

**PARAKUAT KULLANILARAK DENEYSEL OKSİDATİF STRES
OLUŞTURULAN A549 AKCİĞER EPİTEL HÜCRELERİ ÜZERİNE
FARKLI DOZLARDA UYGULANANKAFEİK ASİT FENETİL
ESTERİN BİYOKİMYASAL ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI
Proje No: 16.SAĞ.BİL.07**

**Naime ÇELİK
VETERİNER BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nalan BAYŞU SÖZBİLİR
Afyon Kocatepe Üniversitesi**

2020-AFYONKARAHİSAR

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Parakuat Kullanılarak Deneysel Oksidatif Stres Oluşturulan A549
Akciğer Epitel Hücreleri Üzerine Farklı Dozlarda Uygulanan Kafeik
Asit Fenetil Esterin Biyokimyasal Etkisinin Araştırılması**

Naime ÇELİK

**VETERİNER BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nalan BAYŞU SÖZBİLİR

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ

Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon

Birimi tarafından 16.SAĞ.BİL.07 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2020-002

2020- AFYONKARAHİSAR

KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı

çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 22/05/2020

Prof. Dr. Nalan BAYŞU SÖZBİLİR
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Sefa ÇELİK
Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Metin ERDOĞAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Jüri Üyesi

Dr.Öğr. Üyesi Funda KARABAĞ ÇOBAN
Uşak Üniversitesi
Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe ÖZDEMİR
Uşak Üniversitesi
Jüri Üyesi

Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi NaimeÇELİK'in“Parakuat Kullanılarak Deneysel Oksidatif Stres Oluşturulan A549 Akciğer Epitel Hücreleri Üzerine Farklı Dozlarda Uygulanan Kafeik Asit Fenetil Esterin Biyokimyasal Etkisinin Araştırılması” başlıklı tezi günü saat’da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmamın tamamlanmasında, bilimsel deneyimlerimden ve görüşlerimden yararlandığım başta saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Nalan BAYŞU SÖZBİLİR'e ve ikinci danışmanım Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ'a, bu süreçte bana yol gösteren ve destek olan tez izleme komitemdeki saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Sefa ÇELİK ve Doç. Dr. Metin ERDOĞAN'a, çalışmalarımında yardımcı olan Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ömer HAZMAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren, bilgi ve desteklerini benden esirgemeyen A.K.Ü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı doktora öğrencileri Tayfun DİKMEN ve Shah NAWAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmamı destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Serbest Radikaller.....	1
1. 2. Reaktif Oksijen Türleri.....	3
1. 2.1. Süperoksit Radikali	3
1. 2. 2. Hidrojen Peroksit	4
1. 2. 3. Hidroksil Radikali	5
1. 3. Oksidatif Stres.....	6
1. 4. Serbest Radikallerin Etkileri.....	7
1. 4.1. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri.....	8
1.4. 2. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri.....	8
1. 4. 3. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri.....	10
1. 4. 4. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere Etkileri.....	11
1. 5. Parakuat (PQ).....	13
1. 6. PQ'ın Hücrel Toksisitesi.....	16
1. 7. Antioksidanlar.....	21
1. 7. 1. Süperoksit dismutaz (SOD).....	22
1. 7. 2. Katalaz (CAT).....	23
1. 7. 3. Glutasyon Peroksidaz (GPx).....	24
1. 7. 4. Glutasyon Redüktaz (GR).....	25
1. 7. 5. İndirgenmiş Glutasyon (GSH).....	26
1. 7. 6. Askorbik Asit (C Vitamini).....	27
1. 7. 7. Tokoferoller	27
1. 7. 8. Karotenoidler.....	28
1. 7. 9. Polifenoller.....	29

1. 7. 10. Kafeik Asit Fenil Ester (KAFE).....	29
1. 8. A549 Hücre Hattı.....	33
1. 9. Tezin Amacı ve Kurulan Hipotezler.....	34
2. MATERYAL VE METOD.....	37
2. 1. Materyal.....	37
2. 1. 1. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	37
2. 1. 2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	37
2. 1. 3. Kullanılan Cihazlar.....	38
2. 1. 4. Kullanılan Kitler.....	38
2. 1. 5. Kullanılan Hücre Materyali.....	39
2. 2. Metod.....	39
2. 2. 1. A549 Hücre Kültürünün Hazırlanması.....	39
2. 2. 2. Hücrelerin Subkültürü.....	39
2. 2. 3. Deney Gruplarının Hazırlanması.....	40
2. 2. 4. Hücresel Sitotoksosite Analizi (MTT Yöntemi).....	41
2. 2. 5. Hücre Lizatlarının Hazırlanması.....	42
2. 2. 6. Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) Ölçüm Yöntemi.....	42
2. 2. 7. Toplam Oksidan Kapasite (TOK) Ölçüm Yöntemi.....	43
2. 2. 8. Total Protein Analizi.....	44
2. 2. 9. Oksidatif Stres İndeksinin (OSİ) Hesaplanması.....	45
2. 2.10. İstatistiksel Yöntemler.....	45
3. BULGULAR.....	46
3. 1. Hücre Canlılık Bulguları.....	46
3. 2. Toplam Oksidan Kapasite Düzeyleri.....	50
3. 3. Toplam Antioksidan Kapasite Düzeyleri.....	51
3. 4. Oksidatif Stres İndeksi.....	54
4. TARTIŞMA.....	55
5. SONUÇ.....	65
ÖZET.....	67
SUMMARY.....	68
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

8-OHdG	: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
AB	: Avrupa Birliği
Abs	: Absorbans
ABTS ⁺	: 2,2'- azinobis - 3 - etilbenzotiazolin - 6 - sülfonik asit
ADP	: Adenozindifosfat
ATP	: Adenozintrifosfat
⁰ C	: Santigrat Derece
CAT	: Katalaz
CO ₂	: Karbondioksit
cm ²	: Santimetre kare
Cu ⁺²	: Bakır
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Dpbs	: Dulbecco's fosfat buffered saline
EC-SOD	: Ekstraselüler süperoksid dismutaz
Eq	: Equivalent
FBS	: Fötal buzağı serumu
Fe ²⁺	: Ferro demir
Fe ⁺³	: Ferrik demir
g	: Gram
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSG	: Oksideglutasyon
GST	: Glutasyon-S-transferaz
HNO ₂	: Nitrik asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
H ₂ SO ₄	: Sülfürik asit
HOCl	: Hipokloröz asit

KAFE	: Kafeik asit fenetil ester
L	: Litre
LOOH	: Lipit peroksit
LOO \cdot	: Lipit peroksil radikali
MDA	: Malondialdehit
μg	: Mikrogram
mg	: Miligram
μl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
μM	: Mikromolar
mmol	: Milimol
mM	: Milimolar
Mn	: Manganez
Max	: Maksimum
Min	: Minimum
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NADP	: Nikotinamidadeninükleotidfosfat
nm	: Nanometre
NO \cdot	: Nitrik oksit radikali
NO $_2\cdot$: Nitrojen dioksit
N $_2$ O $_3$: Dinitrojentrioksit
O $_2^{\cdot-}$: Süperoksit anyon
O $_3$: Ozon
$^1\text{O}_2$: Singlet oksijen
O $_2$: Moleküler oksijen
OH \cdot	: Hidroksil
ONOO $^-$: Peroksinitrit
OSİ	: Oksidatif Stres İndeksi
pH	: Power of hidrojen
PQ $^{2+}$: Parakuat iyonu
PQ $^{+\cdot}$: Parakuatmonokatyon radikali
PCO	: Protein karbonil

PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
PQ	: Parakuat
RNA	: Ribonükleik asit
ROO·	: Peroksil radikali
RO·	: Alkoksil radikali
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksitdismutaz
sn	: Saniye
TAK	: Toplam antioksidan kapasite
TOK	: Toplam oksidan kapasite
UV	: Ultraviyole
Zn	: Çinko
%	: Yüzde
ΔAbs	: Toplam Absorbans

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. Oksidatif Stres Oluşumu.....	7
Şekil 1. 2. Çoklu Doymamış Yağ Asidinin Non-Enzimatik Peroksidasyonu.....	10
Şekil 1. 3. PQ Redoks Döngüsü.....	17
Şekil 1. 4. Glutasyon Döngüsü	26
Şekil 1. 5. Kafeik Asit ve KAFE Molekül Yapısı	31
Şekil 3. 1. A549 Akciğer Epitel Hücreleri Üzerine 400 µM PQ ve Farklı Dozlarda (1, 2,5 ve 5 µg) KAFE Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	46
Şekil 3. 2. PQ ve Kontrol Gruplarının Hücre Canlılıkları.....	47
Şekil 3. 3. PQ, Kontrol ve PQ+1 µg Kafe Grupları Hücre Canlılıkları.....	48
Şekil 3. 4. PQ, Kontrol ve PQ+2,5 µg Kafe Grupları Hücre Canlılıkları.....	48
Şekil 3. 5. PQ, Kontrol ve PQ+5 µg Kafe Grupları Hücre Canlılıkları.....	49
Şekil 3. 6. Toplam Oksidan Kapasite Değerleri	50
Şekil 3. 7. Toplam Antioksidan Kapasite Değerleri.....	52
Şekil 3. 8. OSI Değerleri.....	54

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. 1. Reaktif Oksijen Türleri	2
Tablo 1. 2. Reaktif Nitrojen Türleri.....	2
Tablo 2. 1. Deney Grupları ve Yapılan Uygulamalar.....	40
Tablo 3. 1. Gruplardaki Canlılık Oranları ve Anlamlılıkları.....	47
Tablo 3. 2. Grupların TOK Ortalamaları ve Gruplar Arası Anlamlılık Değerleri.....	51
Tablo 3. 3. Grupların TAK Ortalamaları ve Gruplar Arası Anlamlılık Değerleri.....	52
Tablo 3. 4. Grupların OSİ Ortalamaları ve Gruplar Arası Anlamlılık Değerleri	54

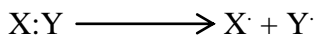
1. GİRİŞ

1.1. Serbest Radikaller

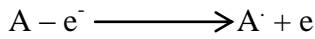
Oksijen insan yaşamı için çok gerekli olmasına rağmen, normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri (ROS) vücuda zarar verebilir (Diplock, 1998). Çoğunu serbest radikallerin oluşturduğu reaktif oksijen türlerinin (ROS) normal oksijen molekülleriyle kıyaslandığında kimyasal reaktivitesi daha yüksektir (Nawar, 1996). ROS'nin zararlarına karşılık vücuttaki doğal savunma sistemleri serbest radikalleri kontrol altında tutar. Bu sistemler birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir (Diplock, 1998).

Serbest radikaller dış orbitallerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduran atom veya moleküllerdir (Mercan, 2004). Serbest radikallerin başlıca üç yolla meydana geldiği kabul edilmektedir;

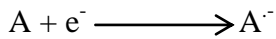
1. Kovalent bağlı normal bir molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan biri kalacak şekilde homolitik bölünmesi.



2. Normal bir molekülün bir elektronunu kaybetmesi.



3. Normal bir molekülün bir elektron alması.



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu oluşur (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Serbest radikaller; ROS, reaktif nitrojen türleri ve diğer reaktifler olarak üç gruba ayrılır (Sorg, 2004). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan serbest radikallerdir (Mates, 2000).

Reaktif oksijen türleri arasında süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil (OH^{\cdot}), peroksil (ROO^{\cdot}), lipid peroksil (LOO^{\cdot}) ve alkoksil (RO^{\cdot}) radikalleri sayılabilir. Reaktif nitrojen türlerini ise nitrik oksit (NO^{\cdot}) ve nitrojen dioksit (NO_2^{\cdot}) oluşturur. ROS ve reaktif nitrojen türleri diğer nonradikal reaktif türlere kolay bir şekilde dönüşebilir. Genellikle oksidanlar olarak adlandırılan hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3), singlet oksijen (1O_2), hipokloröz asit ($HOCl$), nitrik asit (HNO_2), peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$), dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve lipid peroksit ($LOOH$) ise serbest radikaller arasında gösterilmezler (Fang ve ark., 2002; Halliwell ve Gutteridge, 1999; Pham-Huy ve ark., 2008; Valko ve ark., 2007).

Tablo 1. 1. Reaktif Oksijen Türleri (Karabulut ve Gülay, 2016)

Radikaller		Nonradikaller	
Süperoksit	$O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil	OH^{\cdot}	Hipokloröz asit	$HOCl$
Peroksil	ROO^{\cdot}	Hipobromöz asit	$HOBr$
Alkoksil	RO^{\cdot}	Singlet oksijen	1O_2
Hidroperoksil	HO_2^{\cdot}	Ozon	O_3
Lipit peroksil	LOO^{\cdot}		

Tablo 1. 2. Reaktif Nitrojen Türleri (Karabulut ve Gülay, 2016)

Radikaller		Nonradikaller	
Nitrik oksit	NO^{\cdot}	Nitrik asit	HNO_2
Nitrojen dioksit	NO_2^{\cdot}	Nitrosil katyonu	NO^+
		Nitroksil anyonu	NO^-
		Dinitrojen tetroksid	N_2O_4
		Dinitrojen trioksit	N_2O_3
		Peroksinitrit	$ONOO^{\cdot}$
		Peroksinitrik asit	$ONOOH$
		Nitronyum katyonu	NO_2^+
		Nitril klorid	NO_2Cl
		Alkil peroksinitrit	$ROONO$

Normal metabolizma olayları sırasında meydana gelen serbest radikallerin organizmaya zarar verme potansiyelleri bulunsa da bazı metabolik olayların devamı için oluşumları zorunludur (Freeman ve Cropa, 1982). Serbest radikaller düşük yoğunlukta olduğu zaman yararlı etkilerinden söz edilebilmektedir. Düşük yoğunlukta serbest radikaller enfeksiyonlara karşı savunma, kanser hücrelerinin öldürülmesi ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu gibi savunma fonksiyonlarıyla birlikte intrasellüler depolardan kalsiyum salınımı, tirozin aminoasidinifosfatlama aktivasyonu ve büyüme faktörü sinyallerinin aktivasyonu gibi hücrel sinyallerin aktivasyonunda rol oynamaktadır (Karabulut ve Gülay, 2016).

Serbest radikal oluşturan başlıca endojen kaynaklar; mitokondriyal elektron taşıma zinciri, mikrozomal membran elektron taşıma zinciri, oksidan enzimlerin reaksiyonu, ksantin oksidaz, lipooksijenaz, normal stimülasyonla fagositik hücre aktivasyonu, nötrofil, monosit ve makrofajlar, eozinofiller, endotelial hücreler ve otooksidasyon reaksiyonlarıdır. Eksojen kaynaklardan bazıları ise redoks döngüsü maddeleri, ilaç oksidasyonları, iyonize radyasyon, güneş ışığı ve sigara içimidir (Kargın ve Fidancı, 1997).

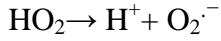
1. 2. Reaktif Oksijen Türleri

Başlıca ROS'lar süperoksit radikali (O_2^-), hidroksil radikali ($OH\cdot$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) 'dir. Bunlardan ilk ikisi serbest radikal olup hidrojen peroksit ise prooksidan'dır (Navarro ve Boveris, 2004).

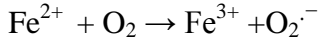
1. 2. 1. Süperoksit Radikali

Moleküler oksijenin dış orbitalinde paylaşılmamış iki elektron bulunmaktadır. Bu elektronlar paylaşılmadığında, spinleri aynı yönde fakat farklı orbitallerde bulduklarında en düşük enerji seviyesindedirler. Bu dış orbitallerin her biri birer

elektron daha alabilir (Fridovich, 1975). Aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda süperoksit radikalleri oluşur. Süperoksit grubu çok etkilidir ve hücre hasarına yol açmaktadır. Bu indirgenmede süperoksit grubuna, bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinler etki etmektedir (Mercan, 2004). Özellikle elektronca zengin bir ortam olan iç mitokondri zarında ve ksantin oksidaz gibi flavoenzimler tarafından endojen olarak oluşturulurlar.

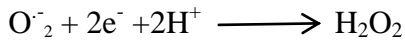
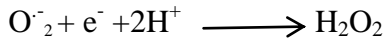


Ayrıca indirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu da süperoksit radikali meydana getirebilir (Valko ve ark., 2005).



1. 2. 2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Moleküler oksijenin enzimatik olarak elektron çifti alması ya da süperoksidin bir elektron alması sonucunda peroksit meydana gelir. Peroksit molekülü iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksiti (H_2O_2) oluşturur (Akkuş, 1995).

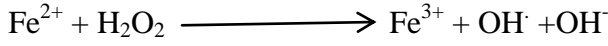
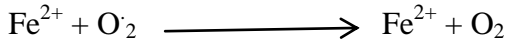


Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin üretimi süperoksitin ($O_2^{\cdot-}$) dismutasyonu ile gerçekleşir. Bu reaksiyonda iki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijen meydana getirir. Süperoksit dismutaz enzimi bu reaksiyonu katalizler veya reaksiyon spontan olarak gerçekleşir (Miao ve Clair, 2009).

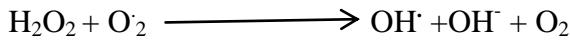


Hidrojen peroksit serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri sınıfına girer ve serbest radikal oluşumunda önemli rol oynar. Hücresel kompartımanlarda bulunan ürat oksidaz, glikoz oksidaz ve D-aminoasit oksidaz gibi birçok enzim aracılığıyla iki elektronun oksijene transferi ile direkt olarak hidrojen peroksit oluşturulur. Fe^{2+} (ferro) veya diğer geçiş metallerinin (Fenton reaksiyonu) ve süperoksit radikalının ($O_2^{\cdot-}$) varlığında (Haber-Weiss reaksiyonu) en güçlü radikal olan hidroksil radikalini ($OH\cdot$) oluşturur.

Fenton Reaksiyonu;



Haber-Weiss Reaksiyonu;



Hidrojen peroksit, süperoksit radikalinden farklı olarak yağda çözünür özelliindedir ve oluştuğu yerden uzakta olan ve Fe^{2+} içeren hücresel membranlarda da hasar oluşturabilir (Mocada ve ark., 1991, Jomova ve ark., 2011).

1. 2. 3. Hidroksil Radikali ($OH\cdot$)

Son derece güçlü oksidanlardır, yarılanma ömrü 9-10 saniye olup oldukça kısadır ve ROS'un en güçlüsüdürler (Ayala ve ark., 2014). Hidroksil radikali, geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu ve süperoksit radikali ile Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten veya suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda meydana gelir (Cheesman ve Slater, 1993; Halliwell, 1999; Song, 2004).

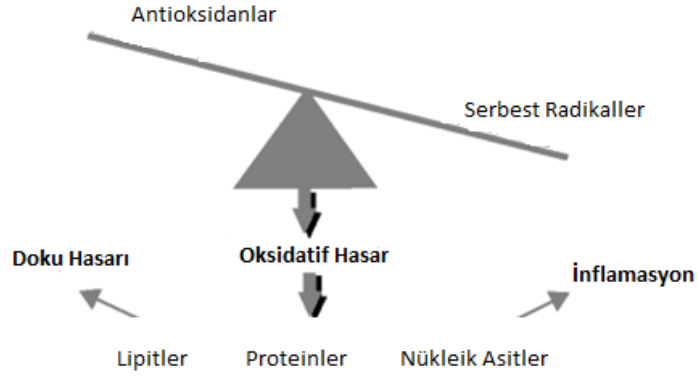
Lipidler, nükleik asitler ve proteinler gibi neredeyse tüm biyolojik molekülleri okside edebilir (Fantel, 1996). Bu sebeple diğer reaktif oksijen türleriyle kıyaslandığında biyolojik sistemlerde daha fazla hasar meydana getirir (Betteridge, 2000). Hidroksil radikalının başlıca tepkimeleri elektron transfer tepkimeleri ve bunu takiben katılma tepkimeleridir. Hidroksilin seçtiği başlıca hedef noktalar elektronca zengin bileşiklerdir. Biyolojik moleküllerle başlatılan tepkimelerde binlerce farklı ara ürün oluşabilir (Akkuş, 1995., Kılınç, 2002).

1. 3. Oksidatif Stres

Serbest radikaller hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında parakuat, alloksan gibi kimyasalların etkisi altında kalma, karbontetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, alkol ve uyuşturucular gibi alışkanlık yapıcı maddeler bulunması nedeniyle serbest radikaller toksikolojik açıdan da önemlidir (Mercan, 2004).

Reaktif türlerin zararlarına karşı vücuttaki çeşitli doğal savunma sistemleri serbest radikalleri kontrol altında tutarlar. Bu sistemler farklı hücrelerde ve farklı serbest radikaller üzerinde rol oynadıkları için birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir (Diplock, 1998).

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere antioksidanlar adı verilir (Elliot, 1999). Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile ortadan kaldırılma hızı bir denge içindedir ve oksidan-antioksidan denge olarak isimlendirilir. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma serbest radikallerden etkilenmez. Bu radikallerin oluşum hızında bir artma veya ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur ve oksidatif stres olarak isimlendirilir (Altan ve ark., 2006).



Şekil 1. 1. Oksidatif stres oluşumu

Oksidatif strese karşı organizmanın savunma mekanizmaları (antioksidan mekanizmalar) yetersiz kaldığında, hücrelerde oksidatif hasar gelişir ve hücre fonksiyonları önemli oranda aksar. Birçok hastalığın patogeneğinde oksidatif stres kritik bir öneme sahip olduğundan hastalığın şiddeti artar. Bu mekanizmanın, yaşlanma süreci ve kardiyovasküler hastalıklar, kanser, sepsis, dejeneratif nörolojik hastalıklar, böbrek yetmezliği, infertilite, kas ve karaciğer hastalıkları gibi pek çok hastalığın etiolojisinden sorumlu olduğu söylenebilir (Ercan, 2012., Gutteridge, 1993).

1. 4. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller hücrenin lipit, DNA (deoksiribonükleik asit), karbonhidrat, protein gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve de yapılarında bozulmaya neden olurlar (Altan ve ark., 2006).

1. 4. 1. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

Hidroksil gibi serbest radikallerin karbonhidratlar ile reaksiyonu sonucu karbon atomlarının birinden bir hidrojen atomu çıkarılırlar ve karbon merkezli radikal üretirler. Bu radikaller hyaluronik asit gibi önemli moleküllerde zincir kırılmalarına yol açar (Devasagayam ve ark., 2004).

Serbest radikallerin etkisiyle, monosakkaritler otooksidasyona uğrar ve bunun sonucu olarak hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehid yapısında ürünler meydana gelir. Okzoaldehidler, DNA, RNA(ribonükleik asit) ve proteinlere bağlanabilme özelliğindedir ve bundan dolayı antimitotik etki gösterirler. Bu sebeple kanser ve yaşlanma gibi olaylarda etkili oldukları düşünülmektedir (Thornaley ve Vasak, 1985).

