen süpernatant SOD, GSHPx ve CAT enzim aktivitelerinin ölçümü için kullanılır.

2.4.1.2.3.1. SOD Aktivitesinin Ölçümü

Total SOD (Mn SOD + CuZn SOD) ve Mn SOD aktivitesi, Marklund (331) tarafından tanımlanan ve pirogallol otooksidasyonunun SOD tarafından inhibisyonu esasına dayanan yöntemin hücre kültürleri için modifiye edilmiş şekli (332) ile ölçülmüş, CuZn SOD aktivitesi bu değerlerden hesaplanmıştır.

Yöntem, pirogallolün süperoksit radikali tarafından otooksidasyonu ile süperoksit radikalinin SOD tarafından dismutasyonu arasındaki yarışmanın 420 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Pirogallol

otooksidasyonunun inhibisyonu, ortama eklenen SOD konsantrasyonuna bağlıdır ve absorbanstaki artışın 420 nm’de ölçülmesi yoluyla belirlenir. Aynı deney koşullarında CuZn SOD’ın KCN ile inhibisyonu Mn SOD’ın tayinine olanak sağlar.

2.4.1.2.3.1.1. Total SOD Ölçüm Yönteminin Uygulanışı

1. Spektrofotometre küvetine 935 µl DTPA-Tris-Kakodilik asit tamponu ve 25 µl Bölüm 2.4.1.2.3’de anlatıldığı şekilde hazırlanan süpernatandan konur, karıştırılır.
2. Bu karışıma 40 µl pirogallol çözeltisi eklenerek tekrar karıştırılır ve absorbans 420 nm’de 1 dakika boyunca izlenir.
3. Her deney günü hücre lizatı yerine tampon kullanılarak paralel bir kör deney yapılır.
4. Her deney günü SOD standart çözeltileri kullanılarak hazırlanan standart eğriler kullanılarak örneklerin aktivitesi aşağıdaki şekilde hesaplanır.

2.4.1.2.3.1.1.1. SOD Aktivitesinin Hesaplanması

1 ünite SOD, pirogallol oksidasyonunu % 50 oranında inhibe edebilen enzim miktarı olarak tanımlanır. Pirogallol otooksidasyonunun inhibisyon yüzdesi aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanır:

$$\text{İnhibisyon \%’si} = \frac{\Delta A_{\text{kör}} - \Delta A_{\text{örnek}}}{\Delta A_{\text{kör}}} \times 100$$

Kullanılan SOD enziminin ünite/ml olarak değeri aşağıdaki formül ile hesaplanır:

$$\text{Total SOD (Ü/ml)} = \frac{\text{İnhibisyon \%si} \times 1000}{25 \times 50}$$

Nihai küvet hacmi= 1000 µl,

Örnek hacmi= 25 µl,

Ünite tanımında kullanılan inhibisyon oranı= 50

Sonuçlar protein içeriği üzerinden hesaplanarak *Ü/mg protein* olarak ifade edilir.

2.4.1.2.3.1.2. Mn SOD Aktivitesi ÖlçümYönteminin Uygulanışı

1. Bölüm 2.4.1.2.3.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan süpernatandan 300 µl alınır. Üzerine 60 µl KCN çözeltisi eklenir.
2. Spektrofotometre küvetine 850 µl DTPA-Tris-Kakodilik asit tamponu, 1. basamakta hazırlanan karışımdan 100 µl ve 50 µl pirogallol çözeltisi konur.
3. Küvet karıştırılır ve karışımın absorbansı spektrofotometrede 420 nm'de 1 dk süreyle izlenir.
4. Her deney günü SOD standart çözeltileri kullanılarak hazırlanan standart eğriler kullanılarak örneklerin aktivitesi aşağıdaki şekilde hesaplanır.

2.4.1.2.3.1.2.1. Mn SOD Aktivitesinin Hesaplanması

Mn SOD aktivitesi, 2.4.1.2.3.1.1.1.'de total SOD aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan ilkeler temel alınarak aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanır:

$$\text{Mn SOD (Ü/ml)} = \frac{\text{İnhibisyon \%si} \times 1000}{100 \times 50} \times 1.2$$

Nihai küvet hacmi= 1000 µl,

Örnek hacmi= 100 µl,

Ünite tanımında kullanılan inhibisyon oranı= 50,

Seyreltme faktörü= 1.2

Sonuçlar protein içeriği üzerinden hesaplanarak $\bar{U}/mg$ protein olarak ifade edilir.

2.4.1.2.3.1.3. CuZn SOD Aktivitesinin Hesaplanması

CuZn SOD aktivitesi, total SOD aktivitesi değerinden Mn SOD aktivitesi değerinin çıkartılması suretiyle hesaplanır.

2.4.1.2.3.2. GSHPx Aktivitesinin Ölçülmesi

GSHPx aktivitesi Gunzler ve ark. (333) tarafından tanımlanan yöntemle ölçülmüştür. Bu yöntem, GSHPx enziminin katalizlediği bir reaksiyon ile substrat olarak kullanılan t-butil hidroperoksidin oksitlediği GSH'un, GSH redüktaz ve NADPH varlığında redüklenmiş forma dönüşmesi ve bu reaksiyon sırasında NADPH absorpsiyonunda meydana gelen azalmanın 340 nm'de ölçülmesi esasına dayanır.

2.4.1.2.3.2.1. GSHPx Aktivitesi Ölçüm Yönteminin Uygulanışı

1. Spektrofotometre küvetine sırasıyla 900 μ l Tris tamponu, 50 μ l Bölüm 2.4.1.2.3.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan süpernatant, 20 μ l GSH, 20 μ l GSH redüktaz ve 20 μ l NADPH konur.
2. Küvet karıştırılır ve 1 dk süreyle oda sıcaklığında bekletilir.
3. Karışıma 20 μ l t-butil hidroperoksit çözeltisi eklenir.
4. Absorbansdaki azalma 340 nm'de 3 dk süreyle izlenir.
5. Her deney günü örnek yerine Tris tamponu kullanılarak paralel bir kör deney yapılır.

2.4.1.2.3.2.1.1. GSHPx Aktivitesinin Hesaplanması

GSHPx enzim aktivitesi dakikada okside olan μ mol NADPH üzerinden ifade edilir ve aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

$$\text{GSHPx Aktivitesi (Ü/l)} = \frac{\Delta A \text{ örnek} - \Delta A \text{ kör}}{dk} \times 3311.9^*$$

(*NADPH'ın ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Nihai küvet hacmi (1030 μl)

Örnek hacmi (50 μl)den hesaplanan faktör)

Nihai sonuç protein içeriği üzerinden hesaplanarak *Ü/mg protein* olarak ifade edilir.

2.4.1.2.3.3. CAT Aktivitesinin Ölçülmesi

CAT aktivitesi Aebi (250)'nin tanımladığı yönteme göre ölçülmüştür. Bu yöntem, H_2O_2 'in katalaz tarafından yıkımlanması sırasında absorbansda meydana gelen azalmanın spektrofotometrik olarak 240 nm'de izlenmesi yoluyla ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

2.4.1.2.3.3.1. CAT Aktivitesinin Ölçüm Yönteminin Uygulanışı

1. 50 μl 0.05 M fosfat tamponu (pH 7.0)'na 100 μl % 30'luk H_2O_2 eklenir. Bu çözeltinin 240 nm'de, 0.05 M fosfat tamponuna karşı okunan absorbansı 0.520-0.550 olmalıdır.
2. Spektrofotometre küvetine 2.9 ml yukarıdaki çözelti ve 0.1 ml Bölüm 2.4.1.2.3.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan süpernatant eklenir.
3. Küvet alt üst edilerek karıştırılır ve absorbanstaki azalma, 240 nm'de 20 saniye süreyle izlenir.
4. Kör deney 2.9 ml 0.05 M fosfat tamponuna süpernatant eklenerek yapılır.

2.4.1.2.3.3.2. CAT Aktivitesinin Hesaplanması

CAT enzim aktivitesi 1 dakikada yıkımlanan H_2O_2 'in μmol olarak miktarı üzerinden ifade edilir. 240 nm'de izlenen absorbansın 0.450'den 0.400'e düşmesi için

gerekli süre ve buna karşılık gelen $\Delta A/dk$ ile ilişkilidir. Aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$\text{CAT Aktivitesi (Ü/ml)} = \frac{3.45 \times \Delta A/dk}{(0.450-0.400) \times 0.1 \text{ ml}}$$

(3 ml'lik reaksiyon karışımında bulunan H_2O_2 'in μmol olarak miktarı= 3.45,

Örnek hacmi= 0.1 ml)

Sonuçlar protein içeriği üzerinden hesaplanarak Ü/mg protein olarak ifade edilir.

2.4.2. Primer Astrosit Kültürlerinde Yapılan Çalışmalar

2.4.2.1. Primer Astrosit Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Primer astrosit kültürleri Booher ve Sensenbrenner (334) tarafından tanımlanan yöntemle, 2 günlük Sprague Dawley (Iffa Credo, Les Oncins) sıçan beyinlerinden hazırlanmıştır.

1. Dekapite edilen 15 hayvanın beyinleri çıkarılıp PBS/glukoz çözeltisi ile 4 kez yıkanır ve mikroskop altında membranlarından temizlenir.
2. Üzerine 300-400 μl DNAaz çözeltisi eklenen dokular bistüri yardımıyla parçalanıp homojen hale getirilir.
3. Homojenata 2 ml tripsin (% 0.4, h/h) çözeltisi eklenir, 10 dk süreyle devamlı karıştırılmak suretiyle 37°C 'de inkübe edilir.
4. Elde edilen süspansiyona 30 ml PBS eklenir ve 4°C 'de, $1000 \times g$ 'de 9 dk süreyle santrijüje edilir.
5. Pellet PBS ile yıkandıktan sonra üzerine 15 ml PBS eklenerek ikinci kez 4°C 'de, $800 \times g$ 'de 8 dk süreyle santrijüje edilir.
6. Elde edilen pellete 300-400 μl DNAase çözeltisi ve 6 ml tripsin inhibitörü eklenir ve dikkatle süspande edilir.

7. Süspansiyon birkaç kez, farklı çaplarda Pastör pipetlerinden 10-15er kez geçirilip dissosiyeye edilerek homojen hale getirilir.
8. Elde edilen bu süspansiyon tekrar 4°C'de, 800 × g'de 8 dk süreyle santrifüje edilir. Pellet 10 ml PBS ile alınarak tekrar en küçük çaplı Pastör pipetinden geçirilerek dissosiyeye edilir.
9. Dördüncü kez 8. basamaktaki koşullarda santrifüje edildikten sonra elde edilen pellet, bu kez M1 kültür ortamında süspande edilerek sırasıyla 100 ve 20 µm por çapında steril, naylon filtrelerden geçirilir.
10. Elde edilen hücre süspansiyonundaki hücre sayısı hemositometrede Tripan mavisi ile boyanarak sayılır ve istenilen konsantrasyona M1 kültür ortamı kullanılarak seyreltilir. Hücreler, poli-L-lizin ile kaplanmış 60 cm²'lik petri kaplarına 40.000 hücre/ cm² veya 96 kuyucuklu kültür plaklarına 14.000 hücre/ cm² yoğunlukta ekilir ve % 5 CO₂ ve % 95 O₂ içeren nemli atmosferde, 37°C'de inkübe edilir.
12. Kültür ortamı, ekimi izleyen ilk 6 saat içinde daha sonra 3 günde bir değiştirilir.

CPR'le yapılan tüm deneylerde yaklaşık 14 günlük bir proliferasyon evresini geçirmiş astrosit kültürleri ile çalışılmış, dolayısıyla testler hücrelerinin farklılaşma fazı süresince gerçekleştirilmiştir.

2.4.2.2. CPR'e Maruz Bırakılan Primer Astrosit Kültürlerinde Hücre Proliferasyonu ve Sitotoksitenin Araştırılması

Yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanıp 96 kuyucuklu kültür plaklarına ekilen astrosit kültürleri 14 günlük proliferasyonu takiben, nihai ilaç konsantrasyonu 0.005-300 mg/l olacak şekilde kültür ortamına eklenen CPR'e maruz bırakılmıştır. Hücreler 7, 24, 48, 72 veya 96 saat süreyle 37°C'de inkübe edilmiş, 10 ayrı CPR konsantrasyonu kullanılmış, her konsantrasyon 4'lü veya sekizli çalışılmıştır. Ayrıca CPR içermeyen "kontrol kültürleri" ve hücre içermeyen "kör deney" aynı koşullarda çalışılmıştır.

2.4.2.2.1. Primer Astrosit Kùltürlerinin E Vitamini ile Ön-İnkübasyonu

Bölüm 2.4.2.2.'de anlatılan koşullarda hazırlanan kùltürler CPR uygulanmasından önce 4 saat süreyle 50 µM konsantrasyonda E vitamini ile inkübasyona bırakılmıştır. Takiben, 300 mg/l konsantrasyonda CPR ile 96 saat inkübasyon yapılmıştır.

2.4.2.2.2. Primer Astrosit Kùltürlerinin SOD ile Ön-İnkübasyonu

Bölüm 2.4.2.2.'de anlatılan koşullarda hazırlanan kùltürler CPR uygulanmasından önce 1 saat süreyle 500 Ü/ml konsantrasyonda SOD ile inkübasyona bırakılmıştır. Takiben, 300 mg/l konsantrasyonda CPR ile 96 saat inkübasyon yapılmıştır.

2.4.2.2.3. Primer Astrosit Kùltürlerinin CAT ile Ön-İnkübasyonu

Bölüm 2.4.2.2.'de anlatılan koşullarda hazırlanan kùltürler CPR uygulanmasından önce 1 saat süreyle 50 Ü/ml konsantrasyonda CAT ile inkübasyona bırakılmıştır. Takiben, 300 mg/l konsantrasyonda CPR ile 96 saat inkübasyon yapılmıştır.

2.4.2.2.4. Primer Astrosit Kùltürlerinin 'SOD + CAT' ile Ön-İnkübasyonu

Bölüm 2.4.2.2.'de anlatılan koşullarda hazırlanan kùltürler CPR uygulanmasından önce 1 saat süreyle 500 Ü/ml SOD ve 50 Ü/ml konsantrasyonda CAT ile inkübasyona bırakılmıştır. Takiben, 300 mg/l konsantrasyonda CPR ile 96 saat inkübasyon yapılmıştır.

2.4.2.2.5. Sitotoksosite Ölçümü

2.4.2.2.5.1. NR Testinin Uygulanması

Astrosit kültürleri için NR testi, 2.4.1.1.3.'de fibroblast hücreleri için anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Tek fark olarak spektrofotometrik ölçümler otomatik plak okuyucusu sistemi (Titertek Multiscan, MCC/340) kullanılarak yapılmıştır.

2.4.2.2.5.2. MTT Testi

CPR'e maruz bırakılan hücrelerde canlılık derecesi, dolayısıyla sitotoksik etki, NR testinin yanısıra, Mossman (267) tarafından tanımlanan ve Bölüm 1.3.4.1'de anlatılan MTT testi ile ölçülmüştür.

2.4.2.2.5.2.1. MTT Testinin Uygulanışı

1. İnkübasyon sürelerinin sonunda, (kontrol ve kör deney dahil) hücre kültürlerine 10 µl MTT çözeltisi eklenir. Hücreler 2 saat süreyle 37°C'de inkübe edilir.
2. MTT içeren kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra, oluşan koyu mavi renkli formazan kristallerinin çözünmesini sağlamak üzere kuyucuklara 100 µl DMSO ilave edilir.
3. Kültür plakları 5 dk süreyle, oda sıcaklığında, otomatik karıştırıcıda karıştırılır.
4. Meydana gelen rengin absorbansı 570 nm'de otomatik plak okuyucusu kullanılarak ölçülür.

Kontrol kültürleri ve CPR (ve/veya antioksidan + CPR) içeren kültürler için ölçülen absorbans değerinden kör deney için ölçülen absorbans değeri çıkarılır. CPR içeren kültürlerdeki canlılık yüzdesi, kontrol kültürlerinin yüzdesi olarak, aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

$$\text{Canlılık Yüzdesi} = \frac{A_{\text{ilaç}} - A_{\text{kontrol}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

2.4.2.3. CPR'e Maruz Bırakılan Primer Astrosit Kültürlerinde Lipid Peroksidasyonu ve GSH Düzeyleri ile CAT Aktivitesinin Ölçülmesi

Bölüm 2.4.2.1.'de anlatıldığı şekilde 60 cm²'lik petri kutularında hazırlanan primer astrosit kültürleri 300 mg/l CPR ile 96 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

1. Hücreler tripsinleme işlemiyle kültür kaplarından ayrılır. Taze kültür ortamı ilave edilerek hazırlanan hücre süspansiyonu, 1000 × g'de 5 dk süreyle santrifüje edilir.
2. Elde edilen pellet, 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra, PBS ile yeniden süspande edilir.
3. Süspansiyon, 800 × g'de 5 dk süreyle santrifüje edilir ve süpernatant uzaklaştırılır.
4. Elde edilen pellet, 3 ml hipotonik Tris-HCl tamponunda süspande edilir.
5. Hücre lizatı, elde edilen süspansiyonun sıvı azot ve 30°C'lik su banyosunda dönüşümlü olarak 5 kez dondurma ve çözme işlemine tabii tutulması suretiyle hazırlanır.

Elde edilen lizat lipid peroksidasyonu, total hücre içi GSH düzeyi ve katalaz enzim aktivitesinin tayininde kullanılmıştır.

2.4.2.3.1. Lipid Peroksidasyonunun Ölçülmesi

CPR'e maruz bırakılan astrosit hücrelerinde meydana gelen lipid peroksidasyonu düzeyleri, Bölüm 2.4.1.2.1.'de fibroblast hücreleri için uygulaması anlatılan TBARS ölçüm yöntemi ile ölçülmüştür.

2.4.2.3.2. Total GSH Düzeyinin Ölçülmesi

Bölüm 2.4.1.2.2.'de fibroblast hücreleri için uygulaması anlatılan yöntemle ölçülmüştür.

2.4.2.3.3. CAT Aktivitesinin Ölçülmesi

Bölüm 2.4.1.2.3.3.3.1'de fibroblast hücreleri için uygulaması anlatılan yöntemle ölçülmüştür.

2.4.3. CPR'e Maruz Bırakılan Fibroblast ve Astrosit Hücrelerinde ESR-Spin Tuzağı Yöntemiyle Serbest Radikal Aranması

CPR'e maruz bırakılan fibroblast ve astrosit kültürlerinde meydana gelmesi olası serbest radikaller ESR-Spin Tuzağı tekniği ile araştırılmıştır.

Bu amaçla fibroblast kültürleri Bölüm 2.4.1.1.'de anlatıldığı şekilde hazırlandıktan sonra 130.000 hücre/cm² yoğunlukta olacak şekilde 75 cm²'lik kültür kaplarına ekilip 1 hafta süreyle üretilmiştir. Astrosit kültürleri ise Bölüm 2.4.2.1.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan 25 cm²'lik kültür kaplarına 50.000 hücre/cm² yoğunlukta ekilip üretildikten 14 gün sonra, aşağıdaki işlemleri takiben spin-tuzağı olarak 4-POBN kullanılmak suretiyle ESR tekniği ile analize edilmiştir.

1. Kültür ortamları uzaklaştırılıp hücreler 2 ml PBS ile yıkanır.
2. Kültür ortamı yerine PBS eklenen hücre kültürlerine nihai konsantrasyonları 0.3, 0.4 ve 1 mM (120, 155, 390 mg/l) olacak şekilde CPR ve 50 mM 4-POBN ilave edilir ve 30, 60 ve 180 dk süreyle 37°C'de inkübasyon yapılır.
3. İnkübasyon sürelerinin sonunda hücreler PBS ile yıkayıp, kültür kaplarından sıyrılarak alınır ve kalibre edilmiş 50 µl'lik kapiller tüplerle ESR analizleri yapılır.

2.5. Mikrozomal Çalışmalar

2.5.1. Sıçan Karaciğer ve Beyin Mikrozomlarının Hazırlanması

Bir hafta süreyle laboratuvar koşullarına uyumları sağlanmış, yem ve su tüketimleri kısıtlanmamış 170-190 g ağırlığında erkek Wistar-Albino sıçanların beyin ve karaciğerleri, giyotinle dekapite edildikten sonra 2-3 dk içinde çıkarılmış, 0°C'de PBS ile 3 kez yıkanmıştır.

Doku homojenizasyonu işlemi, buz içinde soğutulan teflon başlıklı bir el homojenizatörü ile yapılmıştır. Dokular Chelex-100 reçinesi ile muamele edilmiş 0.25 mM sukroz içeren 10 mM potasyum fosfat tamponu, pH 7.4 kullanılarak 1/5 (a/h) oranında seyreltme ile homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlardan hareketle aşağıdaki uygulama şemasına göre mikrozomlar hazırlanmıştır.

1. Homojenat 4°C'de $750 \times g$ 'de 10 dk santrifüje edilir.
2. Süpernatant ayrılır ve 4°C'de, $6000 \times g$ 'de 10 dk santrifüje edilir.
3. Elde edilen süpernatant bu kez, $16\,000 \times g$ 'de 10 dk (4°C) süreyle santrifüje edilir.
4. Elde edilen süpernatant, 4°C'de, $105\,000 \times g$ 'de 60 dk süreyle santrifüje edilir. Elde edilen mikrozomal pellet alınır ve 0.25 mM sukroz içeren 10 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 7.4) süspand edilir.
5. Süspansiyon 4°C'de, $105\,000 \times g$ 'de 30 dk süreyle santrifüje edilir.
6. Süpernatant ayrıldıktan sonra kalan pellet 0.25 mM sukroz içeren 10 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 7.4) süspand edilerek mikrozomal fraksiyon hazırlanır ve küçük hacimlere ayrılarak ependorf tüpler içinde kullanıma kadar -80°C'de saklanır.

Mikrozomal protein konsantrasyonları, Shopis ve McCay'ın (335) yöntemiyle ölçülmüştür.

2.5.2. CPR ile İnkübe Edilen Beyin ve Karaciğer Mikrozomlarında Radikal Oluşumunun ESR Spin Tuzağı Tekniği ile Ölçülmesi

CPR'in mikrozomal ortamda sitokrom P-450-bağımlı karışık fonksiyonlu oksidaz sistemleriyle oluşturması olası serbest radikallerin belirlenmesi amacıyla, yukarıda hazırlanışları anlatılan sıçan beyin ve karaciğer mikrozomları ile çalışılmış ve serbest radikal oluşumu ESR-Spin Tuzağı tekniği ile ölçülmüştür. Spin tuzağı olarak 4-POBN kullanılmıştır.

Mikrozomal sistem koşulları ön deneylerle optimize edilmiştir. Tablo 2.1'de karaciğer, Tablo 2.2'de beyin mikrozomal inkübasyonları için optimize edilmiş sistem bileşenleri görülmektedir.

Tablo 2.1. ESR-Spin Tuzağı çalışmalarında kullanılan optimum karaciğer mikrozomal sistem bileşimi.

Bileşen	Nihai konsantrasyon
Hepatik mikrozomal süspansiyon	4 mg protein/ml
CPR	10-780 mg/l (0.025-2 mM)
4-POBN	50 mM
NADPH	2.5 mM
Fosfat tamponu (pH 7.4)	10 mM

Nihai hacim: 400 µl (pH= 7.3)

Tablo 2.2. ESR-Spin Tuzağı çalışmalarında kullanılan optimum beyin mikrozomal sistem bileşimi.

Bileşen	Nihai konsantrasyon
Serebral mikrozomal süspansiyon	1 mg protein/ml
CPR	120-780 mg/l (0.3-2 mM)
4-POBN	50 mM
NADPH	2.5 mM
Fosfat tamponu (pH 7.4)	10 mM

Nihai hacim: 300 µl (pH= 7.3).

ESR spektrumu oda sıcaklığında 100 KHz modülasyon frekansında bir ESR spektrometresi (Bruker ESP 380) kullanılarak kaydedilmiştir. Aletin diğer enstrümental ayarlarına ilişkin bilgiler Tablo 2.3.'de görülmektedir:

Tablo 2.3. Karaciğer ve beyin mikrozomları ile yapılan ölçümlerde ESR spektrometresine ilişkin aletsel ayarlar

	Hepatik Mikrozomlar	Serebral Mikrozomlar
Mikrodalga gücü	43 mW	43 mW
Modülasyon amplitüdü	1.01 G	1.006 G
Mikrodalga sıklığı	9.56 GHz	9.56 GHz
Zaman sabiti	40.96 ms	40.96 ms
Receiver Gain	4×10^4	4×10^4

2.5.2.1. Mikrozomal Sistemde CPR ile İnkübasyon ve Radikal Ölçüm Yönteminin Uygulanması

1. Reaksiyonun yürütüleceği cam tüpe, sırasıyla fosfat tamponu, mikrozomal süspansiyon, CPR, spin tuzağı madde 4-POBN konur ve reaksiyon NADPH ilavesiyle başlatılır.
2. Karışım, 37°C'de, manyetik karıştırıcıyla sürekli karıştırılarak karaciğer mikrozomları için 30, 60 veya 180 dakika; beyin mikrozomları için 60, 180 veya 240 dk süreyle inkübe edilir (İnkübasyon süresince tüpler alüminyum folio ile kapatılarak ışıktan korunmuştur).
3. İnkübasyon sürelerinin sonunda örnekler hemen kalibre edilmiş kapiller 50 µl'lik tüplere alınır. Kapiller tüpler, özel kuvarz ESR tüpüne yerleştirilerek ESR kavitesine konur ve ölçümler oda sıcaklığında yapılır.
4. ESR spektrometresinde karaciğer mikrozomları için 15 dk, beyin mikrozomları için ise 20 dk süreyle tarama yapılır.

2.5.2.2. ESR Spektrometresinde Ölçüm ve Değerlendirme

EPR-spin tuzağı tekniği ile elde edilen sonuçların hesaplanması, 4-POBN/radikal adduct'ına ait '*nisbi sinyâl şiddeti*' ile '*aşırı ince yapı sabite*' değerleri (a_N ve a_H^B)'nin ölçülmesi yoluyla yapılmıştır.

2.5.2.3. CPR'in Karaciğer veya Beyin Mikrozomal Ortamlarında Radikal İndükleyici Etkilerinin Enzim İnhibitörleri, Metal Şelatörleri, Demir ve Antioksidanlarla Değiştirilmesi

Mikrozomal sistemlerde CPR ile indüklenen radikal oluşumuna sitokrom P 450 inhibitörleri, metal şelatörleri ve demir ile antioksidanların etkileri, Tablo 2.1. ve 2.2.'de verilen optimum sistem bileşenleri ve 1 mM'lık CPR konsantrasyonu kullanılarak incelenmiştir (Bu bileşimde yapılan mikrozomal inkübasyonlar tezin bundan sonraki bölümlerinde 'Standart Sistem' olarak anılacaktır).

2.5.2.3.1. SKF 525A

Karaciğer veya beyin mikrozomları, nihai konsantrasyonu 1.5 mM olacak şekilde SKF 525A ile 20 dakika süreyle ön inkübasyona bırakıldıktan sonra, reaksiyon ortamına, sırasıyla, CPR, 4-POBN ve NADPH eklenerek hazırlanan Standart Sistemle inkübasyona devam edilmiştir. Karaciğer mikrozomları için 30. ve 60., beyin mikrozomları için ise 60. ve 180. dk'ları takiben alınan örnekler kullanılarak ESR analizleri yapılmıştır.

2.5.2.3.2. ZnCl₂

Karaciğer veya beyin mikrozomları, nihai konsantrasyonu 0.1 mM olacak şekilde ZnCl₂ ile 1 saat süreyle ön inkübasyona bırakıldıktan sonra reaksiyon ortamına CPR ve 4-POBN eklenmiş, NADPH eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Karaciğer mikrozomları için inkübasyonun 30. ve 60. dk'larında; beyin mikrozomları

için inkübasyonun 60. ve 180. dk'larında alınan örneklerde ESR analizleri yapılmıştır.

2.5.2.3.3. E Vitamini

Hepatik mikrozomlar, nihai konsantrasyonu 100 μ M olacak şekilde E vitamini ile 1 veya 4 saat süreyle ön inkübasyona maruz bırakıldıktan sonra reaksiyon ortamına CPR, 4-POBN ve NADPH eklenerek reaksiyon başlatılmış, inkübasyonun 60. ve 180. dk'larında alınan örneklerde ESR ölçümleri yapılmıştır.

2.5.2.3.4. Troloks

Karaciğer mikrozomlarında Troloks etkisi iki farklı uygulamayla araştırılmıştır:

1. Karaciğer mikrozomları, 0.1 mM Troloks ile 1 saat süreyle ön inkübasyona maruz bırakıldıktan sonra mikrozomal ortama CPR, 4-POBN ve NADPH eklenerek reaksiyon başlatılmış, inkübasyonun 30. ve 60. dk'larında alınan örneklerde ESR analizleri yapılmıştır.
2. Troloks, ön inkübasyon yapılmaksızın, mikrozomal karışıma NADPH'den önce ilave edilmiş, NADPH ile reaksiyonun başlatılmasını takiben 30. ve 60. dk'larda alınan örneklerde ESR analizleri yapılmıştır.

2.5.2.3.5. SOD

SOD, nihai konsantrasyonu 500 Ü/ml olacak şekilde, ön inkübasyon yapılmaksızın mikrozomal karışıma ilave edilmiş, NADPH ile reaksiyonun başlatılmasını takiben karaciğer mikrozomal sisteminden 30. ve 60. dk'larda, beyin mikrozomal sisteminden 60. dk'da alınan örneklerde ESR analizleri yapılmıştır.

2.5.2.3.6. FeSO₄

Karaciğer mikrozomal süspansiyonuna, CPR, 4-POBN, ve nihai konsantrasyonu olacak şekilde 0.1 mM FeSO₄ eklenmesini takiben, reaksiyon NADPH ile başlatılmış; 30 ve 60 dk'lık inkübasyonu takiben alınan örnekler kullanılarak ESR spektrometresinde analiz yapılmıştır.

2.5.2.3.7. DFO

Karaciğer veya beyin mikrozomal süspansiyonuna, CPR ve 4-POBN'ni takiben, nihai konsantrasyonu 0.5 mM olacak şekilde desferrioksamin çözeltisi eklenir. Reaksiyon NADPH ilavesiyle başlatılır. Karaciğer mikrozomal sisteminde 30. ve 60. dk'lık, beyin mikrozomal sisteminde ise 60 ve 180 dk'lık inkübasyonu takiben alınan örneklerde ESR analizi yapılmıştır.

2.5.2.3.8. DTPA

Karaciğer mikrozomal süspansiyonuna, CPR ve 4-POBN'ni takiben, nihai konsantrasyonu 1.5 mM olacak şekilde DTPA çözeltisi eklenir. Reaksiyon NADPH ilavesiyle başlatılır. 30 ve 60 dk'lık inkübasyonu takiben alınan örnekler kullanılarak ESR analizi yapılır.

2.5.2.3.9. Fe⁺⁺/DTPA

Karaciğer mikrozomal süspansiyonuna, CPR ve 4-POBN'ni takiben nihai konsantrasyonu 0.1 mM olacak şekilde DTPA ile şelate edilmiş demir çözeltisi (Fe⁺⁺/DTPA) eklenir. Reaksiyon NADPH ile başlatılır. 30 ve 60 dk'lık inkübasyonu takiben alınan örnekler kullanılarak ESR spektrometresinde analiz yapılır.

2.5.2.4. Fenton Reaksiyonu ve CPR'in Etkisi

Kimyasal ortamda 4-POBN-OH[•] radikal adduct oluşumunu sağlamak ve CPR'in bu sistemdeki olası etkisini incelemek amacıyla Fenton reaksiyonu yapılmıştır:

1. 10^{-5} M FeSO₄, 8.8×10^{-3} M H₂O₂, 50 mM 4-POBN ve 10 mM fosfat tamponundan (pH 7.4) oluşan karışım hazırlanır.
2. Reaksiyon, deney ortamına 50 µl H₂O₂ eklenmesi ile başlatılır. Tüp karıştırılır ve örnekler hemen kapiller tüplere alınarak ESR spektrometresinde analiz yapılır.

Bu sisteme CPR eklenmesi ile meydana gelecek olası değişiklikleri incelemek için deney ortamına nihai konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde CPR eklenir ve işlem yukarıda anlatıldığı şekilde tamamlanarak ESR analizi yapılır.

Tablo 2.3.'de anlatılan ESR spektrometresine ilişkin aletsel ayarlar Fenton reaksiyonu için Tablo 2.4.'de açıklandığı şekilde değiştirilmiştir.

Tablo 2.4. Fenton reaksiyonu ölçümlerinde ESR spektrometresine ilişkin aletsel ayarlar.

Fenton Reaksiyonu	
Mikrodalga gücü	17.7 mW
Modülasyon amplitüdü	1.005 G
Mikrodalga sıklığı	9.57 GHz
Zaman sabiti	40.96 ms
Receiver Gain	2×10^4

2.5.2.5. CPR'in Mikrozomal Ortamda İndüklediği Radikalin DMPO Spin Tuzağı Kullanarak ESR ile Belirlenmesi

2.5.2.1.'de 4-POBN spin tuzağı kullanılarak yapılan işlemler, Tablo 2.5'de verilen reaksiyon bileşenleri ile spin tuzağı olarak DMPO kullanılmak suretiyle karaciğer mikrozomlarıyla yapılmıştır.

Tablo 2.5. ESR-Spin Tuzağı çalışmalarında karaciğer mikrozom sistemi için DMPO ile kullanılan sistemin bileşenleri

Bileşen	Nihai konsantrasyon
Hepatik mikrozomal süspansiyon	2, 4, 6, 8 mg protein/ml
CPR	(195, 390, 774 mg/l) veya (0.5, 1, 2 mM)
DMPO	80 ve 100 mM
NADPH	1, 2, 4 mM
Fosfat tamponu (pH 7.4)	10 mM
Nihai hacim: 400 µl	

2.5.2.6. Mikrozomal Sistemlerde Lipid Peroksidasyonu Ölçümü

CPR ile inkübe edilen karaciğer ve beyin mikrozomlarında meydana gelen lipid peroksidasyonunun ölçümü için, 2.5.2. ve 2.5.2.1.'de anlatılan mikrozomal sistemler (4-POBN kullanılmaksızın) hazırlanmış ve inkübasyonlar yapılmıştır.

Kullanılan CPR konsantrasyonu 0.5 ve 1 mM olup, 60 ve 180 dakikalık inkübasyon yapılmıştır. Takiben 1/8 oranında fosfat tamponu (10 mM, pH 7.4) ile seyreltilen mikrozomal karışımın 100 µl'si kullanılarak, 2.4.1.2.1.'de anlatılan TBARS ölçüm yöntemiyle, lipid peroksidasyonu ölçülmüştür.

2.5.2.7. Mikrozomal Tiyol Gruplarının Tayini

CPR'e maruz bırakılan karaciğer ve beyin mikrozomlarda total tiyol düzeylerinin tayini, Ellman'ın (254) yöntemiyle yapılmıştır. Yöntem, DTNB'nin tiyol

grupları tarafından indirgenmesi ile meydana gelen sarı renkli kromojenik türevin 412 nm'de verdiği absorbansın ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

1. Karaciğer ve beyin mikrozomları CPR ile, Bölüm 2.5.2.6.'da mikrozomal lipid peroksidasyonu ölçümü için anlatıldığı şekilde inkübe edilirler.
2. İnkübasyon sürelerinin sonunda 1/8 oranında fosfat tamponu (10 mM, pH 7.4) ile seyreltilen örneklerden 250 µl alınır. Üzerine 350 µl fosfat tamponu, ve 100 µl DTNB (DTNB'nin fosfat tamponundaki 10 mM'lık çözeltisi) çözeltisi eklenir, karıştırılır ve oda sıcaklığında ışıktan korunarak 10 dakika inkübe edilir.
3. Kör deney için fosfat tamponu kullanılır.
4. Karışımın absorbansı 412 nm'de köre karşı otomatik Hitachi 904 apereyinde okunur.
5. Standart çözelti olarak N-asetil sistein çözeltileri (N-asetil sisteinin distile sudaki 0.125 mM'lık çözeltisinden hareketle hazırlanan standart çözeltilerdir) kullanılır ve örneklerin total tiyol grubu düzeyleri alette otomatik olarak hesaplanır.

Nihai sonuçlar protein değerleri üzerinden hesaplanarak $\mu\text{mol/g protein}$ olarak ifade edilir.

2.5.2.8. Hepatik Mikrozomlarda Oluşan 4-POBN/radikal Adduct'ının On-Line HPLC-ESI MS Sistemiyle Analizi

Bölüm 2.5.2. ve 2.5.2.1.'de tanımlanan koşullarda ESR-Spin Tuzağı analizleri için hazırlanan hepatik mikrozomal karışımlardan alınan örnekler, ESR tekniği ile gözlenen radikalın tanımlanabilmesi için bir HPLC-ESI MS sisteminde analiz edilmiştir.

1. Bu analizler için 1 mM CPR konsantrasyonu ve 60 dk inkübasyon süresi ile elde edilen örnekler kullanılır.
2. İnkübasyon işlemi tamamlandığında mikrozomal karışım $100\ 000 \times g$ 'de 30 dk santrifüje edilir.

3. Süpernatant kalibre edilmiş 50 µl'lik kapiller tüplere alınır ve ESR spektrometresinde sinyal oluşumu izlenir.
4. Süpernatant aşağıdaki koşullarda HPLC-ESI MS aпарeyine enjekte edilerek analize edilir.

2.5.2.8.1. HPLC-ESI MS'e İlişkin Çalışma Koşulları

HPLC-ESI MS analizleri için örnekler aşağıda belirtilen koşullarda analize edilmiştir.

HPLC'ye ilişkin çalışma koşulları:

HPLC: Waters, LC G16
 Kolon: Hypersil M5 C18-25F, 25 mm,
 Hareketli faz: Asetonitril:su (1:1),
 Akış hızı: 600 µl/dk,
 Dedektör: UV dedektör, 260 nm.

Kütle spektrometresine ilişkin çalışma koşulları:

Kütle spektrometresi: Mikromass, VG Qattro II, elektrosprey iyonizasyon
 kütle spektrometresi (ESI MS),
 Kütle spektrumu negatif iyon modunda alınmıştır,
 Kaynak sıcaklığı: 90°C,
 Uygulanan elektron enerjisi: 70 eV
 HPLC-ESI MS analizi için HPLC kolonu doğrudan kütle spektrometresine
 bağlanmıştır (On-line HPLC-ESI MS),
 HPLC'den ESI-MS'e akış hızı: 140 µl/dk,
 Bilgisayar ve integrasyon sistemi: MASS-LYNX version 3.2.

2.6. Protein Tayinleri

Antioksidan enzim aktivitesi tayinlerinde kullanılan lizat süpernatantlarındaki çözünür proteinler Lowry ve ark. (336)'nın tanımladığı yöntemin modifiye şekli ile; mikrozomal proteinler ve lizat proteinleri ise Shopsis ve Mackay (335) tarafından tanımlanan benzer bir yöntemle tayin edilmiştir.

Her iki yöntemin esasını, NaOH ile çözünür hale getirilen tirozin ve triptofan artıklarının, alkali bakır ve fenol reaktifi ile verdikleri mavi renkli kompleksin renk şiddetinin spektrofometrik yöntemle ölçülmesi teşkil eder.

2.6.1. Modifiye Lowry Yöntemi ile Protein (Çözünmüş Protein) Tayini

1. Bölüm 2.4.1.2.3.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan hücre lizat süpernatanından 100 µl alınır, üzerine 500 µl Bakır Reaktifi (I) konur ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.
2. Karışım üzerine 50 µl 1 N folin-fenol çözeltisi eklenir, karıştırılır, karanlık ortamda 30 dk bekletilir.
3. Meydana gelen mavi renkli kompleksin absorbansı 623 nm'de distile suyla hazırlanan köre karşı okunur.
4. Sonuçlar her deney günü sığır serum albumin standart çözeltileri kullanılarak hazırlanan standart eğri yardımıyla hesaplanır.

2.6.2. Total Protein Tayini Yöntemi

1. Bölüm 2.4.1.2.'de hazırlanışı anlatılan hücre lizatları veya 2.5.2.'de kullanılan mikrozomal süspansiyonlar 1 N NaOH ile 1:1 oranda seyreltilip 2 saat süreyle oda sıcaklığında bekletilir.
2. Karışımın 150 µl'sine Bakır Reaktifi (II) eklenir, karıştırılır ve oda sıcaklığında 15 dk bekletilir.
3. 150 µl 1 N folin-fenol çözeltisi eklenir, karıştırılır ve karanlıkta 45 dk bekletilir.
4. Meydana gelen mavi renkli kompleksin absorbansı 630 nm'de köre (0.5 N NaOH ile hazırlanır) karşı okunur.
5. Sonuçlar her deney günü sığır serum albumini standart çözeltileri kullanılarak hazırlanan standart eğri yardımıyla hesaplanır.

2.7. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Mann-Whitney U-testi kullanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Hücre Kültürü Çalışmalarının Sonuçları

3.1.1. CPR'in Fibroblast Kültürlerindeki Etkileri

Farklı konsantrasyonlarda CPR ile 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe edilen fibroblast kültürlerinde NR testi ile belirlenen ve canlılık (canlı hücre) yüzdesi şeklinde ifade edilen hücre proliferasyonu sonuçları Şekil 3.1'de verilmiştir.

5-150 mg/l konsantrasyon aralığında uygulanan CPR'in 24 saatlik inkübasyon süresi içinde fibroblast kültür hücrelerinde sitotoksik bir etkisinin olmadığı gözlenmiş, hatta kontrol düzeyinin üzerinde hücre proliferasyonu olduğu saptanmıştır.

İnkübasyon süresi 48 saate uzatıldığında 50 ve 75 mg/l konsantrasyonlarda CPR'in canlı hücre yüzdesini önemli ölçüde ($p < 0.05$) düşürdüğü gözlenmiştir. Şekil 3.2'deki fotoğraflarda 75 mg/l CPR ile 48 saatlik inkübasyonu takiben gözlenen hücre sayısı azalması, kontrol kültürlerindeki normal hücre proliferasyonu ile kıyaslamalı olarak görülmektedir.

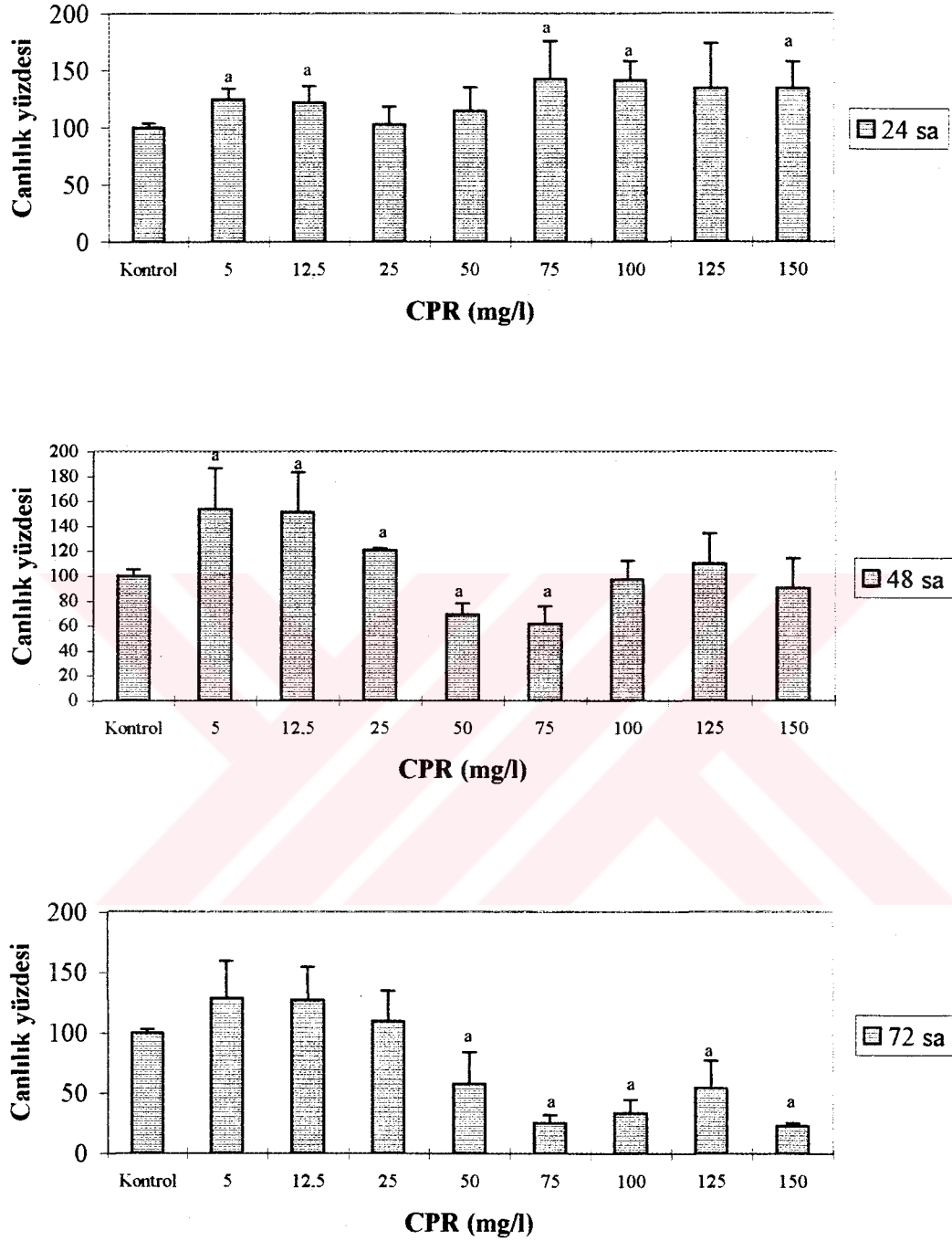
72 saat inkübe edilen kültürlerde ise ≥ 50 mg/l'lik konsantrasyonlarda önemli ölçüde ($p < 0.05$) sitotoksikite saptanmıştır.

CPR'in düşük konsantrasyonlarının (5 ve 12.5 mg/l) tüm inkübasyon periyotlarında hücre proliferasyonunu artırıcı etki gösterdiği gözlenmiştir.

3.1.1.1. Fibroblast Kültürlerinde E Vitamininin Etkisi

50 veya 100 μ M E vitamini ile 4 saat ön inkübasyona bırakılan fibroblast hücreleri, takiben 75 mg/l konsantrasyonda CPR ile 48 saat inkübe edildiklerinde, yalnız başına CPR'e temas eden hücrelere kıyasla önemli ölçüde yüksek oranda (50 ve 100 μ M E vitamini için sırasıyla $p < 0.001$ ve $p < 0.002$) büyüme göstermişlerdir (Şekil 3.3).

Yalnız başına 50 μ M E vitamini ile 48 veya 52 saat inkübe edilen fibroblastlarda hücre proliferasyonunda artış olmasına karşılık ($p < 0.01$), 100 μ M E

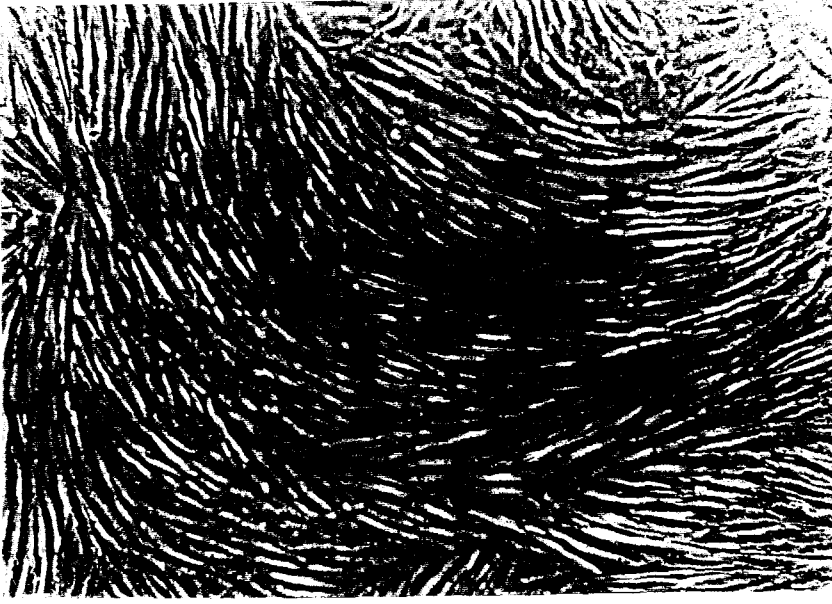


Şekil 3.1. CPR'le inkübe edilen (24-72 saat) fibroblast kültürlerinde gözlenen hücre büyümesi.

Canlılık yüzdesi NR deneyi ile belirlenmiş ve kontrolün yüzdesi olarak gösterilmiştir.

Sonuçlar herbiri üçlü çalışılmış, üç ayrı deneyin ortalama $\pm$ SD değeri olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı, $p < 0.05$.



Kontrol

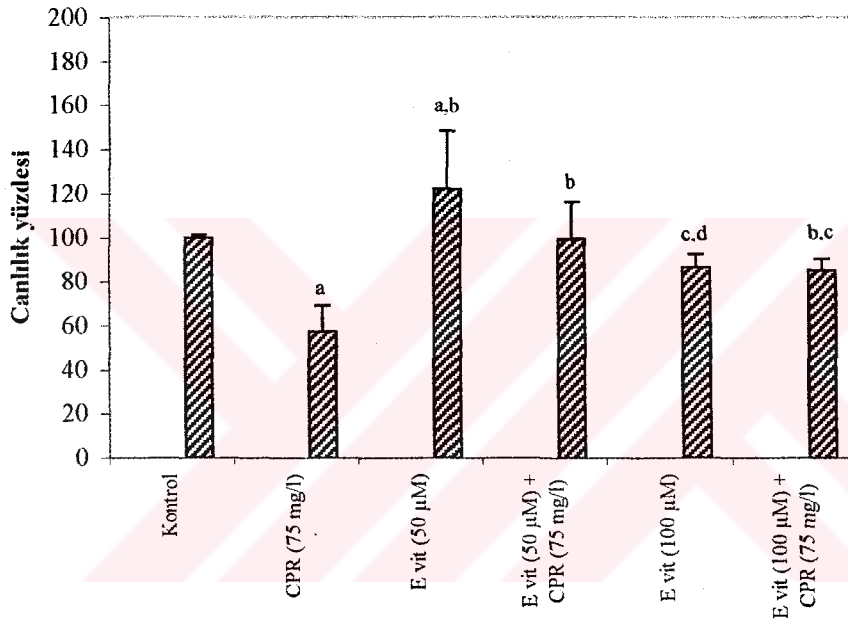


CPR

Şekil 3.2. Normal insan dermal fibroblast hücre kültürlerinde 75 mg/l CPR'e 48 saat süreyle maruziyeti takiben hücre sayısının azalması.

vitamini ile inkübasyonda kontrolden farklı bir proliferasyon gözlenmemiştir (Şekil 3.3).

Hücreler E vitamininin hazırlanışında kullanılan absölü etanol (nihai konsantrasyonu= % 0.01, h/h) ile inkübe edildiklerinde canlılık yüzdelerinde herhangi bir azalma meydana gelmemiştir.



Şekil 3.3. Fibroblast kültürlerinde CPR'in indüklediği sitotoksik etkiye karşı E vitamininin koruyucu etkisi.

Canlılık yüzdesi NR yöntemi ile saptanmış ve kontrolün yüzdesi olarak gösterilmiştir.

Sonuçlar herbiri üçlü çalışılmış, üç ayrı deneyin ortalama $\pm$ SD değeri olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı, $p < 0.01$.

^b CPR grubundan önemli ölçüde farklı, $p < 0.001$.

^c Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı, $p < 0.02$.

^d CPR grubundan önemli ölçüde farklı, $p < 0.002$.

3.1.1.2. CPR ve 'CPR + E Vitamini' ile İnkübe Edilen Fibroblastlarda Lipid Peroksidasyonu ve GSH Düzeyleri ile Antioksidan Enzim Aktiviteleri

75 mg/l CPR ile 48 saat süreyle inkübasyon, fibroblast hücrelerinde lipid peroksidasyonu düzeylerinin önemli ölçüde ($p < 0.05$) artmasına neden olmuştur (Tablo 3.1).

50 μ M E vitamini ile inkübasyon bazal TBARS düzeylerini önemli ölçüde düşürmüştür; 50 μ M E vitamini ile 4 saatlik ön inkübasyonu takiben 75 mg/l CPR ile 48 saatlik inkübasyon sonunda ölçülen TBARS düzeyleri E vitamininin önemli ($p < 0.05$) düzeyde koruyuculuk sağladığını göstermiştir (Tablo 3.1).

Aynı koşullarda CPR'in, hücre içi GSH düzeylerinde % 50'ye yakın bir azalmaya neden olduğu; yalnız başına uygulamada E vitamininin hücre GSH düzeyini önemli ($p < 0.05$) ölçüde arttırdığı saptanmıştır. Ancak 'CPR + E vitamini' uygulamalarında önemli bir koruyucu etki gözlenmemiştir (Tablo 3.1).

Yalnız başına E vitamini ile inkübe edilen fibroblast kültürlerinde GSHPx aktivitesinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca CPR ve 'CPR + E vitamini' uygulamasıyla ölçülen GSHPx aktiviteleri ile gözlenen değişiklikler de istatistiksel olarak önemli değildir (Tablo 3.2).

CPR uygulaması, istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte, katalaz aktivitesinde % 30 oranında bir azalmaya neden olmuştur. E vitamini ile ön inkübasyon ise önemli ölçüde koruyuculuk sağlamıştır (Tablo 3.2).

Fibroblast hücrelerinin total SOD aktivitesi CPR veya 'CPR ve E Vitamini' uygulamasıyla değişmemiştir. Yalnız başına CPR veya E vitamini Mn SOD veya CuZn SOD düzeylerini değiştirmemiştir. Ancak 'CPR ve E Vitamini' uygulaması ile, kontrol değerlerine kıyasla, Mn SOD aktivitesinde önemli bir artış ve CuZn SOD aktivitelerinde önemli bir azalma gözlenmiştir (Tablo 3.3).

Tablo 3.1. CPR ve E vitamininin normal insan fibroblast hücrelerinde TBARS ve total GSH düzeyleri üzerine etkileri. ^a

Deney Grubu	TBARS (nmol/ mg protein)	Total GSH (nmol/ mg protein)
Kontrol	0.51 ± 0.13	14.26 ± 3.42
CPR (75 mg/l)	1.07 ± 0.30 ^c	7.36 ± 4.71
E vitamini (50 µM)	0.20 ± 0.04 ^c	24.05 ± 4.19 ^c
CPR + E vitamini ^b	0.23 ± 0.07 ^{c, d}	9.29 ± 5.26

^a Sonuçlar ortalama ± SD (n= 3) olarak verilmiştir.

İstatistiksel değerlendirmeler Mann-Whitney U-testi kullanılarak yapılmıştır.

^b Hücreler 50 µM E vitamini ile ön inkübasyonu (4 saat) takiben 75 mg/l CPR ile 48 saat inkübe edilmişlerdir.

^c Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı, $p < 0.05$.

^d CPR grubundan önemli ölçüde farklı, $p < 0.05$.

Tablo 3.2. CPR ve E vitamininin normal insan fibroblast hücrelerinde GSHPx ve CAT enzim aktiviteleri üzerine etkileri.^a

Deney grubu	GSHPx (Ü/ mg protein)	CAT (Ü/ mg protein)
Kontrol	71.14 ± 42.27	10.09 ± 2.93
CPR (75 mg/l)	59.46 ± 60.24	6.45 ± 0.25
E vitamini (50 µM)	72.49 ± 59.55	13.80 ± 3.75
CPR + E vitamini ^b	86.51 ± 58.74	11.86 ± 4.45 ^c

^a Sonuçlar ortalama ± SD (n= 3) olarak verilmiştir.

İstatistiksel değerlendirmeler Mann-Whitney U-testi kullanılarak yapılmıştır.

^b Hücreler 50 µM E vitamini ile ön inkübasyonu (4 saat) takiben 75 mg/l CPR ile 48 saat inkübe edilmişlerdir.

^c CPR grubundan önemli ölçüde farklı, $p < 0.05$.

Tablo 3.3. CPR ve E vitamininin normal insan fibroblast hücrelerinde total SOD, CuZn SOD ve Mn SOD düzeyleri üzerine etkileri.^a

Deney grubu	Total SOD (Ü/ mg protein)	Mn SOD (Ü/ mg protein)	CuZn SOD (Ü/ mg protein)
Kontrol	8.52 ± 1.75	2.20 ± 0.50	6.32 ± 2.24
CPR (75 mg/l)	8.57 ± 2.71	1.88 ± 0.70	6.69 ± 2.05
E vitamini (50 µM)	9.61 ± 2.00	3.22 ± 1.55	6.39 ± 1.23
CPR+ E vitamini ^b	7.71 ± 0.40	3.85 ± 0.41 ^{c,d}	3.85 ± 0.69 ^{c,d}

^a Sonuçlar ortalama ± SD (n= 3) olarak verilmiştir.

İstatistiksel değerlendirmeler Mann-Whitney U-testi kullanılarak yapılmıştır.

^b Hücreler 50 µM E vitamini ile ön inkübasyonu (4 saat) takiben ardından 75 mg/l CPR ile 48 saat inkübe edilmişlerdir.

^c Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı, $p < 0.05$.

^d CPR grubundan önemli ölçüde farklı, $p < 0.05$.

3.1.2. CPR'in Primer Astrosit Kültürlerindeki Etkileri

Farklı konsantrasyonlarda CPR ile 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe edilen primer astrosit kültürlerinde NR testi ile belirlenen ve canlılık (canlı hücre) yüzdesi şeklinde ifade edilen hücre proliferasyonu sonuçları Şekil 3.4'de görülmektedir.

0.5 ile 300 mg/l konsantrasyon aralığında uygulanan CPR'in, astrosit hücreleriyle 7 saatlik inkübasyonu herhangi bir proliferatif veya sitotoksik etkiye neden olmamaktadır.

CPR'in 0.5-150 mg/l konsantrasyon aralığında 24, 48, 72 ve 96 saatlik inkübasyonları ile de bir etki gözlenmemiştir. Ancak 200 ve 300 mg/l'lik konsantrasyonlarda CPR'in 24, 48, 72 ve 96 saatlerde önemli ölçüde sitotoksik olduğu saptanmıştır. Diğer taraftan düşük konsantrasyonlarda CPR uygulanan astrosit hücrelerinde proliferasyonun arttığı gözlenmiştir.

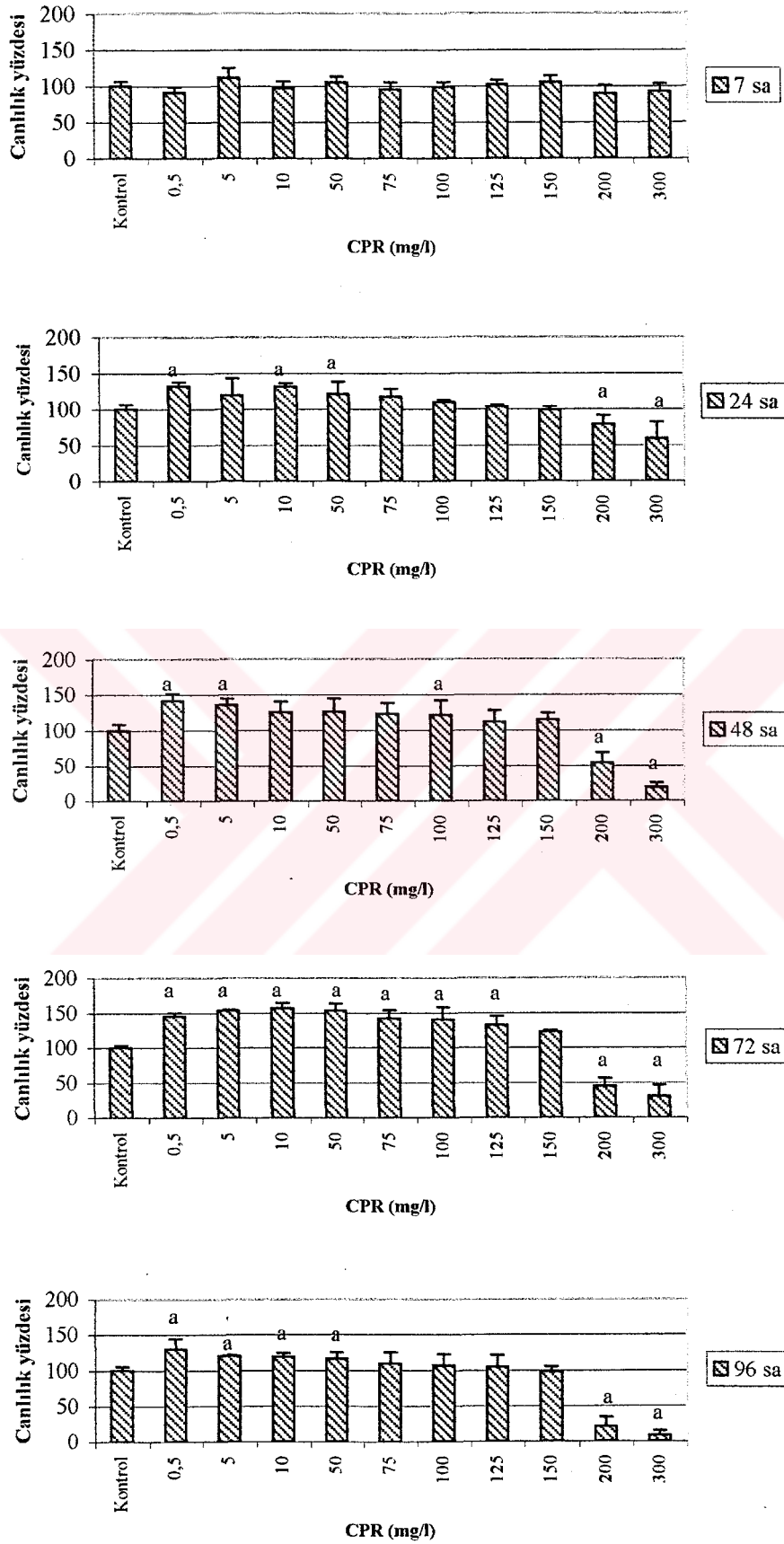
MTT testi ile, aktif metabolik aktivite gösteren canlı hücrelerin yüzdesinin ölçüldüğü deneylerin sonuçları Şekil 3.5.'de görülmektedir.

0.5-300 mg/l CPR ile 7 saat inkübe edilen astrosit hücrelerinde bir değişiklik gözlenmemiştir. 0.5 ve 5 mg/l konsantrasyonlarda CPR ile 24 saatlik inkübasyon düşük, fakat önemli düzeyde hücre proliferasyonuna neden olurken, > 50 mg/l konsantrasyonlarda önemli düzeyde sitotoksik etki varlığı saptanmıştır. 48, 72 ve 96 saatlik inkübasyonlarda da benzer sonuçlar tekrarlamıştır. CPR ile 96 saat inkübe edilen kültürlerde sitotoksik etkinin doza bağımlılığı belirgin olarak görülmektedir. Şekil 3.6'daki fotoğraflarda 300 mg/l CPR ile inkübe edilen astrosit kültürlerinde hücre sayısının inkübasyon süresine bağımlı olarak azalması görülmektedir.

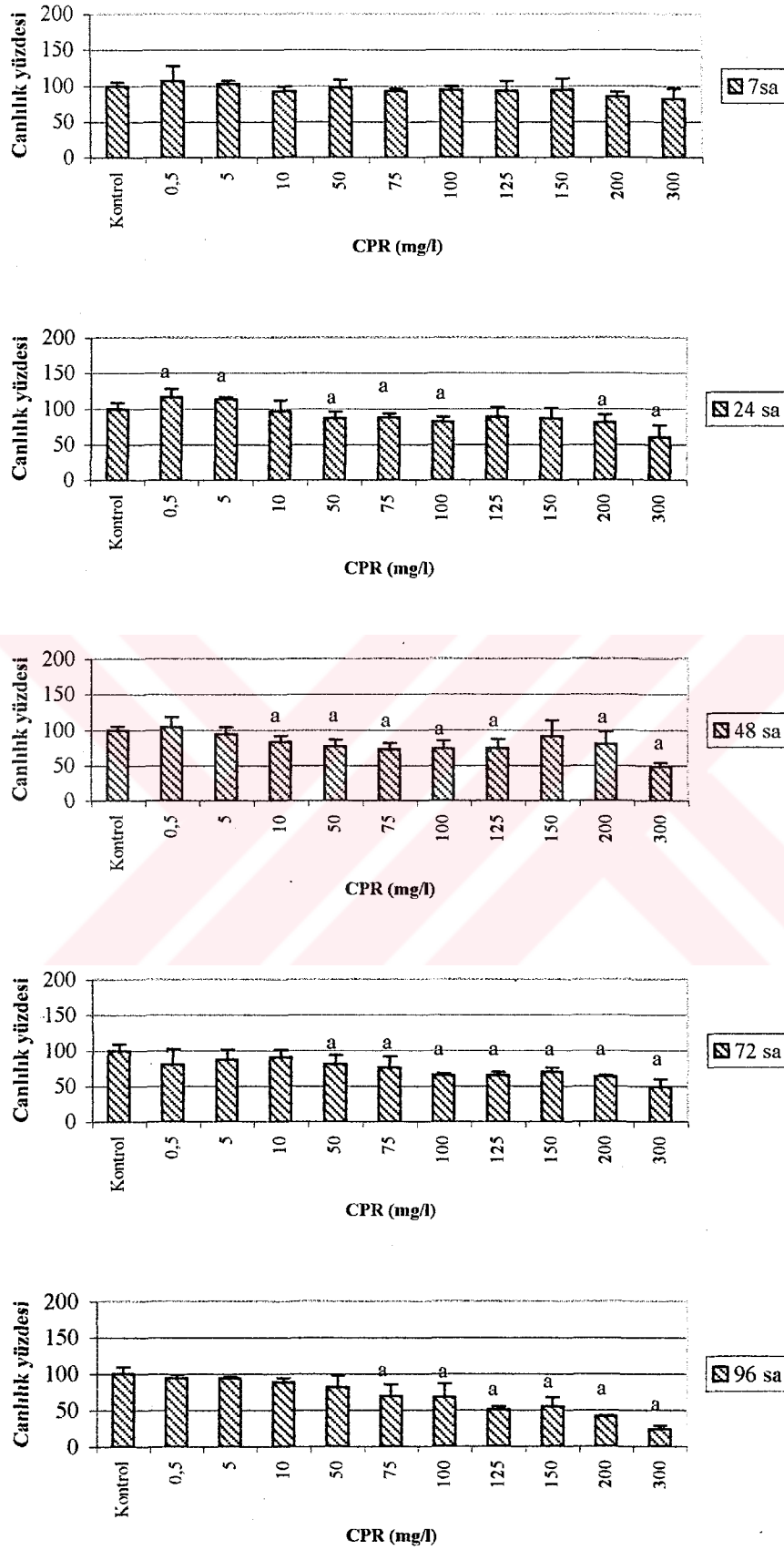
3.1.2.1. CPR'in Primer Astrosit Kültürlerindeki Sitotoksik Etkisinin Antioksidanlarla Değiştirilmesi

3.1.2.1.1. Primer Astrosit Kültürlerinde E Vitamininin Etkisi

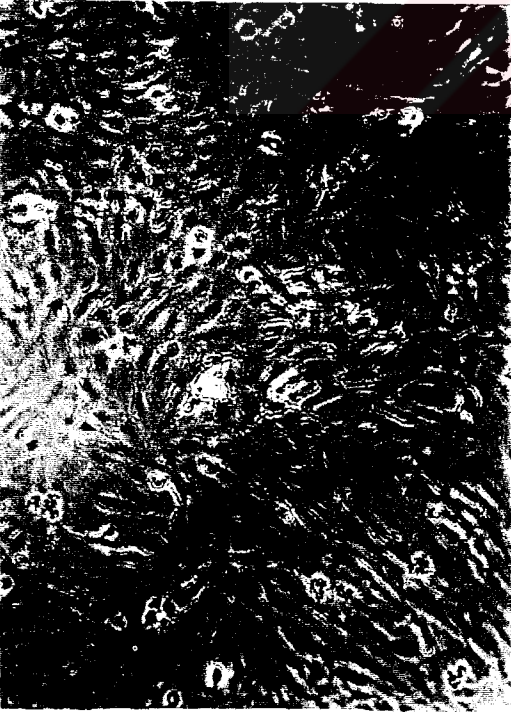
50 µM E vitamini ile 4 saat süreyle inkübe edilen astrosit kültürleri, takiben 96 saat süreyle 300 mg/l konsantrasyonda CPR'e maruz bırakıldıklarında, yalnız başına CPR'e temas eden hücrelere oranla NR testi ile saptanan canlılık yüzdelerinde



Şekil 3.4. CPR ile inkübe edilen (7-96 saat) primer astrosit kültürlerinde gözlenen hücre büyümesi
 Canlılık yüzdesi NR deneyi ile belirlenmiş ve kontrolün yüzdesi olarak gösterilmiştir
 Sonuçlar herbiri 4'lü veya sekizli çalışılmış, üç ayrı deneyin ortalama $\pm$ SD değeri olarak verilmiştir
^a Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı, $p < 0.05$



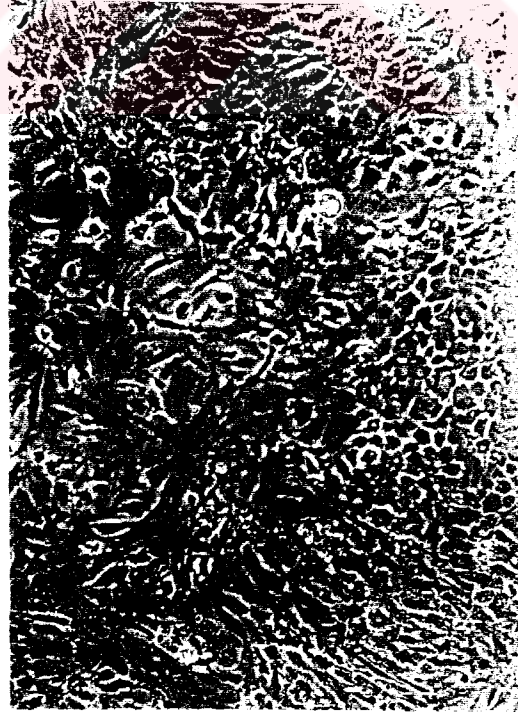
Şekil 3.5. CPR ile inkübe edilen (7-96 saat) primer astrosit kültürlerinde gözlenen hücre büyümesi
 Canlılık yüzdesi MTT deneyi ile belirlenmiş ve kontrolün yüzdesi olarak gösterilmiştir
 Sonuçlar herbiri 4'lü veya sekizli çalışılmış, üç ayrı deneyin ortalama $\pm$ SD değeri olarak verilmiştir
^a Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı, $p < 0.05$



Kontrol 24 saat



CPR 24 saat



Kontrol 48 saat

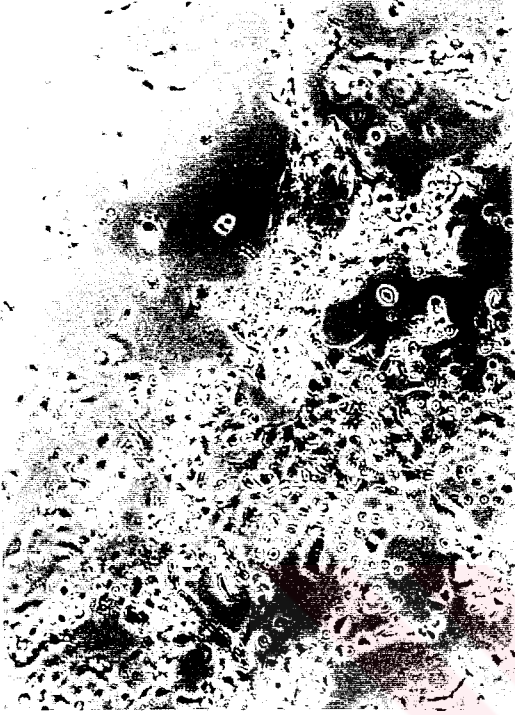


CPR 48 saat

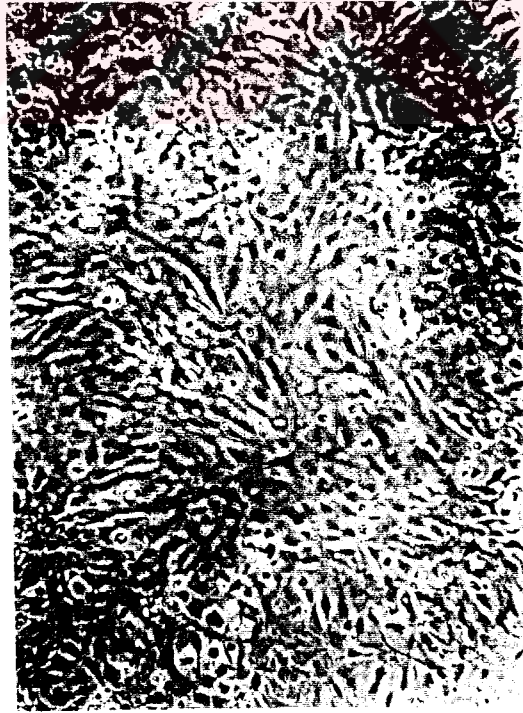
Şekil 3.6. Primer astrosit kültürlerinde 300 mg/l CPR ile 24-96 saat inkübasyonu takiben gözlenen hücre sayısı azalması



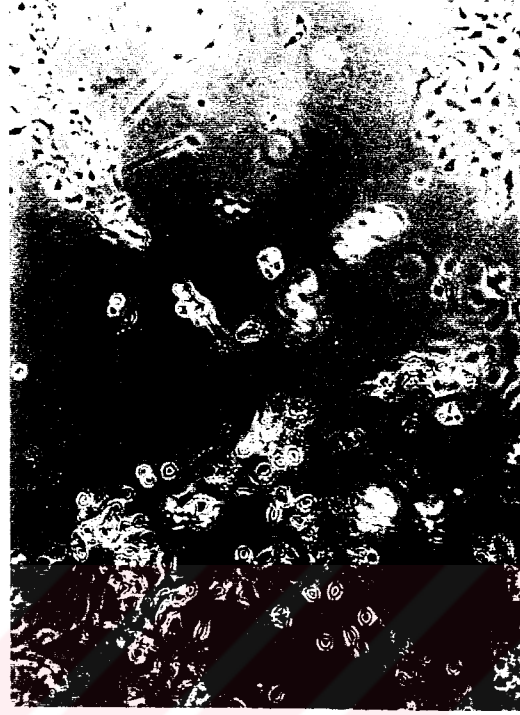
Kontrol 72 saat



CPR 72 saat



Kontrol 96 saat



CPR 96 saat

Şekil 3.6. (Devam) Primer astrosit kültürlerinde 300 mg/l CPR ile 24-46 saat inkübasyonu takiben gözlenen hücre sayısı azalması.

yaklaşık dört katı oranda bir artış gözlenmiştir (Şekil 3.7). E vitamininin aynı koşullarda MTT testi ile yapılan ölçümlerde de, CPR'in yaptığı sitotoksik etkiyi azalttığı ancak farkın önemli olmadığı saptanmıştır (Şekil 3.8).