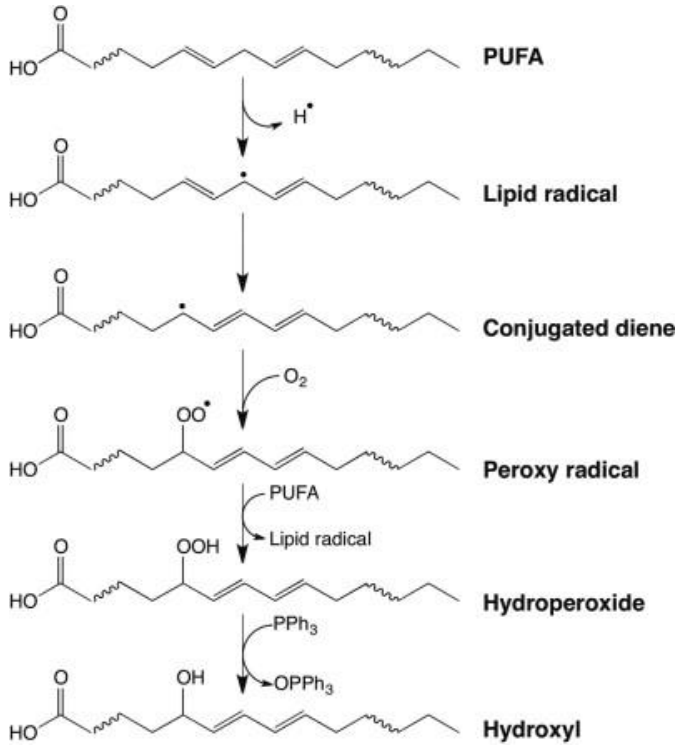
1. 4. 2. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri

Lipitler serbest radikal hasarına karşı en hassas moleküllerdir (Aydilek ve Aksakal, 2003). Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) ve fosfolipitler otooksidasyona eğilimlidirler (Porter, 1985). PUFA'nın oksidatif hasarı zincirleme bir reaksiyondur ve irreversibl membran hasarıyla sonuçlanır. Hücre membranında bulunan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve Na^+K^+ - ATPaz gibi enzimler ve hormon akseptörleri lipit peroksidasyonu sırasında inaktive olur ve hücrelerde dejeneratif, mutajenik ve karsinojenik bozukluklar meydana gelir (Aydilek ve Aksakal, 2003). Lipit peroksidasyonu bir metilen grubundan ($-\text{CH}_2$) hidrojen atomu kopartabilecek reaktiviteye sahip herhangi bir reaktif oksijen türünün lipit molekülüne saldırısıyla başlar (Halliwell ve Chirico, 1993). Hidrojen atomu tek elektron içerdiği için metilen gruptan bir elektron koparılması karbon üzerinde eşleşmemiş bir elektron kalmasıyla sonuçlanır ($\cdot\text{C}$). Yağ asidinde bulunan çift bağ, bitişindeki karbon ve hidrojen arasındaki bağı zayıflatır ve hidrojenin koparılması kolaylaşır (Özcan ve ark., 2015).

Karbon radikalleri çeşitli reaksiyonlara uğrayabilir. Örneğin iki tanesinin membran içinde karşılaşması yağ asitleri yan zincirleriyle çapraz bağlar yapmasına neden olur (Halliwell ve Chirico, 1993).

Hidrojen kaybeden yağ asidinin moleküler olarak yeniden düzenlenmesi sonucu konjuge dien yapısı oluşur ve bu yapı oksijenle birleşerek lipit peroksil radikallerine dönüşür. Bu peroksil radikalleri membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna neden olur ve açığa çıkan hidrojen atomlarını bağlayarak lipit hidroperoksitlere dönüşürler (Girotti, 1998). Üretilen hidroperoksitler daha fazla radikali yıkarak lipit peroksit, etan ve pentan gibi uçucu gazları oluşturur (Halliwell ve Chirico, 1993). Lipit hidroperoksitlerin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehitler hücre yüzeyinde metabolize olur veya başlangıçtaki alanlarına diffüze olarak hücrenin diğer kısımlarına hasarı yayarak sekonder bozukluklara neden olur (Mercan, 2004).

Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan aldehitlerden en önemlisi malondialdehittir (MDA) (Halliwell, 1991). Oluşan MDA, hücre membranında iyon alışverişine etki edip membran bileşiklerinin çapraz bağlanmasına neden olur ve iyon geçirgenliğinde, enzim aktivitesinde olumsuz sonuçlar doğurur (Mercan, 2004).



Şekil 1. 2. Çoklu doymamış yağ asidinin non-enzimatik lipid peroksidasyonu (Landau ve ark., 2013)

1. 4. 3. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Serbest radikaller proteinleri direk etkiler fakat proteinlerin etkilenme derecesiamino asit içeriklerine göre değişir. Doymamış bağ ve sülfür içeren aminoasitlerden meydana gelen proteinler serbest radikaller ile daha yüksek reaktiviteye sahip olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitler içeren proteinler serbest radikallerden kolayca etkilenir (Devasagayam ve ark., 2003).

Aktivitesi bu aminoasitlere bağlı olan gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz gibi enzimler, serbest radikal reaksiyonları sonucu inhibe olurlar. Son derece reaktif olan hidroksil radikalleri, peptid ve aminoasitlerde hidroksilasyona neden olarak yapı ve fonksiyonlarını bozar (Akpoyraz ve Durak, 1995).

Ayrıca protein tiyol gruplarının oksidasyonu enzim fonksiyonunda kayıpların yanı sıra membran iyon ve metabolit transportunda aksama ve kontraktıl fonksiyonlarda bozulmaya sebep olur (Shacter, 2000).

Serbest radikallerin proteinler üzerinde neden olduğu başlıca değişiklikler; aminoasitlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmantasyonu, proteinlerin agregasyonu ve çapraz bağlanmalardır (Erenel ve ark., 1992).

Oksidatif stres sonucu meydana gelen protein karbonil deriveleri (PCO) protein oksidasyonunun belirlenmesinde kullanılan en yaygın belirteç olup hastalıklar sonucunda oluşan oksidatif stresi değerlendirmede kullanılır. Protein karbonil derivelerinin oksidatif hasar belirteci olarak kullanılmaları yarı ömrü dakikalarla sınırlı olan lipit peroksidasyon ürünlerine göre daha avantajlıdır (Dalle-Donne ve ark., 2003; Levine ve ark., 1990).

1. 4. 4. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere Etkileri

Stabil bir molekül olan DNA da lipitler, karbonhidrat ve proteinler gibi spontan kimyasal oksidatif hasara uğrayabilir. Vücudun her hücresinde DNA günde 10^3 defa oksidatif hasara uğrar (Burçak ve Andican, 2004).

DNA hasarı, hücrenin yaşamı boyunca yaygın olarak görülen ve mutasyon, kanser, yaşlanma ve sonuçta hücre ölümüne yol açabilen bir olaydır. DNA, yaşam boyunca hücresel metabolitler ve ekzojen ajanlar tarafından sürekli olarak değişimlere maruz kalır. Bu değişimler sonuçta tek hücreli organizmalarda hücresel ölüme veya çok hücreli organizmalarda dejenerasyon ve yaşlanmaya sebep olabilir (Sancar ve ark., 2004; Rupp, 2006).

Oksidatif hasar sonucu DNA'da tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları, şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma oluşabilir (Burçak ve Andican, 2004).

DNA baz modifikasyonları içerisinde en sık karşılaşılanı 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) 'dir. Hidroksil radikalleri, guanin molekülünde 8. pozisyonda etkileşerek oksidasyona sebep olur. Değişikliğe uğrayan DNA yapısının oksidatif hasarı sonucunda 8-OHdG meydana gelir. Bunun yanındabakır (Cu^{+2}) iyonlarıDNA'nın özellikle guanin bazlarına yüksek afinite ile bağlanıp H_2O_2 ile etkileşime reaksiyon göstererek DNA hasarına katkıda bulunurlar. 8-OHdG formu DNA hasarının miktarının belirlenmesinde kullanılır (Helbock ve ark., 1999).

Hidroksil radikalleri DNA üzerindeki şeker kalıtlarından hidrojen atomu koparıp şeker modifikasyonlarına ve zincir kırılmalarına da sebep olur. Sonuçta hücrelerin H_2O_2 veya diğer oksidan maddelere maruziyeti replikasyon ve transkripsiyon üzerine etki eder ve aynı zamanda DNA tamir mekanizmalarını baskılayıp DNA hasarını artırır (Hu ve ark., 1995).

Hücrede DNA hasarı meydana geldiğinde oluşan yanıtlar;

- 1- DNA hasar kontrol noktalarının aktivasyonu aracılığıyla hücre döngüsünün ilerlemesinin durdurulması, bu sayede hasarlı genetik materyalin onarımına imkan sağlanması ve hasarlı kromozomların genetik aktarımının engellenmesi,
- 2- Hasarlı DNA'nın çıkarılmasının ardından DNA çift zincirinin yeniden yapılandırılması (DNA tamiri),
- 3- Hücredeki bazı genlerin transkripsiyon düzeylerinin hücrenin lehine değişmesi (transkripsiyonel cevap),
- 4- Yoğun hasar görmüş hücrelerin ölümü (programlı hücre ölümü, apoptoz).

Bu yanıtlardan herhangi birinin oluşmaması hücre bazında genomik kararsızlıkla, organizma bazında genetik hastalıklar, kanser veya yaşlanma ile

sonuçlanır (Kulaksız ve Sancar, 2007; Zhang ve ark., 2009; Norbury ve Hickson, 2001).

1. 5. Parakuat (PQ)

Kültür bitkisi yetiştirilen tüm alanlarda yabancı otlar sorun yaratır. Bu yabancı otlarla mücadelede kullanılan çeşitli yöntemler mevcuttur; fakat bunların içinde en yaygın kullanılanı kimyasal mücadeledir. Herbisitler bitkileri öldürebilen veya gelişimlerini engelleyen kimyasal ilaçlara verilen genel isimdir. Kimyasal mücadelede kullanılan herbisitler yararları yanında birçok yan etkiye de neden olabilirler (Başaran ve Serim, 2009).

Parakuat (PQ), sağlık standartlarına uymadığı için 2007'den beri Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde yasaklanmasına rağmen dünyada en fazla kullanılan herbisitlerden biridir. Bazı Asya ülkelerinde % 60-70 ölüm oranı gösteren, tahmini yıllık 2000 kişi civarında toksik alımı yapılan PQ intoksikasyonu ciddi bir halk sağlığı problemidir. PQ gelişmiş ülkelerde kolay ulaşılabilirliği, düşük toksik dozu ve ucuz olmasına bağlı olarak sıklıkla bir intihar ajanı olarak kullanılmaktadır (Gil ve ark., 2014).

Toprak parçacıklarına ve organik materyale adsorbsiyon konusunda güçlü afinite, herbisit olarak PQ'nın kullanılması konusunda en büyük avantajlardan biridir; çünkü bu özellikler bitki ve mikroorganizmaların biyoyararlanımını kısıtlar. Üstelik PQ çoğunlukla toprakta hareketli değildir ve toprak bakterileri tarafından toksik olmayan ürünlere dönüştürülebilir. Bu sayede yeraltı suyu kontaminasyonu açısından yüksek bir risk oluşturmaz. Ultraviyole ışık, güneş ışığı ve toprak mikroorganizmaları PQ'ı ana bileşikten daha az toksik ürünlere indirgeyebilir (Pasi, 1978).

Parakuatın meslek dolayısıyla maruziyeti hem akut hem kronik zehirlenmeyle sonuçlanabilir. PQ'nın metabolizasyonu zayıftır ve genellikle idrarda değişmeden kalır (Ayala ve ark., 2014). PQ oral yoldan alındığında yüksek toksisite gösterir ve spesifik bir tedavisi olmaması sebebiyle mortalite oranı % 90'ın üzerindedir. Ölümcül dozu 1-3 g olarak bildirilmiştir (Yushen ve ark., 2015).

Parakuat maruziyetinin en sık karşılaşılan şekilleri hayvanlarda ve insanlarda kazayla veya isteyerek PQ'nın yutulması veya doğrudan cilt temasıdır. Yutulduğu takdirde PQ ağızda ve boğazda bir yanma hissi oluşturur ve sonrasında gastrointestinal irritasyon, abdominal ağrı, iştah kaybı, bulantı, kusma ve diyare görülür (Pasi, 1978). PQ solüsyonlarıyla direk temas cilt yanıklarına ve dermatite neden olabilir (Spiewak, 2001).

Gözlere sıçrayan PQ tahriş edebilir, yakabilir, kornea hasarına ve gözlerin yaralanmasına neden olabilir. Düşük buhar basıncı ve büyük damlacıkların oluşumu nedeniyle, açık ortamda kullanılan PQ spreyinin solunmasının herhangi bir önemli sistemik toksisiteye neden olduğu gösterilmemiştir; bununla birlikte, bir sera gibi sınırlı alanlarda PQ'nın solunmasının ölümcül akciğer hastalığı ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Pasi, 1978).

Parakuat pnömotoksikan olarak belirlenmiş, tüm hayvan ve insanlar üzerinde yüksek toksisite gösteren oksidatif stres indükleyici bir herbisittir (Brooks, 1971). Serbest radikal oluşumunu sağlar ve miyokardiyal kaslar, akciğer, karaciğer ve böbrekler üzerinde nekrotik hasara neden olan multiorgan toksisitesi yaratır. PQ ayrıca vücudun tamamında yaygın hemorajik olayları indükler ve sonuçta ölüm ortaya çıkar (Adachi ve ark., 2000). PQ toksisitesine maruz kalan ana hedef organlar akciğerler ve daha az oranda böbreklerdir. Akciğerler PQ'nın, poliamin taşıyıcıları sayesinde bu organa hızlıca alınıp biriktirilmesiyle tercihen hedeflenir. PQ konsantrasyonu PQ alımından sonraki ilk birkaç saat içinde plazmada azalmasına rağmen, akciğerde artış gösterir. Bazı bilim adamları bu fenomeni PQ'nın alveoler hücrelere olan yüksek afinitesine dayandırır (Gill ve ark., 2014).

Ağır PQ zehirlenmesi; yetişkin respiratuvar distres sendromu, pulmoner hiper tansiyon, dem ve ilerleyen akciğer fibrozisine neden olur. Serbest radikaller PQ'ın indüklediği akciğer toksisitesinde çok kritik rol oynar. Toksisitenin sırasıyla ROS oluşumu ve bir demir-PQ complexinin redoks döngüsü ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca PQ'ın sırasıyla hidrojen peroksit ve akciğer hasarına neden olan hidroksil radikallerine dönüşen süperoksit oluşumunda bir elektron donörü olduğu bildirilmiştir (Ayala ve ark., 2014).

Parakuatın memeli sistemlerine verdiği primer yaralanma, Clara hücrelerinde ve alveoler tip I ve II epitel hücrelerinde aktiftransport yoluyla biriktiği akciğerde meydana gelir. Parakuatın neden olduğu akciğer hasarı, alveoler tip I ve tip II epitel hücrelerinin hasar gördüğü erken yıkıcı bir faz; ve alveolit, akciğer ödemi ve enflamatuar hücrelerin infiltrasyonu ile tanımlanan ikinci bir proliferatif fazdır (Suntres, 2002).

Alveoler hücre tahribatı ve sonrasında meydana gelen pulmoner kapillerdeki yırtıklar intra-alveoler hemoraji ve pulmoner enfeksiyona neden olur. Sonuçta alveoler ekstraselüler matriks içindeki pulmoner hücrelerin etrafında fibrozis meydana gelir ve bu durum "PQ akciğer" olarak bilinir (Sun ve Chen., 2016).

Beyin oksidatif hasara en duyarlı bölgedir. Serbest radikaller santral sinir sistemi patolojilerinde doğrudan doku hasarı meydana getirirler (Mercan, 2004). PQ genellikle L-valin taşıyan nöral bir aminoasit transport sistemi aracılığıyla kan-beyin bariyerini geçer ve beyne ulaşır. PQ uzun zaman boyunca beyinde varlığını sürdürür ve farklı beyin dokularında birikir (Ayala ve ark., 2014).

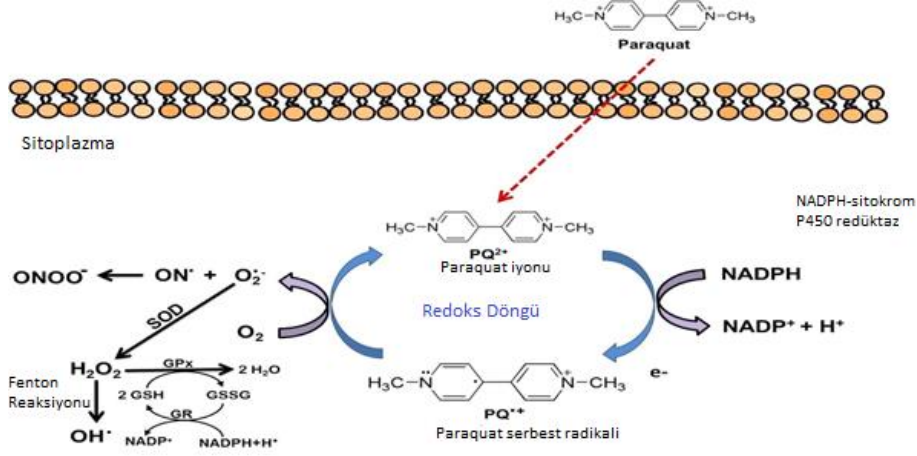
PQ intoksikasyonunda akut böbrek hasarının görülme sıklığı % 50 oranındadır. İntoksikasyondan sonra kalıcı renal fonksiyon kaybına dair bildiri yoktur; fakat renal bozukluğu olan hastalarda ölüm oranı belirgin şekilde yüksektir (Gil ve ark., 2014).

Parakuat maruziyetini takiben gözlenen yüksek mortalite oranı zehrin toksik etkilerini düzelterek antidot veya etkili bir tedavinin olmayışı ile ilgilidir. PQ'nın toksik etkilerini temel olarak oksidatif stresin indüklediği mekanizmalar aracılığıyla gösterdiği belirlenmiş, araştırmacılar ve klinisyenler parakuat toksisitesinin tedavi yöntemi olarak antioksidanların kullanımına önemli yer vermişlerdir (Suntres, 2002).

1. 6. Parakuatın Hücresel Toksisitesi

Parakuat herbisidal aktivitesini intrasellüler elektron transport fotosistemlerini, oksidize NADP (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)'nin fotosentez sırasında NADPH'a redüksiyonunu inhibe ederek gösterir. PQ iyonu (PQ^{2+}) spontan olarak oksijenle reaksiyona girebilen ve böylece süperoksit anyon (O_2^-), singlet oksijen (1O_2), hidroksil ($OH\cdot$) ve peroksil radikalleri ($ROO\cdot$) gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olan PQ monokasyon radikaline (PQ^+) redüklenir. Bu reaktif oksijen türleri bitki hücre membranlarıyla reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna ve hücre ölümüne neden olabilir (Vicente ve ark. 2001).

Parakuat toksik etkilerini kendi redoks döngüsü ile gösterir. Hücre içinde PQ sitozolik seviyede bir redoks döngüsü bileşiği gibi davranır ve indirekt mitokondriyal toksisiteye neden olur (Mayhew, 1978). PQ^{2+} (PQ iyonu) redoks döngüsünü başlatabilenler mikrozomal membranda ve plazma membranında bulunan enzimler ve bazı sitozolik bileşiklerdir. Bunlar; NADPH oksidaz, nitrik oksit sentaz ve NADH-sitokrom P450 enzimleri olabilir (Cocheme, 2009., Cristovao, 2009).



Şekil 1. 3. Parakuat redoks döngüsü (Ayala-Blanco ve ark., 2014).

Sitozolik bölümde parakuat toksisitesinin, parakuatın NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi aracılığıyla PO^+ (monokasyon radikali)'ne dönüşmesiyle şekillendiği gösterilmiştir (Şekil 1.3) (Franco ve ark., 2010). Bu radikaller süperoksit anyon ($O_2^{\cdot-}$) radikallerini oluşturmak üzere moleküler oksijene ekstra elektron aktarırlar ve yeni bir elektron almaya hazır kaynak bileşik oluştururlar (Gragus, 1996., Koppus, 1986). Süperoksit radikali SOD enzimi ile hidrojen peroksit dönüşür, ardından hidroksil radikallerine dönüşür veya glutatyon (GSH) varlığında katalaz (CAT) ya da glutatyon peroksidaz (GPx) tarafından okside glutatyon (GSSG) ve suyu oluşturmak üzere detoksifiye edilirler (Gragus ve Klaassen 1996).

Bu reaktif oksijen türleri özellikle hidroksil radikalleri, hidroperoksitleri oluşturmak üzere çoklu doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer. Bu olay, membran akışkanlığı, geçirgenliği ve bütünlüğünde kayba sebep olan hücresel oksidatif hasarı indükleyen lipid radikal zincir reaksiyonunu başlatır. Bunun yanı sıra hücresel oksidatif hasarın sonucu olarak mitokondri ve sarkoplazmik retikulumun disfonksiyonu ve artmış kalsiyum homeostazı şekillenebilir (Berisha ve ark., 1994). Parakuatın hücre ölümüne sebep olması ile ilgili anahtar komponent mitokondridir. Bulgular parakuat ve mitokondriyal elektron transport sistemi komponentleri arasında direkt bir ilişki olduğunu doğrulamaktadır (Cocheme ve ark., 2009).

PQ mitokondriyal lipid peroksidasyonunu ve mitokondriyal ROS miktarını artırabilir. Ayrıca mitokondride oksijen tüketimi, elektron transport zincirinde kompleks I, III, IV aktivitesini ve membran potansiyelini etkileyebilir ve ATP (adenozin trifosfat) sentaz hızı ve ADP (adenozin difosfat)/O oranında düşmeye bağlı olarak ATPaz aktivitesini inhibe edebilir (Ayala ve ark., 2014).

Parakuatın elektron transport zinciri ve mitokondri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla parakuat zehirlenmesi geliştiren akut modellerde katekolamin miktarları, kompleks-I aktivitesi ve lipid peroksidasyonu gibi parametreler değerlendirilmiştir. PQ'nın beyin, akciğer ve karaciğerde kompleks-I aktivitesini düşürdüğü belirlenmiştir. Ayrıca PQ dozunun artırılması beyin ve akciğerlerde lipid peroksidasyonunu da artırmıştır. Aynı çalışmada rat beyin striatumunda dopamin miktarının PQ grubunda düşük olduğu bildirilmiş ve bunun nedeni PQ alımından sonra PQ'nın kan-beyin bariyerini geçebilmesine bağlanmıştır (Tawara ve ark., 1996).

Parakuat için bilinen herhangi bir farmakolojik antagonist olmadığından ve parakuatı kanda veya diğer dokularda bağlayabilen şelatlama ajanları bulunmadığından, parakuat zehirlenmesi ile ilgili stratejiler, ya bu zehirli maddenin toksikokinetiğinin değiştirilmesi veya emiliminin azaltılması yada ortadan kaldırılmasının artırılması üzerinedir (Suntres, 2002). Bu tür yaklaşımların dokularda parakuat birikmesini önleme amacı vardır ve indüklenmiş kusma veya ishal, gastrik lavaj, oral emetiklerin uygulanması, hemodiyaliz ve hemoperfüzyon gibi prosedürleri içerir (Suntres, 2002). Bununla birlikte, tüm bu tedavi yöntemleri hayal kırıklığı yaratmıştır ve ölüm oranı halen yüksektir.

Chen ve ark. (2013) fare modelinde PQ kaynaklı akut akciğer hasarına ve pulmoner fibrozise karşı, antioksidan özelliği bilinen naringinin koruyucu etkinliğini araştırmışlardır. Bu çalışmada naringin ön tedavisinin, doza bağlı bir şekilde, PQ grubunda gözlemlenen toplam lökosit ve nötrofiller de dahil olmak üzere inflamatuvar belirteçlerin yüzdelerini azalttığı ve ayrıca makrofaj seviyelerindeki azalmayı önlediği gösterilmiştir. Ayrıca naringin, PQ zehirlenmesinin ardından

akciğer dokularında SOD ve GPx gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde meydana gelen azalmayı da önlemiştir. Öte yandan, naringin fibrozis gelişmesine doğrudan dahil olan enzimlerin ekspresyonunu azaltarak PQ ile indüklenen fibrozise karşı koruyucu etkiler göstermiştir. Bu sonuçlar naringinin, oksidatif stresi baskılayarak ve antioksidan enzimlerin regülasyonunu sağlayarak PQ ile indüklenen akut akciğer hasarı, pulmoner fibrozis ve pulmoner inflamasyona karşı koruyucu olabileceğini ve PQ zehirlenmesinin yönetimi için potansiyel bir terapötik olabileceğini düşündürmüştür.