3.1.2.1.2. Primer Astrosit Kültürlerinde SOD'ın Etkisi

Hücrelerin 1 saat süreyle 500 Ü/ml SOD ile ön inkübasyonunu takiben 300 mg/l konsantrasyonda CPR ile 96 saat süreyle inkübe edilmesi, NR testiyle ölçülen canlılık yüzdesini, yalnız başına CPR'e temas eden hücrelere oranla, önemli ölçüde arttırmıştır (Şekil 3.7). Ancak aynı koşullarda MTT testi ile yapılan ölçümlerde SOD uygulamasının koruyucu etkisi gözlenmemiştir (Şekil 3.8).

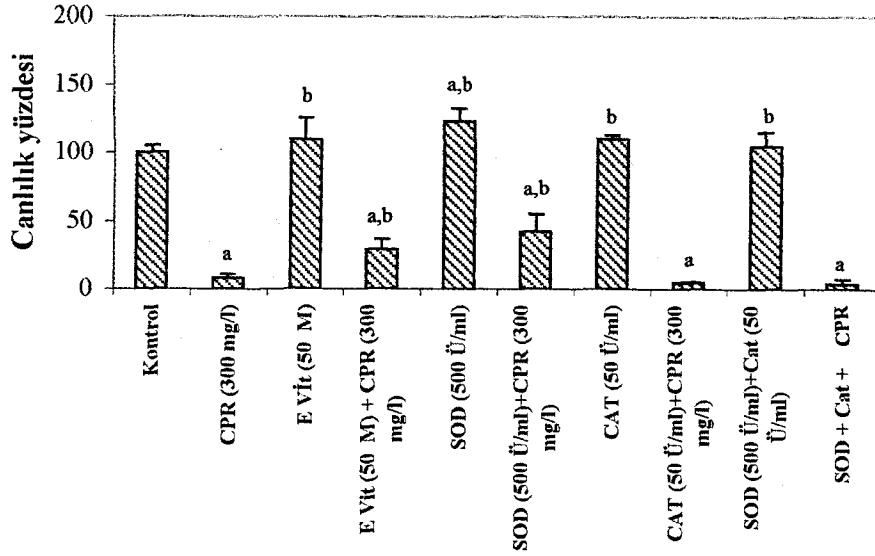
3.1.2.1.3. Primer Astrosit Kültürlerinde CAT'ın Etkisi

50 Ü/ml CAT ile 1 saat süreyle inkübe edilen astrosit kültürleri takiben 96 saat süreyle 300 mg/l konsantrasyonda CPR'e maruz bırakıldıklarında NR ya da MTT ile ölçülen canlılık testlerinde herhangi bir koruyucu etki gözlenmemiştir (Şekil 3.7).

Aynı şekilde kültürlerin 500 Ü/ml SOD + 50 Ü/ml CAT ile inkübasyonunu takiben yapılan NR ve MTT testlerinde de koruyucu bir etki olmadığı saptanmıştır (Şekil 3.7).

3.1.2.2. CPR'e Maruz Bırakılan Primer Astrosit Hücrelerinde Lipid Peroksidasyonu, GSH Düzeyleri ve CAT Aktivitesi

96 saat 300 mg/l CPR ile inkübe edilen astrosit kültürlerinde TBARS düzeylerinde 2 kezlik bir artış saptanmıştır. Total GSH düzeylerinin ve CAT aktivitelerinin kontrol düzeylerinden farklı olmadığı gözlenmiştir (Tablo 3.4).

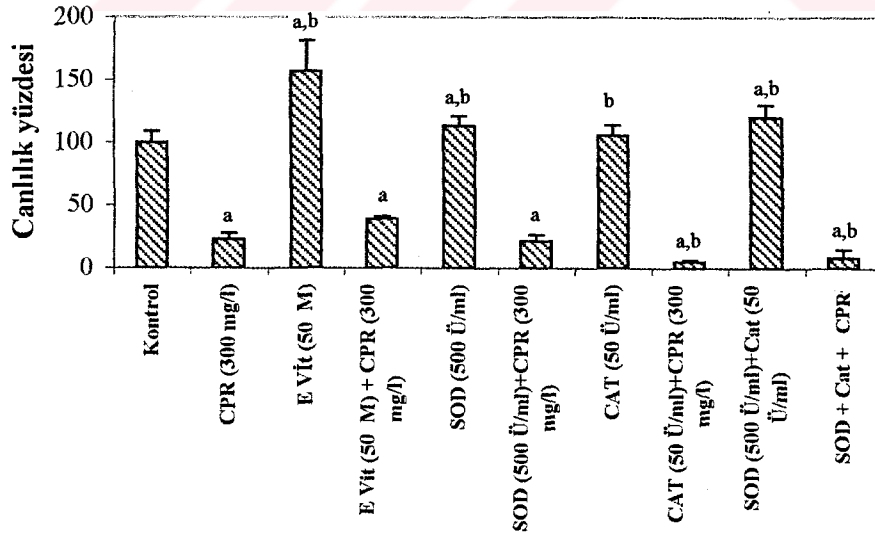


Şekil 3.7. Primer astrosit kültürlerinde CPR'in indüklediği sitotoksik etkiye karşı E vitamini, SOD, CAT veya 'SOD + CAT'ın etkisi

Canlılık yüzdesi NR deneyi ile belirlenmiş ve kontrolün yüzdesi olarak gösterilmiştir. Sonuçlar herbiri 4'lü veya sekizli çalışılmış, üç ayrı deneyin ortalama $\pm$ SD değeri olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı, $p < 0.05$

^b CPR grubundan önemli ölçüde farklı, $p < 0.05$



Şekil 3.8. Primer astrosit kültürlerinde CPR'in indüklediği sitotoksik etkiye karşı E vitamini, SOD, CAT veya 'SOD + CAT'ın etkisi

Canlılık yüzdesi MTT deneyi ile belirlenmiş ve kontrolün yüzdesi olarak gösterilmiştir. Sonuçlar herbiri 4'lü veya sekizli çalışılmış, üç ayrı deneyin ortalama $\pm$ SD değeri olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı, $p < 0.05$

^b CPR grubundan önemli ölçüde farklı, $p < 0.05$

Tablo 3.4.CPR'in primer astrosit kültürlerinde TBARS, total GSH düzeyleri ile CAT enzim aktivitesi üzerine etkileri.^a

Deney grubu	TBARS (nmol/ mg protein)	Total GSH (nmol/ mg protein)	CAT (Ü/ mg protein)
Kontrol	0.53 ± 0.05	14.30 ± 6.43	11.68 ± 0.09
CPR (300 mg/l)	1.13 ± 0.18 ^b	16.93 ± 5.18	10.50 ± 2.82

^a Sonuçlar ortalama ± SD değeri (n = 5-6) olarak verilmiştir.

İstatistiksel değerlendirmeler Mann-Whitney U-testi kullanılarak yapılmıştır.

^b Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı, $p < 0.001$.

3.1.3. Hücre Kültürlerinde ESR Ölçümleri

Fibroblast ve astrosit kültürlerinde ESR-Spin Tuzağı tekniği ile 4-POBN kullanılarak yapılan analizlerde herhangi bir ESR sinyali gözlenmemiştir.

3.2. Mikrozomal Çalışmaların Sonuçları

3.2.1. CPR ile İnkübe Edilen Mikrozomlarda Radikal Oluşumu

Şekil 3.9.'da 1 mM CPR ile 60 dk süreyle inkübe edilen beyin ve karaciğer mikrozomlarında gözlenen 4-POBN/radikal adduct'larının ESR spektrumları verilmiştir.

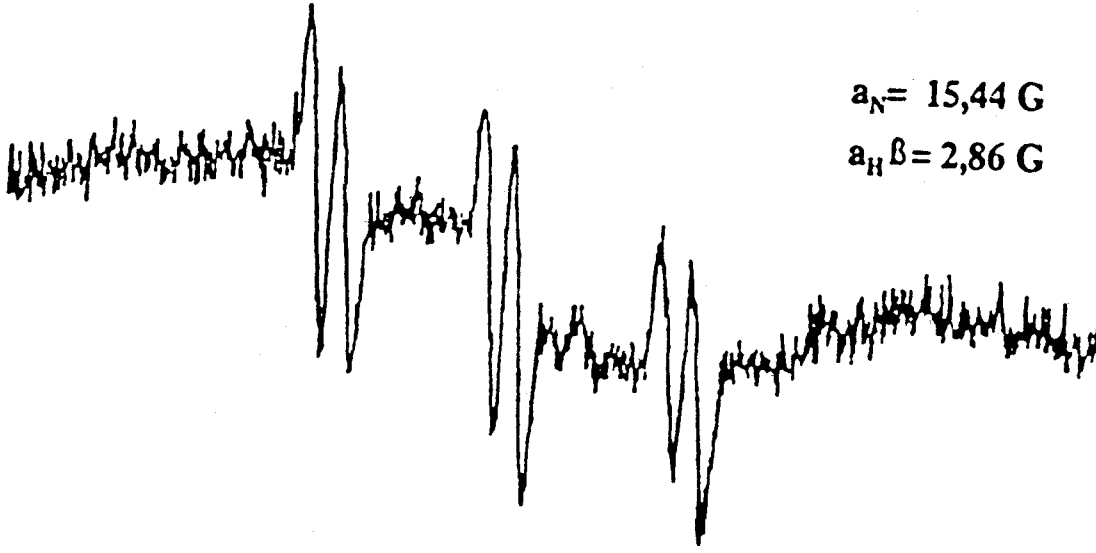
Heriki mikrozomal sistemde saptanan radikal-adduct'larının aynı ESR spektrumuna ve aynı aşırı ince yapı sabitelerine ($a_N = 15.44$ G, $a_H^B = 2.86$ G) sahip oldukları görülmektedir. Dolayısıyla CPR'in beyin ve karaciğer mikrozomlarıyla aynı tip radikalleri oluşturduğu gözlenmiştir. Ancak beyin mikrozomlarında ölçülen sinyal şiddeti, karaciğer mikrozomlarında ölçülenden yaklaşık 4 kez daha düşüktür.

Şekil 3.10'da karaciğer mikrozomlarında CPR ile indüklenen 4-POBN/radikal adduct oluşumunun mikrozomal inkübasyon bileşenlerine bağımlılığı görülmektedir. Radikal oluşumunun deney ortamında CPR, NADPH ve aktif mikrozom bulunmasına bağlı olduğu; standart sistem bileşenlerinden birinin eksikliğinde veya aktif mikrozomlar yerine ısıyla denatüre edilmiş mikrozomlar kullanılması halinde hiçbir ESR sinyali gözlenmediği görülmektedir.

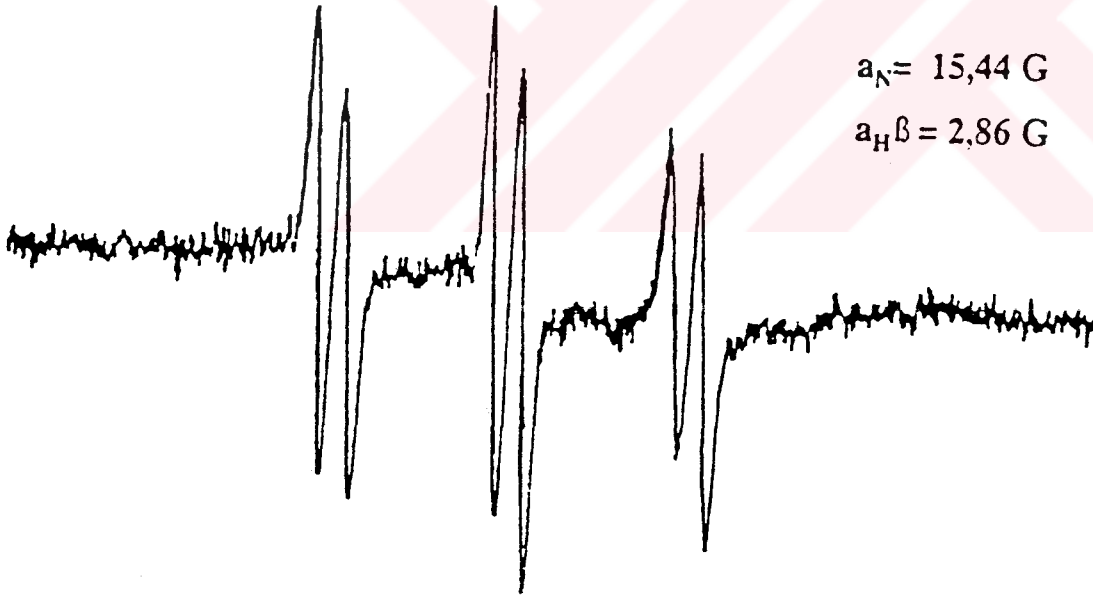
Şekil 3.11'de beyin mikrozomlarında yapılan benzer kontrol çalışmalarının sonuçları verilmiştir.

Meydana gelen ESR sinyalinin oldukça stabil olduğu, 5 saatten sonra azalmaya başladığı ancak 24 saat sonra tamamen kaybolduğu saptanmıştır.

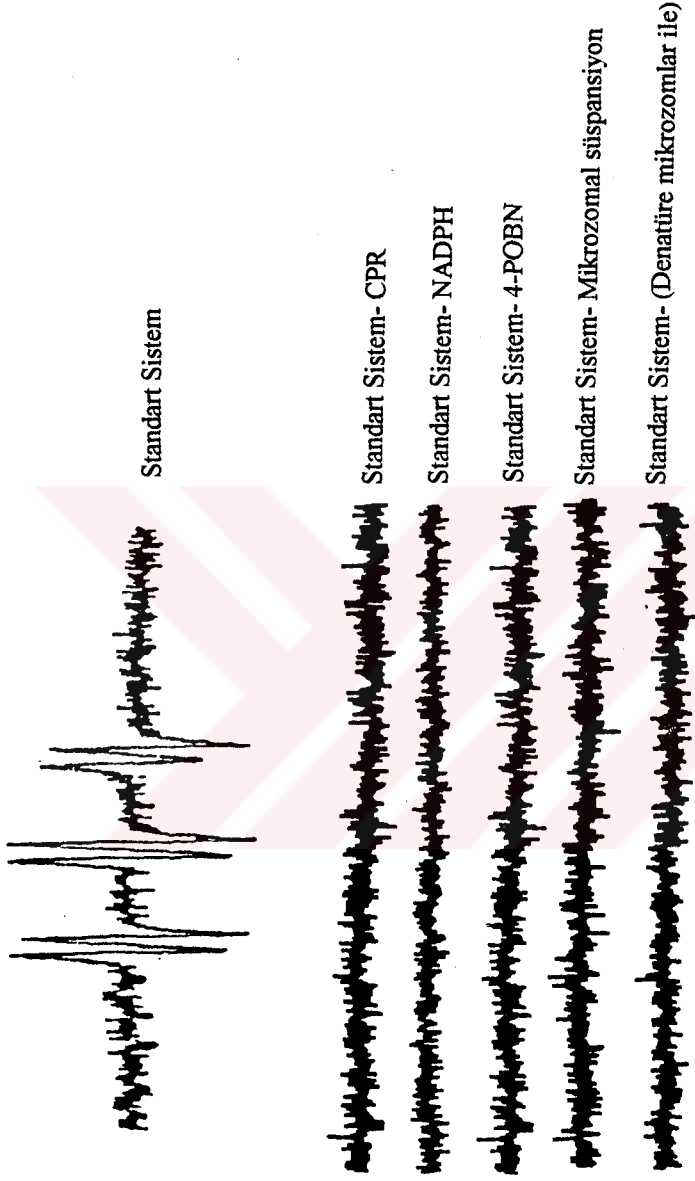
Beyin Mikrozoamları-1 mM CPR, 1 saat



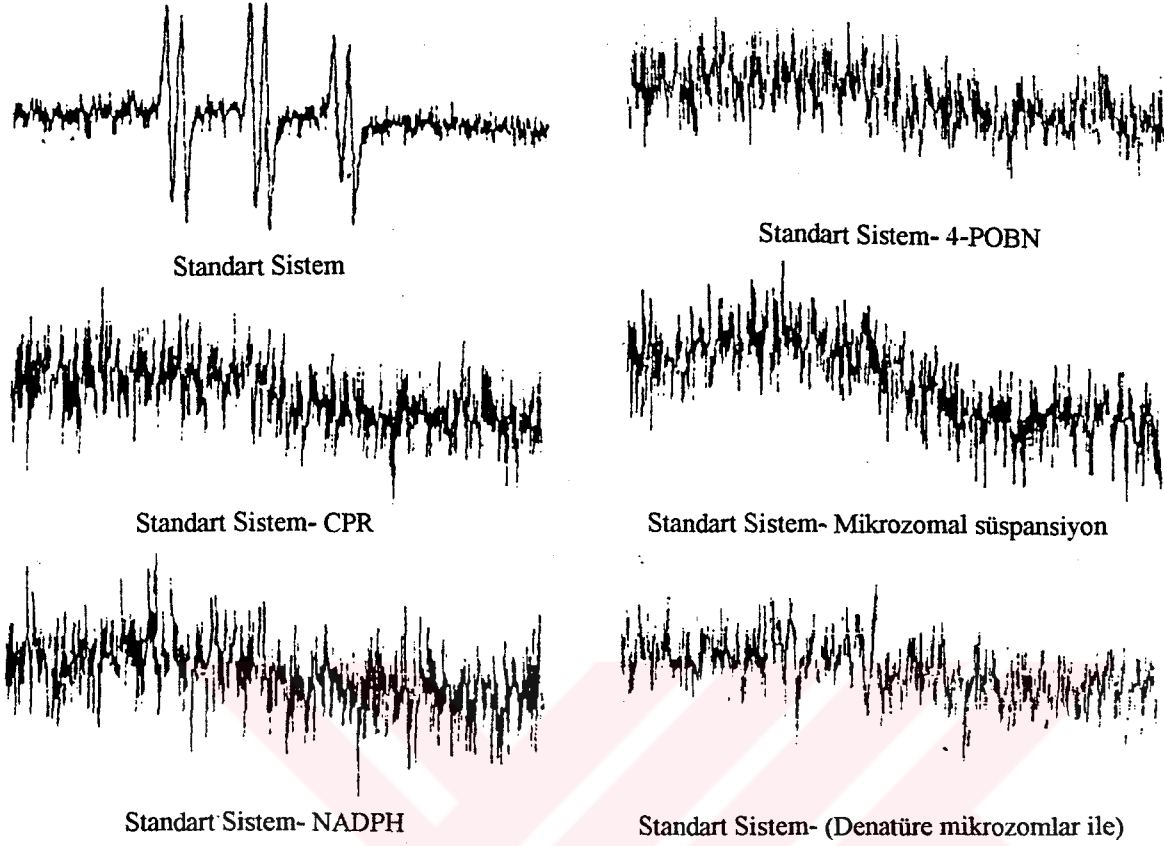
Karaciğer Mikrozoamları-1 mM CPR, 1 saat



Şekil 3.9. Beyin ve karaciğer mikrozoamlarında CPR ile indüklenen 4-POBN/radikal adduct'larının ESR spektrumları.



Şekil 3.10. Karaciğer mikrozomlarında CPR ile indüklenen 4-POBN/radikal adduct'larının oluşumunun optimum mikrozomal sistem bileşenlerine bağımlılığı.
Standart sistem: Mikrozomal süspansiyon + tampon + NADPH + POBN + CPR.

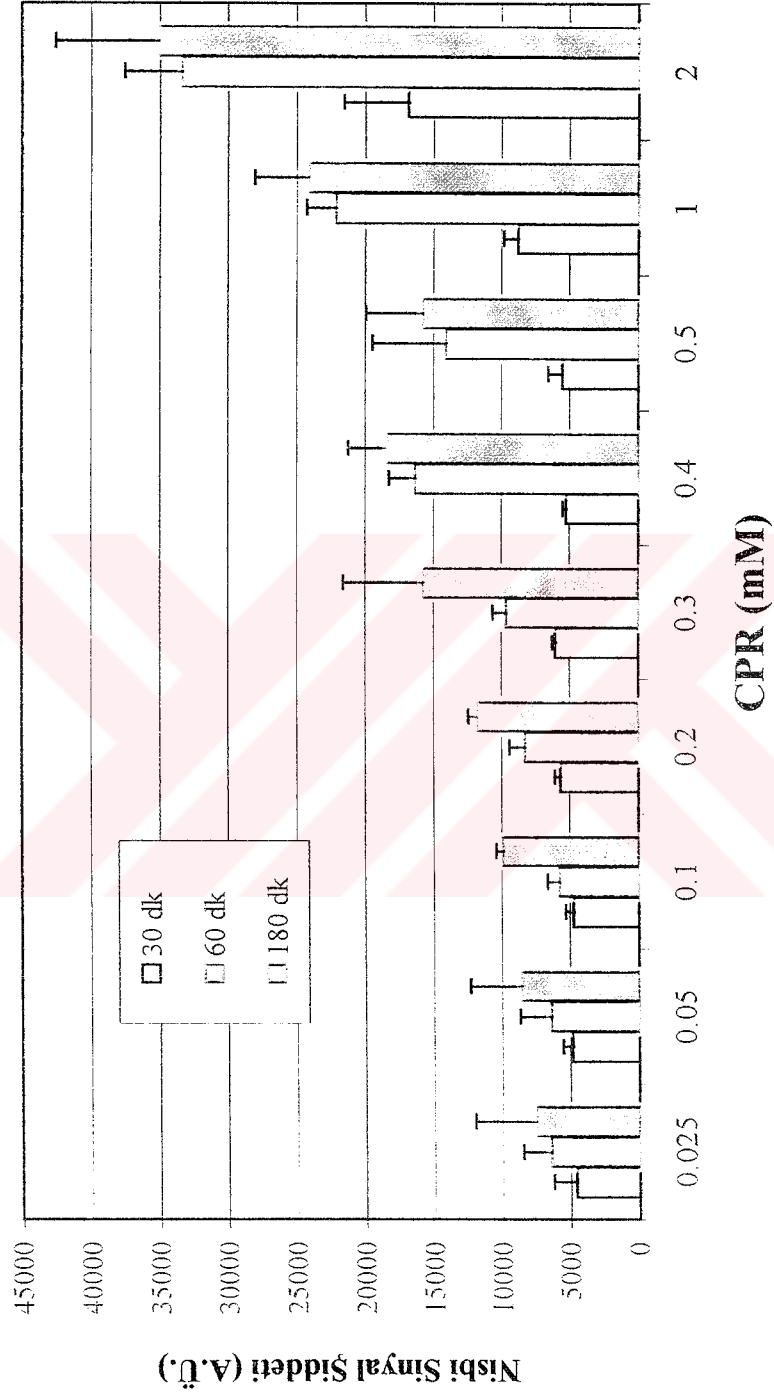


Şekil 3.11. Beyin mikrozomlarında CPR ile indüklenen 4-POBN/radikal adduct'larının oluşumunun optimum mikrozomal sistem bileşenlerine bağımlılığı.
Standart sistem: Mikrozomal süspansiyon + tampon + NADPH + POBN + CPR.

3.2.2. Radikal Oluşumunun Kinetiği

Mikrozomal sistemde CPR ile oluşan 4-POBN radikal-adduct'ının zaman ve konsantrasyona bağlı oluşum kinetikleri, karaciğer mikrozomları için Şekil 3.12.'de, beyin mikrozomları için Şekil 3.13'de CPR konsantrasyon $\times$ relatif sinyal (ESR sinyali) şiddeti grafikleri şeklinde gösterilmiştir.

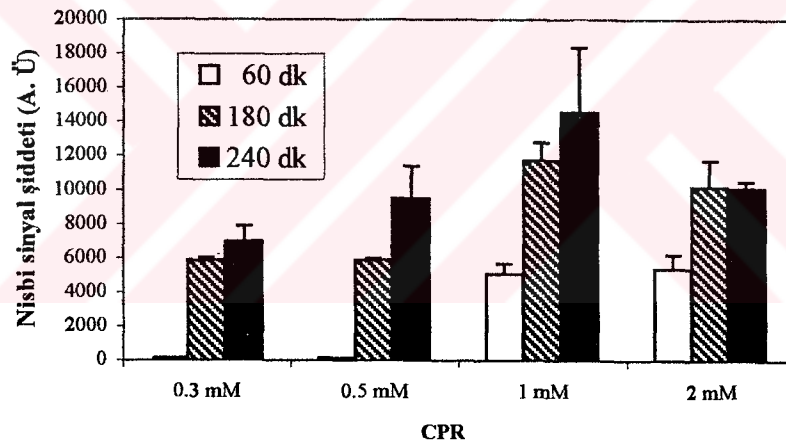
Karaciğer mikrozomlarıyla 30 dakika inkübasyon ile 0.025 mM konsantrasyonda CPR ile gözlenen sinyal şiddeti, konsantrasyonun 0.5 mM'a kadar artırılmasıyla değişmemiştir. Ancak daha yüksek konsantrasyonlarda (1 ve 2 mM) radikal oluşumunun arttığı gözlenmiştir. Buna karşılık 60 veya 180 dakikalık



Şekil 3.12. Karaciğer mikrozomlarında CPR ile indüklenen radikal oluşumunun doz ve zamanla ilişkisi.
Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (n=3).

inkübasyon sürelerinde doza bağlı radikal oluşum hızındaki artışın yüksek olduğu görülmüştür (3 saatlik inkübasyon süresinde doza bağlı radikal oluşumu için regresyon eğrisinin denklemi $y = 2917 + 1707x$, $r = 0.83$).

Beyin mikrozomlarında 0.3 ve 0.5 mM CPR ile 60 dakikada bir sinyal elde edilememiştir. 1 mM ve 2 mM CPR ile bu süre içinde meydana gelen radikal sinyalleri de birbirinden farklı değildir. Ancak 3 saatlik ve özellikle 4 saatlik inkübasyon sürelerinde CPR konsantrasyonu ile radikale bağlı sinyal şiddetinin 1 mM konsantrasyona kadar doğrusal olarak arttığı gözlenmiştir. Bu sürelerde 2 mM'lık CPR konsantrasyonu ile elde edilen sinyal şiddetlerinde düşme olmaktadır.



Şekil 3.13. Beyin mikrozomlarında CPR ile indüklenen radikal oluşumunun doz ve zamanla ilişkisi.

Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (n= 3).

3.2.3. Mikrozoamlarda CPR ile İndüklenen Radikal Oluşumunun Sitokrom P-450 İnhibitörleri ile Önlenmesi

Şekil 3.14'de görüldüğü gibi, SKF 525A ile 20 dakika ön inkübasyondan sonra CPR ile inkübe edilen karaciğer ve beyin mikrozoamlarında 4-POBN/radikal adduct oluşumu tamamen inhibe olmaktadır.

0.1 mM $ZnCl_2$ ile 1 saat süreyle inkübasyonu takiben CPR ile inkübe edilen mikrozoamlarda da radikal oluşumunun tamamiyle inhibe olduğu saptanmıştır (Şekil 3. 14).

3.2.4. Mikrozoamlarda CPR ile İndüklenen Radikal Oluşumuna E Vitamini ve Troloksun Etkisi

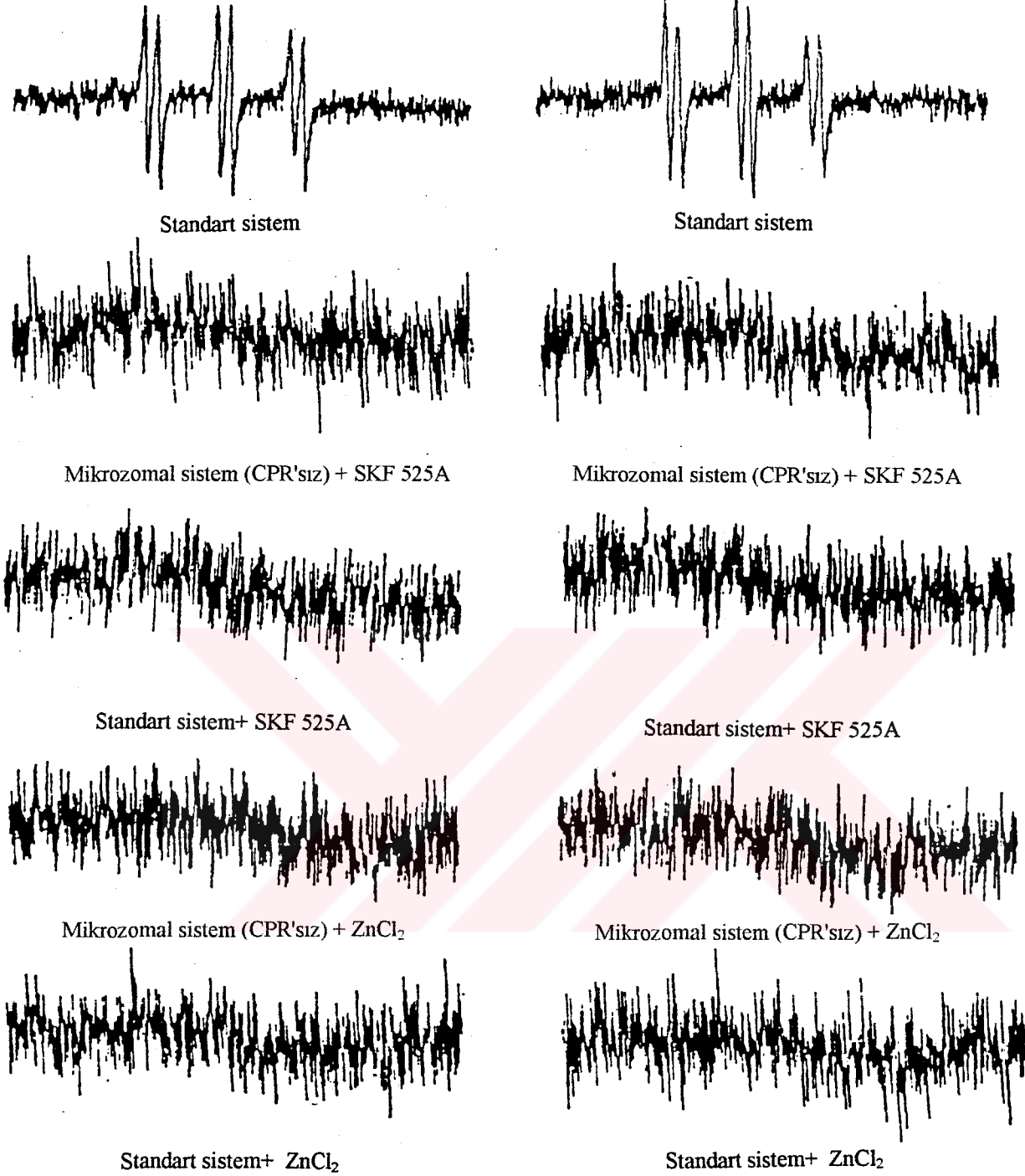
100 μM E vitamini ile 1 veya 4 saatlik ön inkübasyonunu takiben, 1 mM CPR ile 1 veya 3 saat inkübe edilen hepatik mikrozoamlarda, CPR ile indüklenen 4-POBN/radikal adduct'ına ait sinyal şiddetinde $> \% 50$ oranda azalma olduğu saptanmıştır (Tablo 3.5). Bu azalmanın E vitamini ile ön inkübasyon süresinin uzaması halinde daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

E vitamininin suda çözünen analogu Troloks ile yapılan benzer deneylerde, 0.1 mM Troloks ile 1 saatlik ön inkübe edilmiş karaciğer mikrozoamlarında CPR ile indüklenen radikale ait sinyal şiddetinin 30 ve 60 dk'da tamamen inhibe edildiği saptanmıştır.

Aynı miktar Troloksun mikrozomal inkübasyon karışımına ön inkübasyon yapılmaksızın doğrudan ilavesiyle yapılan benzer deneylerde ilk 30 dk'da tam inhibisyon olmamakla birlikte önemli ölçüde sinyal inhibisyonu gözlenmiş, 60 dk'da ise sinyalin tamamen inhibe olduğu saptanmıştır (Tablo 3.5.).

KARACİĞER MİKROZOMLARI

BEYİN MİKROZOMLARI



Şekil 3.14. Karaciğer ve beyin mikrozomlarında CPR ile indüklenen 4-POBN/radikal adduct oluşumuna SKF 525A ve $ZnCl_2$ 'ün etkisi.
Standart sistem: Mikrozomal süspansiyon + tampon + NADPH + POBN + CPR

Tablo 3.5. CPR'in karaciğer mikrozomlarında meydana getirdiği radikal oluşumuna E vitamini ve Troloksun etkisi.

Sistem	Nisbi Sinyal Büyüklüğü*		
	30 dk	60 dk	180 dk
1 mM CPR (standart sistem)**	100 ± 8	252 ± 14	274 ± 23
100 µM E vit (1 sa ön ink)	-	0	0
100 µM E vit (1 sa ön ink) + 1 mM CPR	-	112 ± 32 ^a	122 ± 4 ^b
100 µM E vit (4 sa ön ink)	-	0	0
100 µM E vit (4 sa ön ink) + 1 mM CPR	-	85 ± 0.1 ^c	91 ± 4 ^b
0.1 mM Troloks	0	0	-
0.1 mM Troloks + 1 mM CPR	42 ± 5 ^d	0	-
0.1 mM Troloks (1 sa ön ink)	0	0	-
0.1 mM Troloks (1 sa ön ink) + 1 mM CPR	0	0	-

* 30, 60 ve 180 dk'lık inkübasyonu takiben ölçülen 4-POBN/radikal adduct miktarı.

** Standart sistem: Mikrozomal süspansiyon + tampon + NADPH + POBN + CPR

Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir (n= 3).

^a Standart sistemden (60 dk'lık ink) önemli ölçüde farklı, $p < 0.05$.

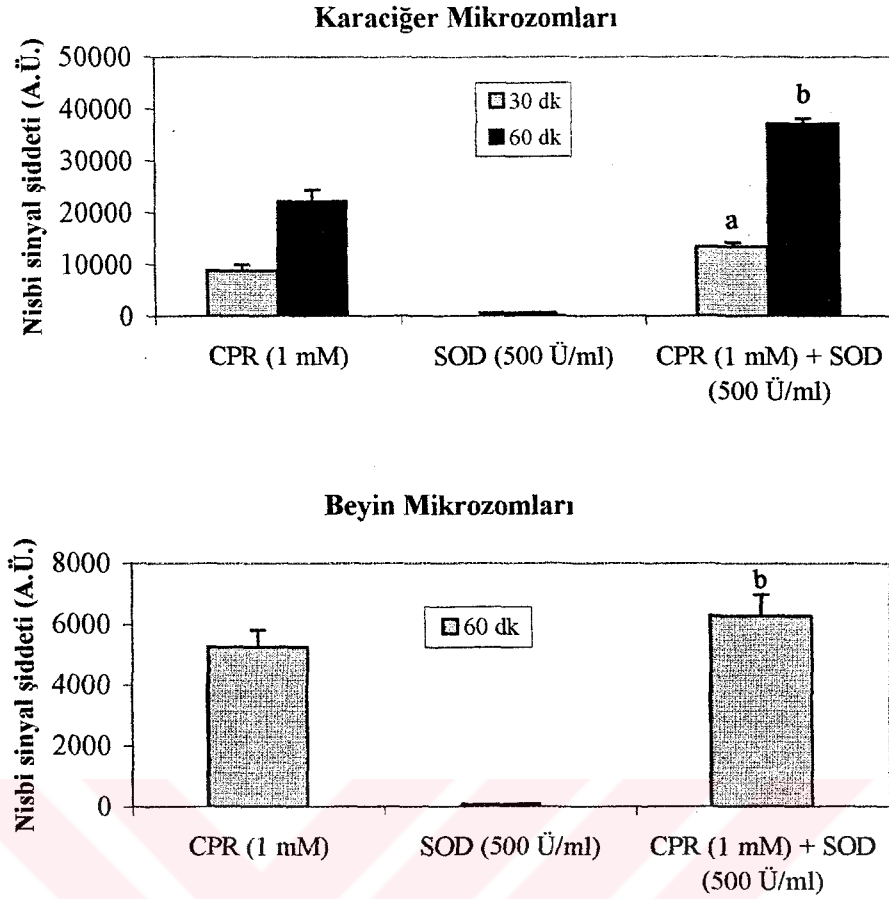
^b Standart sistemden (180 dk'lık ink) önemli ölçüde farklı, $p < 0.05$.

^c Standart sistemden (60 dk'lık ink) önemli ölçüde farklı, $p < 0.02$.

^d Standart sistemden (30 dk'lık ink) önemli ölçüde farklı, $p < 0.05$.

3.2.5. Mikrozomlarda CPR ile İndüklenen Radikal Oluşumuna SOD'm Etkisi

Şekil 3.15'de görüldüğü gibi, gerek karaciğer, gerekse beyin mikrozomlarında CPR ile indüklenen radikal oluşumunu, mikrozomal karışımın 500 Ü/ml konsantrasyonda SOD ile ön inkübasyonu önlemediği gibi, SOD ile 60 dk'lık inkübasyon karaciğer mikrozomlarında radikal oluşumunu > % 50 oranında arttırmıştır.



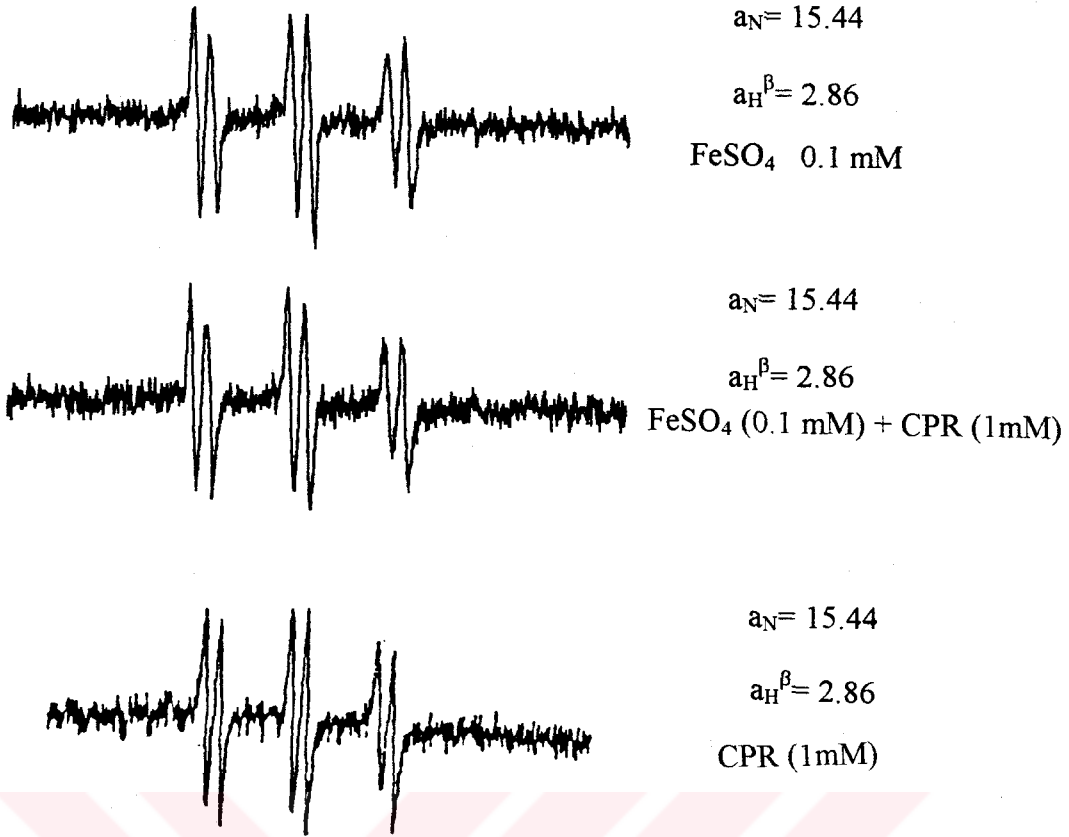
Şekil 3.15. Karaciğer ve beyin mikrozomlarında CPR ile indüklenen 4-POBN/radikal adduct oluşumuna SOD'ın etkisi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD değeri olarak verilmiştir (n=3).

^a CPR grubundan önemli ölçüde farklı, $p < 0.05$.

^b CPR grubundan önemli ölçüde farklı, $p < 0.02$.

3.2.6. Mikrozomlarda CPR ile İndüklenen Radikal Oluşumuna Demir ve Demir Şelatörlerinin Etkileri

Karaciğer mikrozomları CPR olmaksızın 0.1 mM demir (FeSO_4) ile inkübe edildiğinde, ESR spektrumu CPR ile indüklenen 4-POBN/radikal adduct'ı ile aynı olan bir radikal meydana geldiği (Şekil 3.16) ve sinyal şiddetinin 1 mM CPR ile ölçülenden farksız olduğu gözlenmiştir (Tablo 3.6). Deney CPR + FeSO_4 ile tekrarlandığında sinyal şiddetinde önemli ölçüde artış olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.16. Karaciğer mikrozomlarında 0.1 mM FeSO_4 ile indüklenen 4-POBN/radikal adduct'ının ESR spektrumu.

Mikrozomal inkübasyon DTPA ile şelate edilmiş demir ($\text{Fe}^{++}/\text{DTPA}$) ile yapıldığında 30. dakikada herhangi bir sinyal gözlenmemiştir. Ancak 60 dakikalık inkübasyon ise sinyal şiddetinde artışa neden olmuştur (Tablo 3.6).

CPR ile birlikte $\text{Fe}^{++}/\text{DTPA}$ ile inkübe edilen karaciğer mikrozomlarında 30 dakikalık inkübasyonla yalnız başına CPR ile elde edilene kıyasla önemli bir artış olmamış; 60 dakikalık inkübasyon ise 3 kezden fazla bir yükselmeye neden olmuştur.

CPR ile birlikte metal şelatörü DTPA (1.5 mM) ile inkübe edilen mikrozomlarda sinyal şiddetinin 30. dakikada önemli ölçüde azaldığı, 60. dakikada tamamen önlendiği gözlenmiştir (Tablo 3.6.).

Tablo 3.6. Karaciğer mikrozomlarında demir ve demir şelatörlerinin; beyin mikrozomlarında DFO'nin CPR'in meydana getirdiği radikal oluşumuna etkisi.

Mikrozomal sistem	Nisbi Sinyal Büyüklüğü*	
	30 dk	60 dk
<u>Karaciğer mikrozomları</u>		
1 mM CPR (standart sistem)**	100 ± 8	252 ± 14
0.1 mM FeSO ₄	110 ± 13	216 ± 25
0.1 mM FeSO ₄ + 1 mM CPR	483 ± 23 ^a	534 ± 11 ^c
10 µM Fe ⁺⁺ /20 µM DTPA	0	76 ± 13 ^b
10 µM Fe ⁺⁺ /20 µM DTPA + 1 mM CPR	110 ± 9	394 ± 10 ^{c, d}
1.5 mM DTPA	0	0
1.5 mM DTPA + 1 mM CPR	50 ± 10 ^a	0
0.5 mM DFO	0	0
0.5 mM DFO + 1 mM CPR	0	0
<u>Beyin mikrozomları</u>		
1 mM CPR (standart sistem)**	100 ± 11	231 ± 9
0.5 mM DFO	0	0
0.5 mM DFO + 1 mM CPR	0	0

* 30 ve 60 dk'lık inkübasyonu takiben ölçülen 4-POBN/radikal adduct miktarı.

** Standart sistem: Mikrozomal süspansiyon + tampon + NADPH + POBN + CPR.

Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir (n= 3).

^a Standart sistemden (30 dk'lık ink) önemli ölçüde farklı, $p < 0.05$.

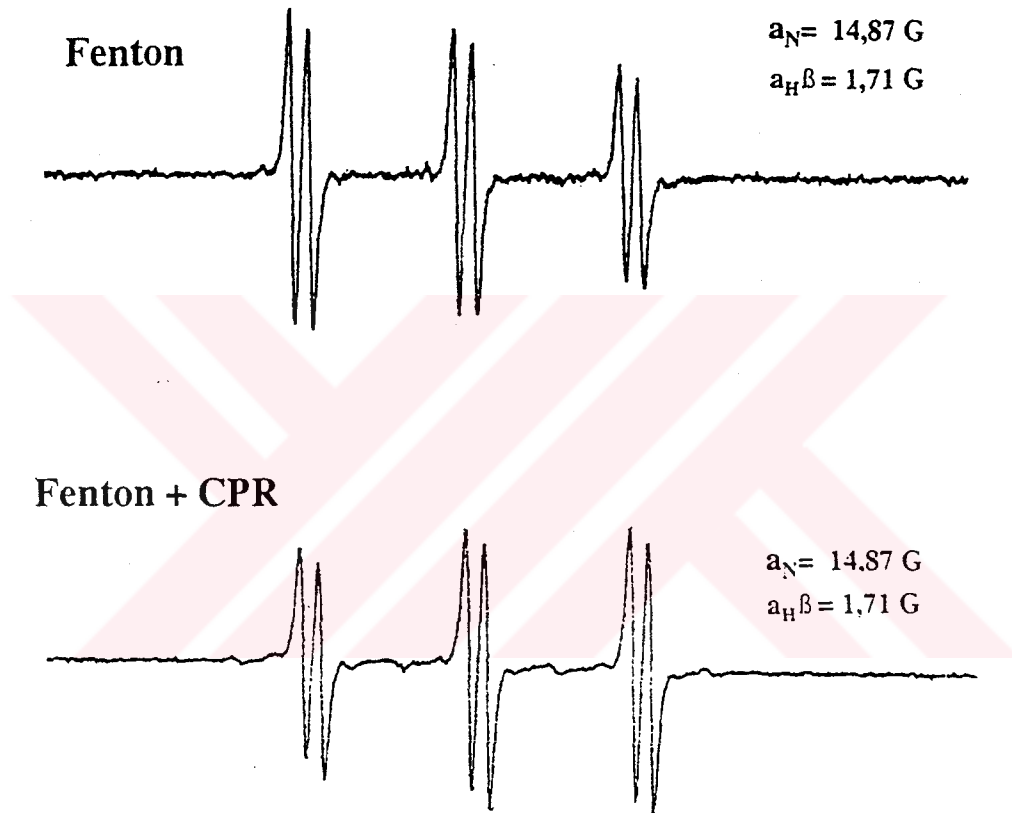
^b FeSO₄ grubundan (30 dk'lık ink) önemli ölçüde farklı, $p < 0.05$.

^c Standart sistemden (60 dk'lık ink) önemli ölçüde farklı, $p < 0.02$.

^d 10 µM Fe⁺⁺/20 µM DTPA grubundan (60 dk'lık ink) önemli ölçüde farklı, $p < 0.05$.

3.2.7. Fenton Reaksiyonu ile 4-POBN/OH[•] Radikal Adduct'ı Oluşturulması.

Şekil 3.17'de Fenton reaksiyonu ile oluşan OH[•] 'nin 4-POBN ile oluşturduğu adduct'ın ESR spektrumu verilmiştir ($a_N = 14.87$ G, $a_H\beta = 1.71$ G). Fenton reaksiyonunda ortama 1 mM CPR ilavesinin ESR spektrumunda bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 3.17. Fenton reaksiyonu ile oluşan hidroksil radikalının 4-POBN adduct'ının ESR spektrumu ve CPR'in etkisi.

3.2.8. Karaciğer Mikrozomlarında CPR ile İndüklenen Radikalın DMPO Spin Tuzağı Kullanılarak İncelenmesi

Oksijen merkezli radikaller için daha spesifik bir spin tuzağı olan DMPO, 4-POBN'in kullanıldığı koşullarda mikrozomal karışımlara CPR ile birlikte uygulandığında herhangi bir ESR sinyali saptanamamıştır.

3.2.9. Mikrozoamlarda CPR ile İndüklenen Lipid Peroksidasyonu ve Tiyol Düzeyi Kayıpları

0.5-1 mM CPR ile 1-3 saat süreli mikrozomal inkübasyonların sonrasında ölçülen lipid peroksidasyonu düzeylerinin karaciğer mikrozoamlarında konsantrasyona bağlı olarak 3 veya 4 kez, beyin mikrozoamlarında 2 keze yakın düzeyde arttığı saptanmıştır (Tablo 3.7.).

Tablo 3.7. CPR ile inkübe edilen mikrozoamlarda lipid peroksidasyonu düzeyleri.

Mikrozomal sistem	Deney grubu	MDA ^a (nmol/mg protein)
Beyin	Kontrol	15.70 ± 0.26
	1 mM CPR (1 sa ink)	26.71 ± 0.59*
	0.5 mM CPR (3 sa ink)	28.08 ± 0.74*
	0.5 mM, CPR (NADPH'sız 3 sa ink)	14.31 ± 0.29
Karaciğer	Kontrol	6.93 ± 0.42
	1 mM CPR (1 sa ink)	29.13 ± 2.82**
	0.5 mM CPR (3 sa ink)	20.31 ± 0.59**
	0.5 mM CPR (NADPH'sız 3 sa ink)	5.69 ± 0.35

^a Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir (n= 3-8)

İstatiksel değerlendirmeler Mann-Whitney-U testi ile yapılmıştır.

* Kontrol ile karşılaştırıldığında, $p < 0.05$.

** Kontrol ile karşılaştırıldığında, $p < 0.02$.

Aynı koşullarda ölçülen mikrozomal total tiyol düzeylerinin karaciğer mikrozoamlarında yaklaşık 2.5 kez, beyin mikrozoamlarında ise 5 kez üzerinde azaldığı saptanmıştır (Tablo 3.8).

Tablo 3.8. CPR ile inkübe edilen mikrozomlarda total tiyol düzeyleri.

Mikrozomal sistem	Deney grubu	Total tiyol düzeyi ^a ($\mu\text{mol/g}$ protein)
Beyin	Kontrol	34.77 ± 9.70
	1 mM CPR (1 saat ink)	$7.40 \pm 2.50^*$
	0.5 mM CPR (3 saat ink)	$6.42 \pm 2.35^*$
	0.5 mM CPR (NADPH'sız 3 sa ink)	32.00 ± 5.7
Karaciğer	Kontrol	32.33 ± 2.87
	1 mM CPR (1 saat ink)	$16.55 \pm 2.59^{**}$
	0.5 mM CPR (3 saat ink)	$14.63 \pm 3.49^{**}$
	0.5 mM CPR (NADPH'sız 3 sa ink)	30.25 ± 7.5

^a Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.
İstatistiksel değerlendirmeler Mann-Whitney-U testi ile yapılmıştır.
(n= 3-8)

* Kontrol ile karşılaştırıldığında, $p < 0.05$.

** Kontrol ile karşılaştırıldığında, $p < 0.02$.

3.2.10. Karaciğer Mikrozomlarında CPR ile İndüklenen Radikalin 4-POBN Adduct'ının On-Line HPLC-ESI MS Tekniği ile Analizine İlişkin Bulgular

Bölüm 2.5.2.8.'de anlatıldığı şekilde (karaciğer) mikrozomal inkübasyon karışımından (standart sistem, 1 mM CPR ve 1 sa inkübasyon) hazırlanan $100.000 \times \text{g}$ süpernatana ait ESR spektrumu Şekil 3.18'de görülmektedir. Elde edilen spektrumun a_N ve a_H^b değerlerinin mikrozomal karışımda gözlenen değerlere eşdeğer olduğu, dolayısıyla bu işlemle POBN/radikal adduct'ında bir değişimin olmadığı saptanmış, ancak nisbi sinyal şiddetinde % 20 oranında bir azalma kaydedilmiştir.

Bu süpernatana kullanılarak yapılan on-line HPLC-ESI MS analizi sonuçları Şekil 3.19-3.26'da verilmiştir.

Şekil 3.19'da süpernatant karışımında gözlenen total iyon akımı görülmektedir. Şekil 3.20'de ise a, b, c ve d kromatogramlarında, reaksiyon ürünlerinin HPLC-ESI MS analizi sonucunda elde edilen, sırasıyla, m/z 601, 503, 346 ve 211 pikleri gösterilmektedir

$t_R \approx 8.60$ dk'da elüe olan fraksiyonun kütle spektrumu 150-500 m/z aralığında Şekil 3.21'de; 150-650 m/z aralığında Şekil 3.22'de gösterilmiştir.

m/z 346 (345.8)'da görülen moleküler iyon piki $[M-H]^-$ 'nin, CPR'in M3 metabolitinin 2 proton almış (diprotone) türevi olduğu, dolayısıyla büyük bir olasılıkla molekül ağırlığı 347 olan ve piperazinil halkasında 4' N konumunda bir radikalik yapıya sahip "dihidrooksosiprofloksazin" yapısına karşılık geldiği düşünülmektedir.

m/z 211 (210.9)'de gözlenen şiddetli pik, m/z 346'nın ana fragman pikidir ve dihidrooksosiprofloksazin molekülünden piperazinil, flour ve hidroksil gruplarının kopmasıyla oluşan yapıya karşılık geldiği düşünülmektedir.

Ayrıca m/z 319 (318.5)'da gözlenen pikin bir (CO) kopması ile oluşan fragman olduğu; m/z 309 (309.4)'de gözlenen pikin ise bir flour ve hidroksil çıkışı ile oluşan fragmana karşılık geldiği söylenebilir (Şekil 3.21. ve 3.22).

Şekil 3.23'de m/z 346 pikinin parçalanması ile elde edilen spektrum, Şekil 3.24'de ise m/z 211 pikinin fragmentasyon spektumları verilmiştir. Görüldüğü gibi burada ana yapı m/z 346 piki olup, diğerleri onun fragmanlarıdır. Ayrıca, m/z 211 pikinin fragmentasyonu ile elde edilen spektrumda 4-POBN'e ilişkin herhangi bir pik gözlenmemiştir. Böylece bu verilerden, $t_R = 8.60$ dk'da elüe olan fraksiyonun, sadece bir CPR türevi bileşiğe karşılık geldiği söylenebilir.

$t_R = 4.10$ dk'da elüe olan fraksiyonun kütle spektrumu 150-650 m/z aralığında Şekil 3.25'de, 150-440 m/z aralığında Şekil 3.26'de verilmiştir.

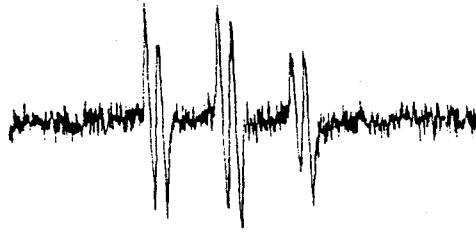
Görüldüğü gibi bu fraksiyon daha karmaşık bir fragmentasyon kalıbı göstermektedir. Ancak 4-POBN'nin bir lipid-türevi radikal adduct'ının varlığına ilişkin data içerdiği saptanmıştır. Bu karbon merkezli radikalın bir pentenil radikali olduğuna ilişkin kanıtlar gözlenmiştir. Şöyle ki: m/z 193 (194.6)'de gözlenen pik, molekül ağırlığı 194 olan 4-POBN'nin $[M-H]$ pikidir. Bu pik, Şekil 3.27'de yapısı ve fragmentasyon kalıbı görülen ve molekül ağırlığı 263 olan 4-POBN/pentenil radikal

adduct'ından pentenil grubunun (69 dalton) kopmasıyla oluşan fragmana karşılık gelmektedir.

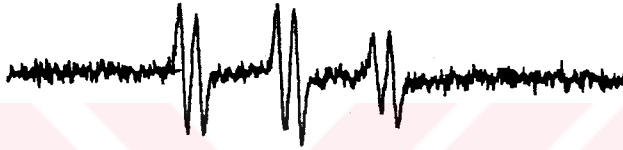
4-POBN/pentenil radikal adduct'ına ait moleküler iyon piki spektrumda görülmemekle birlikte, m/z 233 (232.5) ve m/z 217 (216.6)'de gözlenen piklerin, adduct'ın moleküler iyon pikinden C_nH_{2n+2} kayıpları sonucunda oluşan fragmanlar olduğu söylenebilir.

Ayrıca m/z 176 (176.4)'da gözlenen pikin, 4-POBN yapısındaki karbon-azot bağının kopması ile oluşan [M-87] fragmanı olması kuvvetle olasıdır. Bu son bulgular da bir 4-POBN/pentenil adduct'ının varlığı görüşünü destekler niteliktedir.

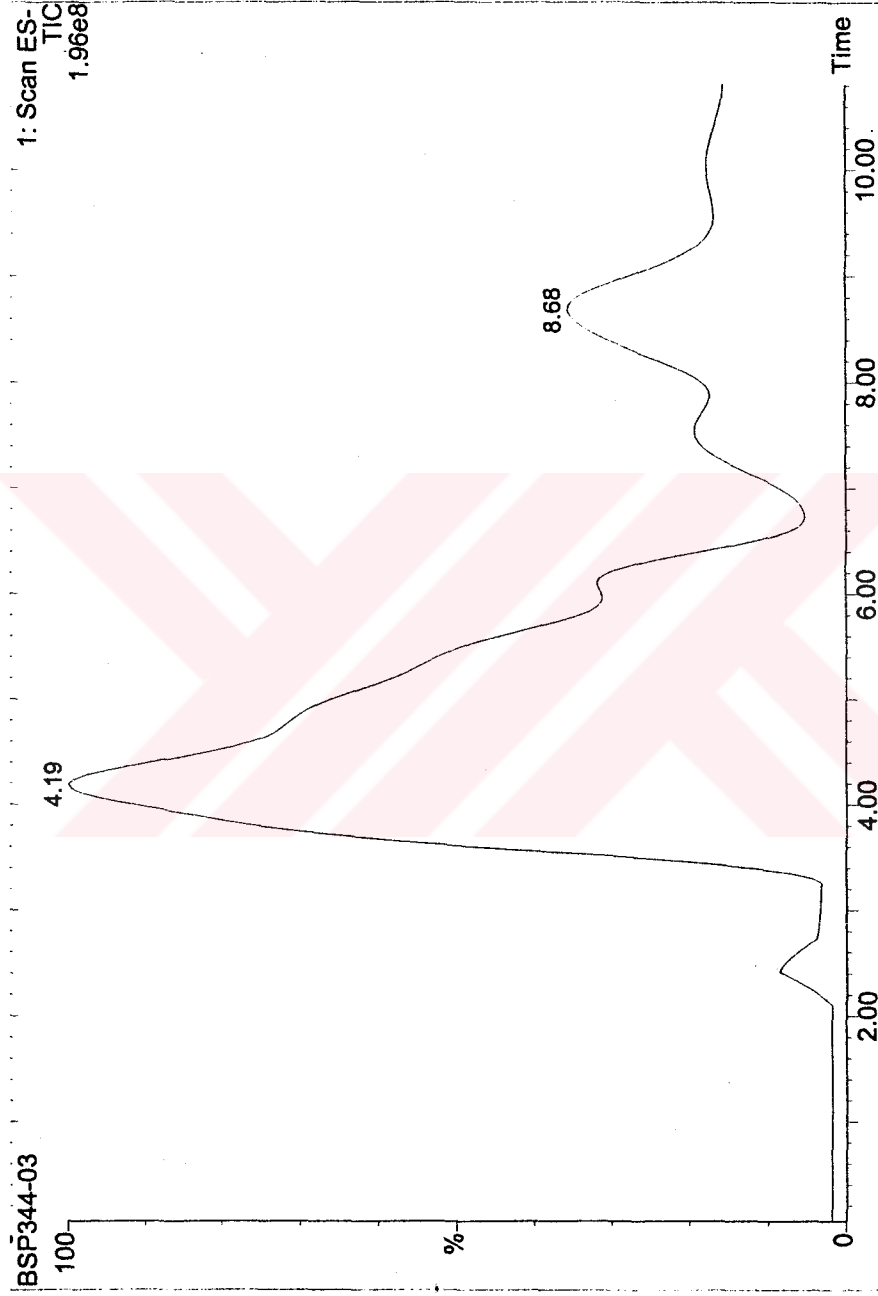




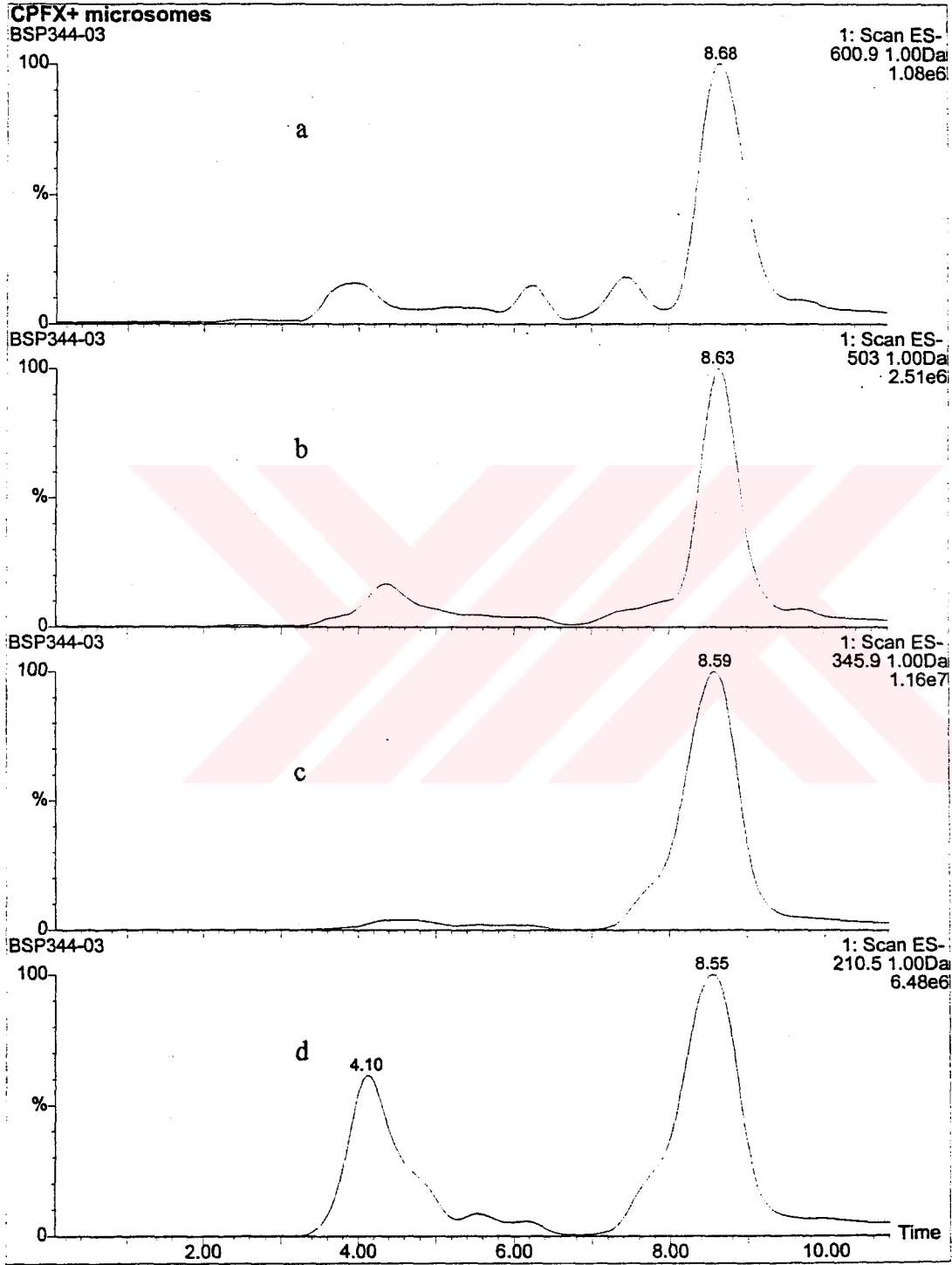
Standart sistem

Standart sistem
(100 000 g süpernatant)

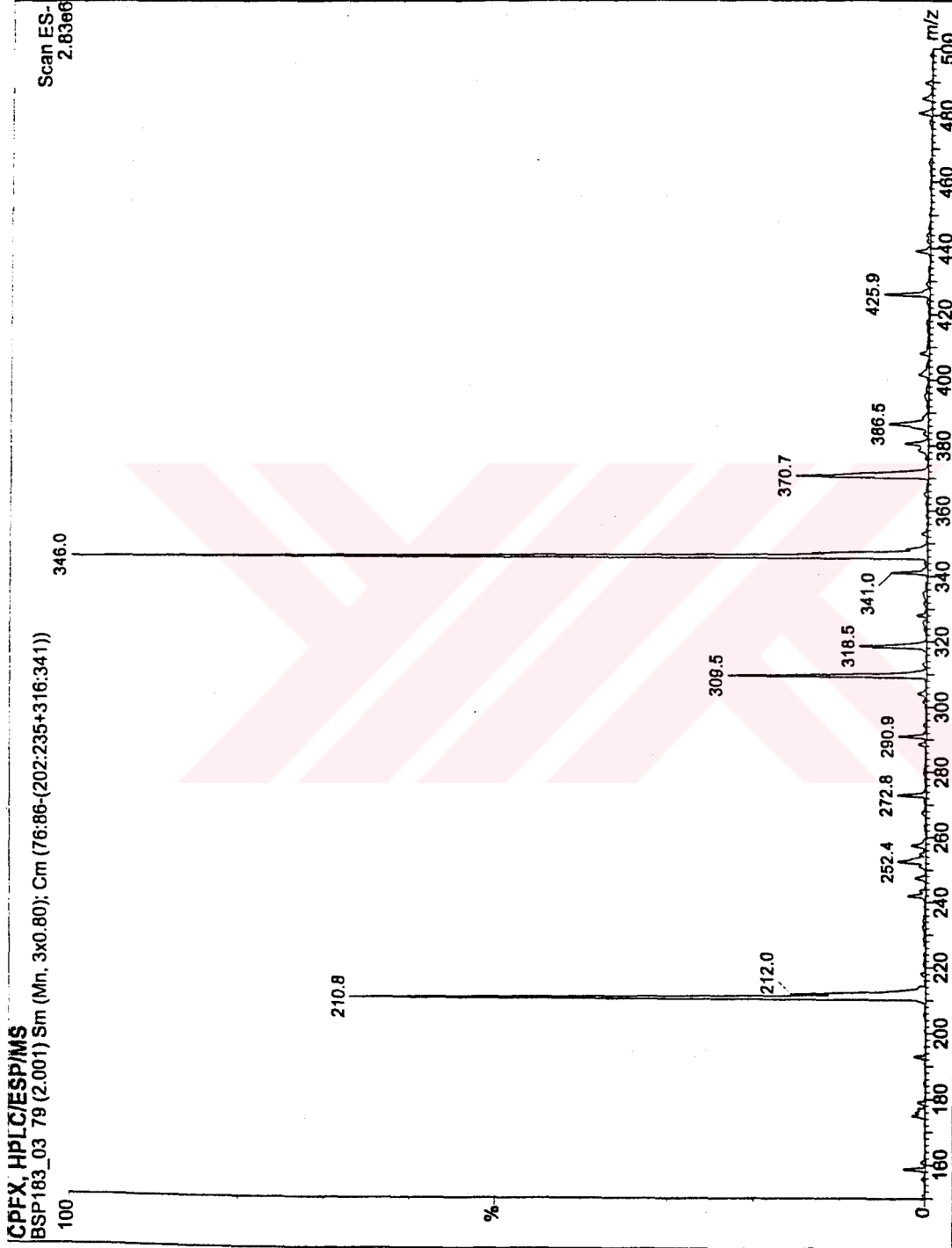
Şekil 3. 18. Karaciğer mikrozomal inkübasyon karışımından hazırlanan 100000 × g süpernatana ait ESR spektrumu



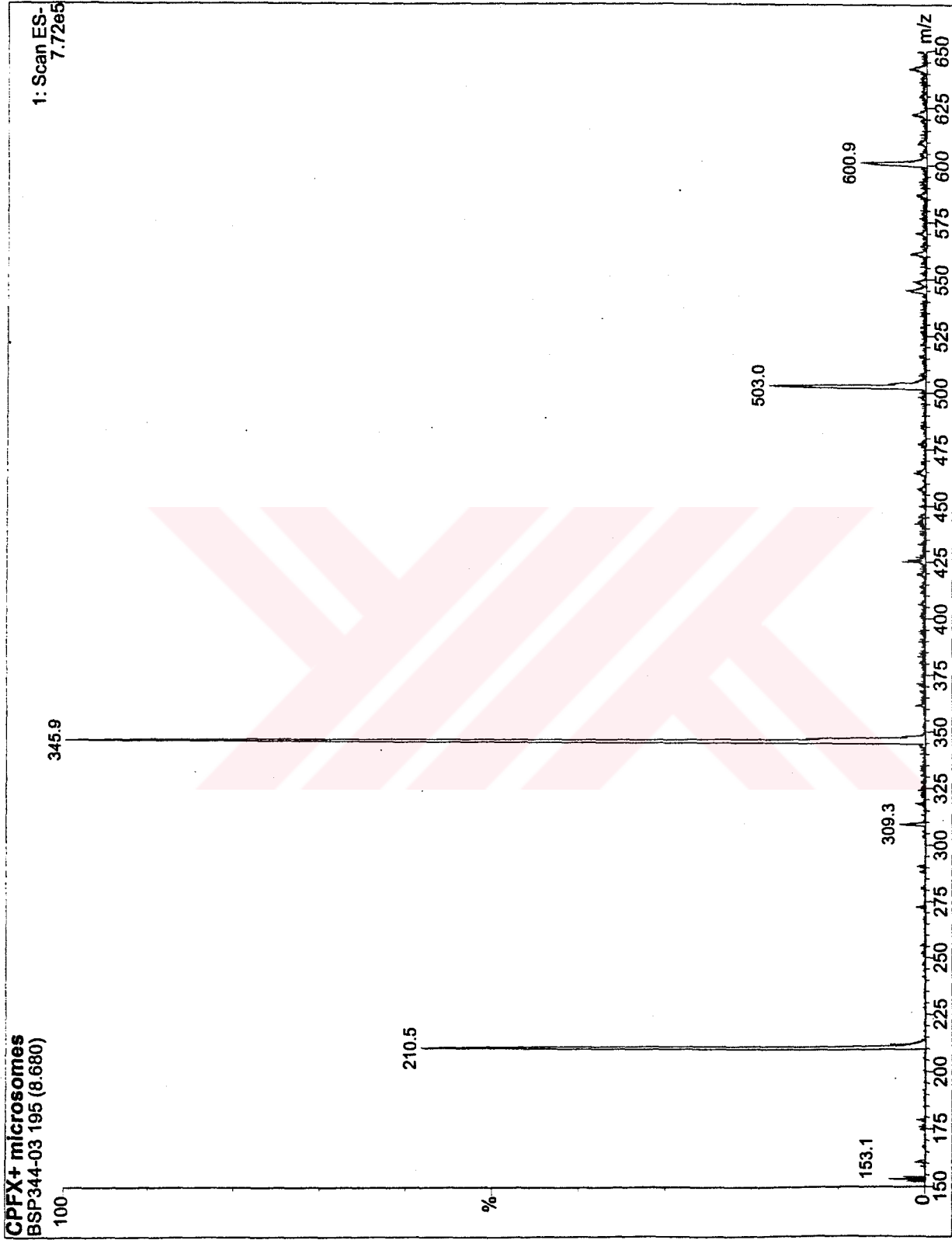
Şekil 3.19. CPR'in 4-POBN varlığında oluşan mikrozomal inkübasyon ürünlerinin total iyon akımı olarak ölçülen HPLC-ESI MS analizi sonuçları.