Silimarin meyvelerden izole edilmiş bir polifenolik flavanoiddir. Podder ve ark. (2012) insan A549 adenokarsinom hücre hattında PQ ile indüklenen toksisite üzerine silimarinin koruyucu etkisini incelemiştir. Reaktif oksijen türleri miktarının silimarinle muamele edilen grupta belirgin şekilde düştüğünün gösterilmesi, silimarinin PQ zehirlenmesini hafifletme potansiyeli olan bir antioksidan madde olabileceğini ortaya koymuştur.

Zhi ve ark. (2011) rat akciğer dokusunda ve bronşiyal lavaj sıvısında PQ tarafından indüklenen pulmoner fibrozis ve akciğer hasarına karşı yeni bir antidot bulmak için yaptıkları çalışmada, oksidatif stres ve inflamatuvar reaksiyonlardaki değişiklikleri test etmişler ve akciğer hasarına karşı edaravonun muhtemel koruyucu etkisini araştırmışlardır. Çalışmanın sonuçları edaravonun reaktif oksijen türleri miktarını azaltarak, enzim ve sitokin seviyelerini değiştirerek PQ toksisitesine karşı koruyucu etki gösterdiğini, pulmoner fibrozis ve akciğer hasarını azalttığını göstermiştir.

Reaktif oksijen türlerine karşı korunmak için birçok doğal antioksidan sistem arasında GPx, GSH'nin GSSG'ye oksidasyonunu katalize ederek önemli bir rol oynar. GPx'in aktivitesinin ise esas olarak selenyumun mevcudiyeti tarafından düzenlendiği bilinmektedir. Kim ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada PQ'a maruz kalan farelerde düşen GPx enzim aktivitelerinin selenyum verilmesiyle yükseldiğini

ve oksidatif hasarın daha az olduğunu göstermişlerdir. Selenyum tarafından artırılmış GPx aktivitesinin PQ zehirlenmesinde yararlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Kuarsetin güçlü antioksidan özellikler gösteren, meyve ve sebzelerde bulunan en yaygın flavonoidlerden biridir. Park ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, kuarsetinin sıçanlarda muhtemelen antioksidan aktivitesi ile PQ kaynaklı akciğer hasarına karşı koruyucu rolü olduğu gösterilmiştir. Zerlin ve arkadaşlarının çalışmasında (2013) ise kuarsetin, MTT analizleri ile değerlendirilen A549 hücrelerinde PQ ile indüklenen sitotoksisteyi azaltmıştır. Parakuata maruz kalan hücreler kuarsetin ile tedavi edildiğinde ROS seviyelerinde dikkate değer bir azalma ve toplam hücresel GSH seviyesinde bir artış meydana gelmiştir. Bulgular, kuarsetinin parakuat zehirlenmesinde ROS oluşumunu engelleyerek oksidatif stresi azaltmak veya en aza indirmek için kullanılabileceğini düşündürmüştür .

C vitamininin antioksidan potansiyeli; OH•, nitrik oksit radikalleri, oksisülfür radikalleri, süperoksit anyon radikalleri gibi serbest radikalleri yakalama ve tokoferol, GSH ve β-karoten gibi diğer küçük moleküllü antioksidanların yenilenmesi şeklindedir. Moon ve Chun (2011) parakuat zehirlenmesi olan hastalarda yüksek dozda C vitamininin antiinflamatuvar ve immünosupresif tedavi ile birlikte etkinliğinin değerlendirildiği retrospektif bir çalışma yürütmüştür. Yüksek doz C vitamininin parakuat zehirlenmesi üzerindeki etkinliğini belirlemek için akut böbrek hasarı, hepatit ve hipoksiyi ayırt eden parametrelerin değerlendirildiği çalışmada, yüksek doz C vitamini tedavisinin PQ zehirlenmesi olan hastaların hayatta kalma oranında artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Awadalla (2012) ise C vitamininin deney hayvanlarının karaciğer ve böbreğinde parakuat tarafından indüklenen morfolojik hasarları azalttığını kanıtlamıştır.

Günümüzde PQ toksisitesi ve bunu izleyen hücre ölümü hakkındaki çalışmalar büyük ilerlemeler göstermiştir, ancak PQ zehirlenmesine karşı etkili bir tedavi mevcut değildir. Antioksidanlar, lipid peroksidasyonunun baskılanması aracılığıyla reaktif oksijen türlerinin azaltılması, antioksidan enzim seviyelerinin azalmasının

veya tükenmesinin engellenmesi ve fibrosiste yer alan proteinlerin miktarındaki artışın engellenmesi gibi koruma mekanizmalarına sahiptir (Ayala-Blanco ve ark., 2014). Bu sebeple kafeik asit fenetil ester gibi çeşitli antioksidanların PQ zehirlenmesi tedavisinde kullanılabilmesi için çalışmaların artırılması gerekmektedir.

1. 7. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve serbest radikallerin meydana getirdiği hasarı önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak amacıyla görev yapan sistemlere ‘antioksidan savunma sistemleri’ denir (Karabulut ve Gülay, 2016). Tüm antioksidanlar başlıca dört farklı şekilde etki ederler:

1. Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tüm tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme toplayıcı etkidir. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tür etki gösterirler.

2. Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme bastırıcı etkidir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

3. Zincir kırıcı etki: Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

4. Onarıcı etki: Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması onarıcı etkidir (<https://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01b.pdf>).

Pestisitlerin neden olduğu oksidatif stres sonucunda en fazla etkilenen sistemlerden biri de antioksidan sistemdir. Antioksidanlar doğrudan ve dolaylı olarak ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir (Deveci ve ark., 2015).

Antioksidanlar; doğal ve sentetik antioksidanlar olarak iki ana sınıfa ayrılabilir. Doğal antioksidanlar ise kendi içerisinde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir (Karabulut ve Gülay, 2016). Enzimatik doğal antioksidanlar; süperoksitdismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon-s-transferazlar (GST), mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ve hidroperoksidazdır.

Enzimatik olmayan doğal antioksidanlardan endojen olanlar; melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, urat, laktoferrin ve albumindir. Eksojen olanlar ise; askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler ve polifenollerdir (Yavaşer, 2011).

1. 7. 1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz enzimi ilk olarak 1968 yılında oksijenli solunum yapan canlılarda belirlenmiştir. Bu enzim; süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Ardından, hidrojen peroksit; GSH-Px ve katalaz enzimi aracılığı ile etkisiz hale getirilir. Hücre bölünmelerindeki süperoksit düzeylerinin kontrolünde rol oynar (Kurt, 2008). Bu reaksiyonda SOD enziminin aktif bölgesini oluşturan çinko (Zn) önemli bir mineraldir.



Bu reaksiyon enzim katalizi olmasa bile normal fizyolojik pH değerlerinde oldukça hızlı yürümektedir. Bununla birlikte, gerçekte tüm aerobik organizmaların SOD içerdiği belirlenmiştir ve SOD enzimi reaksiyon hızını artırmak için güçlü bir katalisttir. Aerobik hücrelerde bulunan SOD, fizyolojik pH' da süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene reaksiyonunu, spontan dismutasyonla, katalizsiz reaksiyona göre 10.000 kez daha hızlı katalizler (Bekerecioğlu ve ark 1998).

Kofaktör olarak içerdiği metal iyonu tipine göre SOD enziminin üç çeşidi vardır. Bunlardan biri sitozolde bulunan bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren izomer Cu-Zn SOD'dır. Bu izomerin her bir alt ünitesinde bir Cu atomu, bir Zn atomu, bir zincir içi disülfür köprüsü, bir sülfidril grubu ve bir asetillenmiş terminal amino grubu bulunur (Freeman ve Crapo, 1982). Diğer bir izomer de mitokondride bulunan manganez (Mn) içeren izomerdir (Mn-SOD). Farklılıklara rağmen iki izomer aynı reaksiyonu katalizler (Karabulut ve Gülay, 2016).

Son izomer olan ekstraselüler SOD (EC-SOD) 1982 yılında tanımlanmış, glikoprotein yapısında olan bir moleküldür. Molekül ağırlığı 135.000 dalton'dur. 4 Cu ve 4 Zn atomu taşımaktadır. EC-SOD ve Cu-Zn SOD'ın prostetik metalleri benzemesine rağmen aminoasit dizilişi, antijenik özellikleri ve kromozal yerleşimlerinde farklılıklar mevcuttur (Çakar, 2005). Ekstraselüler düzeyde enzimatik olarak O_2^- radikallerini etkisizleştirebilen tek antioksidandır ve oksidan hasar, yangı ve fibrozis gibi bir çok akciğer hastalıklarından korunmada çok önemli bir rol oynar (Gao ve ark., 2008).

1. 7. 2. Katalaz (CAT)

Katalaz, 4 hem grubu içeren bir hemoproteindir. Her subünitte bir hem grubu ve NADPH molekülü bulunur. Birçok katalazda NADPH molekülü yüzeye yakın ve sıkıca bağlıdır. NADPH, peroksitin oksijene dönüşümünde katalazın aktivasyonunu korur ve etkisini artırır (Zamocky ve Koller, 1999). Enzim, oksijenli solunum yapan tüm hücrelerde bulunur. Karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde aktivitesi yüksektir. Hidrojen peroksidi suya ve oksijene parçalar. Peroksidaz aktivitesinin yanında, bir molekül hidrojen peroksidi elektron vericisi, diğerini de elektron alıcısı olarak kullanabilir (Akkuş, 1995).

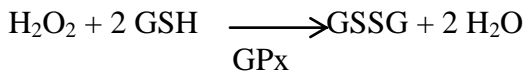


Katalaz çoğunlukla peroksizomlarda, daha az miktarda ise mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunur. SOD aracılığıyla süperoksit radikalinden ortaya çıkan H_2O_2 bir radikal değildir ve biyolojik öneme sahip moleküllerin çoğuyla reaksiyona girmez. Fakat Fe ve Cu iyonlarının katalizörlüğünde gerçekleşen fenton reaksiyonu sonucu ortaya çıkan hidroksil ($OH\cdot$) radikali oluşumunda bir ön madde olarak rol oynar (Karabulut ve Gülay, 2016).

1. 7. 3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla ve serbest radikalleri yakalayarak görev yapan hücrel antioksidanlar olan tiyol gruplarını içeren GSH, serbest radikal etkilerini azaltan birçok enzimin substratı olarak görev yapar. Glutasyonun görevi biyolojik membranları lipid peroksidasyonundan korumaktır. Bu korumayı enzimatik olarak gerçekleştirir. GSH-Px enzimi glutasyonun indirgenmiş formunu (GSH), oksitlenmiş forma (GSSG) dönüştürür (Di Mascio ve ark., 1991).

Glutasyon peroksidaz enzimi, lipitleri peroksidasyondan koruyan önemli bir enzimdir. GPx, redükte glutasyonu (GSH) yükseltirken H_2O_2 'i de suya çevirir ve böylece membran lipitlerini vehemoglobini oksidatif strese karşı korur (Memişoğulları, 2005).



GPx'in aktivitesinin devam etmesi için glutasyon'un belirli bir seviyede bulunması gerekir. NADPH'e bağımlı glutasyon redüktazın katalizlediği bir reaksiyonla, Glutasyon disülfid (GSSG), tekrar iki molekül GSH'a dönüşür (Akkuş 1995).

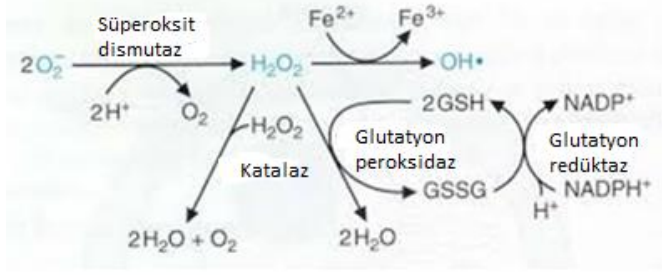
Glutasyon peroksidaz enziminin selenyum bağımlı ve selenyum bağımsız olarak iki tipi vardır. Selenyum bağımlı GPx hidrojen peroksitin de içinde bulunduğu tüm organik hidroperoksitler üzerinde etkiliyken (Mulder ve ark., 1995), selenyum

bağımsız GPx hidrojen peroksit haricindeki hidroperoksitlere etki eder (Lawrence ve Burk, 1976) .

Bunun dışında GPx yapısal ve enzimatik olarak birbirinden farklı dört gruba ayrılmıştır. Bunlar; selüler GPx (cGPx), gastrointestinal GPx (GIGPx), ekstraselüler GPx (eGPx) ve fosfolipid hidrojen peroksid GPx (PHGPx) 'dir. cGPx, GPx ailesinin tanımlanan ilk üyesidir ve her yere dağılmış halde bulunur. GIGPx de hücre içi bir enzimdir ama yalnız gastrointestinal sistem epitelinde lipid hidroperoksidlere karşı ilk savunma hattı olarak ortaya çıkar. eGPx başlıca kan dolaşımına salıverildiği böbreklerde ortaya çıkar. GPx ailesinde eGPx plazma gibi ekstraselüler sıvılarda bulunan tek enzimdir. PHGPx membranlarda veya düşük dansiteli lipoprotein yapısındaki hidroperoksi lipidleri gibi hidroperoksidleri indirger (Takebe ve ark., 2002).

1. 7. 4. Glutasyon Redüktaz

Glutasyon peroksidaz enziminin katalizlediği reaksiyonlardan hidroperoksitlerin detoksifikasyonu ve bazı bileşiklerin indirgenmesi sonucu glutasyon disülfid (GSSG) ortaya çıkmaktadır. Glutasyon redüktaz (GR) enzimi hücre içi glutasyonun indirgenme/yükseltgenme reaksiyonları için merkezi bir role sahiptir. GSSG'nin GSH'a indirgenmesi mitokondrial matriks ve sitosolde yer alan glutasyon redüktaz enzimi tarafından katalizlenir. GR, GSH/GSSG oranını yükseltir (Toribio ve ark., 1996). Bu oranın düşmesi eritrositlerde hemolize neden olur (Keha ve Küfrevioğlu, 2010). GR, aktivitesi için kofaktör olarak pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH'a ihtiyaç duyar (Mates ve ark., 1999).



Şekil 1. 4. Glutasyon döngüsü (<https://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01b.pdf>.)

1. 7. 5. İndirgenmiş Glutasyon (GSH)

Glutasyon dokularda birbiriyle denge halinde olan iki farklı şekilde bulunur; bunlar okside glutasyon (GSSG) ve indirgenmiş glutasyon (GSH)'dur. GSH, GSH peroksidaz enzimi tarafından GSSG'ye dönüştürülür (Reed, 2000). Hücresel GSH düzeyleri oksidatif strese karşı çok duyarlıdır ve reaktif oksijen türleri varlığında hızla azalır. Bu nedenle GSH'ın GSSG'ye oksidasyonu oksidatif stresin erken belirtisi olarak değerlendirilir (Kasap, 2010). Glutasyon; hidrojen peroksit, diğer peroksitler ve serbest radikallerin detoksifikasyonunda görevlidir (Pastorea ve ark., 2003). Hücrede çeşitli şekillerde ortaya çıkan H_2O_2 , GSH varlığında, GPx ile suya redüklenmektedir ve birçok organik hidroperoksidi (ROOH) alkollere indirgeyerek hücreleri bu moleküllerin oksidatif hasarına karşı korumaktadır (Kumaragrupan ve ark., 2002).

GSH hücrelerin oksidatif strese karşı korunması mekanizmasında önemli bir role sahiptir. Bunu iki şekilde yapar; hücrede biriken serbest radikaller veya peroksitleri enzimatik olmayan bir yolla azaltır ve indirgen bir ortam yarattığı için intrasellüler proteinlerin tiyol gruplarının oksitlenerek disülfid bağları oluşturmasını engeller. İkinci olarak da glutasyon-s-transferaz enzimiyle beraber lipid oksidasyonu sonucu ortaya çıkan yağ asidi peroksitlerinin ve zarar görmüş DNA'nın detoksifikasyonunda görevlidir. GSH ayrıca intrasellüler bakır transportunda görev alır ve bakır iyonları ile şelatlar oluşturarak bu iyonların serbest radikal oluşturmasını engeller (Kasap, 2010).

1. 7. 6. Askorbik Asit (C Vitamini)

Askorbik asit suda çözünebilen, çok düşük konsantrasyonlarda bile hidroksil, alkoksil, peroksil, süperoksit anyon, hidroperoksil radikalleri gibi fazla miktarda reaktif oksijen türünü ve nitrojen dioksit, peroksinitrit gibi reaktif nitrojen türlerini nötralize edebilen bir antioksidandır. Hem in vivo hem de in vitro koşullarda güçlü etki gösterir. Oksijen radikallerini hızlıca elimine eder ve oksidatif prosesi engeller. α - tokoferolle sinerjik çalışarak radikallere karşı lipidlerin oksidasyonunu engellerken lipid peroksid radikallerinin eliminasyonunu sağlar. Askorbik asit ayrıca α -tokoferol, ürat ve β -karoten gibi diğer bazı antioksidanların radikal türlerinden yeniden radikal kasyonlar üretebilir. α -tokoferol radikalini α -tokoferole çevirerek bir ko-oksidan görevi görür (Pavlovic ve ark., 2005).

1. 7. 7. Tokoferoller

Vitaminler, hücre bileşenlerini oksidatif reaksiyonlar sırasında üretilen reaktif oksijen radikallerinin saldırısından direkt olarak korurlar veya SOD/glutasyon peroksidaz sistemi tarafından bu radikallerin eliminasyonunu arttırıcı etki gösterirler. Günümüzde E vitamininin moleküler ve hücrel etkileri; spesifik olarak reaktif oksijen türlerini ve nitrikoksiti temizleyerek zarlara veya proteinlere zarar vermelerini önlemek, antioksidan olarak etki etmek ya da spesifik enzimler ve transkripsiyon faktörlerini düzenleyerek hücrel yapıları korumak olarak açıklanmaktadır (Altınar ve ark., 2017).

α , β , γ , δ olmak üzere dört farklı tokoferol formu bulunur. Biyolojik olarak en yaygın ve en aktif E vitamini şekli olan d- α -tokoferoldür. Yağda çözünen bu bileşikler oksijen bulunmayan ortamlarda asit ve sıcaklığa dayanıklıdır (Antmen, 2005). E vitamini büyüme, üreme, çeşitli hastalıkların önlenmesi ve dokuların bütünlüğünün korunması gibi vücut fonksiyonları için gereklidir. E vitamini ile yapılan araştırmalar, serbest radikal kaynaklı doku hasarını ve bazı dejeneratif ve yangısal hastalıkların gelişimini önleyebilen E vitamininin güçlü bir antioksidan

olduğunu göstermiştir (Altınar ve ark., 2017). E vitamini, eşleşmemiş elektronlarla reaksiyona giren ve indirgeyebilen hidroksil grubu içerir. Radikal reaksiyonları sırasında zincir kırıcı etkiye sahiptir. Glutasyon ve askorbik asit ile antioksidan etkisi artar (Antmen, 2005). Apoptoza neden olan reaktif oksijen türlerinin fazla üretiminin E vitamini tarafından inhibisyonu bu prosesi yavaşlatmaktadır. E vitamini, dokularda lipoperoksitlerin sentezi ve birikimine karşı korunmada önemli bir bileşendir ve demir birikimi nedeniyle meydana gelebilecek doku patolojisini de azaltır (Altınar ve ark., 2017).

1. 7. 8. Karotenoidler

Karotenoidler, insan ve hayvanlar tarafından sentezlenemezken, bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenir. Memelilerde % 10'dan az bir kısmı provitamin A olarak işlev görür ve retinole metabolize edilir. Pigment bileşikleri ailesine aittir ve bitkilerde fotosentez sırasında hücreleri ışığın zararlı etkilerinden koruduğu bildirilmektedir. Meyve ve sebzeler önemli karotenoid kaynaklarıdır, bunlarda özellikle sarı ve/veya kırmızı renkte mikrobileşikler halinde bulunur. Bir provitamin A olmasının yanında antioksidan olarak kalp-damar hastalıkları, kanser ve diğer kronik hastalıkların engellenmesinde etkilidir (Yılmaz, 2010).

Konjuge yapıda reaktif çift bağ içermeleri, bu pigmentlere serbest radikallere etki eden antioksidan özelliği kazandırmaktadır. Karotenoidlerin uyarılmış (singlet) oksijeni baskı altına alması, yağ dokularına zarar veren peroksitlerin oluşumunu engeller. Karotenoidler, pek çok etki mekanizması ile kanseri önleme yeteneği gösterebilirler. Bu mekanizmalardan biri antioksidan aktivitesidir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucu antioksidanların, DNA'ya zarar veren ve kanserin başlangıç aşamasında etkili olan serbest radikallerin etkisini yok ettiği anlaşılmıştır (Ötleş ve Atlı., 1997).

1. 7. 9. Polifenoller

Polifenoller suda çözüner halde veya organellerde selüloza bağı olarak bulunan, bitki hücresinde fotosentez sonucu endoplazmik retikulumda sentezlenen maddelerdir. Bitkilerin ikincil metabolizması sonucu sentezlenir, bir ve daha fazla polimerize fenollerden ve fenol halkasına bağı hidroksil (-OH) ve diğel fonksiyonel gruplardan oluşur ve bitkiyi dış etkenlere karşı koruma özelliğı taşır (Fatih, 2010).

Polifenoller insan ve bitki diyetinde büyük oranda bulunmaktadır. Bitki kaynaklı polifenoller güçlü antioksidan etkileriyle insan sağına oldukça yararlıdırlar. Kalp üzerinde koruyucu etkisi, vitamin C biyolojik aktivitesini desteklemesi, erken yaşlanmayı önlemesi ve virüs-bakteri bağlanmasını engellemesi en önemli yararlarındandır (Somer ve Sütçü., 2017). Bitkisel kaynaklı birçok gıda fenolik fitokimyasalları içermekte ve oksidatif zararlara karşı da vücut savunmasına katkıda bulunmaktadır. Bu bileşikler gıdaları bozulmalara karşı korur ve aynı zamanda tüketilmeleri sonucu da vücudumuza antioksidan madde sağılar (Güleşci ve Aygöl., 2016).

Bitkisel gıdalardaki fenolik maddeler; lignanlar, fenolik asitler, stilbenler ve flavonoidler gibi alt gruplara ayrılmaktadır. Bunlardan antioksidan olarak önem taşıyanlar, fenolik asitler ve flavonoidlerdir. Antioksidan özelliğinden dolayı flavonoidler, diyetdeki en önemli antikarsinojenlerden biridir (Güleşci ve Aygöl., 2016). Polifenollerin (Ferulik asit, p-koumarik asit, kafeik asit, quercetin, kaempferol, luteolin, naringenin, delphinidin, malvidin, cyanidin) antioksidan kapasitesi vitaminlerden daha yüksektir (Pellegrini ve ark., 1999).