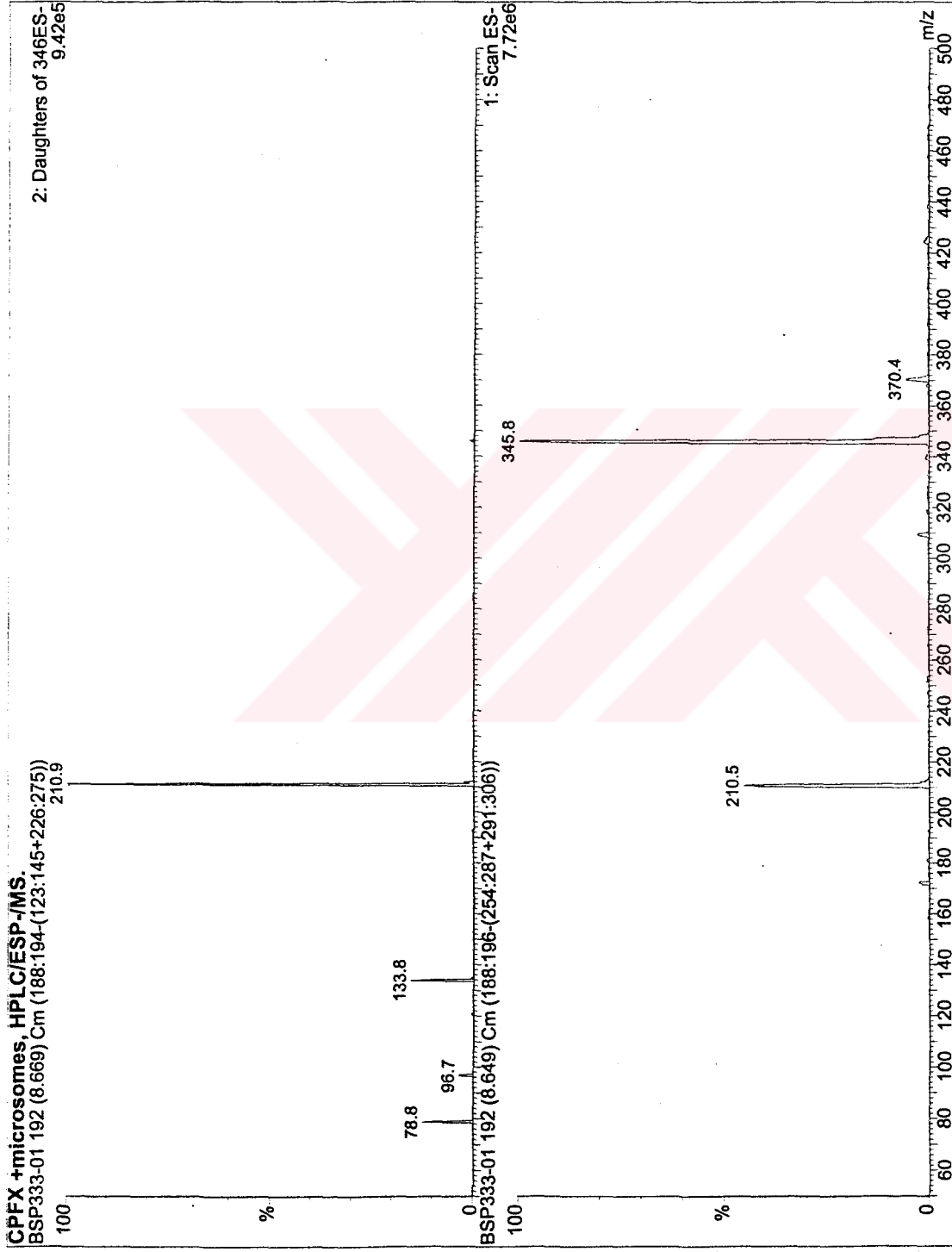
Şekil 3.20. CPR ve 4-POBN varlığında oluşan mikrozomal reaksiyon ürünlerinin HPLC-ESI MS analiziyle elde edilen m/z 601, 503, 346 ve 211 piklerini gösteren kromatogramlar.



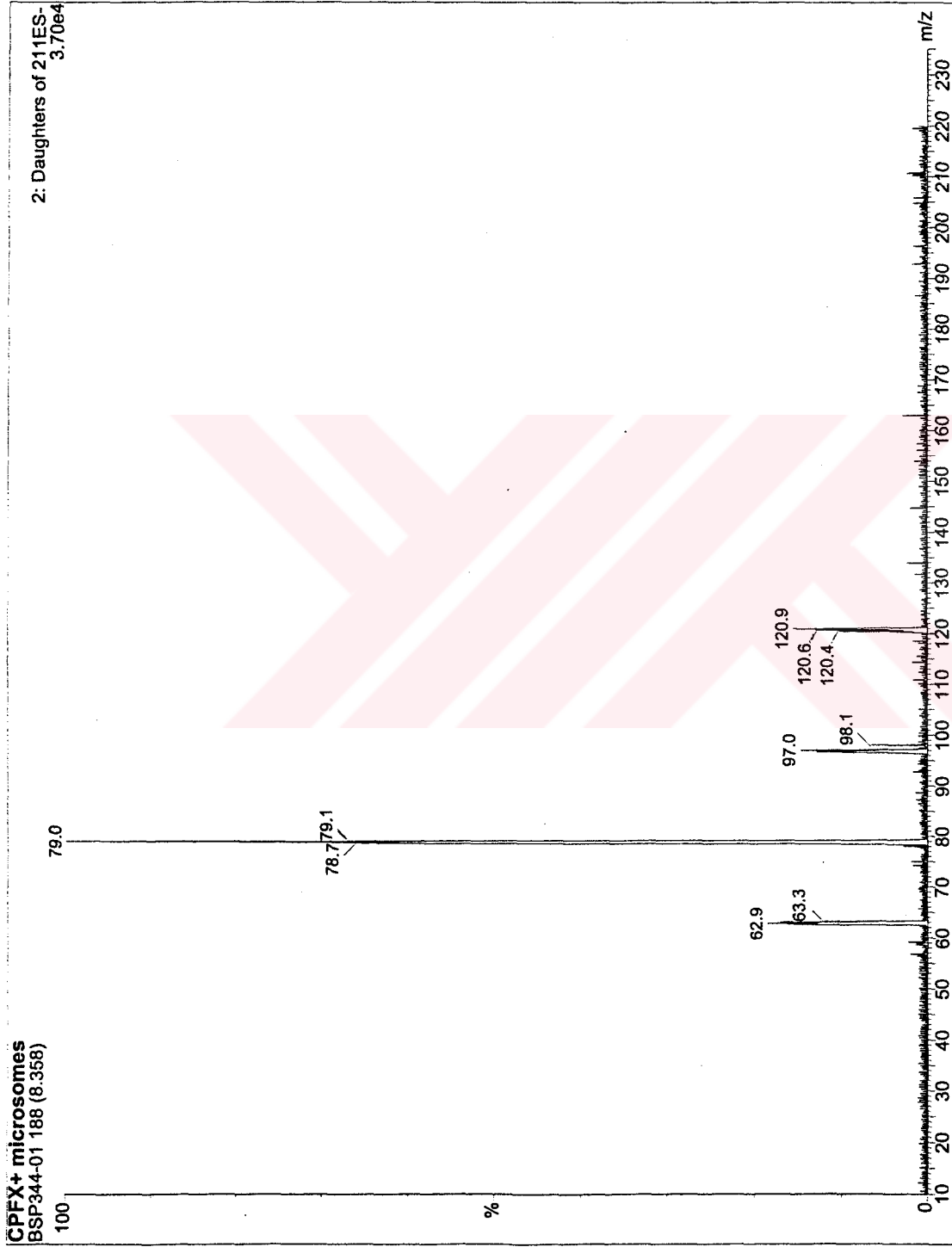
Şekil 3.21. CPR ile inkübe edilen mikrozomal karışımın, $t_R = 8.60$ dk'da elüe olan HPLC fraksiyonunun ESI MS spektrumu (m/z 150-500).



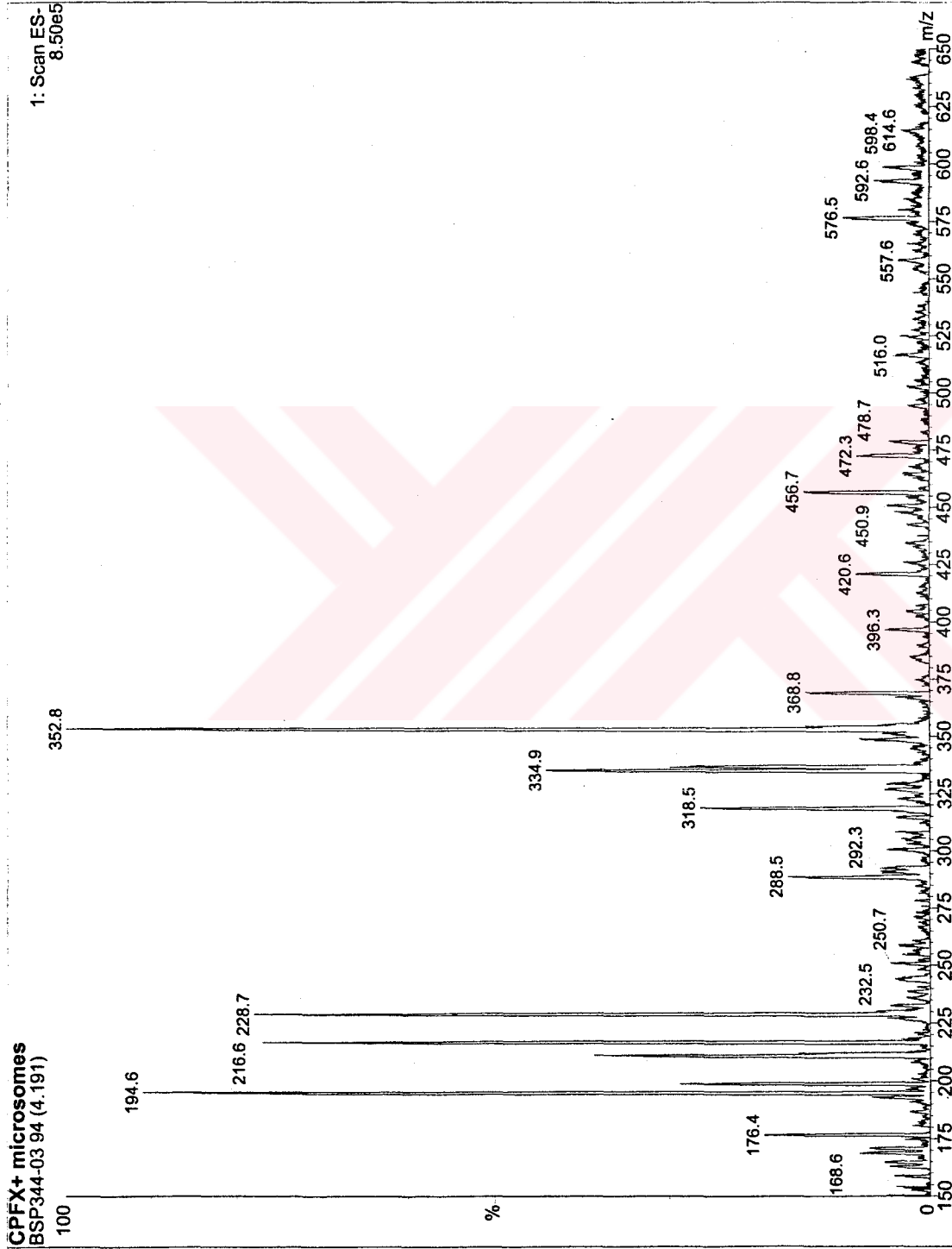
Şekil 3.22. CPR ile inkübe edilen mikrozomal karışımın, $t_R = 8.60$ dk'da elüe olan HPLC fraksiyonunun ESI MS spektrumu (m/z 150-650).



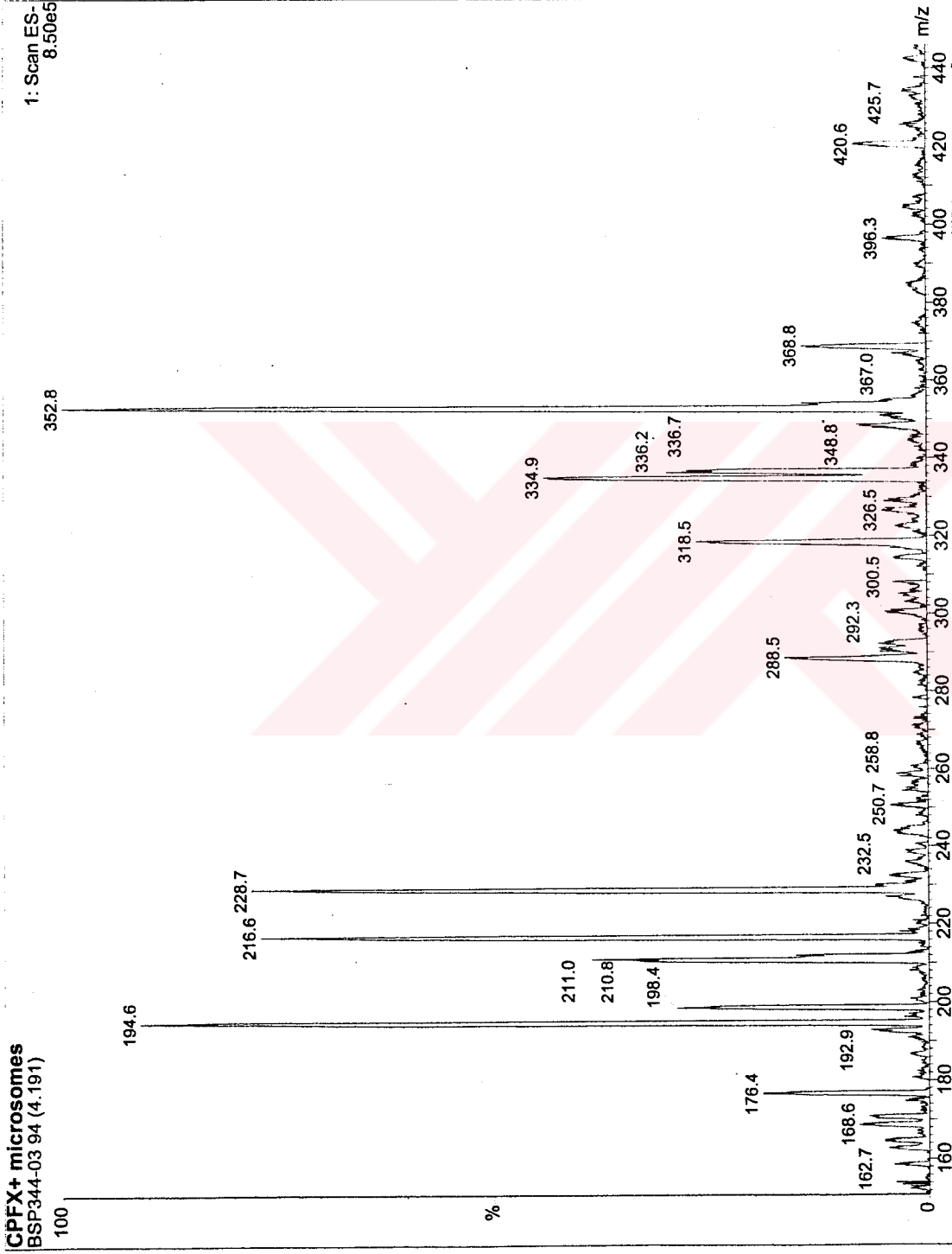
Şekil 3.23. m/z 346 pikinin fragmentasyonunu gösteren ESI MS spektrumu.



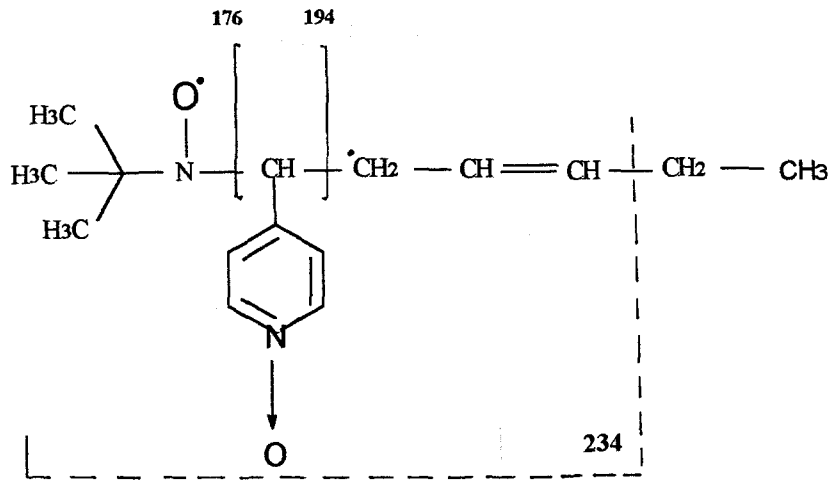
Şekil 3.24 m/z 211 pikinin fragmentasyonunu gösteren ESI MS spektrumu.



Şekil 3.25. CPR ile inkübe edilen mikrozomal karışımın, $t_R = 4.19$ dk'da elüe olan HPLC fraksiyonunun ESI MS spektrumu (m/z 150-650).



Şekil 3.26. CPR ile inkübe edilen mikrozomal karışımın, $t_r = 4.19$ dk'da elüe olan HPLC fraksiyonunun ESI MS spektrumu (m/z 150-440).



MA: 263

Şekil 3.27. 4-POBN'in pentenil radikal adduct'ının yapısı ve fragmantasyon kalıbı.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, literatür verilerinden ve CPR ile yaptığımız daha önceki çalışma sonuçlarımızdan hareketle, CPR'nin, özellikle SSS'nde gözlenen toksisitesi ile bağlantılı olarak oksidatif stres meydana getirici etkisi ve mekanizmaları konusu araştırılmıştır. Bu amaçla, üç ayrı *in vitro* sistemde, standart biyokimyasal teknikler ve/veya ESR, LC/MS teknikleri kullanılarak, olası sitotoksitenin ve/veya oksidatif stresin çeşitli açılardan değerlendirilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır.

Bu çerçevede, öncelikle bir model hücre kültürü sisteminde çalışılmış, sağlıklı yetişkin insanlardan alınan deri biyopsisi örnekleri kullanılarak hazırlanmış fibroblast hücre kültürlerinde sitotoksiste ve oksidatif stres parametreleri ölçülmüştür. İkinci bir hücre kültürü sistemi olarak sıçan astrosit hücre kültürlerinde çalışılmış ve bu sistem CPR'in SSS'de meydana getirdiği etkilerde oksidatif stresin olası rolünü araştırmak için yakın bir model olarak seçilmiştir. Takiben, CPR uygulaması ile oluşan istenmeyen etkilerin ve ilişkili olduğunu düşündüğümüz oksidatif stresin CPR'in metabolizması ile ilişkili olup olmadığı konusunda ayrıntılı bilgi edinebilmek ve de meydana gelmesi olası serbest radikalleri tanımlayıp ölçebilmek amacıyla beyin ve karaciğer mikrozomlarında ESR-Spin Tuzağı tekniği ile çok yönlü incelemeler yapılmıştır. Mikrozomal sistemde ESR tekniği ile çalışmayı seçim nedenlerimizden biri de hücre kültürlerine oranla daha hızlı ve kolay sonuç vermesi ve koşulların daha iyi kontrol edilip çeşitli ilave tekniklerle daha kesin olarak irdelenip doğrulanabilmesidir. Son olarak LC-ESI MS tekniği kullanılarak, mikrozomal reaksiyon ürünlerinin on-line analiz yoluyla separasyonlarını takiben kütle spektrumları üzerinden ayrıntılı analiz ve yorumlamanın yapılmasına çalışılmıştır.

Daha önce değinildiği üzere CPR kullanımıyla gözlenen fototoksik yan etkilerin UVA ışık etkisiyle meydana gelen serbest oksijen radikalleri aracılığı ile oluştuğuna ilişkin çeşitli yayınlar bulunmaktadır (94, 99-103). Ancak sunduğumuz çalışmada CPR'nin etkileri, çalışılan *in vitro* sistemler UVA irradyasyonuna maruz bırakılmasızın incelenmiş ve bu amaçla yapılan tüm deneylerde örneklerin ışıktan korunmasına dikkat edilmiştir.

4.1. CPR'in Fibroblast Hücre Kültürlerindeki Etkileri

CPR da dahil, fluorokinolon antibiyotikler ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında, bu grup ilaçların kemik iliği, hepatosit, insan karsinoma, fare embriyo fibroblast ve HeLa hücreleri gibi çeşitli memeli hücrelerinin büyümesini inhibe ettikleri bildirilmiştir (337-339). Bu çalışmalarda, sitotoksik etkinin 20 mg/l'nin üzerindeki konsantrasyonlarda başladığı, daha sık olarak da 40-80 mg/l konsantrasyon aralığında meydana geldiği ve doza-bağımlı olduğu (339); hücre büyümesinin tam olarak inhibisyonunun ise 100 mg/l'den yüksek konsantrasyonlarda görüldüğü bildirilmiştir (337, 338).

Literatürde yer alan çalışmalara benzer şekilde, sunduğumuz çalışmada da CPR'in normal insan dermal fibroblast hücrelerinin proliferasyonunu 48 saatlik inkübasyonu takiben 50-75 mg/l arasındaki konsantrasyonlarda; 72 saatlik inkübasyonu takiben ise 50 mg/l'den yüksek konsantrasyonlarda inhibe ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, CPR, 24 saatlik inkübasyonu takiben, 5-150 mg/l konsantrasyon aralığında hücrelerin canlılığı üzerinde herhangi bir etki meydana getirmemiştir. Bu şekildeki bir gecikmiş etki, Lawrence ve ark. (339) tarafından CPR'in indüklediği büyüme inhibisyonunun genel bir özelliği olarak tanımlanmış ve bu etkinin, ilaca birkaç günlük maruziyetten sonra meydana geldiği bildirilmiştir. Aynı yazarlar, bu oyalanma döneminin (lag phase), hücre türüne bağlı olduğunu ve yaklaşık olarak 3-4 hücre bölünmesine karşılık geldiğini göstermişlerdir. Dolayısıyla CPR'e kısa süreli temasın önemli bir sitotoksik etkiye neden olmadığını ileri sürmüşlerdir (339).

Lawrence ve ark. (338) sitotoksisite mekanizmasının mitokondriyal DNA (mtDNA) fonksiyonlarının kaybıyla ilişkili olduğunu ileri sürmüşler, hücre proliferasyonu nalidiksik asitle ve CPR ile inhibe edilmeden önce, hücresel mtDNA miktarında zamana bağımlı bir azalma gözlediklerini bildirmişlerdir. Sonuçta yazarlar, CPR'in memeli hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edici etkisinin, mitokondriyal topoizomera II benzeri aktivite ile bir etkileşim yoluyla, mtDNA'nın seçici olarak tüketilmesi şeklinde bir mekanizma ile ilişkili olduğu görüşünü ileri sürmüşlerdir.

Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar Lawrence ve ark.(338, 339)'nın ileri sürdüğü bu hipoteze, CPR ile gözlenen sitotoksik etkide oksidatif stres ve serbest radikal reaksiyonlarının rol oynayabileceği şeklinde bir ikinci bileşenin ilave edilebileceğini düşündürmektedir. Şöyle ki, Tablo 3.1'de görüldüğü gibi CPR'e maruz bırakılan hücrelerde lipid peroksidasyonu düzeylerinde artış gözlenmiştir ve bu artış hücrelerin zincir kırıcı antioksidan E vitamini ile ön inkübasyonu ile önlenmektedir.

İnsan diploid fibroblastları sınırlı bir çoğalma potansiyeline sahiptirler. Bu durum, hücre düzeyinde yaşlanma olayında gösterilmiş olup (340), oksidatif stresin bu olaydaki rolü konusunda da birçok araştırma yapılmıştır.

Murrell ve ark. (140) fibroblast hücrelerinin aktive fagositlere, lenfositlere ve endotel hücrelerine benzer şekilde, fakat daha düşük oranda olmak üzere reaktif oksijen bileşikleri, spesifik olarak da süperoksit radikali oluşturduklarını; bu endojen serbest radikallerin inhibisyonu halinde fibroblast kültürlerindeki hücre proliferasyonunun durduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, eksojen serbest radikallerin düşük konsantrasyonlarının fibroblast kültürlerinin proliferasyonunu stimüle ettiğini; yüksek konsantrasyonlarının ise, hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini timidin inkorporasyonu, hücre yoğunluğu, hücre büyüklüğünde azalma şeklindeki ölçümlerle saptamışlardır (140).

Nitekim özellikle onkoloji alanında yapılan çalışmaların bazılarında, bazı hücrelerin serbest oksijen radikallerine proliferasyon ile yanıt verdiği bildirilmiştir (140, 141). Bazı çalışmalarda ise reaktif oksijen bileşiklerinin hücre büyümesini engellediği bildirilmektedir (341). Bu çelişkili sonuçların bir nedeni dozun belirleyici bir faktör olmasıdır. HeLa hücreleri ile yapılan bir çalışmada da parakuatin, bifazik yanıtla sonuçlanan bir şekilde serbest radikal oluşumunu indüklediği gösterilmiştir. Parakuat düşük dozlarda hücre proliferasyonunda artışa neden olurken, yüksek konsantrasyonlarda hücre ölümünü indüklemektedir (342)

Daha önceki *in vivo* çalışmalarımızda, CPR'in sıçan karaciğer ve beyin doku homojenatlarında lipid peroksidasyonu düzeylerini önemli ölçüde arttırdığı ve glutatyon redoks statüsünde (% GSSG) önemli değişiklikler meydana getirdiği gösterilmiştir. Aynı koşullarda E vitamini veya allopurinol ile de koruyucu etki sağlanmıştır (343).

Bu çalışmada CPR'in oksidatif stres indükleyici etkisi, fibroblast kültürlerinin 48 saat süreyle 75 mg/l CPR'e maruz bırakılmalarını takiben lipid peroksidasyonunun ve antioksidan enzim aktivitelerinin ölçümü yoluyla incelenmiştir. Bu konsantrasyon, 48 saatte fibroblastların canlılık oranında % 50'den fazla azalmaya neden olan "kritik bir konsantrasyon" olarak seçilmiştir. Şekillerde de görüldüğü gibi bunun üzerideki konsantrasyonlarda aynı süre inkübasyonla sitotoksiste gözlenmemektedir. Bu gözlemler, Lawrence ve ark. (338, 339)'nın bulgu ve yorumları ve Murrell ve ark. (140)'nın bulguları dikkate alınarak şöyle yorumlanabilir: Eğer fibroblastlar proliferasyon için belli bir düzeyde serbest radikale gerek duyuyorsa ve CPR yalnızca mitokondriyal topoizomerez II benzeri aktivite ile etkileşerek mtDNA replikasyonunu bozmayıp, aynı zamanda sisteme serbest radikal veriyorsa, bu sistemde duyarlı bir dengenin belirli bir noktada kurulması söz konusu olabilir. Fibroblast bölünmesi için geçen sürenin 22 saat olduğu (344) gözönüne alınırsa, fibroblastların 50-75 mg/l konsantrasyonda CPR'e 48 saat süreyle maruz kalmaları esnasında hücreler 2 tam hücre bölünmesine uğrayacaklardır. Bu esnada, Lawrence ve ark. (339)'nın ileri sürdüğü şekilde hücresel mtDNA miktarında meydana gelen azalma, hücre büyümesini devam ettirmeye artık yeterli olmayan kritik bir noktaya ulaşabilir. Buna karşılık, daha yüksek konsantrasyonlardaki (≥ 100 mg/l) CPR'in indüklediği radikal düzeyi, mtDNA'daki azalmanın etkisini telafi edebildiği için de hücreler büyümeyi sürdürebiliyor olabilirler. Nitekim, maruziyet süresi 72 saate kadar uzadığında, CPR'nin 25 mg/l'nin üzerindeki konsantrasyonlarından sonra hücre canlılığının etkilenmeye başladığı ve doza bağımlı olarak azalmaya devam ettiği görülmüştür.

Tablo 3.1'de görülen sonuçlar, fibroblastların 75 mg/l CPR'e 48 saat süreyle maruziyetlerinin oksidatif stresi önemli ölçüde indüklediğini ve bunun sonucunda da lipid peroksidasyonu düzeyinde önemli bir artışa, hücre içi GSH düzeylerinde ise önemli bir azalmaya neden olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, CPR uygulanan sıçanlarla elde edilen daha önceki *in vivo* sonuçlarımız ile benzer olup, E vitamini ile elde edilen veriler ile de bir kez daha desteklenmektedir.

Bu çalışmada, zincir kırıcı antioksidan E vitamini, sadece sitotoksositeye karşı değil, aynı zamanda lipid peroksidasyona karşı da önemli ölçüde koruyucu etki göstermiştir. Sonuçlar, TBARS düzeylerinin E vitamini varlığında kontrol

değerlerinden de daha düşük düzeye indiğini göstermektedir. Ancak E vitamini ile hücre içi GSH düzeylerinde sağlanan artış önemli değildir. Bu bulgular E vitamininin biyolojik membranlarda bir zincir kırıcı antioksidan olarak koruyucu etkili olduğunun gösterildiği yayınların (203) yanı sıra, Bölüm 1.2.2.5’de ayrıntılı olarak sözü edildiği şekilde, hücre sel sinyal iletiminin modülasyonu üzerindeki etkileri nedeniyle hücre proliferasyonunu indükleyici etkisinin gösterildiği çalışma sonuçları ile de uyumludur (211). Diğer taraftan, literatürde bazı çelişkili veriler de bulunmasına karşın, E vitamini suplementasyonunun oksidatif stres sonucu gözlenen GSH ve antioksidan enzim aktivitelerindeki azalmayı önlediği gösterilmiştir (204). Ancak, bu konuya ilişkin bulgularımız, fibroblast hücrelerinde GSH’un bir kısmının hücrede E vitamini radikallerinin rejerasyonu sırasında kullanılmış olabileceği olasılığını da düşündürmektedir.

GSHPx’a ilişkin bulgularımız, özellikle yüksek varyasyon varlığı nedeniyle, kesin bir yorum olanağını vermemektedir. Katalaz aktivitesinde gözlenen azalma, istatistiksel olarak önemli olmasa da % 30 düzeyindedir ve CPR’e temas süresince hücrenin H₂O₂ uzaklaştırma kapasitesinin bozulduğunu ve enzimin muhtemelen meydana gelen serbest radikaller tarafından inhibe edildiğini düşündürmektedir. Katalazın süperoksit tarafından inhibe edildiği daha önce Kono and Fridovich (188) tarafından da gösterilmiştir.

Fibroblast hücrelerinin total SOD ve CuZn SOD aktiviteleri CPR varlığından etkilenmemiştir. Bununla birlikte, önemli düzeyde olmasa da, CPR uygulaması ile Mn SOD aktivitesinde bir azalma gözlenmiştir ve E vitamini ön uygulaması ile önemli ölçüde ($p < 0.05$) korunma sağlanmıştır. Bu bulgular, CPR’in indüklediği oksidatif stresin esas olarak fibroblast hücrelerinin mitokondriyal membranlarında hasara neden olduğunu düşündürmektedir. E vitamini ve CPR’in birlikte uygulanması, CuZn SOD aktivitesinde de önemli ölçüde bir azalmaya neden olmuş, buna karşılık tek başına CPR ile herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Sonuçlar, bu doz ve inkübasyon süresinin CPR’in antioksidan enzim düzeyleri üzerinde önemli herhangi bir değişikliğe neden olması için yeterli olmadığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak, fibroblast kültürlerinde elde edilen bu bulgular, CPR’in insan fibroblast hücre kültürlerinde konsantrasyon ve temas süresine bağlı olarak sitotoksik etkiler meydana getirdiğini göstermektedir. Hücrelerin lipid peroksidasyonu

düzeyinde yükselme olması ve GSH düzeylerinde azalmanın saptanması, CPR uygulaması ile oksidatif stresin indüklendiğini göstermektedir. UVA irradyasyonu olmaksızın elde edilen bu sonuçlar ve E vitamini ile görülen koruyucu etki, fibroblast hücre kültürlerinde görülen sitotoksitenin, CPR'in oksidatif stres indükleyici ve dolayısı ile serbest radikal meydana getirici etkileri ile ilişkili olduğu görüşünü güçlendirmektedir.

4.2. CPR'in Primer Astrosit Hücre Kültürlerindeki Etkileri

Kinolon grubu antibiyotiklerle tedavi sırasında gözlenen SSS'ne ilişkin yan etkiler, bu ilaçların bilinen en önemli komplikasyonlarından bir tanesidir. Terapötik koşullarda gözlenen SSS etkilerinin olası mekanizmalarının araştırıldığı çok sayıda toksikolojik ve biyokimyasal çalışma yapılmıştır. Ancak bugüne kadar kinolonların kullanımıyla meydana gelen SSS toksisitesine ilişkin mekanizmaların ne olduğu konusunda tam bir açıklık getirilmemiş, meydana gelen bu etkilerin temelindeki moleküler hedef veya reseptörler tam olarak aydınlatılmamıştır (44, 51).

Öncelikle başlangıç çalışmaları, bu etkilerin altında yatan mekanizmanın kinolonların GABA_A reseptörlerini inhibe etmesine bağlı olduğunu göstermiştir (42). Kinolonların *in vitro* GABA antagonistik etkilerinin, heterosiklik halkada 7 no'lu konumdaki süstitüente bağlı olduğu bildirilmiştir. Ancak, kinolonların GABA_A ve reseptörlerine bağlanma üzerindeki etkilerinin zayıf olduğu ve bu ilaçların epileptojenik etkilerini açıklayıcı nitelikte olmadığı da bildirilmiştir (44, 86). Halliwell ve ark. (92), ganglion nöronları ile yaptıkları hücre kültürü çalışmalarında, CPR'in GABA yanıtını % 50 oranında inhibe eden konsantrasyonunun 38 mg/l (= 100 µM)'ye karşılık geldiğini göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar, CPR'in bu etkisinin bifenil asetik asit veya fenbufen gibi bileşiklerle birlikte uygulandığında önemli ölçüde arttığını saptamışlardır. Davey ve ark. (89) ise sıçan vagus sinir hücreleri ile yaptıkları deneylerde GABA yanıtını % 50 oranında inhibe eden CPR konsantrasyonunun 95.25 mg/l (= 250 µM) olduğunu saptamışlardır.

Kinolonların eksitator potansiyellerinin araştırılması amacıyla sıçan hipokampus kesitlerinin CA1 bölgesinde, saha potansiyelinin elektrokimyasal yoldan belirlenmesi yoluyla yapılan çalışmalarda, bu ilaçların eksitotoksik özelliğe sahip

olduğu gösterilmiştir (93). Bu çalışmada NMDA reseptörleri, kinolonların SSS etkilerinin olası hedefi olarak tanımlanmıştır. Meydana gelen konvülsif etkinin NMDA reseptör antagonisti MK-801 ile önlenmesi de bu bulguyu destekleyici niteliktedir (93).

Literatürde, eksitator olayların reaktif oksijen bileşiklerinin oluşumunu stimüle edebildiği, reaktif oksijen bileşiklerinin de eksitator amino asit salımına neden olabildiğine ilişkin veriler bulunmakta ve bu iki olay arasındaki ilişkinin, Alzheimer ve Parkinson'dan konvülsiyonlara kadar SSS'de meydana gelen birçok hastalığın oluşum mekanizmasında rol oynadığına inanılmaktadır (287).

Bu bilgilerden hareketle çalışmanın bu bölümünde, CPR kullanımıyla SSS'de meydana gelen istenmeyen etkilerin, ilacın oksidatif stres indükleyici etkisi ile olası bağlantısı dikkate alınarak, sıçan beyin dokusundan hazırlanan primer astrosit hücreleri kullanılmıştır. Son yıllarda bu hücrelerin, mekanik veya kimyasal travma ile farklılaşmış hücre fonksiyonları konusunda araştırma yapmak için mükemmel bir model sistem olduğu ileri sürülmektedir (345). Ayrıca astrosit hücrelerinin, nörotoksik potansiyele sahip kimyasal maddelerin hücre tipine özgü etkilerinin değerlendirilmesinde yararlı bir araç oldukları da bildirilmektedir (345).

Primer astrosit hücreleri ile yaptığımız çalışmalarda, CPR'in 0.5-300 mg/l arasındaki 10 ayrı konsantrasyonu ile çalışılmıştır. CPR'in beyindeki terapötik konsantrasyonları, farklı doz uygulamalarını takiben 0.69-5 mg/l (89), BOS'a ulaşan konsantrasyonları ise 0.15-0.56 mg/l (12 saatlik aralıklarla 200 mg uygulamayı takiben 2-4 ve 10-20 gün sonra) olarak bildirilmiştir (16). Davey ve ark. (89) ise CPR ve sparfloksazinin beyin dokusundaki konsantrasyonlarının BOS'ya ulaşan konsantrasyonun 1.8-19.4 katı oranda olduğunu bildirmişlerdir. Naora ve ark. (17), renal ve hepatik bozukluğu olan hastalarda eliminasyonun gecikmesi nedeniyle plazma ve beyin CPR konsantrasyonunda artış olduğunu göstermişlerdir. Dodd ve ark. (88) ise, tekrarlanan dozda kullanımın duyarlı kişilerde SSS'de birikmeye neden olabileceğini ve sonuçta CPR'in SSS yan etkilerinin artacağını ileri sürmüşlerdir.

Primer astrosit kültürleri ile yaptığımız sitotoksikite deneylerinin sonuçları, CPR'in sitotoksik etkisinin, kullanılan ölçüm yöntemine bağlı olarak farklı olduğunu göstermiştir. Şekil 3.4'de gözlendiği gibi ölü ve hasarlı hücrelerin boyayı hücre içine alamaması ve dolayısıyla lizozomlarda selektif tutulmanın olamaması esasına dayalı

NR testi ile yapılan ölçümlerde ≥ 24 saat süreli CPR maruziyetinin sadece 200 ve 300 mg/l konsantrasyonlarda sitotoksik olduğu gösterilmiştir. Aktif oksidatif metabolizma varlığını gösteren, dolayısıyla metabolik olarak aktif hücreleri belirleyen bir yöntem olan MTT testi ile yapılan ölçümlerde ise, ≥ 24 saat süreli CPR maruziyetiyle > 50 mg/l konsantrasyonlarda önemli düzeyde sitotoksik etki meydana gelmektedir. Özellikle 72 ve 96 saatlik inkübasyon sürelerinde sitotoksitenin doza bağımlılığı net olarak görülmektedir. Sitotoksitenin süreye bağımlılığı ve 24 saatten sonra belirgin hale gelmesi, yukarıda sözü edilen literatür verileriyle ve fibroblastlarla elde edilen verilerle uyumludur. NR testi sonuçlarıyla MTT sonuçlarının farklı oluşu, Bölüm 1.3.4'de de değinildiği üzere, çoğu sitotoksik ajanın yaptığına benzer şekilde, CPR hasarının başlangıç yerinin hücre içinde olması ve bu nedenle de hücre membranı tamamen bozulmamış olsa bile hücrenin irreversibl olarak hasara uğramasına bağlanabilir. Bu durumda MTT yönteminin kullandığımız sistem için daha duyarlı bir yöntem olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca, bu veriler yukarıda değinildiği gibi, CPR'in mtDNA kaybı ile sonuçlanan mitokondriyal topoizomerez II-benzeri bir aktivite ile etkileşerek sitotoksik etkiye neden olduğu görüşünü destekleyecek şekilde, mitokondrilerin CPR için bir hedef organel olduğunu düşündürmektedir. Nitekim, Lawrence ve ark. (338, 339)'nın yukarıda da sözü edilen çalışmalarında, mtDNA'daki azalmaya paralel olarak mitokondrial sitokrom c oksidaz aktivitesi ve mitokondrial solunumunda azalma ve glikolizde artma şeklinde mitokondrial hasar tanımlanmıştır.

CPR'in astrosit kültürlerindeki sitotoksik etkisi, hücrelerin E vitamini ile veya SOD ile ön inkübasyonu ile azalmıştır. Bu azalma NR testiyle yapılan ölçümlerde önemli iken MTT testi ile yapılan ölçümde önemsiz bulunmuştur. Bu bulgular da MTT testinin sitotoksitenin belirlenmesi yönünden sahip olduğu duyarlılığın ve nisbi spesifitenin bir kanıtıdır. Muhtemelen E vitamini membranal hasarlara ilişkin koruyuculuğunu göstermekle birlikte mitokondriyal düzeydeki hücresel hasara karşı koruyucu etkinliğe sahip değildir. SOD için de benzer yorumlar yapılabilir ve biraz daha ileriye gidilerek burada gözlenen sitotoksik etkinin gelişiminde spesifik olarak süperoksit radikalının katkısının önemsiz olduğu söylenebilir.

CAT uygulaması da, yalnız başına veya SOD ile birlikte koruyucu bir etki göstermemiştir. Bu gözlem, CPR'in meydana getirdiği etkide H_2O_2 'in de belirgin bir

rolünün olmadığını göstermektedir. Bunlara karşılık TBARS materyal şeklinde ölçülen lipid peroksidasyonu düzeylerinin, oksidatif stres varlığını vurgulayacak şekilde, önemli ölçüde arttığı saptanmıştır. Total GSH düzeyleri ile CAT aktivitesi ise değişmemiştir. Bu son husus, astrosit hücrelerinin yüksek antioksidan kapasitesi ile de ilişkili olabilir (292, 297). Bu hücreler, sahip oldukları relatif olarak yüksek antioksidan miktarı ve GSH ile askorbatı rejenere etme kapasiteleri nedeniyle oksidatif strese karşı özellikle dayanıklıdırlar (282, 297, 298). Ayrıca astrositlerde GSH sentezinde anahtar rol oynayan γ -glutamilsistein sentaz aktivitesinin de nöronlar ile karşılaştırıldığında, 8 katı oranda yüksek olduğu gösterilmiştir (297). GSH beyindeki ana antioksidan bileşik olup (298), GSH miktarının, astrositlerin reaktif oksijen bileşiklerini süpürücü etkilerini tayin edici bir gösterge olduğu bildirilmektedir (298). Astrosit hücrelerinin beyin hacminin yaklaşık % 30'nu meydana getirdikleri ve astrosit kültürlerindeki GSH miktarının da yaklaşık olarak 6 mM olduğu ileri sürülmektedir (295). Astrositlerin reaktif oksijen bileşiklerini, özellikle de hidrojen peroksiti, inaktive etme yeteneklerinin yüksek oranda olması, bu hücrelerin eksojen oksidatif strese karşı nöronları koruyucu etkilerini açıklamaktadır (298).

4.3. CPR'in Mikrozoal İnkübasyonu ve ESR Sonuçları

Bu çalışmanın Bölüm 3.2.1.'de sunulan sonuçları göstermektedir ki sıçan karaciğer veya beyin mikrozomları CPR ile inkübe edildiğinde 6 çizgili bir ESR spektrumuna sahip bir 4-POBN/radikal adduct'ı oluşmaktadır. Aşırı ince yapı sabiteleri $a_N = 15.44$ G, $a_H^{\beta} = 2.86$ G olan bu adduct'ın oluşumunun CPR dozuna ve inkübasyon zamanına bağlı olarak doğrusal bir şekilde arttığı saptanmıştır.

ESR spektrumu ve aşırı ince yapı sabite değerleri bu adduct'ın bir lipid türevi radikal adduct'ı olduğunu düşündürmüştür.

Ancak hernekadar bu konuda CPR ile yapılmış herhangi bir çalışma yok ise de çeşitli biyolojik sistemlerde mikrozomal veya mikrozomal olmayan çalışmaların sonuçları da bu adduct'ın bir karbon merkezli adduct, bir alkil radikali (L') olması olasılığını artırmaktadır. Şöyle ki: Rosen grubunun (346, 347) lipooksijenaz ve linoleik asit sisteminde aşırı ince yapı sabiteleri $a_N = 15.8$ G, $a_H^{\beta} = 2.6$ G olarak

belirledikleri ve oksijen merkezli lipid türevi bir radikal olarak tanımladıkları 4-POBN/radikal adduct'ının karbon merkezli bir radikale ait olduğu daha sonraları Connors (241) tarafından gösterilmiştir. North ve ark. (348) 6 karbonlu bir PUFA ile zenginleştirdikleri hücre kültürlerinde FeSO_4 ile indüklenen radikalın 4-POBN adduct'ını $a_N = 15.66 \text{ G}$, $a_H^\beta = 2.6 \text{ G}$ değerleri ile saptamışlar ve karbon merkezli bir lipid türevi radikal olduğunu ileri sürmüşlerdir. Morel ve ark. (349) bir demir nitriloasetik asit (Fe-NTA) tuzu ile hepatositlerde indüklenen radikalın, 4-POBN adduct'ı için yine $a_N = 15.6 \text{ G}$, $a_H^\beta = 2.6 \text{ G}$ değerlerini bulmuş ve aynı yorumu yapmışlardır. Iwahashi ve ark.(240)'nın HPLC-ESR ve MS ile yaptığı analizlerin sonuçları ise bu yorumları doğrulayan kesin kanıtlar ortaya koymuştur.

Radikal adduct'ın oluşumu mikrozomal inkübasyon ortamında aktif mikrozomların varlığına, dolayısıyla sitokrom P-450'ye ve NADPH'ya bağımlılık göstermektedir. Ayrıca ölçülen radikal adduct'ın oluşumunun demir varlığına önemli ölçüde bağımlı olduğu saptanmıştır.

Sitokrom P-450 inhibitörü SKF 525A'nın radikal oluşumunu inhibe etmesi olayın sitokrom P-450'ye bağımlılığını, dolayısıyla CPR'in metabolizasyonunun gerekliliğini ortaya koyduğu gibi, ZnCl_2 ile elde edilen inhibisyon da NADPH'ya bağımlılığı desteklemektedir. Bölüm 1.4.'de değinildiği şekilde çinkonun mikrozomlarda NADPH ile indüklenen lipid peroksidasyonunu önlediği, NADPH-bağımlı sitokrom c redüktazı ve NADPH oksidasyonunu inhibe ettiği bildirilmektedir (300-305).

Lipid peroksidasyonunu lipid peroksitlerini toplamak suretiyle önlediği bilinen ve zincir kırıcı bir antioksidan olarak da tanımlanan E vitamini ve onun suda çözünen bir analogu olan Troloks ile sinyal oluşumunun azaltılması veya tamamen önlenmesi bulguları da CPR'in sıçan mikrozomal sistemindeki metabolizması esnasında lipid peroksidasyonuna neden olabilecek (başlangıç ve/veya ilerleme aşamalarında etkili olarak) reaktif oksijen bileşikleri ve/veya lipid türevi radikaller meydana geldiğini destekler niteliktedir.

Nitekim inkübasyonu takiben heriki mikrozomal sistemde ölçülen mikrozomal lipid peroksidasyonu düzeylerinin dozla ve inkübasyon süresiyle arttığı gözlenmiştir. Yine aynı koşullarda ölçülen total tiyol düzeylerinin de heriki mikrozomal sistemde önemli ölçüde azaldığının gözlenmiş olması da CPR'in

oksidatif stres yarattığının ve lipid peroksidasyonuna ve membran protein oksidasyonuna neden olduğunun açık kanıtlarıdır.

Diğer taraftan sinyal oluşumunun demir varlığı ile arttığı ve demir şelatörleri ile azaldığı gözlenmiş olan CPR'in oluşturduğu oksidatif stresin ve ölçülen protein ve lipid hasarı olaylarının temelinde demirin katkısının olduğu anlaşılmaktadır.

Mikrozomal sisteme CPR olmaksızın ilave edilen FeSO_4 , CPR ile aynı ESR spektrumuna sahip radikal oluşumuna neden olmuştur. Bu bulgu literatürde FeSO_4 dahil çeşitli demir bileşikleri ile indüklenen radikal oluşumuyla ve bu radikallerin ESR spektrumları ile uyumludur (348, 349). CPR'in FeSO_4 ile birlikte inkübe edilmesi halinde sinyal şiddetini arttırması ve spektrumun aynı kalması oluşan sinyalin demir aracılığında bir reaksiyonla indüklendiğini kanıtlamaktadır.

Sinyal oluşumunun iki farklı demir şelatörü ile önlenmesi demir aracılıklı bir reaksiyon varlığını gösterdiği gibi, DTPA'nın CPR ile birlikte uygulamada sinyal oluşumunu ilk 30 dk'da önemli ölçüde ve giderek (60. dk'da) tamamen önlenmesi de CPR'in indüklediği reaksiyonun demir aracılığında yürüyüp zamanla çoğalan bir radikal reaksiyonları zinciri olduğunun destekleyici bir kanıtı olarak değerlendirilebilir.

Diğer taraftan, doğrudan Fenton reaksiyonu ile oluşan $\text{OH}^\cdot$ radikalinin 4-POBN adduct'ı $a_N = 14.87$ G, $a_H^B = 1.71$ G ile gözlenebilmişken, ortama CPR ilavesi ESR spektrumunu ve sinyal şiddetini değiştirmemiştir. Bu bulgu CPR'in doğrudan $\text{OH}^\cdot$ oluşturu bir özelliğe sahip olmadığını düşündürebileceği gibi, doğrudan $\text{OH}^\cdot$ ile reaksiyona girip bir radikal meydana getirmediğine de kanıt sayılabilir.

Gerçi mikrozomal sistemde kullandığımız tüm tampon ve çözeltiler bir demir şelatörü olan Chelex-100 ile muamele edilerek demirden arındırılmaya çalışılmıştır. Ancak Chelex-100 dahil, şelate edici reçinelerin, reaktiflerin metal kontaminasyonunu uzaklaştırmadaki etkinliği, reaktif ile reçine arasında kompetitif bir dengenin kurulması esasına dayanır. Eğer tampon veya reaktifin kuvvetli şelate edici özelliği varsa veya şelate edici reçineden daha az metal içeriyorsa, fosfat ve Tris gibi tamponlarda sık rastlandığı üzere, Chelex-100 ile işlemiden sonra da önemli metal kontaminasyonu kalabildiği veya reçineden metal koparılmasının söz konusu olabildiği bildirilmiştir (350).

Alternatif olarak kullanılan DTPA veya DFO'in ise şelate ettikleri demiri inert formda değil, okside veya redükte formda verdikleri bildirilmektedir (350). Aynı şekilde gerek metalle katalize, gerekse metalden bağımsız proseslerin çalışması için bütünüyle uygun tampon sistemleri de tanımlanamamaktadır. Örneğin, fosfat tamponunun bir taraftan Fe^{++} 'nin oksidasyonunu katalize ettiği iddia edilmekte iken diğer taraftan, ESR sinyali vermediği için Tris tamponuna tercih edilmektedir (351). Tris, Mops ve Hepes gibi organik tamponların OH^- gibi reaktif ürünlerle reaksiyon vermesi nedeniyle serbest radikal araştırmalarında kullanımından kaçınılmaktadır.

Diğer taraftan, tampon veya çözeltilerin metal kontaminasyonu en aza indirilmiş olsa da, ya da ekstramembranal demir depo proteinlerinin kontaminasyonu azami ölçüde önlenmiş olsa da, endoplazmik retikulum membranlarından veziküller halinde elde edilen mikrozomlarda büyükçe miktarda *non-hem* demir bulunduğu gösterilmiştir (352). Buna "endojen demir" adı verilir. Dikkatle hazırlanan mikrozomlarda bile 4-5 nmol *non-hem* Fe^{+++} /mg protein bulunur (353). Mikrozomlar, eksojen *non-hem* demir ile katalizledikleri reaksiyonları, endojen demiri kullanarak da katalize edebilirler (352). Bu reaksiyonların en tipik örnekleri lipit peroksidasyonu ve çeşitli biyomoleküllerin (örneğin, askorbat, kateşolamin, tiyol gibi) oksidasyonu reaksiyonlarıdır. "Redoks reaksiyonları" da denilen bu reaksiyonlar demirin redüksiyon ve reoksidasyonu temeline dayanırlar.

Bilindiği gibi demir, lipit peroksidasyonunun hem başlatma, hem de genişleme/ilerleme dönemlerinde rol alır. Bu nedenle lipit peroksidasyonu için ya Fe^{++} 'ye, ya da Fe^{+++} ile birlikte bir redükleyicinin varlığına ihtiyaç vardır. Belirli bir Fe^{++}/Fe^{+++} oranının varlığı lipid peroksidasyonunu arttırır. Mikrozomal sistemlerde hem NADPH-sitokrom P-450 redüktazın, hem de sitokrom P-450'nin Fe^{+++} 'ü redüklediği gösterilmiştir (354). Bazı maddelerin neden olduğu lipit peroksidasyonu DFO ile inhibe edilebilir, fakat bir sitokrom P-450 zehiri olan CO'den etkilenmezler (355). Böyle durumlarda endojen demirin indirgenmesi NADPH-sitokrom P-450 redüktaz ile olmaktadır. NADPH-sitokrom P-450 redüktaz bağımlı demir redüksiyonu SOD varlığından da, CAT'dan da etkilenmez. Bu nedenle NADPH-redüktaz aracılında Fe^{++} salımı ile başlatılan lipit peroksidasyonlarında O_2^- ve H_2O_2 'e bağımlı OH^- 'nin katkısı yoktur. Dolayısıyla bu tip lipit peroksidasyonları ya

doğrudan LOOH-bağımlı mekanizmalarla ya da Fe-oksijen komplekslerine dayalı LOOH-bağımsız mekanizmalarla meydana gelir (355).

O halde, eğer mikrozomal lipid peroksidasyonu endojen demirin varlığı ve mobilizasyonu ve NADPH'in varlığı ve katkısıyla bu ölçüde ilişkili ise CPR'in oluşturduğu lipid peroksidasyonunda da maddenin demire olan afinitesinin önemli rolünün olması gerekir. Nitekim, CPR'in demir dahil çeşitli metal iyonlarıyla (Al, Ca, Mg, Zn, Cu, Mn gibi) kompleks oluşturduğu ve oluşan metal-CPR komplekslerinin CPR'in biyoyararlanımını önemli ölçüde azalttığı bilinmektedir (109-112). Bu etkileşmeler içinde en önemlisi, mineral-vitamin suplemanlarının kullanımıyla da ortaya çıkan demir etkileşmeleri olup, CPR biyoyararlanımının % 50'den fazla azalması ile sonuçlanır. *In vitro* deneylerde Fe^{++} ile karıştırılan CPR çözeltilerinde hızlı spektral değişiklikler olduğu ($t_{1/2} = 1.9$ dk), hızla Fe^{+++} meydana geldiği ve hızla Fe^{+++} -CPR kompleksinin olduğu gözlenmiştir (356). 4-keto ve 3-karboksil gruplarından şelasyonla meydana gelen kompleksin 3:1 (CPR: Fe^{+++}) oranında olduğu, bu esnada oksijen tüketiminin arttığı, ancak CPR yapısının 90 dk'ya kadar stabil kaldığı ve reaksiyonun pH= 6'da yürüdüğü bildirilmiştir. CPR-demir etkileşimi aşağıdaki reaksiyonla gösterilmektedir (356).



Bu verilerden CPR'in endojen Fe^{+++} 'ü şelasyonla bağlayabileceği ve NADPH-redüktaz aracılığıyla meydana gelecek Fe^{+++} redüksiyonunun lipid peroksidasyonunu kısırtabileceği öngörülebilir.

Diğer taraftan yapı-aktivite çalışmaları, CPR gibi az sayıda sübstitüenti olan kinolonlarda bu etkileşmelerin fazla olduğunu, 5 no'lu karbondan bir sübstitüent mevcudiyetinin bu kompleksin oluşumunu ve stabilitesini azalttığını göstermiştir (357).

Kinolonların yapısal özellikleri ile ilişkili bir diğer etkileşme, farmakodinamik tabiatla olup, sitokrom P-450 inhibisyonu yapması ile ilgilidir. CPR dahil bazı kinolonların metilksantinlerle önemli klinik etkileşmelere girdiği ve bunun bu ilaçların metabolizmasından sorumlu sitokrom P4501A2 izozimini kompetitif olarak inhibe etmeleriyle ilgili olduğu gösterilmiştir (115, 116). Genel bilgilerde de

söz edildiği gibi, CPR ayrıca CYP3A2 ve CYP3A4 izozimlerini de inhibe eder (120). Bu etkileşmelerin CPR'in (ve etkileşen diğer kinolonların) 7 piperazinil grubundaki 4' N atomundan sitokrom P450'nin katalitik merkezindeki Fe^{+++} 'e bağlanarak enzimi inhibe etmek şeklinde olduğu bildirilmektedir (357). Ayrıca 8 no'lu karbondaki bir sübstitüent bulunması halinde molekülün planaritesinin bozulduğu ve bunun da bu etkileşmeyi azalttığı gösterilmiştir (357). 4' N atomuna komşu bir karbonil grubunun varlığı (CPR'in M3 metabolitinde olduğu gibi), Fe^{+++} ile N arasındaki afiniteyi bozar, çünkü karbonil grubu elektron çekici etkisi nedeniyle azotun bazikliğini bozar ve bağlanmayı önler (357).

Dolayısıyla CPR planar komformasyonu ve 4' N grubunun mevcudiyetiyle sitokrom P450'nin aktif bölgesindeki Fe^{+++} 'ye bağlanma konusunda da önemli bir yatkınlığa sahiptir.

CPR'in iki farklı yoldan Fe^{+++} 'e olan afinitesini ortaya koyan bu veriler, "endojen" demiri mobilize etmek ve $Fe^{++} \rightarrow Fe^{+++}$ siklusunu kolaylaştırmak niteliklerine sahip olan bu maddenin, Fe-bağımlı bir lipit peroksidasyonu prosesini kışkırtmak konusundaki yatkınlığını da ortaya koymaktadır.

NADPH-bağımlı Fe^{++} salımının uygun Fe^{++}/Fe^{+++} oranı oluşturarak lipit peroksidasyonunu indüklediğine ilişkin kanıtlar, model sistemler kullanılarak elde edilmiştir. Kinon yapıları bir "redoks siklusu" ilacı olan adriyamisin (ADR) ve türevleri gerek antitümoral etkinliklerinin, gerekse güçlü kardiyotoksik etkilerinin temelinde radikal oluşumu ve lipit peroksidasyonu gelişmesinin olduğu gösterilmiş ilaçlar olarak bu konuya uygun modellerdir (358).

ADR, semikinon yapısı nedeniyle CPR'den farklıdır ama, çok iyi bir demir şelasyonu yapıcı etkisi nedeniyle CPR'e benzerlik gösterir, oksijen kullanarak Fe^{+++} otooksidasyonunu kolaylaştırır. Ayrıca lipit peroksidasyonu indükleyici etkisi itibarıyla CPR'e benzerlik gösterir ve çok yüksek toksisite gösterdiği kardiyak dokuda intramiyokardiyal MDA birikmesine ve antioksidan enzim azalmasına yol açar. Sonuç olarak ADR kardiyotoksitesinin nedeninin demire ve oksijen türevi radikallere bağımlı lipit peroksidasyonu olduğu kabul edilmektedir (359). Nitekim ADR, NADPH'lı mikrozomal ortamda NADPH oksidasyonunu, $O_2^{\cdot-}$ oluşumunu ve endojen demir mobilizasyonunu artırır. Bu mobilizasyonu SOD önlemez, dolayısıyla $Fe^{+++} \rightarrow Fe^{++}$ redüksiyonuna $O_2^{\cdot-}$ 'in katkısı çok azdır (353). Bu olay CAT

varlığından da etkilenmez, dolayısıyla H_2O_2 'nin de katkısı yoktur. Dolayısıyla ADR kendi redoks siklusu esnasında Fe^{+++} dönüşümünü hızlandırıp sürekli lipid peroksidasyonunu kışkırtır.

Bilindiği gibi mikrozomlardaki MFO reaksiyonları sitokrom P-450'nin, moleküler oksijenin ve NADHP redüksiyonunun eşlik ettiği reaksiyonlardır. NADPH-sitokrom P-450 redüktazın sitokrom P-450'ye elektron transfer etmesi ve substratın, *hem* proteininin oksijenlenmiş ara ürünlerine bağlanması şeklinde yürür. Dolayısıyla SKF gibi sitokrom P-450 inhibitörleri, NADPH-sitokrom P-450 redüktazın sitokrom P-450'den kenetsizleşmesi ve CO bu reaksiyonların inhibisyonuna neden olur. Şelatörlerin bu reaksiyonlara etkisi yoktur.

Bizim sistemimizde görülen durum CPR ile indüklenen radikal oluşumunun bir taraftan sitokrom P-450'ye bağımlılığını, dolayısıyla ana bileşiğin değil bir metabolitin oluşumunun gerekliliğini ortaya koymaktadır. Diğer taraftan NADPH'ya bağımlılık, uygun bir Fe^{++}/Fe^{+++} oranı oluşturacak şekilde Fe^{++} salımına olan bağımlılığı da göstermektedir. CPR'in Fe^{++} 'ye olan afinitesi ve hızla $Fe^{++} \rightarrow Fe^{+++}$ oluşumunu tetikleyip takiben Fe^{+++} kompleksleri oluşturması da hem *non-hem* endojen demir mobilizasyonunu sağlayabileceği, hem de uygun Fe^{++}/Fe^{+++} oranının oluşumuna katkıda bulunabildiği şeklinde yorumlanabilir.

Oluşan radikalın SOD ile önlenememesi, Fe^{+++} redüksiyonuna O_2^- 'in katkısının az olduğunu düşündürebileceği gibi, SOD fazlasının H_2O_2 ile Fe^{+++} 'nin nonenzimatik reaksiyonunu katalize edecek $OH^\cdot$ oluşumunu arttığına ilişkin literatür verileri ile uyumludur (168).

Diğer taraftan $FeSO_4$ ve DTPA/şelate demir ilavesinin indükleyici etkisine karşılık, DFO ve DTPA'nın bu radikal oluşumunu inhibe etmesi de temeldeki mekanizmada demirin rolü olduğunu vurgulamaktadır.

Endojen *non-hem* demirin mikrozomal ortamda serbest halde mi, yoksa fosfolipidlerin polar başlıklarına gevşek olarak bağlı halde mi bulunduğu ya da proteinlere sıkı olarak bağlı mı olduğu konusundaki soruların aydınlatılması için yapılan deneylerde DFO kullanılmıştır. Çünkü DFO proteine sıkıca bağlı demire bir afinite göstermezken, serbest veya gevşek bağlı demire karşı yarışmaya girer (360). Nitekim etanolle inkübasyondan önce DFO ile yıkanan mikrozomlarda, CO'e duyarız asetaldehit oluşumunun azaldığı saptanmıştır (360). Ancak yine de

mikrozomlarda DFO'in ulaşamadığı, Chelex-100 gibi diğer şelatörlerle de yıkanamayan bir demir mevcut olduğu, dolayısıyla bu demirin proteinlere bağlı olduğu ve bunun *in vivo hem-* demirinin sentezinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür (361). Nitekim mikrozomal ortamda demir bağlayan 2 proteinin varlığı da gösterilmiştir (352).

Sonuç olarak mikrozomal-endojen *non-hem* demirin bir artefakt ya da kontaminasyon olmayıp "gerçek" olduğu ve bunun *hem*-demirinin sentezinde, lipit peroksidasyonunda ve diğer oksidasyon reaksiyonlarında rol aldığı gösterilmiştir (352).

Tüm bu bilgiler, kullandığımız mikrozomal sistemde CPR'in rol aldığı reaksiyonun, demir aracılı bir lipit peroksidasyonunun başlatılıp genişletilmesi şeklinde yürüdüğünü ve sonuçta bir lipit türevi radikal oluşumunun gerçekleştiğini açıklayıcı ve destekleyici niteliktedir.

Bu sonuçları ve olası mekanizma olarak düşündüklerimizi daha ileri düzeyde irdeleyebilmek amacıyla, oluşan radikalın yapısının aydınlatılması ve mikrozomal ortamda oluşması olası diğer yapıların incelenmesi için mikrozomal karışımdan hazırlanan süpernatanda bir on-line HPLC-ESI MS sistemiyle analiz yapılmıştır.

4.4. HPLC-ESI MS Sonuçlarının Yorumu

Şekil 3.25 ve 3.26'da görülen MS spektrumları, mikrozomal inkübasyon ortamında molekül ağırlığı 263 olan bir adduct'ın oluştuğunu destekler niteliktedir. Söz konusu spektrumlarda moleküler iyon piki görülememekle birlikte, bu pikin 4-POBN'e karşılık geldiği düşünülen fragmanı, m/z 193 (192.9)'da gözlenmiştir.

4-POBN yapısındaki karbon-azot bağının kopmasına karşılık geldiği düşünülen bir fragman ise m/z 176.4'de gözlenebilmektedir. Ayrıca bu moleküler iyon (M-H)'un kütlesinden 4-POBN'e ait 194 Dalton'luk kütlenin çıkarılması halinde, tuzaklanmış radikal için 69 Dalton'luk bir kütle değeri ortaya çıkarmaktadır ki bu pentenil radikaline karşılık gelir. Dolayısıyla ESR analizlerinde gözlenen spektrumun "karbon merkezli lipit türevi bir radikal" adduct'ına ait olduğu görüşü bu verilerle desteklenmiş olmaktadır.

Nitekim böyle bir karbon merkezli radikal oluşumu Iwahashi ve ark. (240) tarafından soya lipooksijenazının linolenik asit ile reaksiyonu sonucunda HPLC-ESR ve MS analizleri ile gösterilmiştir. Aynı deneyler linoleik ve araşidonik asit ile yapıldığında oluşan radikalın pentil radikali olduğu moleküler iyon (M-H) pikinin m/z 264'de, fragmanların ise m/z 249, 235 ve 219 varlığının saptanmasıyla gösterilmiştir. Ayrıca 4-POBN'e ait (M-1)'i m/z 193'de gözleyen araştırmacılar, m/z 178'de gözledikleri pikin C-N bağının açılmasıyla meydana geldiğini saptamışlar ve tüm bu sonuçları, sentezini yaptıkları 4-POBN/pentil radikalının kütle spektrumlarıyla da doğrulamışlardır.

Aynı araştırmacılar linolenik asidin HPLC-ESR analizi sonucunda t_R 'leri birbirine çok yakın iki adduct'ın varlığını gözlemişler, MS analizinde de bu iki adduct'ın pentenil radikalının 2 izomeri olduğu sonucuna varmışlardır. Araştırmacıların pentenil radikal adduct'ları için gözledikleri iyon pikleri m/z 247, 233, 217, 176 ve ana iyon piki m/z 263'tür. Görüldüğü gibi 4-POBN pentenil radikal adduct'ı için bizim gözlediğimiz MS spektrumu ile bu çalışmanın sonuçları tamamen uyumludur.

Böylece çalışmamızda bir lipit-türevi ve karbon merkezli radikal oluşumunun varlığı hem ESR sonuçlarıyla, hem de HPLC-MS sonuçlarıyla gösterilmiş olmaktadır. Çeşitli araştırmacılar çok çeşitli biyolojik sistemlerde ve özellikle çeşitli mekanizmalarla lipit peroksidasyonuna neden olan maddelerin oluşturduğu radikaller üzerinde çalışmışlar, önceleri sadece ESR teknikleri kullanarak yapılan çalışmalarda, oksijen merkezli bir lipit peroksit radikalının olduğu görüşü hakim olmuştur (346, 347). Ancak daha sonra yapılan doğrulayıcı deneyler, meydana gelen radikalın özellikle oksijen yokluğunda da oluştuğunun gösterilmesi nedeniyle araştırmacıları, radikalın oksijen merkezli değil, karbon merkezli olması gerektiği sonucuna götürmüştür (241). Yukarıda ayrıntılı olarak sözü edilen çalışma (240) ve izleyen çalışmalarda kullanılan HPLC-ESI MS veya HPLC-MS teknikleri daha doğru ve kesin sonuçların elde edilmesine neden olmuştur (346-349).

Karbon merkezli lipit- türevi radikallerin, spesifik olarak da pentil radikalının oluşum mekanizması şöyle özetlenebilir: Bölüm 1.2.1.5.1.'de ayrıntılı olarak değinildiği üzere, lipit peroksidasyonu esnasında oluşan yağ asiti hidroperoksitlerinin (LOOH) tek-elektron redüksiyonu ile yağ asiti alkoksil radikalleri (LO $\cdot$) oluşur.