1. 7. 10. Kafeik Asit Fenetil Ester (KAFE)

Kimyasal adı 2-feniletıl (2E)-3-(3,4-dihidroksifenil)akrilattır. Aynı zamanda feniletıl kafeat veya fenetil kafeat olarak da isimlendirilir. Moleküler formülü $C_{17}H_{16}O_4$ 'tür. İlk defa Grunberger ve arkadaşları (1988) tarafından tanımlanmıştır. Bu fenolik ester

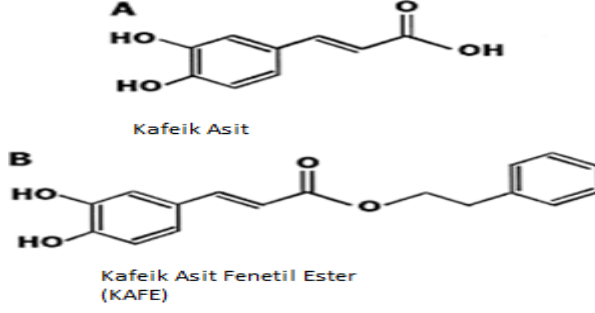
ayrıca kafeik asidin fenetil alkollerle reaksiyonundan da sentezlenebilir (Murtaza ve ark., 2014).

Propolis, çeşitli bitkilerden bal arıları tarafından toplanan reçineli bir maddenin genel ismidir. Yapılan çalışmalarda propolisin içinde 300'den fazla bileşen tespit edilmiştir (Akyol ve ark., 2011). Propolis ortalama olarak % 50 reçineli bileşik ve balsam, % 30 balmumu, % 10 aromatik yağlar ve % 5 arı poleni içerir. Geriye kalan % 5'lik kısmını flavonoidler, aminoasitler ve vitaminler oluşturur. Propolis içindeki farmakolojik olarak en etkili bileşikler flavonoid grubu ile çeşitli fenolik ve aromatik maddelerdir (Yücel ve ark., 2014). Bu aktif bileşenlerin yapılan çalışmalarda antimikrobiyal, antiinflamatuvar, immünmodülatör, antioksidan ve antiproliferatif özelliklere sahip olduğu bulunmuştur (Akyol ve ark., 2011). Propolisin bazı antibiyotiklerle de sinerjik etki gösterdiği gözlenmiştir. Propolis doğal antibiyotik olarak tanımlanır ve 21 bakteri, 9 mantar ve çok sayıda virüs üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmalar propolisin solunum sistemi enfeksiyonları, deri hastalıkları, diş ve diş eti hastalıkları, sindirim sistemi hastalıkları, kadın hastalıkları ve üriner sistem hastalıklarına karşı olumlu etkisi olduğunu göstermiştir (Yücel ve ark., 2014).

Kafeik asit fenetil ester (KAFE), kırmızı renkli meyvelerde, Echinacea cinsi bitkilerde, ayçekirdeği tohumlarında ve turpgillere ait sebzelerde bulunan bir polifenoldür. KAFE, meyve ve sebzelerin dışında, bal arılarının ürettiği propolisin de etken maddesidir (Saraç, 2010). Etkileri çeşitli çalışmalarla ortaya konmuş olan propolisin bu etkilerinin çoğunun içeriğindeki maddelerinden biri olan KAFE'ye bağlı olduğu gösterilmiştir (Gülşen, 2011).

KAFE'nin bu etkinliği membranları rahatlıkla geçmesini sağlayan fenil ve polihidrokarbon zinciri ile birlikte taşıdığı iki adet hidroksil grubuna bağlıdır (Şekil.1). Bu iki –OH grubu moleküle kuvvetli antioksidan özellik kazandırmaktadır.



Şekil 1. 5. Kafeik asit ve kafeik asit fenetil esterin molekül yapısı (Akyol ve ark., 2011).

Sentetik bir madde olan KAFE ile ilgili çok çeşitli in vivo ve in vitro çalışmalar bulunmaktadır. Organizmada çeşitli şekillerde ortaya çıkan serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin serbest radikaller tarafına kayması oksidatif stresin varlığını gösterir. Yapılan çalışmalar KAFE'nin insan nötrofillerinde ksantin/ksantin oksidaz sisteminde reaktif oksijen türleri üretimini durdurarak antioksidan etki oluşturduğunu göstermiştir (Hepşen ve ark., 1996).

Literatürde KAFE'nin biyolojik özellikleriyle ilgili kapsamlı araştırmalar mevcuttur. Bu araştırmalar KAFE'yi enfeksiyon, oksidatif stres, inflamasyon, kanser, diyabet, nörodejenerasyon ve anksiyete gibi çeşitli patolojilere karşı etkili bir molekül olarak tanımlamışlardır (Kumazawa ve ark., 2010; Chen ve ark., 2011; Chen ve ark., 2010; Kurata ve ark., 2010; Wang ve ark., 2006). KAFE'nin antimikrobiyal aktivitesinde birçok virüs türüne karşı RNA, DNA ve hücre proteinleri KAFE'nin hedefi olduğunu gösteren pek çok çalışma vardır (Kishimoto ve ark., 2005; Velazquez ve ark., 2007; Kujumgiev ve ark., 1993; Serkedjieva ve ark., 1992). Bu sayede KAFE'nin diyetle alımının boğaz ağrısı, soğuk algınlığı ve yara tedavisinde de faydalı olduğu gösterilmiştir. KAFE'nin antiinflamatuvar aktivitesi hücre zarından araşidonik asit salınımının inhibe edilmesini içerir.

KAFE'nin antiproliferasyon aktivitesini açıklayan pek çok çalışma vardır. Normal hücresel proliferasyon için yeterli seviyelerde nükleer faktör (NF-kB) aktivitesi sürdürülmelidir. Bazı kanser türlerinde NF-kB aktivasyonunun yüksek

olduğu görülmüş, bu aktivasyonu engellemek için kullanılan KAFE'nin etkili bir kemopreventif ajan olduğu kanıtlanmıştır (Natarajan ve ark., 1996; Zhang ve ark., 2014; Ho ve ark., 2011; Dorai ve Aggarwal, 2004; Bharti ve Aggarwal, 2002). KAFE'nin ayrıca normal hücrelerde sitotoksositeye neden olmadığı için antitümör özellik sağladığı bildirilmiştir (Komericki ve Kranke, 2009). KAFE'nin antitümör aktivitesi; anjiyogenez, tümör istilası ve metastaz dahil olmak üzere kanser gelişimi üzerindeki etkisini ortaya çıkarmaktadır.

Yapılan alışmalar KAFE'nin nöroprotektif aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Akyol ve ark., 2011; Wei ve ark., 2008; Altuğ ve ark., 2008; zyurt ve ark., 2006). KAFE, serebellar granül hücrelerinde apoptozu durdurabilir (Amodio ve ark., 2003) iskemi/reperfüzyonla tetiklenen serebral hasarı (ağlı ve ark., 2005) ve omurilik iskemi reperfüzyon hasarını (Gremy ve ark., 2006) azaltabilir.

Biray ve arkadaşları (2006) yaptıkları çalışmada akut lenfoblastik lösemi hücre dizisinde KAFE'nin önemli düzeyde sitotoksik etki gösterdiğini ve tümör gelişimini durdurduğunu belirlemişlerdir. KAFE'nin nörolojik hastalıklarda da kullanılabileceği belirtilmiştir (Aksoy ve ark., 2011).

Sigara dumanının oluşturduğu hasara karşı KAFE'nin koruyucu etkinliğinin A549 alveolar epitelyal hücreleri üzerinde araştırıldığı çalışmada, bu maddenin sigara içimiyle ilişkili dejeneratif akciğer hastalıklarına karşı koruyucu etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Barlas ve Erdoğan, 2015).

Ratlarda streptozosinin oluşturduğu oksidatif hasar sonrası ratların karaciğerinde KAFE'nin oluşan oksidatif hasarı önlediği belirlenmiştir (Yılmaz ve ark., 2004). Rat eritrositlerinde izoniazid ile ortaya çıkan oksidatif hasara karşı KAFE'nin koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmada ise KAFE'nin antioksidan enzim miktarlarını regüle ederek ve ksantin oksidaz enzimi inhibisyonuyolu ile ROS'u temizleyerek oksidatif hasarı engelleyebileceği belirtilmiştir (Gökalp ve ark., 2006).

Galangin ve KAFE'nin antioksidan etkisinin karşılaştırıldığı çalışmada her ikisinin de ortamdaki O_2^- radikallerini ve ksantin oksidaz sistemi tarafından üretilen ROS'u temizlediği gösterilmiş, ayrıca KAFE'nin ortamdaki malondialdehit (MDA) seviyesini düşürdüğü kanıtlanmıştır (Russo ve ark., 2002).

Deneyisel gentamisin nefrotoksisitesinde oksidatif hasarın önemli bir mekanizma olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada KAFE'nin uygulanmasıyla gentamisinin neden olduğu oksidatif hasarın biyokimyasal parametrelerinde (MDA, SOD, CAT ve GSH-Px) ve histopatolojik bulgularda iyileşme görülmüştür (Aygün, 2010).

Streptozotosin (STZ) tarafından indüklenen diyabetli sıçanların kalp dokularındaki oksidasyonu inceleyen Okutan ve ark. (2005) KAFE'nin diyabetik sıçan kalbinde lipid peroksidasyonu üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğunu ve antioksidan aktivitesinin güçlü olduğunu göstermişlerdir.

1. 8. A549 Hücre Hattı

A549 hücreleri adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyal hücrelerdir. İlk defa 1972'de D. J. Giard ve arkadaşları tarafından 58 yaşında Kafkas bir erkek hastanın kanserli akciğer dokusunun kültüre alınmasıyla hücre hattı geliştirilmiştir (Giard ve ark., 1973).

Pulmoner epitelyum Tip I ve Tip II olarak iki majör hücre tipine sahiptir. Tip I hücreler pulmoner epitelin yüzey alanının yaklaşık % 96'sını kaplar ve bölünme yeteneğine sahip değildir (Ryan ve ark., 1994). Tip II hücreler alveollerde daha az yüzey alanı kaplasalar da çok daha fazla ve belirgin fonksiyonlara sahiptirler. A549 hücre hattı lameller cisimcikler içeren pulmoner epitelin Tip II hücrelerin karakteristik özelliklerine sahiptir (Lieber ve ark., 1976). Bu sebeple sadece akciğer kanserinde model olarak (Wang ve ark., 2009; Shin ve ark., 2009) değil aynı

zamanda in vitro insan primer alveolar epitel hücre modeli olarak da kullanılırlar (Tian ve ark., 2009; Mazarella ve ark., 2007).

A549 hücre hattı in vitro kültüre edilebilir ve yüzeylere tutunan epitelyal tabaka oluşturur. Bu hücre katmanı yüzeyden tripsin muamelesi ile ayrılabilir. Bu hücreler ayrıca lesitin salgılama özelliğine sahiptir ve membran fosfolipidlerini oluşturmak üzere yüksek miktarda doymamış yağ asitleri içerirler (Wu ve ark., 2017).

A549 hücreleri akciğerlerden türetilen bir hücre hattı olduğu için akciğerlerle ilgili hastalıkların moleküler ve hücrel mekanizmalarını araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Podder ve ark., 2013).

1. 9. Tezin Amacı ve Kurulan Hipotezler

Parakuat geniş spektrumlu herbisit olarak yaygın şekilde kullanılan bir kuarterner amonyum bipiridril bileşimidir. Bu ajanın sistematik maruziyetinin akciğerlerde dejeneratif etki göstermesi ve potansiyel olarak ölümcül lezyonlara sebep olması parakuatın memeli toksisitesinin son yıllarda araştırmaların odağı olmasına neden olmuştur (Bus ve Gibson., 1984).

Yüksek reaktif oksijen ve nitrit türlerinin oluşumu birçok organda toksisiteyle sonuçlanır fakat akciğerlerde bir konsantrasyon gradiyentine karşı bir PQ alımı olduğundan toksisite akciğerlerde özellikle şiddetlidir. Akciğerlerde toksisitenin ana hedefi alveoler epiteldir (Gawarammana ve Buckley., 2011).

A549 hücreleri akciğerlerden türetilen bir hücre hattı olduğu için akciğerlerle ilgili hastalıkların moleküler ve hücrel mekanizmalarını araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Podder ve ark., 2013).

Bu sebeple çalışmamızda A549 akciğer epitel hücre hattı kullanıldı. A549 akciğer epitel hücrelerinde PQ'nın sitotoksik etkisinin belirlenmesi için hücre gruplarından birine 24 saat süresince sadece 400 µM PQ uygulaması yapıldı. Bu grubun hücre canlılık düzeyleri ve total oksidan/antioksidan kapasite düzeyleri ölçülerek kontrol grubuyla kıyaslanıp PQ'nın sitotoksik ve oksidatif etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

PQ toksisitesinde ana mekanizma olarak oksidatif stresin dikkate alındığı çalışmalar antioksidan uygulamasının alternatif bir tedavi olabileceğini göstermektedir. Bu antioksidanların koruyucu etkileri oksidatif stres ve inflamasyonun azaltılmasını içerir (Ayala ve ark., 2014). Propolisin aktif bileşenlerinden biri olan KAFE'nin, hidroksil radikali, serbest oksijen radikalleri, peroksil radikali ve süperoksit anyonun toksik etkilerini önleme yeteneğine sahip, serbest radikal giderici bir ajan olduğu bildirilmiştir. Antioksidan aktivite gösteren KAFE, çekirdek DNA'sı, membran lipitleri ve sitosolik proteinleri oksidatif hasara karşı korumada oldukça etkilidir (Ateş ve ark., 2006). PQ'nın neden olduğu oksidatif hasara karşı KAFE'nin olası koruyucu veya tedavi edici etkisinin belirlenmesi amacıyla 24 saat süresince 400 µM PQ uygulanan hücrelere aynı zamanda farklı dozlarda (1; 2,5; 5 µg/ml) KAFE uygulandı.

KAFE farklı konsantrasyonlarda hücre proliferasyonu ve aktiviteleri üzerinde farklı etkilere sahiptir. 24 saat veya daha uzun süreli KAFE uygulamasının sitotoksik etkileri olduğu, bu süreden sonra hücre proliferasyonu ve hücre döngüsünün devamlılığının baskılandığı bildirilmiştir (Chen ve ark., 2004; Wang ve ark., 2006; Avcı ve ark., 2011). Ayrıca yapılan çalışmalarda KAFE'nin yüksek dozlarının A549 hücreleri üzerinde apoptotik veya sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Barlas ve Erdoğan., 2015; Küçükgül ve Erdoğan., 2016). Bu sebeple çalışmamızda KAFE'nin farklı dozları kullanılarak antioksidatif etkisinin maksimum görüldüğü miktarın belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda A549 hücrelerinin PQ ve KAFE ile 24 saatlik inkübasyonun ardından PQ uygulanan hücrelerin hücre canlılık oranları ve total oksidan/antioksidan düzeyleri ile PQ+farklı dozlarda (1; 2,5; 5 µg/ml) KAFE uygulanan hücrelerdeki aynı parametreler karşılaştırılarak, antioksidan özelliği bilinen KAFE'nin PQ'nin neden olduğu oksidatif ve sitotoksik hasar üzerindeki tedavi edici etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

HİPOTEZ 1

KAFE, PQ ile indüklenen oksidatif stresi azaltarak etki gösteriyor olabilir. Hücre lizatlarında toplam oksidan kapasite ve toplam antioksidan kapasite analizleri yapıldı. Bu hipotezi oluşturmamıza neden olan çıkış noktası PQ'nin oksidatif hasar oluşturması ve KAFE'nin antioksidan etki göstermesidir.

HİPOTEZ 2

PQ'nin oluşturduğu sitotoksitenin azaltılması açısından KAFE, koruyucu etki göstererek hücre ölüm oranını düşürüyor olabilir.

2. MATERYAL VE METOD

2. 1. Materyal

Çalışmada Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında ve Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalında mevcut olan laboratuvar ekipmanları kullanılmıştır. Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun verdiği 18. 05. 2016 tarih ve 49533702/69 sayılı karar gereği çalışmamızda etik kurul onayı gerekmemiştir.

2. 1. 1. Kullanılan Sarf Malzemeler

Hücre kültür plakları (96 kuyucuklu)

1.5 ml Mikrosantrifüj tüpleri (Eppendorf)

Steril Filtreli Pipet Ucu 0,5-10 µl (Axygen, TF-300-R-S)

Steril Filtreli Pipet Ucu 2-100 µl (Axygen, TF-100-R-S)

Steril Filtreli Pipet Ucu 50-1000 µl (Axygen, TF-1000-R-S)

15 ml ve 50 ml steril falkon

25 ml ve 15 ml tek kullanımlık steril pipetler

2. 1. 2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma, D2650)

Dulbecco's Modified Eagle's Medyum (Sigma, D5671)

Fötal Buzağı Serum (FBS) (Sigma, F9665)

HEPES Tampon (Sigma, H0887)

L-Glutamin (Sigma, G7513)

Penisilin-Streptomisin (Sigma, P4333)

Triton X-100 (Sigma, T8787)

Tripsin-EDTA (Sigma, T3924)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS) (Sigma)
Proteaz inhibitör kokteyli (Sigma, P8340)
Paraquat dicloryde (Sigma, 36541)
Kafeik Asit Fenetil Ester (Sigma, C8221)
MTT Powder (Biomatik, A3338)

2. 1. 3. Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı (Arçelik-Türkiye)
Buz makinesi (Hoshizaki FM-70GE)
Derin dondurucu (Beko-Türkiye)
Elisa Reader (Biotech Trnity)
Hassas terazi (Precisa-XB220A)
Inverted mikroskop (Nikon Eclipse-TS100)
Karbondioksitli etüv (Thermo Scientific)
Mikropipet Seti
Spektrofotometre (Epond UVWin 5.0)
Sonikatör (Q125-Sonica)
İnkübatör (Thermo Scientific- Forma Direct Heat CO₂ Inkubator)
Soğutmalı santrifüj (Nüve-NF800R)
Spin vorteks (Biosan Multi Vortex V-32)
Steril Güvenlik Kabini (Sınıf 2) (Thermo Scientific MSC-Advantage)
Su banyosu (Nüve ST30)

2. 1. 4. Kullanılan Kitler

Toplam Antioksidan Kapasite Ölçüm Kiti (Rel Assay Diagnostics-Türkiye)
Toplam Oksidan Kapasite Ölçüm Kiti (Rel Assay Diagnostics-Türkiye)
Total Protein Ölçüm Kiti (Supelco- 51254)

2. 1. 5. Kullanılan Hücre Materyali

Araştırmada kullanılan insan akciğer alveoler bazal epitel hücreleri (A549) Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sefa Çelik 'den temin edilmiştir.

2. 2. Metod

2. 2. 1. A549 Hücre Kültürünün Hazırlanması

Hücre kültürü için 440 ml Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) içine 50 ml (%10 oranında) FBS, 5 ml (%1) Penisilin - Streptomisin, 5 ml (%1) Glutamin eklenerek medyum hazırlandı.

A549 hücre hattı liquid nitrojen tankı içerisinde Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji Embriyoloji Laboratuvarına getirildi. Hücreler çözdürüldükten sonra hücre kültürü medyumunu içerisinde % 5 CO₂ ve 37 °C'de kültüre edilerek çoğaltıldı.

2. 2. 2. Hücrelerin Subkültürü

Çoğalmakta olan hücreler 75 cm²'lik flask yüzeyinde % 80 yoğunluğa ulaştığında yüzeyden kaldırılarak hücrelerin subkültürleri yapıldı;

- Flasklarda bulunan kültür medyumunu uzaklaştırıldı.
- Hücrelerin üzerine 4,5 ml Ca-Mg Free Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS) eklenip flask tabanında yayılması sağlanarak hücreler yıkandı.
- PBS uzaklaştırıldıktan sonra 4,5 ml tripsin EDTA solüsyonu (0.5 g porcine tripsin and 0.2 g EDTA • 4Na per liter of Hanks' Balanced Salt Solution)

eklenerek flask içine yayılması sağlandıktan sonra zeminde yapışık halde bulunan hücrelerin kalkması için hafifçe flaskın yan duvarına elimizle vuruldu.

- Tripsin EDTA'nın aktivitesi için flasklar 37 °C' de 5 dk. inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda invert mikroskop altında hücrelerin zeminden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edildi.
- Tripsin aktivitesinin inhibisyonu için flask içine tripsinle aynı miktarda FBS içeren DMEM eklendi ve süspansiyon steril kapaklı falkona alınarak 250 g'de 10 dk. santrifüj edildi.
- Santrifüjün ardından süpernatant dikkatlice falkondan uzaklaştırıldı.
- Falkon dibindeki hücre peleti üzerine 6 ml DMEM eklendi. Yavaşça yapılan çek-bırak işlemi ile hücreler DMEM içinde süspense edildi.
- Oluşan süspansiyon 2'şer ml alınarak 3 adet 75 cm²'lik flasklara pasajlandı (1:3 pasajlama) ve her birinin üzerine 10'ar ml daha DMEM eklenerek 12 ml'ye tamamlandı.
- Pasajlanan hücreler 37 °C'de % 5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakıldı.
- Çalışma için yeterli sayıya ulaşan flasklar her grupta 3 örnek olacak şekilde 5 gruba ayrıldı.

2. 2. 3. Deney Gruplarının Hazırlanması

Gruplar aşağıdaki tabloda (Tablo 2.1) gösterildiği şekilde oluşturuldu.

Tablo 2. 1. Deney grupları ve yapılan uygulamalar

Deney Grupları	Yapılan Uygulamalar
Grup 1 (n= 4)	Kontrol Grubu
Grup 2 (n= 4)	PQ Grubu (400 µM)
Grup 3 (n= 4)	400 µM PQ + 1 µg/ml KAFE
Grup 4 (n= 4)	400 µM PQ + 2,5µg/ml KAFE
Grup 5 (n= 4)	400 µM PQ + 5 µg/ml KAFE

Kontrol grubunda bulunan hücreler hariç tüm hücre gruplarına 400 µM PQ uygulandı. PQ uygulamasının hemen ardından 3 numaralı hücre grubuna 1 µg/ml KAFE, 4 numaralı hücre grubuna 2,5 µg/ml KAFE ve 5 numaralı hücre grubuna 5 µg/ml KAFE uygulaması yapıldı.

2. 2. 4. Hüresel Sitotoksisite Analizi (MTT Yöntemi)

Hücre proliferasyonunu değerlendirmek için MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] testi kullanıldı. Bu yöntem canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri tarafından bir tetrazolyum tuzunun bir formazan ürününe çevrilmesi ve ortaya çıkan bu ürünün miktarının spektrofotometrede kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanırken mitokondri fonksiyonu bozulanlar boyanmamış ölü hücrelerdir. Mor formazan kristallerinin yoğunluğu ortamdaki hücre canlılığı ve aktivitesini göstermektedir (Mosmann, 1983).

Etken madde uygulanmasından bir gün önce 96'lık plak içerisinde her kuyucuğa 100000 hücre gelecek şekilde 100 µl kültür medyumunu ile hücrelerin ekimi yapıldı. Mikroplak 24 saat 37 °C ve %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakılarak hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlandı. İnkübasyonun ardından dilüsyon halinde hazırlanan etken maddeler mikroplaklar içerisine her bir kuyucukta toplam hacim 200 µl olacak şekilde uygulandı ve tekrar 24 saatlik inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresinin sonunda mikroplaklarda bulunan solüsyonlar uzaklaştırıldı ve mikroplaklara 100'er µl MTT solüsyonu eklenip 4 saat inkübasyonun ardından mikroplak okuyucu spektrofotometre ile 540 nm absorbans değerinde ölçümleri 3 tekrarlı olarak yapıldı. Kontrol grubundaki hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek deney gruplarındaki hücrelerin canlılık oranları % olarak ifade edildi. Hesaplamalar için (örnek abs./kontrol abs.)*100 formülü uygulandı.

2. 2. 5. Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Ekilen hücreler %80-90 konflüente ulaştığında etken maddelerle 24 saatlik inkübasyonun ardından flasklardan medyumlar uzaklaştırıldı. dPBS ile yıkama yapıldıktan sonra flasklara tripsin eklenerek hafif çırpma hareketleri ile hücreler serbest bırakıldı. Süspansiyonlar 15 ml'lik falkonlara alınıp 250 g'de 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatant yavaşça döküldükten sonra tekrar dPBS eklenerek yıkama yapıldı. Tüm gruplar hazır olana kadar falkonlar 37 °C 'lık su banyosunda bekletildi. Numuneler tek tek etiketlenerek toplam antioksidan kapasite (TAK) ve toplam oksidan kapasite (TOK) analizleri için soğuk zincirde (max. +4 - min. -20) A.K.Ü. Kimya Bölümü Laboratuvarına götürüldü. Burada her falkon içerisindeki pelet üzerine 500' er µl lizis tampon eklendi. Lizis tampon; hepes buffer, Triton-X, PBS ve proteaz inhibitör kokteylinden (AEBSF, Aprotinin, Bestatin, E-64, Leupeptin, Pepstatin A) hazırlandı. Lizis tampon eklenen örneklerde dağılımı sağlamak için yavaşça çek-bırak işleminin ardından sonikatörde 5'er dakika parçalama işlemi yapıldı.

2. 2. 6. Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) Ölçüm Yöntemi

Örneklerin TAK değerleri Erel (2004) tarafından geliştirilen Rel Assay ticari kitler kullanılarak ölçüldü. Prensip olarak numunede bulunan antioksidan maddelerin, kullanılan ayıraçlardaki koyu yeşil renkli ABTS⁺ (2,2'- azinobis - 3 - etilbenzotiazolin - 6 - sülfonik asit) radikal katyonunu indirgeyerek ABTS molekülüne dönüştürmesi esasına dayanır. Numunede bulunan antioksidan miktarına bağlı olarak koyu renk açılmaya başlar ve spektrofotometrede 660 nm'de okunan absorbans değerleri değişimi numunede bulunan total antioksidan düzeyleri ile ilişkilendirilir. Ölçüm TAK analizlerinde kullanılan bir E vitamini analogu olan Trolox Equivalent olarak isimlendirilen standart antioksidan solüsyonu kullanılarak kalibre edilir, ölçülen TAK değerleri mmol Trolox Equivalent/L olarak okunur.

Kit içeriğindeki kalibrasyon standart solüsyonu deiyonize suyla dilüe edilerek yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru standartlar hazırlandı. Mikropleyitin dikey sırasındaki birinci ve ikinci kuyucuklara kalibrasyon standart solüsyonu eklendi. Çoklu kanal pipetle her bir kanal 250 µl olacak şekilde ayarlanıp Reagent 1 çekildi ve mikropleyitteki standart solüsyonunun da dahil olduğu bütün kuyucuklara boşaltıldı. Üzerlerine çalışma gruplarına uygun şekilde 15'er µl numune eklendi. Kuyucuklardaki sıvılar birbirine karışmayacak şekilde çalkalanan mikropleyitin 30 sn. sonra 660 nm'de 37 °C ortam sıcaklığında absorbans değeri ölçüldü ve bu değer A₁ olarak kaydedildi. Sonrasında 38 'er ml Reagent 2 eklenerek 37 °C 'de 5 dakika inkübasyonun ardından tekrar 660 nm'de ölçüm yapılarak A₂ değerleri kaydedildi.

$A_2 - A_1 =$ Standart veya numunenin Δ Abs değeri olmak üzere;

Numune TAK (mmol/L) = $[(\Delta \text{Abs}_{\text{H}_2\text{O}}) - (\Delta \text{Abs}_{\text{numune}})] / [(\Delta \text{Abs}_{\text{H}_2\text{O}}) - (\Delta \text{Abs}_{\text{standart}})]$

Doku örneklerinde tayin edilen TAK, yukarda verilen formüle göre hesaplandı (mmol/L). TAK değerleri, doku protein düzeyleri (mg/ml)'ne bölünerek mmol Trolox equivalent/g protein olarak verildi.

2. 2. 7. Toplam Oksidan Kapasite (TOK) Ölçüm Yöntemi

Örneklerin toplam oksidan kapasite düzeyi Erel (2005) tarafından geliştirilen Rel Assay ticari kitler kullanılarak ölçüldü. Metodun esası, numunede bulunan oksidanların analizde kullanılan ayıraçtaki ferrous (Fe^{+2}) iyon komplekslerini ferrik (Fe^{+3}) forma okside ederek dönüştürmesidir. Asidik ortamda gerçekleşen bu reaksiyon sonucu miktarı artan ferrik iyonlar kromojen maddeyle birleşerek renkli bir kompleks oluştururlar. Renk yoğunluğuna göre absorbans ölçülerek numunelerdeki oksidan madde konsantrasyonu belirlenir. Kit içeriğinde H_2SO_4 (sülfürik asit) tampon çözeltisi (25 mM, pH 1,75), H_2SO_4 substrat çözeltisi –

prokromojen solüsyonu (H_2SO_4 25 mM, pH 1,75, Fe^{+2} iyonu 5 mM, O-dianisidine, 10 mM), stok stabilize edilmiş standart solüsyon ve deiyonize su vardır. Kit ölçüm metoduna göre, kalibrasyon H_2O_2 ile yapıldığı için, sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eq/L cinsinden bulunur.

Mikropleyt kuyucuklarına 200'er μl Reagent 1 ve üzerlerine 30'ar μl standart veya numune eklenerek 530 nm'de okuma yapıldı ve bu değer A_1 olarak kaydedildi. Ardından kuyucuklara 10'ar μl Reagent 2 eklenmiş ve 37 $^\circ\text{C}$ 'de 5 dakikalık inkübasyonun ardından 530 nm'de A_2 ölçülmüştür.

$A_2 - A_1 =$ Standart veya numunenin ΔAbs değeridir.

Numune TOK(mmol/L) = $[(\Delta\text{Abs numune})/(\Delta\text{Abs standart})] \times$ standart konsantrasyonu

Örneklere tayin edilen TOK, yukarıda verilen formüle göre hesaplandı. TOK değerleri, protein düzeyleri (mg/mL)'ne bölünerek, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eq/g protein olarak verildi.

2. 2. 8. Total Protein Analizi

Total protein analizinde uygulanan Bradford (1976) metodu herhangi bir örnek içindeki protein miktarının kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla kullanılır. Bu yöntemde, proteinlerdeki pozitif yüke bağlanan negatif yüklü Commassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanılmaktadır. Asidik çözeltilerde bu boyanın proteinlere bağlanması sonucu, boyanın maksimum absorbansı 465 nm(kırmızı)'den 595 nm(mavi)'ye kayar. Çalışmamızda protein miktar tayini için Supelco Protein Quantification Kit-Rapid kullanılmıştır. Örneklerin total protein değerleri TAK ve TOK analiz sonuçlarının hesaplanmasında kullanılmıştır.

2. 2. 9. Oksidatif Stres İndeksinin (OSİ) Hesaplanması

Oksidan ve antioksidan dengeye ilişkin yorum yapılmasını sağlayan oksidatif stres indeksi (OSİ) kit (Rel Assay Diagnostics-Türkiye) kataloğunda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$OSI = [(TOK, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/g protein}) / (TAK, (\text{mmol Trolox Equiv/g protein}) \times 100]$$

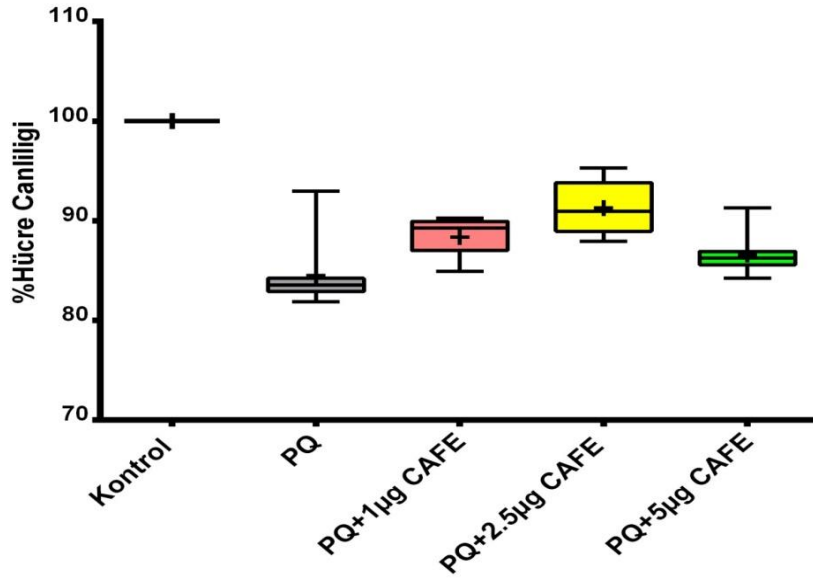
2. 2. 10. İstatistiksel Yöntemler

Verilerin analizi, SPSS 20.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygun dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk normalite testiyle araştırıldı. Parametrik veriler ortalama \pm standart sapma (SD) şeklinde, parametrik-olmayan veriler ortalama \pm standart hata (SEM) olarak gösterildi. Normal dağılım gösteren gruplar arasındaki farkın önemliliği ANOVA, çoklu karşılaştırmalar ise post-hoc Duncan testi ile değerlendirildi. Normal dağılım göstermeyen gruplar arasındaki farkın önemliliği için ise Kruskal Wallis Testi ile değerlendirme yapıldı. $p < 0,05$ için sonuçlar anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3. 1. Hücre Canlılık Bulguları

A549 akciğer epitel hücrelerine 400 μ M parakuat ve hemen ardından farklı konsantrasyonlarda (1; 2,5; 5 μ g/ml) kafeik asit fenetil ester uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda MTT canlılık testleri yapıldı. Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubundaki hücre canlılığı %100 olarak kabul edildi ve diğer grupların canlılık oranları % olarak belirlendi. Buna göre tüm grupların canlılık değerleri Şekil 3. 1 'de gösterildi. Grupların canlılık yüzdeleri ise Tablo 3. 1 'de ifade edilmiştir.

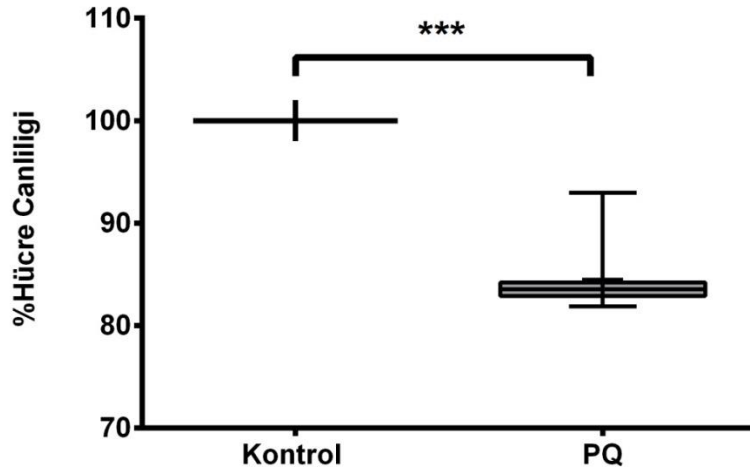


Şekil 3. 1. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 400 μ M PQ ve farklı dozlarda (1; 2,5; 5 μ g/ml) KAFE uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi.

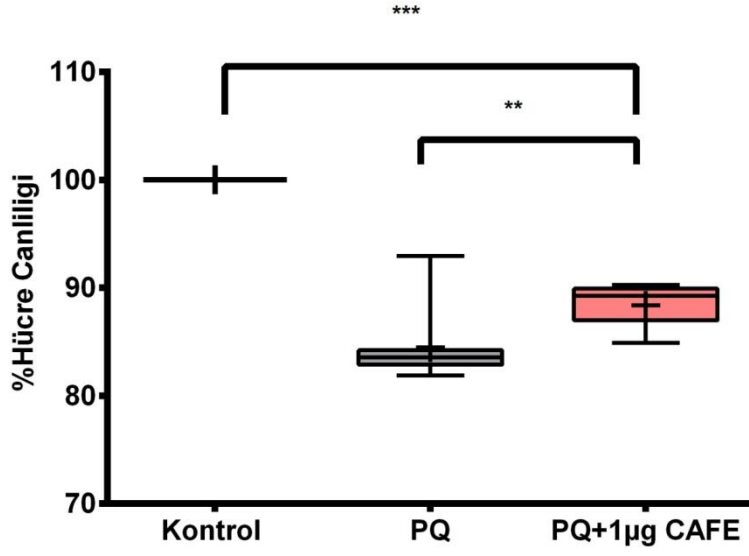
Tablo 3. 1. Gruplardaki canlılık oranları ve anlamlılıkları ($p<0,05$)

Gruplar	Ortalama \pm SH	Ortalama \pm SH	P	
Kontrol - PQ	100	81,41 \pm 1,42	<0,0001	***
Kontrol - PQ+1 KAFE	100	87,73 \pm 1,95	<0,0001	***
Kontrol - PQ+2,5 KAFE	100	90,44 \pm 1,59	<0,0001	***
Kontrol - PQ+5 KAFE	100	84,59 \pm 1,35	<0,0001	***
PQ - PQ+1 KAFE	81,41 \pm 1,42	87,73 \pm 1,95	0,0042	**
PQ - PQ+2,5 KAFE	81,41 \pm 1,42	90,44 \pm 1,59	0,0005	***
PQ - PQ+5 KAFE	81,41 \pm 1,42	84,59 \pm 1,35	0,0698	Ns
PQ+1 KAFE - PQ+2,5 KAFE	87,73 \pm 1,95	90,44 \pm 1,59	0,834	Ns
PQ+1 KAFE - PQ+5 KAFE	87,73 \pm 1,95	84,59 \pm 1,35	0,399	Ns
PQ+2,5 KAFE - PQ+5 KAFE	90,44 \pm 1,59	84,59 \pm 1,35	0,0009	***

Parakuat grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PQ grubunun hücre canlılığında anlamlı bir azalma ($p<0,001$) tespit edildi (Şekil 3. 2). ns: Önem yok; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

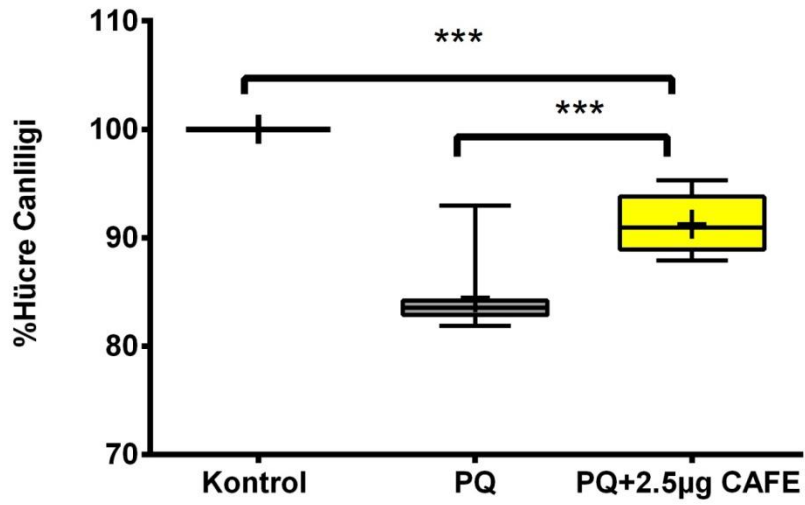
**Şekil 3. 2.** PQ ve kontrol gruplarının hücre canlılıkları.

PQ+1 $\mu\text{g/ml}$ KAFE grubunda hücre canlılığında parakuat grubuna göre anlamlı bir artış gözlenirken ($p<0,01$), kontrol grubuna göre ise azalma ($p<0,001$) gözlenmiştir (Şekil 3. 3).

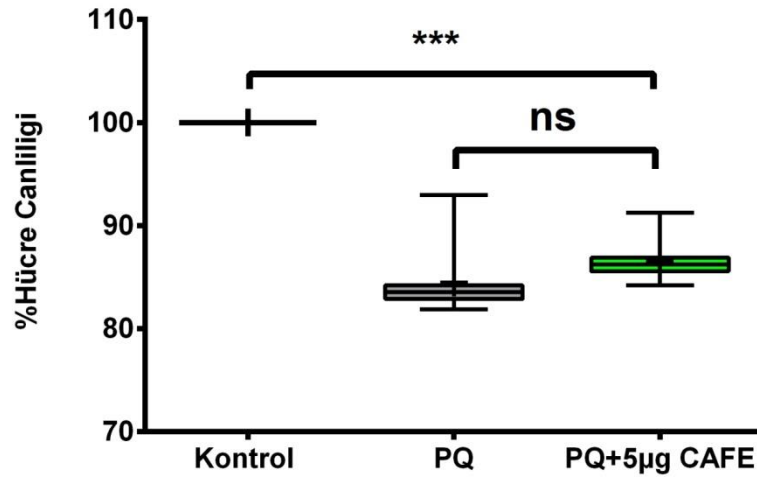


Şekil 3. 3. PQ, kontrol ve PQ+1 µg/ml KAFE grupları hücre canlılıkları.

Parakuat grubuna göre PQ+2,5 µg/ml KAFE grubunda hücre canlılığında anlamlı bir artış gözlenirken ($p < 0,001$) (Şekil 3. 4), PQ ve PQ+5 µg/ml KAFE grupları arasında herhangi bir fark tespit edilmedi (Şekil 3. 5). Aynı zamanda hem PQ+2,5 µg/ml KAFE ($p < 0,001$) hemde PQ+5 µg/ml KAFE grubunda ($p < 0,001$) hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla düşük bulundu.



Şekil 3. 4. PQ, kontrol ve PQ+2,5 µg/ml KAFE grupları hücre canlılıkları.

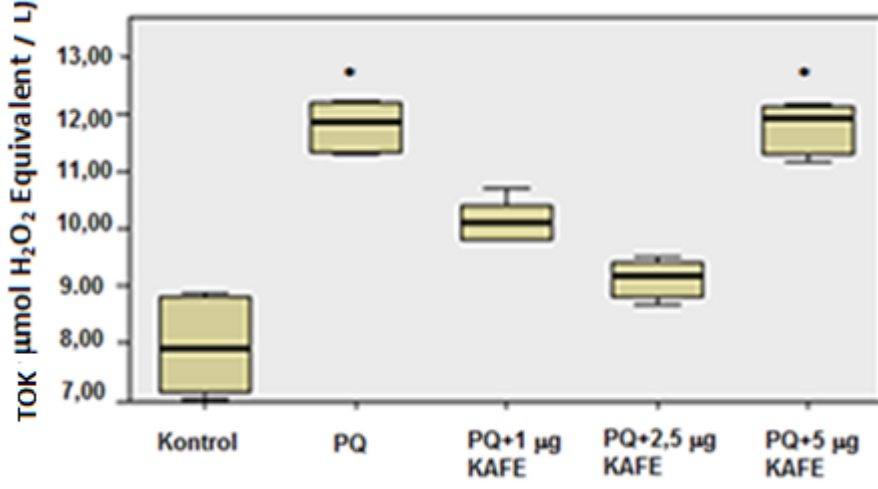


Şekil 3. 5. PQ, kontrol ve PQ+5 µg/ml KAFE grupları hücre canlılıkları.

Parakuatla beraber KAFE'nin farklı dozlarının uygulandığı gruplar arasında yalnızca PQ+2,5 µg/ml KAFE grubu ile PQ+5 µg/ml KAFE grubu arasında hücre canlılığında anlamlı ($p < 0,001$) fark gözlenmiştir.

3. 2. TOK Düzeyleri

Toplam Oksidan Kapasite düzeyleri incelendiğinde PQ grubunda ve PQ + 5 µg/ml KAFE verilen gruplarda oksidan kapasitenin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde ($p<0,05$) yükseldiği görülmüştür (Tablo 3. 2).



Şekil 3. 6. Toplam Oksidan Kapasite Değerleri (ort±(SEM), n=25, *: $p<0,05$ kontrole göre)

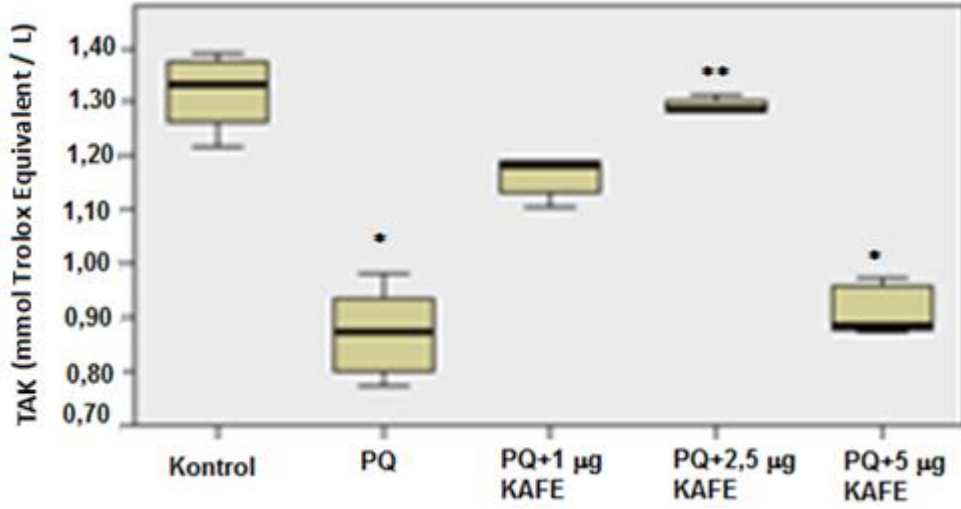
Parakuat verilen grupta yüksek olan toplam oksidan kapasite değerleri, parakuatla beraber 2,5 µg/ml KAFE verilen grupta daha düşük bulunmuştur ve istatistiksel olarak sınırdadır (0,06). 5 µg/ml KAFE verilen grupta ise TOK değerleri 2,5 µg/ml KAFE verilen gruba göre daha yüksektir ve istatistiksel olarak sınırdadır (0,052).

Tablo 3. 2. Grupların TOK ortalamaları ve gruplar arası anlamlılık değerleri. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. *PQ ve PQ +5 $\mu\text{g/ml}$ KAFE grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$).

Test detayları	Ortalama 1	Ortalama 2	Ortalama farkı	n1	n2	P
Kontrol - PQ	7,968 \pm 0,792	11,766 \pm 0,731	3,798	5	5	0,003*
Kontrol - PQ+1 KAFE	7,968 \pm 0,792	10,107 \pm 2,554	2,139	5	5	0,392
Kontrol - PQ+2,5 KAFE	7,968 \pm 0,792	9,130 \pm 0,866	1,162	5	5	1,000
Kontrol - PQ+5 KAFE	7,968 \pm 0,792	11,764 \pm 2,031	3,796	5	5	0,002*
PQ - PQ+1 KAFE	11,766 \pm 0,731	10,107 \pm 2,554	1,659	5	5	1,000
PQ - PQ+2,5 KAFE	11,766 \pm 0,731	9,130 \pm 0,866	2,636	5	5	0,06
PQ - PQ+5 KAFE	11,766 \pm 0,731	11,764 \pm 2,031	0,002	5	5	1,000
PQ+1KAFE-PQ+2,5KAFE	10,107 \pm 2,554	9,130 \pm 0,866	0,977	5	5	1,000
PQ+1KAFE-PQ+5 KAFE	10,107 \pm 2,554	11,764 \pm 2,031	1,657	5	5	1,000
PQ+2,5KAFE-PQ+5KAFE	9,130 \pm 0,866	11,764 \pm 2,031	2,134	5	5	0,052

3.3. TAK Düzeyleri

Toplam antioksidan kapasite düzeyleri incelendiğinde PQ grubunda ve PQ + 5 $\mu\text{g/ml}$ KAFE verilen gruplarda antioksidan statü değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde ($p<0,05$) düştüğü görülmüştür. PQ + 2,5 $\mu\text{g/ml}$ KAFE verilen grupta TAK düzeylerinin yalnız PQ verilen gruba göre belirgin şekilde yükseldiği ($p<0,05$) görülmüştür (Tablo 3. 3). PQ + 1 $\mu\text{g/ml}$ KAFE verilen grupta ise kontrol grubuna göre anlamlı fark gözlenmemiştir.