Bunların β -açılması ile aldehitler ve etil, pentil veya pentenil gibi alkil radikalleri ($L\cdot$ veya $RCH_2\cdot$) oluşur:



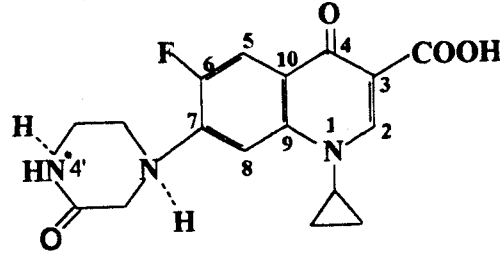
Alkil radikali çevredeki moleküllerden birinden hidrojen çekerek etan ve pentan gibi, esasen lipid peroksidasyonunun tayininde duyarlı göstergeler olarak ölçülen hidrokarbonlar oluştururlar. Dolayısıyla lipid peroksidasyonu tayinlerinde pentan veya etan prekürsörü olarak bunların radikallerinin ölçümü de önerilmektedir (240).

Sonuç olarak CPR'in mikrozomal ortamda lipid peroksidasyonuna neden olduğunun ve bunun da bir pentenil radikali oluşumuyla belirlendiğinin ifade edilebileceği bir data geliştirilmiştir.

Benzer sonuçlara hücre kültürlerinde ulaşamayışımızın ve hatta hiçbir ESR sinyali alamayışımızın nedeni ise büyük bir olasılıkla çalışma tekniğinden kaynaklanmaktadır. Hücre süspansiyonunun lize edilerek veya ekstre edilerek kullanılması halinde hücre içinde oluşan radikallere ulaşım adduct oluşturabilmenin ve izleyebilmenin olanaklı olduğu, benzer yöntemleri kullanan araştırmacıların sonuçlarından anlaşılmaktadır (348, 349).

HPLC-ESI MS analizleri sonucunda elde edilen diğer bir bulgu ise, m/z 346'da gözlediğimiz ve bir dihidrooksosiprofloksazin olduğunu öncelikle m/z 211 (210.5)'de şiddetli bir pik şeklinde gözlenen fragman pikinden ve ilave olarak m/z 315 ve m/z 309 piklerinden hareketle düşündüğümüz (M-H) moleküler iyon pikidir.

Bu bileşiğin piperazinil halkasının 1' ve 4' konumlarındaki azot gruplarının protonlanması ile oluştuğu ve 4' N'unun bir radikal yapısında olduğu düşünülmektedir. Gerçekte her iki N üzerinde de radikal oluşumu olası görülmekle birlikte, radikalin 4' konumundaki N üzerinde oluşması olasılığının fazla olduğu, bunun nedeninin de bir karbonil grubuna komşu olan 4' N'unun rezonans yoluyla kararlı hale gelmek istemesi olduğu söylenebilir ve hipotetik formül aşağıdaki gibi gösterilebilir:



**Dihidrookso-CPR
(MA:347)**

Bu konuda aydınlatıcı ve daha kesin sonuçlara götürücü çalışmalara ihtiyaç olduğu muhakkaktır. Ancak bu çalışmada elde ettiğimiz veriler, CPR metabolizması esnasında en yüksek oranda oluştuğu ve biyolojik olarak aktif olduğu bildirilen M3 metabolitinin çalışma koşullarımızdaki mikrozomal ortamda radikal yapılı bir dihidrookso türevinin oluştuğunu düşündürmektedir. Bu olası metabolitin bir radikal olarak reaktivitesi ve stabilitesi konusunda spekülasyonun ötesinde bir yorum yapmak güç olmakla birlikte, lipid peroksidasyonunun başlatılmasına ve/veya değiştirilmesine katkısının olabileceğini düşünmek mümkündür.

Sonuç olarak, bu çalışmada GABA antagonistik etkinliğe sahip bir antibiyotik olarak tanımlanan CPR'in oksidatif stres indükleyici potansiyele sahip olduğu ve önemli ölçüde lipid peroksidasyonu yaptığı fibroblast ve astrosit kültürlerinde gösterilmiş; mikrozomal düzeyde de lipid peroksidasyonu yaptığı belirlenmiş ve bu etkisinin metabolik aktivasyon sonucu meydana geldiği, NADPH varlığına ihtiyaç gösterdiği ve demir bağımlı olduğu saptanmış; mikrozomal ortamda CPR'in indüklediği bir radikalın varlığı ESR-Spin tuzağı tekniği ile belirlenmiş ve LC-ES MS analizi ile bu radikalın lipid türevi karbon merkezli bir radikal olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuçlarımız, mikrozomal sistemde azot radikali yapısında bir metabolit oluşumuna da işaret eder niteliktedir.

Çalışmanın nihai yorumu şöyle yapılabilir:

CPR fibroblast ve astrosit hücre kültürlerinde oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu indükleyici etkilere sahiptir. Muhtemelen mitokondrial düzeyde bir zıt etkileşimi de içeren bu etkiler E vitamini ile önlenebilir.

CPR mikrozomal düzeyde de oksidatif stres indükleyicidir ve neden olduğu mikrozomal lipit peroksidasyonunun muhtemelen hem başlatma, hem genişleme fazlarında rol alır. Bu etki muhtemelen demir şelate edici etkisiyle, dolayısıyla mikrozomal membranlardaki endojen *non-hem* demiri mobilize etmesi ile ilgilidir. Ancak tetikleyici ajan ana molekül olmayıp metabolizasyonla oluşan bir ara üründür.

CPR'in metabolizmasının daha ayrıntılı olarak incelenmesi ve olası reaktif metabolitlerin veya ara ürünlerinin yapı ve kinetiklerinin aydınlatılması için daha ileri çalışmalara gereksinim vardır. Bu çalışmada elde edilen verilerin bu kapsamdaki ileri çalışmalar ile geliştirilmesiyle, CPR'in zıt etkilerinin, özellikle de SSS'deki istenmeyen etki mekanizmalarının anlaşılmasına katkıda bulunabilecek önemli adımlar atılabilir.



KAYNAKLAR

1. Neu, H. C. (1987) Clinical use of quinolones. *Lancet* 5, 1319-1322.
2. Hooper, D. C., Wolfson, J. S. (1991) Fluoroquinolone antimicrobial agents. *N. Engl. J. Med.* 324, 384-394.
3. Weber, A. H., Scribner, R. K., Marks, M. I. (1985) In vitro activity of ciprofloxacin against pediatric pathogens. *Chemother.* 31, 456-465.
4. Wise, R., Andrews, J. M., Edwards, L. J. (1983) In vitro activity of Bay 09867, a new quinolone derivative, compared with those of other antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23, 559-564.
5. Barry, A. L., Jones, R. N., Thornsberry, C. (1984) Antibacterial activities of ciprofloxacin, norfloxacin, oxolinic acid, cinoxacin, and nalidixic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25, 633-637.
6. Schluter, G. (1989) Ciprofloxacin: Toxicologic evaluation of additional safety data. *Am. J. Med.* 87 (Suppl. 5A) 37S-39S.
7. Davis, R., Markham, A., Balfour, J. A. (1996) Ciprofloxacin: An updated review of its pharmacology, therapeutic efficacy and tolerability. *Drugs* 51, 1019-1074.
8. Vance-Bryan, K., Guay, D.R.P., Roetschafer, J. C. (1990) Clinical pharmacokinetics of ciprofloxacin. *Clin. Pharmacokinet.* 19, 434-461.
9. Turnidge, J. (1999) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Drugs*, 58, 29-36.
10. Naora, K., Katagiri, Y., Ichikawa, N., Hayashibara, M., Iwamoto, K. (1990) A possible reduction in the renal clearance of ciprofloxacin by fenbufen in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 42, 704-707.
11. Naora, K., Katagiri, Y., Ichikawa, N., Hayashibara, M., Iwamoto, K. (1991) Enhanced entry of ciprofloxacin into the rat central nervous system induced by fenbufen. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258, 1033-1037.
12. Siefert, H.M., Maruhn, D., Maul, W., Förster, D., Ritter, W. (1986) Pharmacokinetics of ciprofloxacin. 1st Communication: Absorption, concentrations in plasma, metabolism and excretion after a single administration of ciprofloxacin in albino rats and rhesus monkeys. *Arzneim.-Forsch/Drug Res.* 36, 1496-1502.
13. Bergan, T. (1990) Extravascular penetration of ciprofloxacin. A review. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 13, 103-114.
14. Campoli-Richards, D.M., Monk, J.P., Price, A., Berfield, P., Todd, P.A., Word, A. (1988) Ciprofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs* 35, 373-447.
15. Valainis, G., Thomas, D., Pankey, G. (1986) Penetration of ciprofloxacin into cerebrospinal fluid. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 5, 207-209.

16. Scheld, W. M. (1989) Quinolone therapy for infections of the central nervous system. *Rev. Infect. Dis.* 11 (Suppl. 5) S1194-S1202.
17. Naora, K., Ichikawa, N., Hirano, H., Iwamoto, K. (1999) Distribution of ciprofloxacin into the central nervous system in rats with acute renal or hepatic failure. *J. Pharm. Pharmacol.* 51, 609-616.
18. Ooie, T., Suzuki, H., Terasaki, T., Sugiyama, Y. (1996) Kinetics of quinolone antibiotics in rats: efflux from cerebrospinal fluid to the circulation. *Pharm. Res.* 13, 1065-1068.
19. Ooie, T., Terasaki, T., Suzuki, H., Sugiyama, Y. (1997) Kinetic evidence for active efflux transport across the blood-brain barrier of quinolone antibiotics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283, 293-304.
20. Drusano, G.L., Weir, M., Forrest, A., Plaisance, K., Emm, T., Standiford, H.C. (1987) Pharmacokinetics of intravenously administered ciprofloxacin in patients with various degrees of renal function. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 860-864.
21. Viell, B., Krause, B., Vestweber, K.-H., Schaaf, S., Scholl, H. (1992) Transintestinal elimination of ciprofloxacin in humans-concomitant assessment of its metabolites in serum, ileum and colon. *Infection* 20, 324-327.
22. Gau, W., Kurz, J., Petersen, U., Ploschke, H. J., Wuensche, C. (1986) Isolation and structural elucidation of urinary metabolites of ciprofloxacin. *Arzneim.-Forsch/Drug Res.* 36, 1545-1549.
23. Sörgel, F. (1989) Metabolism of gyrase inhibitors. *Rev. Infect Dis.* 11 (Suppl. 5), S1119-S1129.
24. Beerman, D., Scholl, H., Wingender, W., Förster, D., Beubler, E., Kukowetz, W. (1985) Metabolism of ciprofloxacin in man. "Proceedings from the First International Ciprofloxacin Workshop" (Ed. Neu, H.C., Weuta, H.) da. s. 141-146.
25. Jaehde, U., Sörgel, F., Schunack, W. (1987) Influence of lipophilicity on pharmacokinetics of quinolones (abstract no. M-46). "FASEB Journal of the 71st Annual Meeting" de. Federation of American Societies for Experimental Biology, Washington D.C.
26. Gruber, G., Jaehde, U., Sörgel, F., HeiB, R., Schunack, W. (1988) Relationship between the chemical structure and the HPLC capacity factor of gyrase inhibitors and their metabolites in different methanol-waters eluents. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie.* 330, 388-389.
27. Grözinger, K. H., Beermann, D., Elsas, S. (1989) Biliary kinetics of ciprofloxacin in humans *Rev. Infect. Dis.* 11 (Suppl 5), S1132.
28. Sörgel, F., Kinzig, M. (1993) Pharmacokinetics of gyrase inhibitors, part 2: renal and hepatic elimination pathways and drug interactions. *Am. J. Med.* 94, (Suppl 3A), 56S-69S.
29. Lode, H., Hoffken, G., Boeckk, M., Deppermann, N., Borner, K., Koeppe, P. (1990) Quinolone pharmacokinetics and metabolism. *J. Antimicrob. Chemother.* 26 (Suppl. B) 41-49.

30. Shah, A., Lettieri, J., Blum, R., Millikin, S., Sica, D., Heller, A. H. (1996) Pharmacokinetics of intravenous ciprofloxacin in normal and renally impaired subjects. *J. Antimicrob. Chemother.* 38, 103-116.
31. Zeiler, H.J., Petersen, U., Gau, W., Ploschke, H.J. (1987) Antibacterial activity of the metabolites of ciprofloxacin and its significance in the bioassay. *Arzneim.-Forsch/Drug Res.* 37, 131-134.
32. Blondeau, J. (1999) Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review. *Clinical Therapeutics* 21, 3-40.
33. Chen, C.-R., Malik, M., Snyder, M., Drlica, K. (1996) DNA Gyrase and topoisomerase IV and the bacterial chromosome: Quinolone-induced DNA cleavage. *J. Mol. Biol.* 258, 627-637.
34. Khodursky, A. B., Cozzarelli, N. R. (1998) The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J. Biol. Chem.* 273, 27668-27677.
35. Hooper, D. C. (1999) Mode of action of fluoroquinolones. *Drugs* 58 (suppl 2) 6-10.
36. Blanche, F., Cameron, B., Bernard, F. X. (1996) Differential behaviours of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* type II DNA topoisomerases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2714-2720.
37. Preheim, L. C., Cuevas, T. A., Roccaforta, J. S. (1986) Ciprofloxacin and antacids. *Lancet* ii: 42.
38. Reynolds, J. E. F. (1996). "Martindale The Extra Pharmacopoeia". The Pharmaceutical Press, London.
39. Kucers, A., Crowe, S. M., Grayson, M. L., Hoy, J. F. (1997) "The Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, and Antiviral Drugs", Butterworth-Heinemann, Oxford.
40. Esposito, S., Miniero, M., Barba, D., Sagnelli, E. (1989) Pharmacokinetics of ciprofloxacin in impaired liver function. *International J. Clin. Pharmacol. Res.* 9, 37.
41. Christ, W. (1990) Central nervous system toxicity of quinolones: human and animal findings. *J. Antimicrob. Chemother.* 26 (Supp. B), 219-225.
42. Christ, W., Lehnert, T., Ulbrich, B. (1988) Specific toxicologic aspects of the quinolones. *Rev. Infect. Dis.* 10 (Supp. 1), S141-S146.
43. Ingham, B., Brentnall, D. W., Dale, E. A., McFadzean, J. A. (1977) Arthropathy induced by antibacterial fused N-alkyl-4-pyridone-carboxylic acid. *Toxicol. Lett.* 1, 21-26.
44. Takayama, S., Hirohashi, M., Kato, M., Shimada, H. (1995) Toxicity of quinolone antimicrobial agents. *J. Toxicol. Environ. Health* 45, 1-45.
45. Gough, A.W., Kasali, O.B., Sigler, R.E., Baragi, V. (1992) Quinolone-arthropathy-acute toxicity to immature articular cartilage. *Toxicol. Pathol.* 20, 436- 449.

46. Kato, M., Onodera, T. (1988) Morphological investigation of cavity formation in articular cartilage induced by ofloxacin in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 11, 110-119.
47. Burkhardt, J. E., Walterspiel, J. N., Schaad, U. B. (1997) Quinolone arthropathy in animals versus children. *Clin. Infect. Dis.* 25, 1196-1204.
48. Hayem, G., Petit, P.X., Levacher, M., Gaudin, C., Kahn, M.F., Pocidalo, J.J. (1994) Cytofluorometric analysis of chondrotoxicity of fluoroquinolone antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 243- 247.
49. Stahlman, R., Forster, C., Van Sickle, D. (1993) Quinolone in children. Are concerns over arthropathy justified? *Drug Safety* 9, 397- 403.
50. Stahlmann, R., Kühner, S., Shakibaei, M., Flores, J., Vormann, J., van Sickle, D.C. (2000) Effects of magnesium deficiency on joint cartilage in immature beagle dogs: immunochemistry, electron microscopy, and mineral concentrations. *Arch. Toxicol.* 73, 573- 580.
51. Stahlmann, R., Lode, H. (1999) Toxicity of Quinolones. *Drugs* 58 (Suppl. 2) 37-42.
52. Kashida, Y., Kato, M. (1997) Toxic effects of quinolone antibacterial agents on the musculoskeletal system in juvenile rats. *Toxicol. Pathol.* 25, 6, 635-643.
53. Shakibaei, M., Pfister, K., Schwabe, R. (1999) Effects of ofloxacin on the ultrastructure of Achilles tendon in rats. *Drugs* 58 (Suppl. 2) 390- 392.
54. Rahm, V., Schacht, P. (1989) Safety of ciprofloxacin. A review. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl* 60, 120- 128.
55. Stahlmann, R., Schwabe, R. (1997) Safety profile of grepafloxacin as compared with other fluoroquinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* 40 (Suppl. A), 83-92.
56. Bednarczyk, E.M., Green, J.A., Nelson, A.D., Leisure, G.A., Little, D., Adler, L.P., Berridge, M.S., Panacek, E.A., Miraldi, F.D. (1991) Comparison of the effect of temafloxacin, ciprofloxacin, or placebo on cerebral blood flow, glucose and oxygen metabolism in healthy subjects by means of positron emission tomography. *Clin. Pharmacol. Ther.* 50, 165-171.
57. Yamamoto, K., Yoshimura, K., Matsushita, A. (1980) General pharmacology of cinoxacin. 1. Effects on the central nervous system. *Chemotherapy* 28 (S-4), 530-549.
58. Matsuno, Y., Taira, N., Kadokawa, T. (1984) General pharmacologic properties of AT-2266. *Chemotherapy* 32 (S-3), 164-184.
59. Dodo, M., Nakatsuji, K., Miura, Y., Hori, M., Furukawa, K., Oka, M., Ito, T. (1991) General pharmacology of sparfloxacin, a new quinolone antibacterial agent. (1) Effects on the central nervous system. *Ohyo Yakuri* 41, 147-155.
60. Takasuna, K., Kasai, Y., Usui, C., Takahashi, M., Hirohashi, M., Tamura, K., Takayama, S. (1992) General pharmacology of the new quinolone antibacterial agent levofloxacin. *Arzneim.-Forsch./ Drug Res.* 42, 408-418.

61. Nozaki, M., Tanaka, K., Takeda, N., Niwa, M., Kohno, K., Kobayashi, M., Tsurumi, K. (1991) Neuro excitability of sparfloxacin, a novel quinolone antibacterial drug, in combination with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Chemotherapy* 39, 167-174.
62. McQueen, C.A., Way, B.M., Queener, S.M., Schluter, G., Williams, G.A. (1991) Study of potential in vitro and in vivo genotoxicity in hepatocytes of quinolone antibiotics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 111, 255-262.
63. Lefever, P.A., Ashby, B.J. (1985) Investigations into the reported ability of cimetidine to initiate UDS in rat hepatocyte primary culture. *Environ. Mutagen.* 7, 833-837.
64. Mukherjee, A., Sen, S., Agarwal, K. (1993) Ciprofloxacin: mammalian DNA topoisomerase type poison in vivo. *Mutat. Res.* 301, 87-92.
65. Shimada, H., Ebine, Y., Kurosawa, Y., Arauchi, T. (1984) Mutagenicity studies of DL-8280, a new antibacterial drug. *Chemotherapy* 32 (S-1), 1162-1170.
66. Jick, S.S., Jick, H., Dean, A.D. (1993) A follow-up safety study of ciprofloxacin users. *Pharmacother.* 13, 461-464.
67. Chodosh, S., Lakshminarayan, S., Swarz, H. (1998) Efficacy and safety of a 10-day course of 400 or 600 milligrams of grepafloxacin once daily for treatment of acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis: comparison with a 10-day course of 500 milligrams of ciprofloxacin twice daily. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42, 114-120.
68. Schroeder, D.J., Hart, L.L., Lynch, S.S. (1994) Potential quinolone-induced cartilage toxicity in children. *Ann. Pharmacother.* 28, 336-338.
69. Schaad, U.B., Wedgwood- Krucko, J., Guenin, K., Buehlmann, U., Kraemer, R. (1989) Antipseudomonal therapy in cystic fibrosis: aztreonam and amikacin versus ceftazidime and amikacin administered intravenously followed by oral ciprofloxacin. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8, 858-865.
70. Schaad, U.B., Stoupis, C., Wedgwood, J., Tschaepeler, H., Vock, P. (1991) Clinical, radiologic and magnetic resonance monitoring for skeletal toxicity in pediatric patients with cystic fibrosis receiving a three- month course of ciprofloxacin. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 10, 723-729.
71. Jafri, H.S., McCracken, G.H. (1999) Fluoroquinolones in pediatrics. *Drugs* 58 (Suppl 2), 43-48.
72. Lang, R., Goshen, S., Raas- Rothschild, A., Raz, A., Ophir, D., Wolach, B. (1992) Oral ciprofloxacin in the management of chronic suppurative otitis media without cholesteatoma in children: preliminary experience in 21 children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 11, 925-929.
73. Cheesbrough, J.S., Mwema, F.I., Green, S.D.R., Tillson, G.S. (1991) Quinolones in children with invasive salmonellosis. *Lancet* 338, 127.
74. Samuelson, W.M., Pleasant, R.A., Whitaker, M.S. (1993) Arthropathy secondary to ciprofloxacin in an adult cystic fibrosis patient. *Ann. Pharmacother.* 27, 302-303.

75. Gonski, P.N. (1991) Ciprofloxacin-induced renal failure in an elderly patient. *Med. J. Aust.* 154, 638-639.
76. Boelaert, J., de Jaegere, P.P., Daneels, R. (1986) Case report of renal failure during norfloxacin therapy. *Clin. Nephrol.* 25, 272.
77. Ortiz, A., Plaza, J.J., Egido, J. (1992) Ciprofloxacin associated tubulointerstitial nephritis with linear tubular basement membrane deposits. *Nephron* 60, 248.
78. Lucena, M.I., Marquez, M., Velasco, J. L., Andradde, R. J. (1995) Acute renal failure attributable to ciprofloxacin in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Intern. Med.* 155, 114-115.
79. Thorsteinsson, S.B., Bergan, T., Oddsdottir, S. (1986) Crystalluria and ciprofloxacin, influence of urinary pH and hydration. *Chemotherapy* 33, 448.
80. George, M.J., Dew, R., Daly, J.S. (1991) Acute renal failure after an overdose of ciprofloxacin. *Arch. Intern. Med.* 151, 620.
81. Lo, W. K., Rolston, K. V., Rubenstein, E. B. (1993) Ciprofloxacin-induced nephrotoxicity in patients with cancer. *Arch. Intern. Med.* 153, 1258.
82. Unseld, E., Ziegler, G., Gemeinhardt, A., Janssen, U., Klotz, U. (1990) Possible interaction of fluoroquinolones with the benzodiazepine GABA_A receptor complex. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 30, 63-70.
83. Winrow, A.P., Supramaniam, G. (1990) Benign intracranial hypertension after ciprofloxacin administration. *Arch. Dis. Child.* 65, 1165-1166.
84. Dimpfel, W., Spüler, M., Dalhoff, A., Hoffman, W., Schlüter, G. (1991) Hippocampal activity in the presence of quinolones and fenbufen in vitro. *Antimicrob. Agent Chemother.* 35, 1142-1146.
85. De Sarro, A., Trimarchi, G.R., Ammendola, D., De Sarro, G. (1992) Repeated treatment with quinolones potentiates the seizures induced by aminophylline in genetically epilepsy-prone rats. *Gen. Pharmacol.* 23, 853-859.
86. Akahane, K., Sekiguchi, M., Une, T., Osada, Y. (1989) Structure- epileptogenicity relationship of quinolones with special reference to their interaction with gamma-aminobutyric acid receptor sites. *Antimicrob. Agent Ther.* 32, 190-194.
87. Tsuji, A., sato, H., Kume, Y., Tamai, I., Okezaki, E., Nagato, O., Kato, H. (1988) Inhibitory effects of quinolone antibacterial agents on gamma-aminobutyric acid receptor sites in rat brain membranes. *Antimicrob. Agent Ther.* 32, 190-194.
88. Dodd, P. R., Davies, L. P., Watson, W. E. J., Nielsen, B., Dyer, J. A., Wong, L. S., Johnston, G. A. R. (1989) Neurochemical studies on quinolone antibiotics: effects on glutamate, GABA and adenosine systems in mammalian CNS. *Pharmacol. Toxicol.* 64, 404-411.
89. Davey, P. G., Charter, M., Kelly, S., Varma, T. R. K., Jacobson, I., Freeman, A., Precious, E., Lambert, J. (1994) Ciprofloxacin and sparfloxacin penetration into human

- brain tissue and their activity as antagonists of GABA_A receptor of rat vagus nerve. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 1356-1362.
90. Halliwell, R.F., Davey, P.G., Lambert, J.J. (1993) Antagonism of GABA_A receptors by 4-quinolones. *J Antimicrob. Chemother.* 31, 457-462.
 91. Williams, P.D., Helton, D.R. (1991) The proconvulsive activity of quinolone antibiotics in an animal model. *Toxicol. Lett.* 58, 23-28.
 92. Halliwell, R. F., Davey, P. G., Lambert, J. J. (1991) The effects of quinolones and NSAIDs upon GABA-evoked currents recorded from rat dorsal root ganglion neurones. *J Antimicrob. Chemother.* 27, 209-218.
 93. Schmuck, G., Schürmann, A., Schlüter, G. (1998) Determination of the excitatory potencies of fluoroquinolones in the central nervous system by an in vitro model. *Antimicrob Agents Chemother.* 42, 1831-1836.
 94. Martinez, L. J., Sik, R. K., Chignell, C. F. (1998) Fluoroquinolone antimicrobials: singlet oxygen, superoxide and phototoxicity. *Photochem. Photobiol.* 67, 399-403.
 95. Lietman, P.S. (1995) Fluoroquinolone toxicities. *Drugs* 49 (Suppl 2), 159-163.
 96. Domagala, J.M. (1994) Structure- activity and structure- side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *J. Antimicrob. Chemother.* 33, 685-706.
 97. VonKeutz, E., Schlüter, G., (1999) Preclinical safety evaluation of moxifloxacin, a novel fluoroquinolone. *J. Antimicrob. Chemother.* 43 (Suppl. B), 91-100.
 98. Ferguson, J., Johnson, B. E. (1990) Ciprofloxacin-induced photosensitivity: in vitro and in vivo studies. *Br. J. Dermatol.* 123, 9-20.
 99. Wagai N, Tawara K. (1991) Quinolone antibacterial-agent-induced cutaneous phototoxicity: ear swelling reactions in Balb/c mice. *Toxicol. Lett.* 58, 215-223.
 100. Wagai N, Tawara K. (1991) Important role of oxygen metabolites in quinolone antibacterial agent-induced cutaneous phototoxicity in mice. *Arch. Toxicol.* 65, 495-499.
 101. Wagai N, Yamaguchi, F., Sekiguchi, M., Tawara, K. (1990) Phototoxic potential of quinolone antibacterial agents in Balb/c mice. *Toxicol. Lett.* 54, 299- 306.
 102. Wagai N, Tawara K. (1992) Possible reasons for difference in phototoxic potential of 5-quinolone antibacterial agents: generation of toxic oxygen. *Free Rad. Res. Commun.* 17, 387-398.
 103. Wagai N, Tawara K. (1992) Possible direct role of reactive oxygens in the cause of cutaneous phototoxicity induced by five quinolones in mice. *Arch. Toxicology* 66, 392-397.
 104. Philipps, G., Johnson, B. E., Ferguson, J. (1990) The loss of antibiotic activity of ciprofloxacin by photodegradation. *J. Antimicrob. Chemother.* 26, 783-789.

105. Villeneuve, J.-P., Davies, C., Cote, J. (1995) Suspected ciprofloxacin-induced hepatotoxicity. *Ann. Pharmacother.* 29, 257-259.
106. Grassmick, B.K., Lehr, V.T., Sundareson, A.S. (1992) Fulminant hepatic failure possibly related to ciprofloxacin. *Ann. Pharmacother.* 26, 636-638.
107. Jimenez-Valera, M., Sampedro, A., Moreno, E., Ruiz-Bravo, A. (1995) Modification of immune response in mice by ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39, 150-154.
108. Riesbeck, K., Forsgren, A., Henriksson, A., Bredberg, A. (1998) Ciprofloxacin induces an immunomodulatory stress response in human T lymphocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1923-1930.
109. Höffken, G., Borner, K., Glatzel, P.D. (1985) Reduced enteral absorption of ciprofloxacin in the presence of antacids. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 4, 345.
110. Frost, R.W., Lasseter, K.C., Noe, A.J. (1992) Effects of aluminium hydroxide and calcium carbonate antacids on the bioavailability of ciprofloxacin. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 36, 830.
111. Radanadt, J.M., Marchbanks, C.R., Dudley, M.N. (1992) Interactions of fluoroquinolones with other drugs: mechanisms, variability, clinical significance and management. *Clin. Infect. Dis.* 14, 272-284.
112. Nix, D.E. (1993) Drug-drug interactions with fluoroquinolone antimicrobial agents. "Quinolone Antimicrobial Agents" (Ed. D.C. Hooper ve J.S. Wolfson,)da, American Society of Microbiology, Washington D.C. s. 245.
113. Schulz, T. G., Stahlman, R., Edwards, R. J., Debri, K., Davies, D. S., Neubert, D. (1995) Enoxacin is an inducer of CYP1A2 in rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 50, 1517-1520.
114. Harder, S., Fuhr, U., Staib, H. A., (1989) Ciprofloxacin-caffeine: A drug interaction established using in vivo and in vitro investigations. *Am. J. Med.* 87 (Suppl. 5A), 89S-91S.
115. Fuhr, U., Anders, E.-M., Mahr, G., Sörgel, F., Staib, A. H. (1992) Inhibitory potency of quinolone antibacterial agents against cytochrome P450IA2 activity in vivo and in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 942-948.
116. Fuhr, U., Doehmer, J., Battula, N., Wölfel, C., Kudla, C., Keita, Y., Staib, A. H. (1991) Biotransformation of caffeine and theophylline in mammalian cell lines genetically engineered for expression of single cytochrome P450 isoforms. 43, 225-235.
117. Butler, M. A., Iwasaki, M., Guengerich, F. P., Kadlubar, F. K. (1989) Human cytochrome P450_{PA} (P-450IA2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7696-7700.
118. Arnaud, M. J., Welsch, C. (1982) Theophylline and caffeine metabolism in man. "Theophylline and other methylxanthines" (Ed. N. Rietbrock, B. G. Woodcock, A. H. Staib)de, Vieweg, Braunschweig and Weisbaden, s. 135-148.

119. Valero, F., Torre, R., Segura, J. (1991) Selective in vitro inhibition of hepatic oxidative metabolism by quinolones: 7-ethoxyresorufin and caffeine as model substrates. *J. Pharm. Pharmacol.* 43, 17-21.
120. McLellan, R. A., Drobitch, R. K., Monshouwer, M., Renton, K. W. (1996) Fluoroquinolone antibiotics inhibit cytochrome P450-mediated microsomal drug metabolism in rat and human. *Drug Metab. Dispos.* 24, 1134-1138.
121. Combalbert, J., Fabre, I., Fabre, G. (1989) Metabolism of cyclosporin A. IV. Purification and identification of the rifampicin inducible human liver cytochrome P450 (cyclosporine A oxidase) as a product of P450III_A gene subfamily. *Drug Metab. Dispos.* 17, 197-207.
122. McLellan, R. A., Drobitch, R. K., McLellan, P. D., Acott, P. D., Crocker, J. F. S., Renton, K. W. (1995) Norfloxacin interferes with cyclosporine A disposition in pediatric patients undergoing renal transplantation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 58, 322-327.
123. Jolson, H. M., Tanner, L. A., Green, L. (1991) Adverse reaction reporting of interaction between warfarin and fluoroquinolones. *Arch. Intern. Med.* 151, 1003.
124. Sies, H. (1991) Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91 (Suppl. 3C), 3S-31S.
125. Ballantyne, B., Marrs, T. C., Syversen, T. (1999) "General and Applied Toxicology", Grove's Dictionaries Inc., Oxford.
126. Halliwell, B. (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* 16, 33-50.
127. Aruoma, O. I. (1993) "Free Radicals in Tropical Diseases", Horwood Academic Publishers, Switzerland.
128. Halliwell, B., (1991) Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human diseases. *Am. J. Med.* 91 (Suppl. 3C), 14-22.
129. Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59, 527-605.
130. Babior, B.M., Woodman, R.C. (1990) Chronic granulomatous disease. *Semin. Hematol.* 27, 247-259.
131. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989) "Free Radicals in Biology and Medicine", Oxford, Clarendon.
132. Van den Bosch, H., Schutgens, R.B.H., Wanders, J.A., Tager, J.M. (1992) Biochemistry of peroxisomes. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 157-197.
133. Freeman, B. A., Crapo, J. D. (1982) Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47, 412-426.
134. Alho, H., Leinonen, J. (1999) Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods. *Meth. Enzymol.* 299, 3-6.

135. Mantle, D., Preedy, V.R. (1999) Free radicals as mediators of alcohol toxicity. *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.* 18, 235-252.
136. Mason, R. P., Kalyanaraman, B., Tainer, B. E., Eling, T. E. (1980) A carbon-centered free radical intermediate in the prostaglandin synthase oxidation of arachidonic acid: spin trapping and oxygen uptake studies. *J. Biol. Chem.* 255, 5019-5022.
137. Baccarani, D. P. (1978) Coupled oxidation of NADPH with thiols at neutral pH. *Arch. Biochem. Biophys.* 191, 351-357.
138. Fridovich, I. (1986) Superoxide dismutases. *Meth. Enzymol.* 58, 61-97.
139. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth. Enzymol.* 186, 1-85.
140. Murrell, G. A., Francis, M. J. O., Bromley, L. (1990) Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem. J.* 265, 659-665.
141. Meier, B., Radeke, H., Selle, S., Raspe, H. H., Sies, G., Resch, K., Habermehl, G. G. (1990) Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to treatment with synovial fluids from patients suffering from arthritis. *Free Rad. Res. Commun.* 8, 149-160.
142. Halliwell, B. (1989) Superoxide, iron, vascular endothelium, and reperfusion injury. *Free Rad. Res. Commun.* 5, 315-318.
143. Fridovich, I. (1989) Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J. Biol. Chem.* 264, 7761-7764.
144. Imlay, J., Fridovich, I. (1991) Assays of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266, 6957-6965.
145. Moody, C.S., Hassan, H.M. (1982) Mutagenicity of oxygen free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2855-2859.
146. Imlay, J.A., Linn, S. (1987) Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 169, 2967-2976.
147. Stauffer, C.E., Eton, D. (1969) The effect on subtilisin activity of oxidizing a methionine residue. *J. Biol. Chem.* 244, 5333-5338.
148. Cochrane, C. G. (1991) Mechanisms of oxidant injury of cells. *Mol. Aspect Med.* 12, 137-147.
149. Pryor, W. A. (1986) Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu. Rev. Physiol.* 48, 657-667.
150. Smith, C., Mitchinson, M.J., Aruoma, O.I., Halliwell, B. (1992) Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. *Biochem. J.* 286, 901-905.
151. Bolann, B.J., Ulvik, R.J. (1990) On the limited ability of superoxide to release iron from ferritin. *Eur. J. Biochem.* 193, 899-904.

152. Flint, D.H., Tuminello, J.F., Emptage, M.H. (1993) The inactivation of Fe S cluster containing hydrolyases by superoxide. *J. Biol. Chem.* 268, 22369-22376.
153. Harel, S., Salan, M.A., Kanner, J.(1988) Iron release from metmyoglobin, methaemoglobin and cytochrome *c* by a system generating hydrogen peroxyde. *Free Rad. Res. Commun.* 5, 11-19.
154. Swain, J.A., Darley-USmar, V. Gutteridge, J.M.C. (1994) Peroxynitrite releases copper from caeruloplasmin: implications for atherosclerosis. *FEBS Lett.* 342, 49-52.
155. Slater, T. F. (1984) Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.* 222, 1-15.
156. Aruoma, O. I., Halliwell, B., Gajewski, E., Dizdaroglu, M. (1991) Copper ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 273, 601-604.
157. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., Witztum, J. L. (1989) Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Eng. J. Med.* 320, 915-924.
158. Horton, A. A., Fairhurst, S. (1987) Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 18, 27-79.
159. Farber, J. L., Kyle, M. E., Coleman, J. B. (1990) Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest.* 62, 670-679.
160. Gutteridge, J. M. C., Halliwell, B. (1990) The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS* 15, 129-135.
161. Poli, G., Dianzani, M. U., Cheeseman, K. H., Slater, T. F., Long, J., Esterbauer, H. (1985) Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspensions. *Biochem. J.* 227, 629-630.
162. Basaga, H. S. (1990) Biochemical aspects of free radicals. *Biochem. Cell. Biol.* 68, 989-998.
163. Benedetti, A., Comporti, M., Fulcieri, R., Esterbauer, H. (1984) Cytotoxic aldehydes originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. Identification of 4,5 dihydroxydecenal. *Biochim. Biophys. Acta* 792, 172-181.
164. Turner, S. R., Campbell, J. A., Lynn, W. S. (1975) Polymorphonuclear leucocyte chemotaxis toward oxidized lipid components of cell membranes. *J. Exp. Med.* 141, 1437-1441.
165. Bird, R. P., Draper, h. H. (1980) Effect of malondialdehyde and acetaldehyde on cultured mammalian cells: growth, morphology and synthesis of macromolecules. *J. Toxicol. Environ. Health.* 6, 811-815.
166. Shamberger, R. J., Andreone, T. L., Willis, C. E. (1974) Antioxidants and cancer. IV. Initiating activity of malondialdehyde as a carcinogen. *J. Natl. Cancer Inst.* 53, 1771-1773.