Şekil 3. 7. Toplam Antioksidan Kapasite Değerleri. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. *PQ ve PQ +5 $\mu\text{g/ml}$ KAFE grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$). **PQ +2,5 $\mu\text{g/ml}$ KAFE ve PQ grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$).

PQ + 2,5 $\mu\text{g/ml}$ KAFE grubunda TAK değerleri 5 $\mu\text{g/ml}$ KAFE kullanılan gruba göre yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

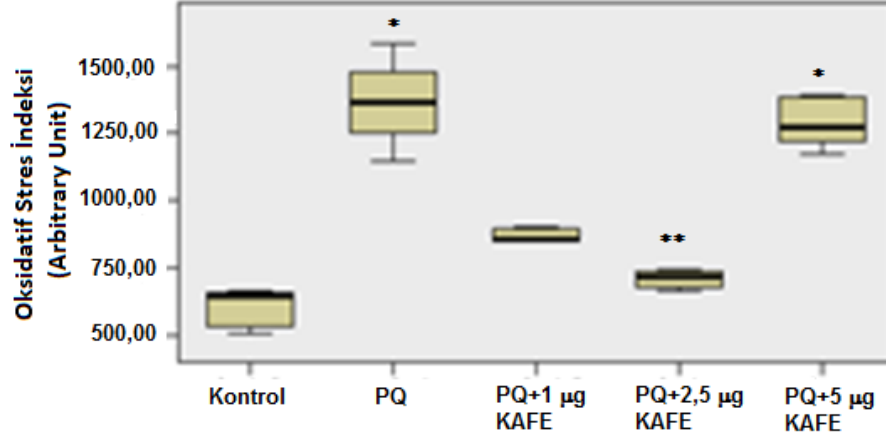
Tablo 3. 3. Grupların TAK ortalamaları ve gruplar arası anlamlılık değerleri.*PQ ve PQ +5 $\mu\text{g/ml}$ KAFE grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$). *PQ +2,5 $\mu\text{g/ml}$ KAFE ve PQ grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$).

Test detayları	Ortalama 1	Ortalama 2	Ortalama farkı	n1	n2	P
Kontrol - PQ	1,337 \pm 0,173	0,867 \pm 0,112	0,470	5	5	0,002*
Kontrol - PQ+1KAFE	1,337 \pm 0,173	1,163 \pm 0,098	0,174	5	5	0,532
Kontrol - PQ+2.5KAFE	1,337 \pm 0,173	1,289 \pm 0,250	0,048	5	5	1,000
Kontrol - PQ+5KAFE	1,337 \pm 0,173	0,908 \pm 0,269	0,429	5	5	0,007*
PQ - PQ+1KAFE	0,867 \pm 0,112	1,163 \pm 0,098	0,296	5	5	0,781
PQ - PQ+2.5KAFE	0,867 \pm 0,112	1,289 \pm 0,250	0,422	5	5	0,023*
PQ - PQ+5KAFE	0,867 \pm 0,112	0,908 \pm 0,269	0,041	5	5	1,000
PQ+1KAFE - PQ+2.5KAFE	1,163 \pm 0,098	1,289 \pm 0,250	0,126	5	5	1,000
PQ+1KAFE - PQ+5KAFE	1,163 \pm 0,098	0,908 \pm 0,269	0,255	5	5	1,000
PQ+2.5KAFE - PQ+5KAFE	1,289 \pm 0,250	0,908 \pm 0,269	0,381	5	5	0,060

Parakuatla beraber 1µg/ml KAFE verilen grupta total antioksidan kapasite düzeyleri kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur fakat istatistiksel olarak sınırdadır ($p<0,053$). Aynı şekilde 2,5 µg/ml KAFE verilen grupta da 5 µg/ml KAFE verilen gruba göre TAK değerleri yüksek fakat istatistiksel olarak sınırdadır ($p<0,06$).

3. 4. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Parakuat ve PQ + 5 µg/ml KAFE gruplarında kontrol grubuna kıyasla oksidatif stres indeksleri belirgin şekilde ($p<0,05$) yüksek bulunmuştur.



Şekil 3. 8. Oksidatif Stres İndeksi Değerleri (ort±std hata, n=25, *: $p<0,05$ kontrole göre, **: $p<0,05$ parakuata göre)

Parakuatla beraber 2,5 µg/ml KAFE verilen grupta oksidatif stres indeksi yalnız parakuat verilen gruba göre düşüktür ($p<0,05$).

Tablo 3. 4. Grupların OSİ ortalamaları ve gruplar arası anlamlılık değerleri (*: $p<0,05$ kontrole göre, **: $p<0,05$ parakuata göre)

Test detayları	Ortalama 1	Ortalama 2	Ortalama farkı	n1	n2	P değeri
Kontrol - PQ	604,156	1366,422	762,266	5	5	0,001*
Kontrol - PQ+1KAFE	604,156	868,277	264,121	5	5	0,353
Kontrol - PQ+2,5KAFE	604,156	707,858	103,702	5	5	1,000
Kontrol - PQ+5KAFE	604,156	1296,007	691,851	5	5	0,003*
PQ - PQ+1KAFE	1366,422	868,277	498,145	5	5	0,857
PQ - PQ+2,5KAFE	1366,422	707,858	658,564	5	5	0,046**
PQ - PQ+5KAFE	1366,422	1296,007	70,415	5	5	1,000
PQ+1KAFE-PQ+2,5KAFE	868,277	707,858	160,419	5	5	1,000
PQ+1KAFE-PQ+5KAFE	868,277	1296,007	427,730	5	5	1,000
PQ+2,5KAFE-PQ+5KAFE	707,858	1296,007	588,149	5	5	0,088

4. TARTIŞMA

Parakuat diklorid yabancı otlara karşı uygun şekilde kullanıldığında güvenilirliği kanıtlanmış sıkça kullanılan etkili bir herbisittir. Bununla birlikte son yıllarda çoğunlukla yanlışlıkla veya gönüllü alımın neden olduğu sayısız ölüm meydana gelmiştir. PQ zehirlenmesi, şuna kadar gözlemlenen yüksek morbidite ve mortalite nedeniyle ve insanlarda kullanılan etkili tedavilerin bulunmamasından dolayı klinik olarak zor bir durum ortaya çıkarır. PQ kandaki seviyeleri düşmeye başladığında bile akciğerlerde birikir (Akciğer konsantrasyonu plazma konsantrasyonundan 6 ila 10 kat daha yüksek olabilir). Pulmoner etkiler; alveoler hücrelerden tip 1-2 ve Clara hücrelerinin zarında bol miktarda eksprese edilen poliamin taşıma sisteminin PQ taşınmasında kullanılmasıyla açıklanabilir. Toksikodinamik seviyede ise PQ toksisitesinin ana moleküler mekanizması redoks döngüsüne ve oksidatif stres oluşmasına dayanır (Dinis-Oliveira ve ark., 2008).

Parakuat toksik etkilerini esas olarak redoks döngüsünden dolayı organizmalardaki süperoksit anyonlarının üretilmesi yoluyla gösterir, böylece hücrenin redoks durumunda dengesizliğe neden olur. Sonunda oksidatif hasar ve hücre ölümü gerçekleşir (Ayala ve ark., 2014).

Parakuat akciğer ve diğer organlarla etkileşimi ile çok büyük miktarlarda ROS (reaktif oksijen türleri) üretebilir. Bu ROS membran lipitlerini oksitleyebilir ve lipit peroksidasyonunu indükler. ROS üretimi glutatyon gibi redükleyici moleküllerin tüketimi sonucu akciğerler ve diğer organlara zarar verir. PQ, alımından sonra dolaşım ile akciğerlere ulaşır ve alveollerde birikir. Alveollerdeki mevcut oksijen redüktazlar tarafından (NADPH gibi) PQ^+ (PQ iyonu) üretimine yol açar ve süperoksit anyon (O_2^-) ve PQ^{+2} oluşumuna neden olur ve sonunda O_2^- diğer pulmoner redüktazlarla hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerine dönüşebilir. Bu güçlü oksidatif türler alveoler hücre hasarı ile sonuçlanacak şekilde alveoler lipitlerden kolayca H atomları alabilirler (Sun ve Chen; 2016).

Akciğer PQ zehirlenmesinin birincil hedefidir ve PQ kaynaklı akciğer toksisitesi; pulmoner ödemin gelişmesine, inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonuna ve ağır fibrosizasyon yol açabilecek şekilde alveoler epitelin hasar görmesine neden olur (Ghio, 2009). Birleşik prosedürler yani antioksidanlarla veya immün baskılayıcılarla hemoperfüzyon PQ tedavisinde kullanılır ancak bu tedaviler çok etkili değildir. Doğal antioksidanların bu kullanımı zehirlenen hastalar için ümit verici bir tedavi seçeneği olabilir ve bu tür tedavilerin etkinliği daha önce gösterilmiştir (Suntres, 2002). Antioksidan aktivite veya serbest radikal temizleme aktivitesi PQ kaynaklı pulmoner toksisiteye karşı korunmada önemlidir.

Reaktif oksijen türleri üretiminin yanı sıra oksijen tüketimindeki azalma, bazı solunum sistemi komplekslerinin aktivitesindeki artışın da dahil olduğu mitokondrial disfonksiyonun katkısı, PQ' in hücre ölümünü indüklediği mekanizmalarda anahtar bir bileşen olarak ortaya çıkmaktadır. Henüz parakuat zehirlenmesi için tedavi yoktur, bununla birlikte, PQ kaynaklı toksisitenin ana mekanizması olarak oksidatif stres dikkate alan çalışmalar uygulanabilir bir alternatif olarak antioksidan tedavi önerilmektedir. Bu antioksidanların koruyucu etkisine dahil olan ana mekanizmalar, oksidatif stres ve inflamasyonun azaltılmasını ve antioksidan savunulmaların uyarılmasını içerir (Ayala ve ark., 2014).

Oksidatif stres sonucu ortaya çıkan serbest radikaller DNA, protein ve hücre fosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitleri gibi pek çok organik ve inorganik bileşiklerle reaksiyona girebilir. Bu etkiler sonucu ortaya çıkan oksidatif hasara bağlı olarak hücrelerde lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve protein yapılarında değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Antioksidan moleküller, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe edebilir (Deveci ve ark., 2015).

Kafeik asit fenetil ester bal propolisinde bulunan fenolik bir bileşiktir (Mehta ve ark., 2018). Biri iki hidroksil grubuna sahip iki siklik yapı içerir. Bu tür hidroksil grupları aktif olarak redoks reaksiyonlarda rol oynar ve antioksidan özellikler

gösterirler (Mohammadzadeh ve ark., 2007). KAFE'nin anti-tümör, immunomodülatör, anti-HIV, antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri bir çok çalışmada bildirilmiştir (Mehta ve ark., 2018). KAFE, lipid peroksidasyonunun yanı sıra lipoksijenaz ve siklooksijenaz enzimleri üzerinde inhibitör etkilere sahiptir (Mohammadzadeh ve ark., 2007).

Farklı bölgelerde bulunan propolislerin kimyasal içerikleri ve KAFE miktarları farklıdır ve KAFE içeren propolisin KAFE içermeyenlere göre çok daha güçlü antioksidan etkisi vardır. KAFE güçlü bir antioksidan olan katekol içermektedir. Propolis ekstraktının farelerde akut böbrek hasarı üzerine antioksidan etkisinin araştırıldığı çalışmada ekstraksiyonun antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu ve temel komponentlerden birinin KAFE olduğu gösterilmiştir (Özyurt ve ark., 2006).

A549 hücreleri kanser araştırmaları için bir araç olarak geliştirilmesine rağmen, bu hücre hattı insan akciğerlerinin Alveolar Tip II pnömositlerini temsil etmektedir ve bu nedenle uzun zamandır solunum araştırmalarında kullanılmaktadır (Cooper, 2012). Ayrıca PQ kaynaklı hücre ölümünün altında yatan mekanizmaları incelemek için de yaygın olarak kullanılmıştır (Podder ve ark., 2013).

Farklı doku ve organlardan köken alan hücrelerin metabolizma hızları, detoksifikasyon yetenekleri, oksidatif strese dirençleri ve yaşam süreleri birbirinden farklı olduğundan dolayı farklı hücre hatlarında aynı kimyasal maddenin lethal dozları farklılık göstermektedir (Kısmalı ve Sel, 2012).

Nakamura ve Liptan (2007)'in nöroblastoma (SK-N-SH) hücreleri kullanarak PQ etkinliğini araştırdıkları çalışmada IC50 değeri olarak 200 µM konsantrasyon belirlemiş, Fabisiak ve arkadaşları (1998) fare miyeloid hücre hattında parakuatın apoptotik etkilerinin incelendiği çalışmalarında IC50 değeri olarak 400 µM parakuat konsantrasyonunda %30 ölüm oranı, Cappelletti ve ark. (1998) ise A549 kullanarak parakuat toksisitesi ve antioksidanların bu toksisite üzerine koruyucu etkilerini

inceledikleri çalışmada 160 µM parakuat ile 24 saat inkubasyon sonunda apoptozisin indüklendiğini belirlemişlerdir.

Parakuatın A549 hücreleri üzerindeki oksidasyonuna karşı ellajik asitin antioksidan özelliğinin araştırıldığı çalışmada PQ doz (50-200 µM) ve zaman bağımlı (12-96 saat) olarak A549 hücreleri üzerine sitotoksosite göstermiştir (Kim ve ark., 2013).

Kanno ve arkadaşları (2019) A549 ve BEAS-2B akciğer epitelyal hücre hatlarını kullanarak PQ'nin hücre içi birikimini, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve mitokondriyal hasarı araştırdıkları çalışmada 16 saatlik PQ maruziyetinden sonra PQ'nin hücrel birikimine bağılı olarak mitokondriyal disfonksiyonun, akciğer hücrelerinde ROS oluşumundan daha fazla, PQ tarafından tetiklenen toksisiteye katkıda bulunabileceği belirtilmiştir.

Parakuat zehirlenmesinde başlıca ölüm nedeni oksidatif stres sonucu meydana gelen alveolar epitelyal hasarın neden olduğu solunum yetmezliğidir. PQ kaynaklı bu redoks döngü akciğerlerdeki oksijen ve elektronların varlığıyla sürdürülmektedir ve akciğerleri PQ toksisitesinde en savunmasız organ haline getirmektedir (Smith, 1987).

MTT, hücre canlılığı analizlerinde sıklıkla kullanılan, MTT'nin mitokondriyal dehidrogenazlarla formazon kristallerine dönüşümüne dayanan bir analizdir (Kim ve ark., 2013). Parakuat toksisitesinin araştırıldığı pek çok çalışmada MTT tekniği ile sitotoksosite belirlenmiştir.

Hipoksinin hücreleri PQ'nin toksisitesinden koruduğunun gösterildiği çalışmada MTT analiziyle 1 mM PQ'nin 24. ve 48. saatlerde hücre canlılığını sırasıyla %60 ve %80 oranlarında azalttığı saptanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları parakuatın endojen antioksidan savunma sisteminde ve oksidatif hasar üzerinde lipid peroksidasyonu gibi belirgin değişiklikler meydana getirdiğini göstermiş, ROS seviyelerindeki artış

ile beraber PQ'nın A549 hücrelerinde serbest radikal oluşumunu indüklediği belirlenmiştir (Kim ve ark., 2011).

Naringenin PQ'nın BEAS-2B hücreleri üzerinde indüklediği sitotoksositeye karşı sitoprotektif etkisinin araştırıldığı çalışmada, PQ'nın 48. ve 72. saatlerde hücre canlılığında %30 ve %70'lik dramatik bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Podder, 2014).

Yapılan bu çalışmada A549 hücrelerinde PQ'nın hücre canlılığını belirgin şekilde azalttığı tespit edildi. Bunun nedeni PQ tarafından indüklenen oksidatif hasar ve mitokondriyal disfonksiyona bağlı gelişen apoptozis olabilir.

Kafeik asit fenetil esterinin ratlarda PQ'nın sebep olduğu doza bağımlı intoksikasyona karşı koruyucu özelliğinin araştırıldığı çalışmada KAFE'nin PQ intoksikasyonunun akut etkilerini engellemede kullanılabileceği belirtilmiştir (Silfeler ve ark., 2015). Silfeler ve ark. (2015)'nin bulgularına paralel olarak çalışmamızda KAFE'nin 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml dozlarında PQ tarafından indüklenen hücre ölümünü durdurduğu saptanmıştır.

Wang ve ark. (2018)'nin A549 hücreleri kullanarak endoplazmik retikulum stresini azaltıcı bir ajan olan salubrinal'in PQ'nın indüklediği akciğer hücre hasarı üzerindeki koruyucu etkisi ile ilgili yaptıkları çalışmada, PQ'nın 24 saat inkübasyonda hücre canlılığını azalttığı, hücre morfolojisini değiştirdiği ve hücre apoptozunu indüklediği gösterilmiştir.

Bulduğumuz sonuçlarla ve literatürde verilen sonuçlarla uyumlu olarak Xu ve Wang (2015) da yaptıkları çalışmada PQ'nın alveolar tip II (A549) hücrelerinde toksisiteye neden olarak hücre canlılık oranını düşürdüğünü göstermişlerdir.

Parakuatın indüklediği hücre ölümünden A549 hücrelerini korumak için deniz iğdesi ekstraktının kullanıldığı çalışmada 200 µM PQ'nın hücre canlılığını kontrol grubuna göre belirgin şekilde azalttığı ve ROS oluşumunu %55 oranında artırdığı tespit edilmiştir (Podder ve ark., 2013).

Parakuata doğrudan maruz kalmak gözler ve cilt üzerinde ciddi tahrişe neden olurken konsantre ürünlerin yutulması ödem, kanama ve ilerlemiş fibrozis nedeniyle akciğerlerde ve diğer organlarda ölümcül yaralanmalara sebep olabilir. Küçük miktarları ise bilinen tedavilere dirençlidir ve geri dönüşümsüz sistemik hasara neden olur.

Akıcılar ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada parakuata maruz kalan ratlarda serum TAK seviyeleri diğer tüm gruplardan daha düşük bulunmuştur. TOK seviyeleri ise diğer gruplardan yüksektir fakat anlamlı değildir. OSI seviyeleri ise PQ grubunda diğer gruplardan yüksektir.

Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stres doku hasarının birincil nedeni olabilir ve inflamasyon gelişebilir (Thomson ve ark., 1998). ROS ve antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlik, akut ve kronik akciğer hasarının patogenezi ile yakından bağlantılı oksidatif stres ile sonuçlanır. Artan ROS seviyeleri doğrudan doku yaralanmasına neden olabilir ve akciğerlerdeki çeşitli pro-inflamatuvar mediatörlerin düzenlenmesi yoluyla inflamatuvar cevapları teşvik edebilir (Tasaka ve ark., 2008). İnflamatuvar reaksiyonlar hastalarda PQ zehirlenmesindeki akciğer hasarında önemli rol oynar (Akıcılar ve ark., 2015).

Propolis bal arılarının yaptığı ve binlerce yıl ilaç olarak kullanılmış doğal bir maddedir ve aminoasitler, fenolik asitler, fenolik asit esterler, flavonoidler ve kafeik asit içerir. Propolisin antilipoperoksidatif ve serbest radikal süpürücü etkileri vardır. Antioksidan etkisinde özellikle kafeik asit fenetil esterinin önemli rolü olduğu bildirilmiştir (Russo ve ark., 2002).

Kafeik asit fenetil ester farklı konsantrasyonlarda hücre proliferasyonu ve aktiviteleri üzerinde farklı etkilere sahiptir. 24 saat veya daha uzun süreli KAFE uygulamasının sitotoksik etkileri vardır, bu süreden sonra hücre proliferasyonu ve hücre döngüsünün devamlılığı baskılanır (Chen ve ark., 2004; Wang ve ark., 2006; Avcı ve ark., 2011). Bu durum KAFE'nin yüksek dozlarının, önemli miktarlarda mitokondriyal membran potansiyeli kaybı yoluyla, apoptozun indüklediği hücre ölümüne yol açan proliferatif hücre nükleer antijeninin (PCNA) ekspresyonunun kademeli olarak azalmasına neden olması ile açıklanabilir.

A549 hücrelerinde sigara dumanının indüklediği inflamasyon ve oksidatif stresin KAFE tarafından inhibisyonunun araştırıldığı çalışmada Küçükgül ve Erdoğan (2016), KAFE'nin farklı dozlarını denemiş ve 2,5 μM 'ın üzerindeki dozlarda sitotoksik etki belirlemişler ve yüksek dozların apoptotik veya sitotoksik olduğunu bildirmişlerdir (Küçükgül ve Erdoğan., 2016).

Barlas ve Erdoğan (2015) akciğer alveoler epitel hücreleri üzerinde KAFE'nin oksidatif ve inflamatuvar strese karşı koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada 2,5 μg 'ın üzerindeki KAFE konsantrasyonunun sitotoksik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Çalışmada 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ KAFE verilen grupta hücre canlılığı 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verilen gruba göre yüksek düzeyde bulunmuştur. PQ grubu ile PQ + 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ KAFE verilen gruplar arasında hücre canlılığı açısından anlamlı fark bulunmaması KAFE'nin bu dozunun diğer çalışmalarla uyumlu olarak sitotoksik etki gösterdiğini kanıtlamaktadır.

Alveolar epitel hücre hasarı ve onarımı, oksidan kaynaklı akciğer hasarı ve çeşitli ajanların neden olduğu fibrozisin patogenezinde önemlidir. Oksidatif strese cevap olarak veya hücre metabolizmasının yan ürünleri olarak reaktif oksijen ve azot türlerinin oluşması; enzim inhibisyonu, protein, DNA ve lipid hasarına neden olarak akciğer hasarını indükler (MacNee, 2001; Sugiura ve Ichinose, 2011; Zhao ve

ark., 2012). Kendini koruma mekanizması olarak hücreler ve dokular bu türlerin hücre içinde ve dışında konsantrasyonlarının düzenlenmesi için çeşitli enzimatik ve non-enzimatik sistemler geliştirmişlerdir (MacNee, 2001). Enzimatik antioksidan savunma sistemleri katalaz, SOD, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazı içerir (Finkel, 2003; Reddy, 2008).

Toplam oksidan kapasite , toplam antioksidan kapasite, paraoxonase-1 (PON-1) ve OSI (oksidatif stres indeksi) genellikle hasarlı dokulardaki toksisite seviyelerinin belirlenmesi amacıyla ölçülür (Oğuz ve ark., 2015). TAK ve TOK analizleri tüm antioksidan ve oksidan parametrelerinin birlikte değerlendirilerek ölçülmesini sağlayan analizlerdir. TAK/TOK oranı, bir başka deyişle OSI, oksidatif stres derecesinin bir göstergesidir ve antioksidasyon ve oksidasyon redoks dengesini gösterir (Torun ve ark., 2014). OSI ölçümleri hassas bir oksidatif stres indeksi sağlar ve hem oksidatif hem de antioksidan parametreleri yansıtabilir (Uzar ve ark., 2012).