167. McCord, J. M., Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
168. Warner, B. B., Wispe, J. R. (1997) Transgenic models for the study of lung injury and repair. "Lung Biology in Health and Disease" (Ed. Linda Biadasz) de, Marcel Dekker, New York, s. 139-158.
169. Hassan, H.M. (1997) Cytotoxicity of oxyradicals and evaluation of superoxide dismutases. "Lung Biology in Health and Disease" (Ed. Linda Biadasz) de, Marcel Dekker, New York, s. 27-39.
170. Fridovich, I. (1986) Antioxidant defenses in the lung. *Annu. Rev. Physiol.* 48, 693-702.
171. Blech, D.M., Borders, C.L. (1983) Hydroperoxide anion, HO_2^- , is an affinity reagent for the inactivation of yeast Cu,ZnSOD: modification of one histidine per subunit. *Arch. Biochem. Biophys.* 224, 579-586.
172. Beyer, W.F., Fridovich, I. (1987) Effect of hydrogen peroxide on the iron-containing superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26, 1251-1257.
173. Fridovich, I. (1987) The biology of oxygen radicals. *Science*. 201, 875-877.
174. Keyer, K., Gort, A.S., Imlay, J. A. (1995) Superoxide and production of oxidative DNA damage. *J. Bacteriol.* 177, 6782-6790.
175. Hassan, H.M., Fridovich, I. (1979) Intracellular production of superoxide radical and hydrogenperoxide by redox active compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* 196, 385-395.
176. Taylor, A. (1992) Role of nutrients in delaying cataracts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 669, 111-114.
177. Ames, B. N., Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. (1993) Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7915-7922.
178. Flohe, L., Ötting, F. (1984) Superoxide dismutase assays. *Meth. Enzymol.* 105, 93-113.
179. Warner, H. R. (1994) Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free Rad. Biol. Med.* 17, 249-258.
180. Sunde, R.A. (1990) Molecular biology of selenoproteins. *Annu. Rev. Nutr.* 10, 451-474.
181. Takahashi, K.T., Avissar, N., Within, J., Cohen, H. (1987) Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 256, 677-686.
182. Chu, F.F., Doroshov, J.H., Esworthy, S. (1993) Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J. Biol. Chem.* 268, 2571-2576.

183. Flohe, L., Loschen, G., Günzler, W.A., Eichele, E. (1972) Glutathione peroxidase, V. The kinetic mechanism. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 987-999.
184. Sunde, R. A., Hoekstra, W. G. (1980) Structure, sythesis and funtion of glutathione peroxidase. *Nutr. Rev.* 38, 266-273.
185. Flohe, L., Günzler, W.A. (1974) "Glutathione", Thieme, Stuttgart.
186. Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius- Flohe, R., Aumann, K.D., Roveri, A., Schomburg, D., Flohe, L. (1995) Diversity of glutathione peroxidases. *Meth. Enzymol.* 252, 38-53.
187. Mueller, S., Riedel, H.-D., Stremmel, W. (1997) Determination of catalase activity at physiological hydogen peroxide concentrations. *Anal. Chem.* 245, 55-60.
188. Kono. Y., Fridovich, I. (1982) Superoxide radicals inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257, 5751-5754.
189. Meister, A., Anderson, M.E. (1983) Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 711-760.
190. Forman, H. J., Liu, R-M. (1997) Glutathione cycling in oxidative stress. "Lung Biology in Health and Disease" (Ed. Linda Biadasz)'de, Marcel Dekker, New York, s. 99-121.
191. Meister, A. (1991) Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal: Applications in research and therapy. *Pharmacol. Ther.* 51, 155-194.
192. Brigelius, R., Muckel, C., Akerboom, T.P.M., Sies, H. (1983) Identification and quantitation of glutathione and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem. Pharmacol.* 32, 2529-2534.
193. Loeb, G.A., Skelton, D.C., Forman, H.J. (1989) Dependence of mixed sulfide formation in alveolar macrophages upon production of oxidized glutathione: effect of selenium depletion. *Biochem. Pharmacol.* 38, 3119-3121.
194. Simplicio, P.D., Rossi, R. (1994) The time- course of mixed disulfide formation between GSH and proteins in rat blood after oxidative stress with tert-butyl hydroperoxide. *Biochim. Biophys. Acta.* 1199, 245-252.
195. Dekant, W., Wamvakas, S., Koob, M., Kochling, A., Kanhai, W., Muller, D. (1990) A mechanism of haloalkene-induced renal carcinogenesis. *Environ. Health Perspec.* 88, 107-110.
196. Robison, T.W., Zhou, H., Forman, H.J. (1995) Modulation of ADP- stimulated inositol phosphate metabolism in rat alveolar macrophages by oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 318, 215-220.
197. Ochi, T. (1993) Mechanism for the changes in levels of glutathione upon exposure of cultured mammalian cells to tertiary-buthylhydroperoxide and diamide. *Arch. Toxicol.* 67, 401-410.
198. Evans, H. M., Bishop, K. S. (1922) On the existence of hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* 56, 650-651.

199. Traber, M.G., Sies, H. (1996) Vitamin E in Humans: Demand and delivery. *Annu. Rev. Nutr.* 16, 321-347.
200. Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L.-A. (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31, 671-701.
201. Meydani, M. (1995) Fat soluble vitamins. Vitamin E. *The Lancet* 345, 21, 170-175.
202. Brigelius-Flohe, R., Traber, M.G. (1999) Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* 13, 1145-1155.
203. Burton, G.W., Ingold, K.U. (1989) Vitamin E as in vitro and in vivo antioxidant. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 570, 7-22.
204. Reed, D. J. (1990) Glutathione: Toxicological implications *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 603-631
205. Chaudiere, J., Ferrari-Iliou, R. (1999) Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem. Toxicol.* 37, 949-962.
206. Lucky, J.A. (1972) Functional and structural aspects of biological membranes: A suggested structural role of vitamin E in the control of membrane permeability and stability. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 203, 4-11.
207. Hall, E.D., Braughler, J.M., McCall, J.M. (1992) Antioxidant effects in brain and spinal cord injury. *J. Neurotrauma.* 9 (Suppl. 1P), S165-172.
208. Willmore, L.J., Triggs, W.J., Gray, J.D. (1986) The role iron- induced hippocampal peroxidation in acute epileptogenesis. *Brain Res.* 382, 422-426.
209. Ray, S. D., Fariss, M. W. (1994) Role of cellular energy status in tocopheryl hemisuccinate cytoprotection against ethyl methane sulfonate-induced toxicity. *Arch. Biochem. Biophys.* 311, 180-190.
210. Kuo, J-H., Chen, H.-W., Lii, C.-K. (1997) Vitamin E protection of cell morphology under oxidative stress is related to cytoskeletal proteins in rat hepatocytes. *Arch. Toxicol.* 71, 231-237.
211. Azzi, A., Boscobonik, D., Hensey, C. (1992) The protein kinase C family. *Eur. J. Biochem.* 208, 547-557.
212. Chan, A. C. (1998) Vitamin E and atherosclerosis. *J. Nutr.* 128, 1593-1596.
213. Chan, A. C., Wagner, M., Kennedy, C., Mroske, C., Proulx, P., Laneuville, O., Tran, K., Choy, P., Choy, P.C. (1998) Vitamin E up-regulates phospholipase A2, arachidonic acid release and cyclooxygenase in endothelial cells. *Akt. Ernahr. Med.* 23, 1-8.
214. Traber, M.G., Kayden, H. J. (1993) Inherited defects in vitamin E transport in humans and animals. "Vitamin E: its usefulness in health and curing diseases" (Ed. M. Momo, H. Nakamura, A.T., Diplock)'da, Karger, Basel,.

215. Fehér, J., Csomos, G., Vereckei, A. (1987) "Free Radical Reactions in Medicine", Springer-Verlag, Berlin.
216. Kaur, H., Kalyanaraman, B. (1996) Invited review. A water soluble C-nitroso-aromatic spin-trap-3,5-dibromo-4-nitrosobenzenesulphonic acid. 'The Perkins spin-trap' Free Rad. Res. 24, 409-420.
217. Jackson, M.J., Jones, D.A., Edwards, R.H.T. (1984) Techniques for studying free radical damage in muscular dystrophy. Med. Biol. 62, 135-138.
218. Reznick, A. Z., Packer, L. (1994) Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. Meth. Enzymol. 233, 346-357.
219. Davies M. J. (1987) Applications of electron spin resonance spectroscopy to the identification of radicals produced during lipid peroxidation. Chem. Phys. Lipids 44, 149-173.
220. Finkelstein, E., Rosen, G. M., Rauckman, E. J. (1980) Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical: Practical aspects. Arch. Biochem. Biophys. 200, 1-16.
221. Bolton, J. R., Borg, D. C., Swartz, H. M. (1972) "Biological Applications of Electron Spin Resonance", Wiley-Interscience, New York.
222. Thornalley, P. J. (1986) Theory and biological applications of the electron spin resonance technique of spin trapping. Life Chemistry Reports 4, 57-112.
223. Yamazaki, I., Mason, H. S., Piette, L. (1960) Identification, by electron paramagnetic resonance spectroscopy, of free radicals generated from substrates by peroxidase. J. Biol Chem. 235, 2444-2449.
224. Ohnishi, T., Yamazaki, H., Iyanagi, T., Nakamura, T., Yamazaki, I. (1969) One electron- transfer reactions in biochemical systems. II The reaction of free radicals formed in the enzymic oxidation. Biochim. Biophys. Acta 172, 357-369.
225. Stone, T.J, Buckman, T., Nordio, P.L, McConnell, H. M. (1965) Spin labelled biomolecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 1010-1017.
226. Dorfman, L. M., Adams, G. E. (1973) Reactivity of The Hydroxyl Radical In Aqueous Solutions. NSRDS, National Bureau of Standards, Washington D. C.
227. West, P. R., Harman, L. S., Josephy, P. D., Mason, R. P. (1984) Acetaminophen: enzymatic formation of a transient phenoxyl free radical. Biochem. Pharmacol. 33, 2933-2936.
228. Mackor, A., Wajer, Th. A. J. W., de Boer, Th. J., Van Voorst, J. D. W. (1966) The formation of nitroxides by photolysis of nitroso compounds as studies by electron spin resonance. Tetrahedron Lett. 19, 2115-2123.
229. Sang, H., Janzen, E.G., Poyer, J.L., McCay, P.B. (1997) The structure of free radical metabolites detected by EPR spin trapping and mass spectroscopy from halocarbons in rat liver microsomes. Free Rad. Biol. Med. 22, 843-852.

230. Janzen, E. G. (1971) Spin trapping. *Accounts in Chemical Res.* 4, 31-40.
231. Tomasi, A., Iannone, A. (1993) ESR spin trapping artifacts in biological model systems. "Biological Magnetic Resonance" (Ed. L. J. Berliner, J. Reuber)'da, Plenum Press, New York.
232. Janzen, E. G., Evans, C.A., Liu, J. I. P. (1973) Factors influencing hyperfine splitting in the ESR spectra of five-membered ring nitroxides. *J. Magnetic. Res.* 9, 513-516.
233. Rosen, G. M., Finkelstein, E. (1985) Use of spin traps in biological systems. *Adv. Free Rad. Biol. Med.* 1, 345-375.
234. Roubaud, V., Sankarapandi, S., Kuppusamy, P., Tordo, P., Zweier, J.L. (1998) Quantitative measurement of superoxide generation and oxygen consumption from leukocytes using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Anal. Biochem.* 257, 210-217.
235. Rashba-Step, J., Turro, N.J., Cederbaum, A.I. (1993) Increased NADPH- and NADH-dependent production of superoxide and hydroxyl radical by microsomes after chronic ethanol treatment. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 401-408.
236. Albano, E., Tomasi, A., Gorla-Gatti, L., Iannone, A. (1989) Free radical activation of monomethyl and dimethyl hydrazines in isolated hepatocytes and liver microsomes. *Free Rad. Biol. Med.* 6, 3-8.
237. Albano, E., Cheeseman, K. H., Tomasi, A., Carini, R., Dianzani, M. U., Slater, T. F. (1986) Effect of spin traps in isolated rat hepatocytes and liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 35, 3955-3960.
238. Mottley, C., Connor, H. D., Mason, R. P. (1986) [¹⁷O] Oxygen hyperfine structure for the hydroxyl and superoxide radical adducts of the spin traps DMPO, PBN, 4-POBN. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141, 622-628.
239. Walling, C. (1963) Chemistry of the organic peroxides. *Radiat. Res. Suppl.* 3, 3-16.
240. Iwahashi, H., Albro, P.W., McGown, S. R., Tomer, K. B., Mason, R. P. (1991) Isolation and identification of (-(4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butyl nitron radical adducts formed by the decomposition of the hydroperoxides of linoleic acid, linolenic acid, and arachidonic acid by soybean lipoxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 285, 172-180.
241. Connor, H.D., Fischer, V., Mason, R.P. (1986) A search for oxygen- centered free radicals in the lipoxygenase/ linoleic acid system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141, 614- 621.
242. Rumyantseva, G.V., Kennedy, C. H., mason, R. P. (1991) Trace metal-catalyzed reactions in the microsomal metabolism of alkyl hydrazines to carbon-centered free radicals. *J. Biol. Chem.* 266, 21422-21427.
243. Albano, E., Tomasi, A., Goira-Gatti, L., Poli, G., Vannini, V., Dianzani, M.U. (1987) Free radical metabolism of alcohols by rat liver microsomes. *Free Rad. Res. Commun.* 3, 243-249.

244. Esterbauer, H., Lang, J., Zdravce, S., Slater, T. F. (1984) Detection of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Meth. Enzymol.* 105, 319-328.
245. Martin, J. P. (1990) Assays for superoxide dismutase based on autoxidation of hematoxylin. *Meth. Enzymol.* 186, 220-227.
246. Wendel, A. (1981) Glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol.* 77, 325-332.
247. Flohe, L., Günzler, W. A. (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol.* 105, 114-121.
248. Tappel, A. L. (1981) Glutathione peroxidase and hydroperoxidases. *Meth. Enzymol.* 77, 224-231.
249. Percy, E. A. (1984) Catalase: an old enzyme with a new role. *Can. J. Biol. Cell. Biol.* 62, 1006-1014.
250. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 105, 121-125.
251. Akerboom, T. P. M., Sies, H. (1981) Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77, 373-382.
252. Jocelyn, P. C. (1972) "Biochemistry of the SH Group. Assay of Thiols and Disulphides". Academic Press. London, s. 137-162.
253. Sedlak, J., Lindsay, R. H. (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25, 192-205.
254. Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archs. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
255. Owens, C.W. I., Belcher, R.V. (1965) A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. *Biochem. J.* 94, 705-711.
256. Tietze, E. (1969) Enzymic method quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27, 502-522.
257. Griffith, O. W. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106, 207-212.
258. Ridnour, L. A., Winters, R. A., Ercal, N., Spitz, D. R. (1999) Measurement of glutathione, glutathione disulfide, and other thiols in mammalian cell and tissue homogenates using high-performance liquid chromatography separation of N(1-pyrenyl)maleimide derivatives. *Meth. Enzymol.* 299, 258-267.
259. Weltman, J. K., Szaro, R. P., Frackelton, A. R. Jr, Dowben, R. M., Bunting, J. R., Cathou, B. E. (1973) N-(3-pyrene)maleimide: a long lifetime fluorescent sulfhydryl reagent. *J Biol Chem.* 248, 3173-3177.
260. Popov, I., Lewin, G. (1999) Antioxidative homeostasis: Characterization by means of chemiluminescent technique. *Meth. Enzymol.* 300, 437-441.

261. Popov, I. N., Lewin, G. (1994) Photochemiluminescent detection of antiradical activity: II. Testing of nonenzymic water-soluble antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* 17, 267.
262. Papanga, G., Wiseman, S., Van Nielen, W., Tijburg, L., Chowienczyk, P., Rice-Evans, C. (1995) Total antioxidant activity of low density lipoproteins and the relationship with alpha-tocopherol status. *FEBS Lett.* 365, 164-166.
263. Davis, J. M. (1994). "Basic Cell Culture. A Practical Approach", Oxford University Press, Oxford.
264. Gey, G. O., Coffman, W. D., Kubicek, M. T. (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12, 364-366.
265. Butler, M., Dawson, M. (1992). "Cell Culture. Labfax", Blackwell, Oxford.
266. Adolphe, M., Guilbuzo, A., Marano, F. (1995) "Techniques en Toxicologie Cellulaire In Vitro Methodes et Applications", Les Editions INSERM, Paris.
267. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65, 55-63.
268. Borenfreund, E., Puerner, J. A. (1985) Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24, 119-124.
269. Summerbell, D., Lewis, J. H., Wolpert, L. (1973) Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature* 244, 492-496.
270. Lewis, J., Chevalier, A., Kienny, M., Wolpert, L. (1981) Muscle nerve branches do not develop in chick wings devoid of muscle. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 64, 211-232.
271. Sengel, P. (1976). "Morphogenesis of Skin", Cambridge University Press, Cambridge.
272. Fries, K. M., Blieden, T., Looney, R. J., Sempowski, G.D., Silvera, M. R., Wills, R. A., Phipps, R. P. (1994) Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulation in fibrosis. *Clin. Immun. Immunopathol.* 72, 283-292.
273. Postlethwaite, A. E., Kang, A. H. (1988) Fibroblast chemoattractants. *Meth. Enzymol.* 163, 694-715.
274. Wach, F., Hein, R., Adelmann-Grill, B.C., Krieg, T. (1987) Inhibition of fibroblast chemotaxis by superoxide dismutase. *Eur. J. Cell Biol.* 44, 124-127.
275. Phipps, R. P., Penney, D. P., Keng, P., Quill, H., Paxhia, A., Derdak, S., Felch, M. E. (1989) Characterization of two major populations of lung fibroblasts: Distinguishing morphology and discordant display of Thy-1 and class II MHC. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1, 65-74.
276. Mollenhaur, J., Bayreuther, K. (1986) Donor-age-related changes in the morphology, growth potential, and collagen biosynthesis in rat fibroblast subpopulations in vitro. *Differentiation* 32, 165-172.

277. Phipps, R. P., Borello, M. A., Blieden, T. M. (1997) Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues. *J. Periodontal Res.* 32, 1 Pt 2, 159-165.
278. LeRoy, E. C. (1972) Connective tissue synthesis by scleroderma skin fibroblasts in culture. *J. Exp. Med.* 135, 1351-1362.
279. MacKenna, D., Summerour, S. R., Villarreal, F. J. (2000) Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc. Res.* 46, 257-263.
280. Bishop, C.T., Mirza, Z., Crapo, J.D., Freeman, B.A. (1985) Free radical damage to cultured porcine aortic endothelial cells and lung fibroblasts: modulation by culture conditions. *In Vitro* 21, 229-236.
281. Yohn, J. J., norris, D. A., Yrastorza, D. G., Buno, I. J., Leff, J. A., Hake, S. S., Repine, J. E. (1991) Disparate antioxidant enzyme activities in cultured human cutaneous fibroblasts, keratinocytes, and melanocytes. 97, 405-409.
282. Peuchen, S., Bolanos, J. P., Heales, S. J. R., Almeida, A., Duchen, M. R., Clark, J. B. (1997) Interrelationship between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system *Prog. Neurobiol.* 52, 261-281, Yamamoto, T. et al (1990) *J. Comp. Neurol.* 302, 853-883.
283. Rothstein, J D., Dykeshoberg, M., Pardo, C. A., Brisitol, L. A., Jin, L., Kunel, R. W., Kanai, Y., Hediger, M. A: (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16, 675-686.
284. Bachus, K. H., Kettenmann, H., Schachner, M. (1989) Pharmacological characterization of the glutamate receptor in cultured astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 22, 274-282.
285. Vernadakis, A. (1988) Neuron-glia interrelations. *Int. Rev. Neurobiol.* 30, 149-224.
286. Schipper, H. M. (1996) Astrocytes, brain aging, and neurodegeneration. *Neurobiol. Aging* 17, 467-480.
287. Bondy, S., LeBel, C. P. (1993) The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. *Free Radical. Biol. Med.* 14, 633-642.
288. Chao, C. C., Hu, S., Molitor, T. W., Shaskan, E. G., Peterson, P. K. (1992) Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J. Immunol.* 149, 2736-2741.
289. Halliwell, B. (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59, 1609-1623.
290. Nowicki, J. P., Duvall, D., Pognet, H., Scatton, B. (1991) Nitric oxide mediates neuronathal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 204, 339-340.

291. Demopoulos, H. B., Flamm, E.S., Seligman, M. L. (1979) Membrane perturbation in central nervous system injury: theoretical basis for free radical damage and a review of the experimental data. "Neural Trauma" (Ed. A. J. Popp ve ark.)'da, s. 63-78.
292. Bolanos, J. P.; Heales, S. J., Land, J. M., Clark, J. B. (1995) Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurons and astrocytes in primary culture. *J. Neurochem.* 64, 1965-1972.
293. Café, C., Torri, C., Bertorelli, L., tartara, F., Tancioni, F., Rodriguez-y-Baena, R., Marzatico, F. (1995) Oxidative events in neuronal and glial cell-enriched fractions of rat cerebral cortex. *Free Rad. Biol. Med.* 19, 853-857.
294. Oka, A., Belliveau, M. J., Rosenberg, P. A., Volpe, J. J. (1993) Vulnerability of oligodendria to glutamate: pharmacology, mechanisms, and prevention. *J. Neurosci.* 13, 1441-1453.
295. Raps, S. P., Lai, J. C. K., Hertz, L., Cooper, A. J. L. (1989) Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons. *Brain Res.* 493, 398-401.
296. Huang, J., Philbert, M. A. (1996) Cellular responses of cultures cerebral astrocytes to ethacrinic acid-induced perturbation of subcellular glutathione homeostasis. *Brain Res.* 711, 184-192.
297. Makar, T. K., Nedergaard, M., Preuss, A., Gelbard, A. S., Perumal, A. S., Cooper, A. J.L. (1994) Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative process in the brain. *J. Neurochem.* 62, 45-53.
298. Drukarch, B., Schepens, E., Stoof, J.C., Langeveld, C.H., Muiswinkel, F.L. (1998) Astrocyte- enhanced neuronal survival is mediated by scavenging of extracellular reactive oxygen species. *Free Rad. Biol. Med.* 25, 217- 220.
299. Arnaud, J., Favier, A. (1991) Le Zinc. "Les Oligoelements en Medecine et Biologie" (Ed. P. Chappus)'de, Lavoisier, Paris, s. 347-397.
300. Coassin, M., Ursini, F., Bindoli, A. (1992) Antioxidant effect of manganese. *Arch. Biochem. Biophys.* 299, 330-333.
301. Har, El R., Chevion, M. (1991) Zinc (II) protects against metal-mediated free radical induced damage: studies on single and double-strand DNA breakage. *Free Rad. Res. Commun.* 12-13 Pt2, 509-515.
302. Chavapil, M., Sipes, G., Ludwig, J. C., Halladay, S. C. (1975) Inhibition of NADPH oxidation and oxidative metabolism of drugs in liver microsomes by zinc. 24, 917-917.
303. Jeffery, E. H. (1983) The effect of zinc on NADPH oxidation and monooxygenase activity in rat hepatic microsomes. *Mol. Pharmacol.* 23, 467-473.

304. Ludwig, J. C., Misiorowski, R. L., Chavapi, M., Seymour, M. D. (1980) Interaction of zinc ions with electron carrying coenzymes NADPH and NADH. *Chem. Biol. Interact.* 30, 25-34.
305. Coppen, D. E., Richardson, D. E., Cousins, R. J. (1988) Zinc suppression of free radicals induced in cultures of rat hepatocytes by iron, t-butyl hydroperoxide, and 3-methylindole. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 189, 100-109.
306. Barch, D. H., Fox, C. C., Rosche, W. A., Rundhaugen, L. M., Wriginton, S. A. (1992) Inhibition of rat methylbenzyl nitrosamine metabolism by dietary zinc and zinc in vitro. *Gastroenterol.* 103, 800-806.
307. Bay, B. H., Sit, K. H., Hsu, A. (1996) Cythrome P450 content and ultrastructural changes in liver of zinc-treated C57/6J mice. *Pharmacol. Res.* 1996, 34, 93-97.
308. Miles, P. R., Wright, J. R., Bowman, L., Colby, H. D. (1980) Inhibition of hepatic microsomal lipid peroxidation by drug substrates without drug metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 29, 565-570.
309. Lee, I. P., Yamamura, H. J., Dixon, R. L. (1968) The effects of β -diethylaminoethyl-diphenylpropylacetate (SKF 525A) on biological membranes-I. SKF 525A-induced stabilization of human erythrocytes. *Biochem. Pharmacol.* 17, 1671-1681.
310. Sipes, I. G., Krishna, G., Gillette, J. R. (1977) Bioactivation of carbon tetrachloride, chloroform and bromotrichloromethane: role of cytochrome P-450. *Life Sci.* 20, 1541-1548.
311. Neubert, D., Timmler, R. (1960) Influence of some phenylacetic acid derivatives (CFT 1201, SKF) on the incorporation of 14-dl-alanine in microsome proteins. *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 238, 358-363.
312. Holmes, W. L., Bentz, J. D. (1960) Inhibition of cholesterol biosynthesis in vitro by β -diethylaminoethyl-diphenylpropylacetate (SKF 525A). *J. Biol. Chem.* 235, 3118-3122.
313. Brodie, B. B., Gillette, J. R., La Du, B. N. (1958) Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 27, 427-454.
314. Soriani, M., Mazzuca, S., Quaresima, V., Minetti, M. (1993) Oxidation of desferrioxamine to nitroxide free radical by activated human neutrophils. *Free Rad. Biol. Med.* 14, 589-599.
315. Morehouse, K.M., Flitter, W.D., Mason, R.P. (1987) The enzymatic oxidation of desferal to a nitroxide free radical. *FEBS Lett.* 222, 246-250.
316. Halliwell, B., Gutteridge, J. M.C. (1985) The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol. Aspects Med.* 8, 89-193.
317. Darley-USmar, V. M., Hersey, A., Garland, L. G. (1989) A method for the comparative assesment of antioxidants as peroxyl radical scavengers. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1465-1469.

318. Hartley, A., Davies, M., Rice-Evans, C. (1990) Desferrioxamine as a lipid chain-breaking antioxidant in sickle erythrocyte membranes. *FEBS Lett.* 264, 145-148.
319. Blake, D. R., Winyard, P., Iunec, J., Williams, A., Good, P. A., Crewes, S. J., Gutteridge, J. M. C., Rowley, D., Halliwell, B. Cornish, A., Hider, R. C. (1985) Cerebral and ocular toxicity induced by desferrioxamine. *Q. J. Med.* 219, 345-355.
320. Kiyose, M., Lee, C., Okabe, E. (1999) Inhibition of skeletal sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity by desferrioxamine nitroxide free radical. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 137-143.
321. Butler, J., Halliwell, B. (1982) Reaction of iron-EDTA chelates with the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 218, 174-178.
322. Buettner, G. R., Doherty, T. P., Patterson, L. K. (1983) The kinetics of the reaction of superoxide radical with Fe(III) complexes of EDTA, DETAPAC and HEDTA. *FEBS Lett.* 157, 143-146.
323. Phoenix, J., Edwards, R. H. T., Jackson, M. J. (1989) Inhibition of Ca^{++} induced cytosolic enzyme efflux from skeletal muscle by vitamin E and related compounds. *Biochem J.* 257, 207-213.
324. Antosiewicz, J., Damiani, E., Jassem, W., Wozniak, M., Orena, M., Greci, L. (1997) Influence of structure on the antioxidant activity of indolinic nitroxide radicals. *Free Rad. Biol. Med.* 22, 249-255.
325. Kagan, V., Serbinova, E., Novikov, K., Ritov, V., Kozlov, Y., Stoytchev, T. (1986) Toxic and protective effects of antioxidants in biomembranes. *Arch. Toxicol. (Suppl.* 9), 302-305.
326. Constantin, E. (1990). "Mass Spectrometry", Market Cross House, West Sussex.
327. Watson, J. T. (1997). "Introduction to Mass Spectrometry", Maple Press, Philadelphia.
328. Wallace, A. (1994) "Principles and Methods of Toxicology", Hayes Raven Press, New York.
329. Richard, M. J., Portal, B., Meo, J., Coudray, C., Hadjian, A., Favier, A. (1992) Thiobarbituric acid reactant determination in plasma and lipoprotein fractions. Evaluation of Sobioda MDA-kit. *Clin. Chem.* 38, 704-709.
330. Emonet, N., Leccia, M. T., Favier, A., Beani, J. C., Richard, M. J. (1997) Thiols and selenium: protective effect on human skin fibroblasts exposed to UVA irradiation. *J Photochem. Photobiol.* 40, 469-474.
331. Marklund, S., Marklund, G. (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469-474.
332. Parat, M-O., Richard, M. J., Beani, J. C., Favier, A. (1998) Involvement of zinc in cellular oxidant/antioxidant balance. *Biol. Trace Elem. Res.* 60, 187-204.

333. Gunzler, W. A., Kremers, H., Flohe, L. (1974) An improved test procedure for glutathione peroxidase in blood. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 12, 444-448.
334. Booher, J., Sensenbrenner, M. (1972) Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiol.* 2, 97-105.
335. Shopsis, C., Mackay, G. J. (1984) Semi- automated assay for cell culture. *Anal. Biochem.* 140, 104-107.
336. Lowry, O. H. N. J., Rosebrough, A. L., Farr and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
337. Hussy, P., Maass, G., Tümmeler, B., Grosse, F., Schomburg, U. (1986) Effect of 4-quinolones and novobiocin on calf thymus DNA polymerase α primase complex, topoisomerases I and II, and growth of mammalian lymphoblasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29, 1073-1078.
338. Lawrence, J. W., Darkin-Rattray, S., Xie, F., Neims, A. H., Rowe, T. C. (1993) 4-quinolones cause a selective loss of mitochondrial DNA from mouse L1210 leukemia cells. *J. Cell. Biochem.* 51, 165-174.
339. Lawrence, J. W., Claire, D. C., Weisis, V., Rowe, T. C. (1996) Delayed cytotoxicity and cleavage of mitochondrial DNA in ciprofloxacin-treated mammalian cells. *Mol. Pharmacol.* 50, 1178-1188.
340. Packer, L., Fuehr, K. (1977) Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature* 267, 423-425.
341. Kong, X. J., Lee, S. L., Lanzillo, J. J., Fanburg, B. L. (1993) Cu-Zn superoxide-dismutase in vascular cells: changes during cell cycle and exposure to hyperoxia. *Am. J. Physiol.* 264, L365-L373.
342. Seve, M., Favier, A., Osman, M., Vaitaitis, G., McCord, J. M., Flores, S. C. (1999) The human immunodeficiency virus-1 tat protein increases sensitivity to zinc chelator-induced apoptosis and changes Sp1 DNA binding in HeLa cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 361, 165-172.
343. Hincal, F., Taşkın, T. (1995) The mechanism of convulsions induced by ciprofloxacin may involve the generation of free radicals and the activation of excitatory amino acid receptors. "Abstracts of the International Congress of Toxicology -VII"de, Abstract 99-s-27. Seattle, Washington.
344. Baudhuin, P. (1975) "Cytologie et Biologie Cellulaire". Acco, Louvain.
345. Richter-Landsberg, C., Besser, A. (1994) Effects of organotins on rat brain astrocytes in culture. *J. Neurochem.* 63, 2202-2209.
346. Rosen, G. M., Freeman, B. A. (1984) Detection of superoxide generated by endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 7269-7273.
347. Rosen, G. M., Rauckman, E. J. (1981) Spin trapping of free radicals during hepatic microsomal lipid peroxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7346-7349.

348. North, J. A., Spector, A. A., Buettner, G. R. (1992) Detection of lipid radicals by electron paramagnetic resonance spin trapping using intact cells enriched with polyunsaturated fatty acid. *J. Biol. Chem.* 267, 5743-5746.
349. Morel, I., Sergent, O., Cogrel, P., Lescoat, G., Padeloup, N., Brissot, P., Cillard, P., Cillard, J. (1995) EPR study of antioxidant activity of the iron chelators pyoverdine and hydroxypyrid-4-one in iron- loaded hepatocyte culture: comparison with that of desferrioxamine. *Free Rad. Biol. Med.* 18, 303-310.
350. Miller, D. M., Buettner, G. R., Steven, D. A., (1990) Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Rad. Biol. Med.* 8, 95-108.
351. Entsch, B., Husain, M., Ballou, H.D., Massey, V., Walsh, G. (1980) Oxygen reactivity of p-hydroxybenzoate hydroxylase containing 1-deaza-FAD. *J. Biol. Chem.* 255, 1420-1429.
352. Minotti, G. (1992) The role of endogenous nonheme iron in microsomal redox reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 297, 189-198.
353. Minotti, G. (1989) Adriamycin dependent release of iron from microsomal membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 268, 398-403.
354. Morehouse, L.A., Thomas, C.E., Aust, S.D. (1984) Superoxide generation by NADPH- cytochrome p-450 reductase: the effect of iron chelators and the role of superoxide in microsomal lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 232, 366-377.
355. Krikun, G., Cederbaum, A. I. (1986) Effect of ethanol consumption on microsomal lipid peroxidation: Role of iron and comparison between controls. *FEBS Lett.* 208, 292-296.
356. Kara, M., Hasinoff, B. B., McKay, D. W., Campbell, N. R. C. (1991) Clinical and chemical interactions between iron preparations and ciprofloxacin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 31, 257-261.
357. Mizuki, Y., Yamamoto, K., Yamaguchi, T., Fujii, T., Miyakazi, H., Ohmori, H. (1996) Intermolecular interactions of antimicrobial fluoroquinolones with purified rat liver CYP1A2 studied by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Xenobiotica*, 26, 1057-1066.
358. Sinha, B. (1989) Free radicals in anticancer drug pharmacology. *Chem. Biol. Interactions* 69, 293-317.
359. Powis, G. (1989) Free radical formation by antitumor quinones. *Free rad. Biol. Med.* 6, 63-101.
360. Kennedy, C. H., Mason, R. P. (1990) A reexamination of the cytochrome P-450-catalyzed free radical production from a dihydropyridine. Evidence of trace transition metal catalysis. *J. Biol. Chem.* 265, 11425-11428.

ÖZGEÇMİŞ

1967 yılında Trabzon'da doğdu. 1989 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezun oldu. Aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'nda bilim uzmanlığı programına başladı. 1990 yılında Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı. Bilim uzmanlığı çalışmalarını "Sıçanda serebral ve hepatik dokuların okside glutatyon ve total glutatyon düzeylerinin ölçümü ve oksidatif stres indükleyen ajanların glutatyon sistemine etkileri" başlıklı tezini vererek tamamladı. 1993 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak Farmasötik Toksikoloji Dalı'nda doktora programına başladı. Joseph Fourier Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında (Grenoble, Fransa) Nisan 1996-Kasım 1997 ve Aralık 1998-Temmuz 1999 tarihleri arasında araştırmacı olarak bulundu. Halen Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmalarını sürdürmektedir.