Kafeik asit fenetil esterinin hepatotoksisiteye karşı antioksidan etkisinin TAK, TOK, OSI gibi parametrelerle gösterildiği çalışmada ratlarda floksetin verilen grupta yükselen TOK ve OSI değerlerinin KAFE etkisiyle düştüğü, azalan TAK değerlerinin ise yükseldiği gösterilmiştir (Yılmaz ve ark., 2016).

Propolis bileşenlerinden olan galangin ve KAFE'nin antioksidan etkilerinin karşılaştırıldığı çalışmada her ikisinin de ortamdaki süperoksit anyon radikallerini ve ROS'u temizlediği ve MDA miktarlarını düşürdüğü görülmüştür (Russo ve ark., 2002).

Küçükgül ve Erdoğan (2014) KAFE'nin, A549 akciğer alveolar epitelyal hücrelerde H₂O₂'in indüklediği inflamasyon ve oksidatif stres sonucu gelişen hücre ölümünü engellediğinin gösterildiği çalışmalarında, azalan GSH ve katalaz enzim değerlerinin yükseldiğini ve KAFE'nin H₂O₂ varlığında dahi toplam antioksidan kapasite değerlerini artırdığını belirlemişlerdir.

Deveci ve ark. (2015)'nın fareler üzerinde yaptığı bir çalışmada akut klorprifos-etil zehirlenmesinin neden olduğu yüksek TOK ve OSI değerlerinin KAFE verilen gruplarda düştüğü, TAK verilerinin ise yükseldiği saptanmıştır (Deveci ve ark., 2015).

Rifaioğlu ve ark. (2015) ratlarda PQ ile indüklenen hasar üzerine KAFE'nin koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada PQ verilen grupta TOK değerlerinin diğer gruplarla kıyaslandığında belirgin şekilde yükseldiği, TAK değerlerinin ise belirgin şekilde düştüğü gözlenmiştir. KAFE verilen gruplarda ise değerler PQ grubuna göre tam tersi şekilde bulunmuştur.

Çalışmada yalnız PQ verilen grupta TOK seviyelerinin yükselmesi, PQ'nın indüklediği oksidatif hasarın göstergesidir. 2,5 µg/ml KAFE verilen grupta istatistiksel olarak sınırdan olmasına rağmen TOK düzeylerinin düşüşü KAFE'nin antioksidan aktivitesine bağlanabilir. Bu aktivitenin bir diğer göstergesi parakuat ile 2,5 µg/ml KAFE verilen grupta TAK düzeylerinin PQ grubuna kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulunmasıdır. Parakuatın neden olduğu TOK düzeyindeki yükselme, TAK düzeyindeki azalma ve sonuçta OSI' deki artış, PQ'nın oksidatif hasarı indüklediğini göstermektedir. KAFE'nin yüksek dozda uygulandığı grupta (5 µg/ml) TOK değerlerinin PQ uygulanan gruba benzer, daha düşük konsantrasyonda uygulandığı gruptan ise yüksek miktarda olması literatüre uyumlu olarak doza bağımlı oksidatif etki gösterebileceği anlamına gelmektedir.

Parakuat tarafından indüklenen karaciğer hasarında salep ekstraktının etkisinin ratlar üzerinde incelendiği çalışmada kontrol grubuna göre PQ grubunda TOK yükselmiş, TAK ise düşmüştür (Atashpour ve ark., 2017).

Parakuat, redoks döngüsünün modülasyonu, serbest radikallerin jenerasyonu ve endojen antioksidanların azalması yoluyla oksidatif strese neden olur. PQ toksisitesinde oksidatif stres mekanizmasının rolü ve etkili bir antidot olmaması,

araştırmacıların PQ zehirlenmesinin tedavisinde antioksidanların önemine yoğunlaşmalarını sağlamıştır (Atashpour ve ark., 2017).

Kafeik asit fenetil esterin antioksidan rolünü değerlendirmek için birçok araştırma yapılmıştır. Sonuçlar, KAFE'nin serbest radikalleri temizleyebilen ve hücre zarını lipid peroksidasyonuna karşı koruyabilen güçlü bir antioksidan olduğunu göstermektedir.

Yaptığımız çalışmanın sonuçları literatürle uyum göstermiştir ve PQ zehirlenmesinde alternatif bir tedavi olarak KAFE'nin değerlendirilebileceğini ortaya koymuştur.

5. SONUÇ

Bu çalışmada insan A549 hücre hatlarına 24 saat süreyle parakuat (400 μ M) ve kafeik asit fenetil ester (1; 2,5; 5 μ g/ml) uygulaması sonucu elde edilen bulgular şu şekilde özetlenebilir;

- Parakuat uygulaması ile hücre canlılığı azalmış, buna karşın kafeik asit fenetil ester uygulaması hücre canlılığını artırmıştır.
- Parakuat uygulaması sonucunda hücrelerde TOK seviyeleri yükselmiş, KAFE uygulaması PQ ile indüklenen bu değerleri tersine çevirmiştir.
- Parakuat uygulaması ile azalan TAK değerleri KAFE uygulaması ile yükselmiştir.
- OSİ PQ uygulanan hücrelerde yükselmiş, KAFE uygulaması bu parametre üzerinde baskılayıcı etki göstermiştir.
- Parakuat uygulaması ile artan TOK ve OSİ seviyeleri ile azalan TAK seviyeleri, KAFE uygulanan en yüksek dozu (5 μ g/ml) ile herhangi bir değişime uğramamıştır.

Özellikle antioksidan etkileri nedeniyle koruyucu ve tedavi edici amaçla dünya genelinde yaygın olarak tercih edilen propolis aktif bileşeni KAFE'nin PQ'nın neden olabileceği hücresel toksisite ve oksidan-antioksidan statü üzerine etkilerinin değerlendirildiği bu çalışmada, genel olarak PQ maruziyeti sonucunda A549 hücrelerinde artan oksidan statü ve azalan antioksidan kapasitenin KAFE uygulamasıyla normale yakın değerlere döndüğü ifade edilebilir. Bu sonucun elde edilmesinde KAFE'nin, tedavide olumlu sonuçlara ulaşılabilmesi açısından önemi

ortadadır. Elde edilen bu sonuçlar yapılacak diğer benzer çalışmalara kaynak teşkil edebilir.

ÖZET

Parakuat Kullanılarak Deneysel Oksidatif Stres Oluşturulan A549 Akciğer Epitel Hücreleri Üzerine Farklı Dozlarda Uygulanan Kafeik Asit Fenetil Esterin Biyokimyasal Etkisinin Araştırılması

Parakuat (PQ) yüksek toksisiteye sahip, kuarterner nitrojen bir herbisittir. Fiyatının ucuzluğu, hızlı etki göstermesi ve çevresel karakteristikleri sayesinde dünyada kullanımı yaygındır. Kazayla veya bilerek gerçekleşen parakuat maruziyeti sonrası etkilenen ana hedef organ akciğerlerdir. Parakuat toksisitesinde reaktif oksijen türlerinin oluşumunun indüklenmesi önemli yer tutar. Bu sebeple, indüklenen reaktif oksijen türleri oluşumuna karşı antioksidanların kullanımı alternatif bir tedavi yöntemi olarak görülmektedir.

Kafeik asit fenetil ester (KAFE) bazı bitkilerde bulunan aynı zamanda bal arıları tarafından üretilen propolisin aktif bileşenlerinden biri olan bir polifenoldür. KAFE, enfeksiyon, oksidatif stres, inflamasyon, kanser, diyabet, nörodejenerasyon, anksiyeteye karşı etkili bir moleküldür.

Bu tez çalışmasında, A549 akciğer epitel hücrelerinde parakuat ile oluşturulan oksidatif streste kafeik asit fenetil esterin etkisini belirlemek amacıyla hücre canlılık testi (MTT), toplam oksidan kapasite (TOK) analizi, toplam antioksidan kapasite (TAK) tayini ve oksidatif stres indeksi (OSİ) hesaplaması yapıldı. Bu amaçla A549 hücre hatlarına 24 saat süresince 400 µM parakuat ve 1; 2,5 ve 5 µg/ml KAFE uygulandı. Uygulama sonunda yapılan analizlerde parakuatın hücre canlılığını önemli derecede azalttığı, TOK değerlerini artırdığı ve TAK değerlerini ise düşürdüğü belirlendi. Parakuatla beraber KAFE'nin 1 µg/ml ve 2, 5 µg/ml dozlarının uygulandığı hücre gruplarında hücre canlılıklarının yalnız parakuat uygulanan gruplara göre yükseldiği, 5 µg/ml KAFE uygulamasının ise hücre canlılığı üzerinde iyileştirici etkisinin olmadığı saptandı. KAFE'nin 2, 5 µg/ml dozda uygulandığı grupta TOK değerleri PQ grubuna göre düşük bulunmuş, fakat istatistiksel olarak sınırda anlamlılık düzeyinde kalmıştır. Parakuat grubunda azalan TAK değerleri 2, 5 µg/ml KAFE uygulamasıyla belirgin şekilde artış gösterirken, 5 µg/ml KAFE uygulaması TAK değerlerini kontrol grubuna kıyasla düşürmüştür. 1 µg/ml KAFE verilen grupta ise TAK değerleri PQ grubuna yüksektir fakat istatistiksel olarak sınırda anlamlılık düzeyinde bir fark bulunmuştur. OSI değerleri PQ ve PQ+5 µg/ml KAFE gruplarında kontrol grubuna göre yüksek, PQ+2,5 µg/ml CAFE grubunda ise PQ grubuna göre düşük bulunmuştur.

Bu bulgulardan hareketle, kafeik asit fenetil esterin doza bağımlı olarak, parakuatın indüklediği oksidatif stres hasarına karşı koruyucu veya tedavi edici özelliğe sahip olduğu söylenebilir.

Anahtar Sözcükler:A549, Antioksidan, Kafeik Asit Fenetil Ester, Oksidatif Stres, Parakuat

SUMMARY

Investigation Of Dose Dependent Biochemical Effect Of Caffeic Acid Phenethyl Ester On Experimental Oxidative Stress Generated By Using Paraquat In A549 Lung Epithelial Cell Line

Paraquat (PQ) is a high toxic, quaternary nitrogen herbicide. It is widely used in the world due to its low price, rapid effect and safe. The main target organs affected by accidental or intentional PQ exposure are the lungs. In PQ toxicity, induction of reactive oxygen species takes an important place. Therefore, the use of antioxidants against the formation of induced reactive oxygen species is seen as an alternative treatment method. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) is a polyphenol found in some plants, which is also one of the active components of propolis produced by honeybees. CAPE is an effective molecule against infection, oxidative stress, inflammation, cancer, diabetes, neurodegeneration, and anxiety.

In this thesis study, cell viability test (MTT), total oxidant capacity (TOC) analysis, total antioxidant capacity (TAC) determination and oxidative stress index (OSI) were calculated in order to determine the effect of caffeic acid phenethyl ester on oxidative stress induced by PQ in A549 lung epithelial cells. For this purpose, 400 μ M paraquat and 1; 2, 5 and 5 μ g/ml CAPE were applied to A549 cell lines for 24 hours. At the end of the application, it was determined that PQ significantly decreased cell viability, increased TOC values and decreased TAC values. It was found that cell viability was increased in the groups of 1 μ g and 2, 5 μ g/ml of CAPE together with paraquat compared to the groups treated with paraquat alone, whereas 5 μ g/ml CAPE had no curative effect on cell viability. TOC values were found to be lower in CAPE group compared to PQ group, but remained a slight statistical difference. In the PQ group, decreasing TAC values increased significantly with 2, 5 μ g/ml CAPE application, while 5 μ g/ml CAPE application reduced TAC values compared to the control group. In the 1 μ g/ml CAPE group, the TAC values were higher than the PQ group but showed a slight statistical difference. OSI values were higher in the PQ and PQ + 5 μ g/ml CAPE groups than in the control group and lower in the PQ + 2.5 μ g/ml CAPE group than the PQ group.

Based on these findings, it can be said that caffeic acid phenethyl ester is dose-dependent and has protective or therapeutic properties against paraquat induced oxidative stress damage.

Keywords: A549, Antioxidant, Caffeic acid phenethyl ester, Oxidative stress, Paraquat.

KAYNAKLAR

- ADACHI, J., TOMITA, M., YAMAKAWA, S., ASANO, M., NAITO, T., UENO, Y. (2000). Hydroperoxycholesterol as a marker of oxidative stress in rat kidney induced by paraquat. *Free Radic. Res.*, **33**: 321-327.
- AKKAN, T. (2000). UV radyasyonunun Bracon Hebetor (hymenoptera: braconidae) ile konukçuları Ephestia kuehniella (lepidoptera: pyralidae) ve Plodia interpunctella (lepidoptera: pyralidae) larvaları üzerine etkisi. Yüksek lisans tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- AKKUŞ, İ. (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Basım Yayım ve Dağıtım, Kuzucular Ofset, Konya-Türkiye, 1-15.
- AKPOYRAZ, M., DURAK, İ. (1995). Serbest radikallerin biyolojik etkileri. *Ankara Tıp Mecmuası*, **48**: 253-262.
- AKYOL, S., ARMUTÇU, F., YİĞİTOĞLU, M. R. (2011). Using of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) the active substance of propolis in some neurologic disease and emergency. *Spatula DD.*, **1(1)**: 37-42.
- ALTAN, N., DİNÇEL, S. A., KOCA, C. (2006). Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi*, **31(2)**: 51-56.
- ALTINER, A., ATALAY, H., BİLAL, T. (2017). Bir antioksidan olarak Evitamini. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, **6(3)**: 149-157.
- ALTINIŞIK, M. (2000). Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar. Erişim [<https://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01b.pdf>]. Erişim Tarihi: 25.07.2019.
- ALTUĞ, M. E., SERARSLAN, Y., BAL, R., KONTAŞ, T., EKİCİ, F., MELEK, I. M., ASLAN, H., DUMAN, T. (2008). Caffeic acid phenethyl ester protects rabbit brains against permanent focal ischemia by antioxidant action: a biochemical and planimetric study. *Brain Research*, **1201**: 135-142.
- AMODÍO, R., DE RUVO, C., SACCHETTI, A., DÍ SANTO, A., MARTELLI, N., DÍ MATTEO, V., LORENZET, R., POGGÍ, A., ROTÍLIO, D., CACCHÍO, M., ESPOSITO, E. (2003). Caffeic acid phenethyl ester blocks apoptosis induced by low potassium in cerebellar granule cells. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **21**: 379-389.
- ANTMEN, E. (2005). Beta talasemide oksidatif stres. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- ATASHPOUR, S., KARGAR JAHROMÍ, H., KARGAR JAHROMÍ, Z., ZAREÍ, S. (2017). Antioxidant effects of aqueous extract of salep on paraquat-induced rat liver injury. *World J Hepatol*, **9(4)**: 209-216.
- ATEŞ, B., DOĞRU, M. I., GÜL, M., ERDOĞAN, A., DOĞRU, A. K., YILMAZ, I., YÜREKLİ, M., EŞREFOĞLU, M. (2006). Protective role of caffeic acid phenethyl ester in the liver of rats exposed to cold stress. *Fundam Clin Pharmacol*. **20(3)**: 283-9.

- AVCI, C. B., GÜNDÜZ, C., BARAN, Y., SAHİN, F., YILMAZ, S. DOĞAN, Z. O., SAYDAM, G. (2011). Caffeic acid phenethyl ester triggers apoptosis through induction of loss of mitochondrial membrane potential in CCRF-CEM cells. *J Cancer Res Clin Oncol.*,**137**: 41-47.
- AWADALLA, E. A. (2012). Efficacy of vitamin C against liver and kidney damage induced by paraquat toxicity. *Exp Toxicol Phatol*, **64**: 431-434.
- AYALA, A., MUÑOZ, M. F., ARGÜELLES, S. (2014).Lipid peroxidation: production, metabolism and signaling mechanisms of malondialdehydeand 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.*,**2014**: 1-31.
- AYALA-BLANCO, T., ANDERİCA-ROMERO, A. C., PEDRAZA-CHAVERRİ, J. (2014). New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. *Free Radical Research*, **48(6)**: 623-640.
- AYDİLEK, N., AKSAKAL, M. (2003). Testosteronun tavşanlarda karaciğer antioksidan sistemi üzerine etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Vet. Fak. Dergisi*, **14 (2)**: 22-25.
- AYGÜN, F. Ö. (2010). Sıçanlarda deneysel gentamisin nefrotoksisitesinde oksidatif stresin rolünün ve olası oksidatif stres üzerine kafeik asit fenetil ester'in etkisinin araştırılması.Enfeksiyon Hastalıkları Ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- BARLAS, F. B., ERDOĞAN, S. (2015) Caffeic acid phenethyl ester protects lung alveolar epithelial cells from cigarette smoke-induced damage. *Turkish Journal of Medical Sciences*,**45**:534-541.
- BAŞARAN, M. S., SERİM, A. T. (2010). Herbisitlerin toprakta parçalanması. *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*,**24(2)**: 54-61.
- BEKERECİOĞLU, M., UĞRAŞ, S., DİLEK, ON. (1998). Serbest radikaller. *Sendrom*, **10(3)**: 85-94.
- BERİSHA, H. İ., PAKBAZ, H., ABSOOD,A., SAİD, S. İ. (1994). Nitric oxide as a mediator of oxidant lung injury due to paraquat. *Proc. Natl. Acad. Sci.*,**91**:7445-7449
- BETTERİDGE, D. J. (2000). What is oxidative stress?.*Metabolism*, **49(2)**: 3-8.
- BHARTİ, A. C., AGGARWAL, B. B. (2002). Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochemical Pharmacology*, **64(5-6)**: 883–888.
- BİRAY, Ç., GÜNDÜZ, C., YILMAZ, B., ŞAHİN, F., TOĞÇUOĞLU, N.(2006). The evaluation of cytotoxic and apoptotic effect of propolis and its extracts caffeic acid phenethyl ester and cinnamic acid in human acute T-Cell Lymphoblastic Leukemia Cell Line (CCRFCEM).*Ege Tıp Dergisi*, **45(2)**: 83-92.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72(1-2)**:248-254.
- BROOKS, R. E. (1971). Ultrastructure of lung lesions produced by ingested chemicals. I. Effect of the Herbicide Paraquat on Mouse Lung. *Lab. Invest.*,**25**: 536-545.

- BURÇAK, G., ANDİCAN, G. (2004). Oxidative DNA damage and aging. *Cerrahpaşa J Med*, **35**: 159-169.
- BUS, J. S., GIBSON, J. E. (1984). Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. *Environ Health Perspect*, **55**:37-46.
- CAPPELLETTI, G., MAGGIONI, M., MACI, R. (1998). Apoptosis in human epithelial cells: triggering by paraquat and modulation by antioxidants. *Cell Biology Internationale*,**22**: 671–678.
- CHEN, M. F., WU, C. T., CHEN, Y. J., KENG, P. C., CHEN, W. C. (2004). Cell killing and radiosensitization by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in lung cancer cells. *J Radiat Res*,**45**: 253-260.
- CHEN, H. C., JU, H. Y., TWU, Y.K., CHEN, J. H., CHANG, C. M., LIU, Y. C., CHANG, C., SHIEH, C. J. (2010). Optimized enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester by RSM. *New Biotechnology*,**27(1)**:89–93.
- CHEN, H. C., CHEN, J. H., CHANG, C., SHIEH, C. J. (2011). Optimization of ultrasound-accelerated synthesis of enzymatic caffeic acid phenethyl ester by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*; **18(1)**: 455–459.
- CHEN, Y., NIE, Y. C., LUO, Y. L., LIN, F., ZHENG, Y. F., CHENG, G. H., WU, H., ZHANG, K. J., SU, W. W., SHAN, J. G., LI, P. B. (2013). Protective effects of naringin against paraquat-induced acute lung injury and pulmonary fibrosis in mice. *Food Chem Toxicol*, **58**: 133-140.
- CHEN, Y. G., SUN, B. (2016). Advances in the mechanism of paraquat-induced pulmonary injury. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **20**: 1597-1602.
- CHEESEMAN, K. H., SLATER, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull*, **49(3)**: 481-93.
- CNUBBEN, N. H. P., RIETJENS, I. M. C. M., WORTELBOER, H., ZANDEN, J., BLADEREN, P. J. (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environ Toxicology And Pharmacology*, **10**: 141-152.
- COCHEMÉ, H. M., MURPHY, M. P. (2009). The uptake and interactions of the redox cyler paraquat with mitochondria. *Methods Enzymol*, **456**: 395–417.
- COOPER, J. (2012). Cell Line Profile A549. European Collection of Authenticated Cell Cultures, Public Health England.
- CRISTOVAO, A. C., CHOI, D.H., BALTAZAR, G., BEAL, M. F., KİM, Y. S. (2009). The role of NADPH oxidase 1-derived reactive oxygen species in paraquat-mediated dopaminergic cell death. *Antiox Redox Signal*, **11**: 2105–2118.
- ÇAĞLI, K., BAĞCI, C., GÜLEÇ, M., CENGİZ, B., AKYOL, O., SARI, I., ÇAVDAR, S., PENÇE, S., DİNÇKAN, H. (2005). In vivo effects of caffeic acid phenethyl ester on myocardial ischemia-reperfusion injury and apoptotic changes in rats. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, **35(4)**, 440–448.
- ÇAKAR, H. (2005) Etanolün oluşturduğu karaciğer hasarı üzerine quercetin'in etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

- DALLE-DONNE, I., ROSSÌ, R., GIUSTARINI, D., ET AL. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.*, **329**: 23-38.
- DEVASAGAYAM, T. P. A., TILAK, J. C., BOLOOR, K. K., SANE, K. S., GHASKADBI, S. S., LELE, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India*, **52**: 794-804.
- DEVECİ, H. A., KARAPEHLİVAN, M., KAYA, İ., KÜKÜRT, A., ALPAY, A. (2015). Akut klorprifos-etil zehirlenmesine karşı kafeik asit fenetil ester'in koruyucu etkisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* **62**: 255-260.
- DİNİS-OLIVEIRA, R. J., DUARTE, J. A., SÁNCHEZ-NAVARRO, A., REMÍÃO, F., BASTOS, M. L., CARVALHO, F. (2008). Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment. *Crit Rev Toxicol*, **38(1)**: 13-71.
- DİPLOCK, A. T. (1998). Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. *ILSI Europe concise monograph series*, 59 p., Belgium.
- DORAİ, T., AGGARWAL, B. B. (2004). Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Letters*, **215(2)**: 129-140.
- ELLIOT, J. G. (1999). Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech.*, **53(2)**: 46-48.
- ERCAN, N., FİDANCI, U.R. (2012). Piyodermalı köpeklerde idrarda 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeyleri. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **59**: 163-168.
- EREL, Ö. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*, **37(2)**: 112-119.
- EREL, Ö. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clin Biochem*, **38(12)**: 1103-1111.
- ERENEL, G., ERBAŞ, D., ARICIOĞLU, A. (1992). Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. *Gazi Tıp Derg.*, **3**: 243-250.
- FABIŞIAK, J., KAGAN, V., TYURİNA, Y., TYURİN, V., LAZO, J. (1998) Paraquat induced phosphatidylserine oxidation and apoptosis are independent of activation of PLA2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **274**: 793-802.
- FANG, Y. Z., YANG, S., WU, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, **18(10)**: 872-879.
- FANTEL, A. G. (1996). Reactive Oxygen Species in Developmental Toxicity: Review and Hypothesis. *Teratology*, **53(3)**: 196-217.
- FINKEL, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol*, **15**: 247-254.
- FRANCO, R., LÍ, S., RODRÍGUEZ-ROCHA, H., BURNS, M., PANAYIOTIDIS, M. I. (2010). Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: relevance to Parkinson's disease. *Chem Biol Interact*, **188**: 289-300.
- FREEMAN, B. A., CROPA, J. D. (1982). Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest*, **47**: 412-27.

- FRIDOWICH, I. (1975). Superoxide dismutase. *Annual Review of Biochemistry*, **44**: 147-159.
- GAO, F., KINNULA, V. L., MYLLÄRNIEMI, M., OURY, T. D. (2008). Extracellular superoxide dismutase in pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal.*, **10(2)**: 343-354.
- GAWARAMMANA, I.B., BUCKLEY, N. A. (2011). Medical management of paraquat ingestion. *British Journal of Clinical Pharmacology*. **72 (5)**: 745–757.
- GHIO, A. J. (2009). Disruption of iron homeostasis and lung disease. *Biochim Biophys Acta.*, **1790(7)**: 731-9.
- GIARD, D.J., AARONSON, S. A., TODARO, G. J., ARNSTEIN, P., KERSEY, J. H., DOSIK, H., PARKS, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. **51(5)**: 1417-1423.
- GİL, H., HONG, J., JANG, S., HONG, S. (2014). Diagnostic and therapeutic approach for acute paraquat intoxication. *J Korean Med Sci.*, **29**: 1441-1449.
- GİROTTI, A. W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.*, **39**: 1529-1542.
- GÖKALP, O., UZ, E., ÇİÇEK, E., YILMAZ, H. R., ÖZER, M. K., ALTUNBAŞ, A., ÖZÇELİK, N. (2006) Ameliorating role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against isoniazid-induced oxidative damage in red blood cells. *Mol Cell Biochem*, **290**: 55-59.
- GRAGUS, Z., KLAASSEN, C. D. (1996) Mechanisms of toxicity. In: Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons. Ed: Klaassen, CD., Andur, MO., Doull, J., Macmillan Publishing, sy. 41-48.
- GREMY, O., BENDERİTTER, M., LİNARD, C. (2006). Caffeic acid phenethyl ester modifies the Th1/Th2 balance in ileal mucosa after γ -irradiation in the rat by modulating the cytokine pattern. *World Journal of Gastroenterology*, **12(31)**: 4996–5004.
- GRUNBERGER, D., BANERJEE, R., EİSİNGER, K., OLTZ, E. M., EFROS, L., CALDWELL, M., ESTEVEZ, V., NAKANİSHİ, K. (1988). Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*, **44(3)**: 230–232.
- GUTTERİDGE, J. M. C. (1993). Free radicals in disease processes: A compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun.*, **19(3)**: 141-158.
- GÜLEŞCİ, N., AYGÜL, İ. (2016). Beslenme yer alan antioksidan ve fenolik madde içeren çerezler. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **5(1)**: 109-129.
- GÜLŞEN, İ. (2011). Akut omurilik hasarı sonrası kafeik asit fenetil esterinin inflamatuvar sitokinler üzerine etkisi. Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı.
- HALLİWELL, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med.*, **91**: 11-12.

- HALLIWELL, B., CHIRICO, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr*, **57(5)**: 715-725.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. (1999). Free radicals in biology and medicine. 3th ed. Oxford Science Publications, 617-624.
- HELBOCK, H. J., BECKMAN, K. B., AMES, B. N. (1999). 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-Hydroxy-guanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol*, **300**: 156-166.
- HEPŞEN, I. F., TILGEN, F., ER, H. (1996). Propolis: Tıbbi özellikleri ve oftalmolojik kullanımı. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, **3**: 386-91.
- HO, H. C., CHANG, H. C., TING, C. T., KUO, Y. C., YANG, V. C. (2011). Caffeic acid phenethyl ester inhibits proliferation and migration, and induces apoptosis in platelet-derived growth factor-BB-stimulated human coronary smooth muscle cells. *Journal of Vascular Research*, **49(1)**: 24-32.
- HU, J. J., DUBIN, N., KURLAND, D., MA, B. L., ROUSH, G. C. (1995) The effects of hydrogen peroxide on DNA repair activities. *Mutat Res.*, **336**: 193-201.
- HUANG, H. L., HSING, H. W., LAI, T. C., CHEN, Y. W., LEE, T. R., CHAN, H. T., LYU, P. C., WU, C. L., LU, Y. C., LIN, S. T., LIN, C. W., LAI, C. H., CHANG, H. T., CHOU, H. C., CHAN, H. L. (2010). Trypsin induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *Journal of Biomedical Science*, **17**: 36.
- JOMOVA, K., VALKO, M. (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, **283**: 65-87.
- KANNO, S., HIRANO, S., MUKAI, T., RO, A., KATO, H., FUKUTA, M., AOKI, Y. (2019). Cellular uptake of paraquat determines subsequent toxicity including mitochondrial damage in lung epithelial cells. *Leg Med*, **37**:7-14.
- KAPPUS, H. (1986) Overview of enzyme systems involved in bio-reduction of drugs and in redox cycling. *Biochem. Pharmacol.*, **35**: 1-6
- KARABULUT, H., GÜLAY, M. Ş. (2016). Serbest radikaller. *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.*, **4(1)**: 50-59.
- KARGIN, F., FIDANCI, U. R. (1997). Serbest oksijen radikalleri ve oksidatif hasar. *Türk Veteriner Hekimliği Dergisi*, **9(2)**: 26-28.
- KASAP, Y. (2010). Glutatyon(GSH) düzeyinin plasentada araştırılması. Yüksek lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- KEHA, E., KÜFREYOĞLU, Ö. İ.(2010). Biyokimya. Aktif Yayınevi, Erzurum, 653.
- KILINÇ, K., KILINÇ, A. (2002) Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **33(2)**: 110-118.
- KISMALI, G., SEL, T. (2012). Paraquat ile oluşturulmuş oksidatif stresin HepG2 hücrelerinde apoptozis üzerine etkisinin araştırılması. *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.*, **26 (2)**: 79 – 85.

- KİM, H., LEE, S. W., BAEK, K. M., PARK, J. S., MİN, J. H. (2011). Continuous hypoxia attenuates paraquat-induced cytotoxicity in the human A549 lung carcinoma cell line. *Experimental and Molecular Medicine*, **43(9)**: 494-500.
- KİM, K. S., SUH, G. J., KWON, W. Y., KWAK, Y. H., LEE, K., LEE, H. J., JEONG, K. Y., LEE, M. W. (2012). Antioxidant effects of selenium on lung injury in paraquat intoxicated rats. *Clin Toxicol (Phila)*, **50**: 749-753.
- KİM, Y. S., ZERİN, T., SONG, H.Y. (2013). Antioxidant action of ellagic acid ameliorates paraquat-induced A549 cytotoxicity. *Biol. Pharm. Bull.*, **36(4)**: 609-615.
- KİSHİMOTO, N., KAKİNO, Y., IWAİ, K., MOCHİDA, K., FUJİTA, T. (2005). In vitro antibacterial, antimutagenic and anti-influenza virus activity of caffeic acid phenethyl esters. *Biocontrol Science*, **10(4)**: 155-161.
- KOCA, N., KARADENİZ, F. (2003). Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, **Aralık**: 32-37.
- KOMERİCKİ, P., KRANKE, B. (2009). Maculopapular exanthem from propolis: case report and review of systemic cutaneous and noncutaneous reactions. *Contact Dermatitis*, **61(6)**: 353-355.
- KUJUMGİEV, A., BANKOVA, V., IGNATOVA, A., POPOV, S. (1993). Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. *Pharmazie*, **48(10)**: 785-786.
- KULAKSIZ, G., SANCAR, A. (2007). Nükleotid eksizyon onarımı ve kanser. *Türk Biyokimya Dergisi*, **32(3)**: 104-11.
- KUMARAGRUPAN, R., SUBAPRIYA, R., VISWANATHON, P. (2002). Tissue lipid peroxidation and antioxidant status in patients with adenocarcinoma of the breast. *Clin. Chim. Acta.*, **325**: 165-170.
- KUMAZAWA, S., AHN, M. R., FUJİMOTO, T., KATO, M. (2010). Radical scavenging activity and phenolic constituents of propolis from different regions of Argentina. *Natural Product Research*, **24(9)**: 804-812.
- KURATA, A., KİTAMURA, Y., IRİE, S., TAKEMOTO, S., AKAI, Y., HİROTA, Y., FUJİTA, T., IWAİ, K., FURUSAWA, M., KİSHİMOTO, N. (2010). Enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester analogues in ionic liquid. *J Biotechnol*, **148(2-3)**: 133-8.
- KURT, N. (2008). Yaşa bağlı olarak antioksidan enzimlerinin süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) aktivitelerinin ve malondialdehit (MDA) seviyesinin incelenmesi. Yüksek lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- KÜÇÜKGÜL, A., ERDOĞAN, S. (2014). Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) protects lung epithelial cells against H₂O₂-induced inflammation and oxidative stress. *HealthMED*, **8(3)**: 329-338.
- KÜÇÜKGÜL, A., ERDOĞAN, S. (2016). Inhibition of cigarette smoke induced inflammation and oxidative damage by caffeic acid phenethyl ester in A549 cells. *Asian Journal of Pharmaceutics*, **10 (4)**: 711-716.

- LANDAU, G., KODALI, V. K., MALHOTRA, J. D., KAUFMAN, R. J. (2013). Detection of oxidative damage in response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum. *Methods In Enzymology*, **526**: 231-250.
- LAWRENCE, R. A., BURK, R. F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Communi.*, **71(4)**: 952-958.
- LEVINE, R. L., GARLAND, D., OLIVER, C. N., AMICI, A., CLIMENT, I., LENZ, A. G., AHN, B. W., SHALTIEL, S., STADTMAN, E. R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, **186**: 464-478.
- LI, G., YUSHEN, L., YI, C., XIAOXIANG, C., WEI, Z., CHANGOING, Z., SHUANG, Y. (2015). DNase1 Protects Against Paraquat-Induced Acute Lung Injury and Pulmonary Fibrosis Mediated by Mitochondrial DNA. *Biomed Res Int*. **2015**: 386952.
- LIEBER, M., SMITH, B., SZAKAL, A., NELSON-REES, W., TODARO, G. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer.*, **17(1)**: 62-70.
- LIN, H. P., JIANG, S. S., CHUU, C. P. (2012). Caffeic acid phenethyl ester causes p21 induction, Akt signaling reduction, and growth inhibition in PC-3 human prostate cancer cells. *PLoS One*, **7(2)**: e31286.
- MACNEE, W. (2001). Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol*, **429**: 195-207.
- MASCIO, D. P., MURPHY, M.E., SIES, H. (1991). Antioxidant defense system: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.*, **53**: 194-200.
- MATES, J.M., PEREZ-GOMEZ, C., de CASTRO, I.N. (1999). Antioxidant enzymes and human disease. *Clin Biochem.*, **32**: 595-603.
- MATES, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, **153**: 83-104.
- MAYHEW, S. G. (1978). The redox potential of dithionite and SO₂ from equilibrium reactions with flavodoxins, methyl viologen and hydrogen plus hydrogenase. *Eur J Biochem.* **85**: 535-547.
- MAZZARELLA, G., FERRARACCIO, F., PRATI, M. V., ANNUNZIATA, S., BIANCO, A., MEZZOGIORNO, A., LIGUORI, G., ANGELILLO, I. F., CAZZALO, M. (2007). Effects of diesel exhaust particles on human lung epithelial cells: an in vitro study. *Respir Med.*, **101(6)**: 1155-1162.
- MEHTA, J., RAYALAM, S., WANG, X. (2018). Cytoprotective effects of natural compounds against oxidative stress. *Antioxidants (Basel)*. **Oct 20**: **7(10)**: 147.
- MEMİŞOĞULLARI, R. (2005). Diabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, **3**: 30-39.
- MERCAN, U. (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **15(1-2)**: 91-96.
- MIAO, L., CLAIR, D. K. S. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic. Bio.Med.*, **47**: 344- 356.

- MOHAMMADZADEH, S., SHARRIATPANAHIA, M., HAMEDIE, M., AMANZADEH, Y., EBRAHIMI, S. E. S., OSTAD, N. S. (2007). Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chemistry*, **103(3)**: 729-733.
- MONCADA, S., PALMER, R. M., HIGGS, E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.*, **43(2)**: 109-142.
- MOON, J. M., CHUN, B. J. (2011). The efficacy of high doses of vitamin C in patients with paraquat poisoning. *Hum Exp Toxicol*, **30**: 844-850.
- MOSMANN T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. **65**: 55-63.
- MULDER, T. P., MANI, J. J., ROELOFS, H. M., PETERS, W. H., WIERSMA, A. (1995). Glutathione Peroxidases In Human Head And Neck Cancer. *Acta Otolaryngol.*, **115**: 331-333.
- MURTAZA, G., KARIM, S., AKRAM, M. R., KHAN, S. A., AZHAR, S., MUMTAZ, A., BIN ASAD, M. H. (2014). Caffeic acid phenethyl ester and therapeutic potentials. *Biomed Res Int.*, **2014**:145342.
- NAKAMURA T, LIPTAN A. (2007). Molecular mechanisms of nitrosative stress-mediated protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Cell and Mol L Sci.*, **64(13)**: 1609-1620.
- NATARAJAN, K., SINGH, S., BURKE, T. R., GRUNBERGER, D., AGGARWAL, B. B. (1996). Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci.*, **20**: **93(17)**: 9090-5.
- NAVARRO, A., BOVERIS, A. (2004). Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **287**: 1244-1249.
- NAWAR, W.W. (1996). Lipids. In: Food Chemistry. Ed: Fennema, OR. pp: 225-319. Marcel Dekker, New York.
- NORBURY, C. J., HICKSON, I. D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, **41**: 367-401.
- OĞUZ, A., KAPAN, M., KAPLAN, I., ALABALIK, U., ÜLGER, B. V., USLUKAYA, Ö., TÜRKÖĞLU, A., POLAT, Y. (2015). The effects of sulforaphane on the liver and remote organ damage in hepatic ischemiareperfusion model formed with pringle maneuver in rats. *International Journal of Surgery*, **18**: 163-168.
- OKUTAN, H., ÖZÇELİK, N., YILMAZ, H. R., UZ, E. (2005). Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clinical Biochemistry*, **38(2)**: 191-196.
- ÖTLEŞ, S., ATLI, Y. (1997). Karotenoidlerin insan sağlığı açısından önemi. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, **1(3)**: 249-254.
- ÖZCAN, O., ERDAL, H., ÇAKIRCA, G., YÖNDEN, Z. (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, **6(3)**: 331-336.

- ÖZYURT, B., GÜLEÇ, M., ÖZYURT, H., EKİCİ, F., ATİS, Ö., AKBAŞ, A. (2006). The effect of antioxidant caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on some enzyme activities in cisplatin-induced neuro toxicity in rats. *European Journal of General Medicine*, **3**: 167–172.
- ÖZYURT, H., PEKMEZ, H., PARLAKTAŞ, P. S., KUŞ, İ., ÖZYURT, B., SARSILMAZ, M. (2006). Oxidative stress in testicular tissues of rats exposed to cigarette smoke and protective effects of caffeic acid phenethyl ester. *Asian J Androl.*, **8(2)**: 189–193.
- PARK, H. K., KİM, S. J., KWONDO, Y., PARK, J. H., KİM, Y. C. (2010). Protective effect of quercetin against paraquat-induced lung injury in rats. *Life Sci*, **87**: 181-186.
- PASÍ, A. (1978). The Toxicity of Paraquat, Diquat and Morfamquat. Huber: Bern.
- PASTOREA, A., FEDERICA, G., BERTINIB, E., PIEMONTE, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta.*, **333**: 19–39.
- PAVLOVIĆ, V., CEKIĆ, S., RANKOVIĆ, G., STOILJKOVIĆ, N. (2005). Antioxidant and pro-oxidant effect of ascorbic acid. *Acta Medica Medianae*, **44(1)**: 65-68.
- PELLEGRINI, N., KE, R., YANG, M., RICE-EVANS, C. (1999). Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic) acid radical cation decolorization assay. *Methods in Enzymology*, **299**: 379-389.
- PHAM-HUY, L. A., HE, H., PHAM-HUYC, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*, **4(2)**: 89-96.
- PODDER, B., KİM, Y. S., ZERİN, T., SONG, H. Y. (2012). Antioxidant effect of silymarin on paraquat-induced human lung adenocarcinoma A549 cell line. *Food Chem Toxicol*, **50**: 3206-3214.
- PODDER, B., KİM, Y. S., SONG, H. Y. (2013). Cytoprotective effect of bioactive sea buckthorn extract on paraquat-exposed A549 cells via induction of Nrf2 and its downstream genes. *Mol Med Rep.*, **8(6)**: 1852-60.
- PODDER, B., SONG, H. Y., KİM, Y. S., (2014). Naringenin Exerts Cytoprotective Effect Against Paraquat-Induced Toxicity in Human Bronchial Epithelial BEAS-2B Cells Through NRF2 Activation. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **24(5)**: 605–613.
- PORTER, N. A. (1985). Mechanism of fatty acid and phospholipid autoxidation. In: *Chemical Changes in Food During Processing*. Ed: Richardson, T., Finley, J.V., Springer Science & Business Media, New York, sy: 73-105.
- REDDY, S. P. (2008). The antioxidant response element and oxidative stress modifiers in airway diseases. *Curr Mol Med.*, **8**: 376-383.
- REED, D.J. (2000). Mechanisms of chemically induced cell injury and cellular protection. In: *Introduction to Biochemical Toxicology*. Ed: Hodgson, E., Smart, R.C. Wiley and Sons Inc., sy. 221-253.

- RİFAİOĞLU, M. M., SEFİL, F., GÖKÇE, H., NACAR, A., DORUM, B. A., DAVARCI, M. (2015) Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on the dose-dependent acute nephrotoxicity with paraquat in a rat model. *Environ Toxicol.*, **30**: 375-81.
- RUPP, D. W. (2006). Molecular mechanism of DNA damage, October 2006, Web erişim: http://radonc.yale.edu/training/pdf/molecular_mechanisms.pdf Erişim Tarihi: 25 Nisan 2018
- RUSSO, A., LONGO, R., VANELLA, A. (2002). Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, **73**: 21-29.
- RYAN, R.M., MİNEO-KUHN, M.M., KRAMER, C. M., FİNKELSTEİN, J. N. (1994). Growth factors after neonatal type II alveolar epithelial cell proliferation. *Am. J. Physiol.* **266**: 17-22.
- SANCAR, A., LİNDSEY-BOLTZ, L. A., ÜNSAL-KAÇMAZ, K., LİNN, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.*, **73**: 39-85.
- SARAÇ, Ö. (2010). Epigallokateşin gallat (egcg) ve kafeik asit fenetil esterinin(CAPE) genotoksik ve antigenotoksik etkileri. Yüksek lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- SERKEDJİEVA, J., MANOLOVA, N., BANKOVA, V. (1992). Anti-influenza virüs effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). *Journal of Natural Products*, **55(3)**: 294-297.
- SHACTER, E. (2000). Protein oxidative damage. *Methods Enzymol*, **319**: 428-436.
- SHIN, S., CHA, H. J., LEE, E. M., LEE, S. J., SEO, S. K., JIN, H. O., PARK, I.C., JIN, Y. W., AN, S. (2009). Alteration of miRNA profiles by ionizing radiation in A549 human non-small cell lung cancer cells. *Int. J. Oncol.*, **35(1)**: 81-86.
- SİLFELER, I., ALP, H., ÖZGÜR, T., EVLİOĞLU, O., ÇELİK, M., ER, M., YİLMAZ, G. (2015). Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on dose-dependent intoxication of rats with paraquat. *Toxicol Ind Health*, **31(11)**: 1000-7.
- SMİTH, L. L. (1987). Mechanism of paraquat toxicity in lung and its relevance to treatment. *Hum Toxicol.*, **6(1)**: 31-6.
- SOMER, A., SÜTÇÜ, M. (2017). Cistus incanus bitki özünün anti-enfektif özellikleri, *Çocuk Dergisi*, **17(1)**: 1-3.
- SONG, O. (2004). Oxidative Stress: A theoretical model or biological reality? *Comptes Rendus Biology*, **327(7)**: 649-62.
- SPIEWAK, R. (2001). Pesticides as a cause of occupational skin diseases in farmers. *Ann Agric Environ Med*, **8(1)**: 1-5.
- SUGİURA, H., İCHİNOSE, M. (2011). Nitrativestress in inflammatorylung disease. *Nitric Oxide*, **25**: 138-344.
- SUN, B., CHEN, Y. G. (2016). Advances in the mechanism of paraquat-induced pulmonary injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, **20(8)**: 1597-602.

- SUNTRES, Z. E. (2002). Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology*, **30**, **180(1)**: 65-77.
- TAKEBE, G., YARİMİZU, J., SAİTO, Y., HAYASHİ, T., NAKAMURA, H., YODOİ, J., NAGASAWA, S., TAKAHASHİ, K. (2002). A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *The Journal Of Biological Chemistry*, **277(43)**: 41254–41258.
- TASAKA, S., AMAYA, F., HASHİMOTO, S., ISHİZAKA, A. (2008). Roles of oxidants and redox signaling in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Antioxid Redox Signal.*, **10**: 739-753.
- TAWARA, T., FUKUSHIMA, T., HOJO, N., ISOBE, A., SHIWAKU, K., SETOGAWA, T., YAMANE, Y. (1996). Effects of paraquat on mitochondrial electron transport system and catecholamine contents in rat brain. *Arch Toxicol.*, **70**: 585-589.
- THOMSON, A., HEMPHİLL, D., JEEJEEBHOY, K. N. (1998). Oxidative stress and antioxidants in intestinal disease. *Dig Dis.*, **16**: 152-158.
- THORNALEY, P. J., VASAK, M. (1985). possible role of metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress: kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochem. Biophys. Acta.*, **827(1)**: 36–44.
- TIAN, D., ZHU, M., LI, J., MA, Y., WU, R. (2009). Cigarette smoke extract induces activation of beta- catenin/TCF signaling through inhibiting GSK3beta in human alveolar epithelial cell line. *Toxicol Lett.*, **187(1)**: 58-62.
- TORİBİO, F., MARTİNET, L.E., PASCUAL, P., LOPEZ, B. J. (1996). Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes. *J. Chromatog. B.*, **684**: 77-97.
- TORUN, E., GEDİK, A. H., ÇAKIR, E., UMUTOĞLU, T., GÖK, O., KILIÇ, U. (2014). Serum paraoxonase, TAS, TOS and ceruloplasmin in brucellosis. *Int J Clin Exp Med.*, **7**: 1592-1597.
- UZAR, E., ACAR, A., EVLİYAOĞLU, O., FIRAT, U., KAMASAK, K., GÖÇMEZ, C., ALP, H., TÜFEK, A., TAŞDEMİR, N., ILHAN, A. (2012). The anti-oxidant and anti-apoptotic effects of nebivolol and zofenopril in a model of cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **36(1)**: 22–28.
- VALKO, M., MORRİS, H., CRONİN, M. T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.*, **12**: 1161-1208.
- VALKO, M., LEİBFRİTZ, D., MONCOL, J., CRONİN, M. T., MAZUR, M., TELSER, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, **39**: 44-84.
- VELAZQUEZ, C., NAVARRO, M., ACOSTA, A., ANGULO, A., DOMİNGUEZ, Z., ROBLES, R., ROBLES-ZEPEDA, R., LUGO, E., GOYCOOLEA, F. M., VELAZQUEZ, E. F., ASTÍAZARAN, H., HERNANDEZ, J. (2007). Antibacterial and free-radical scavenging activities of sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*. **103(5)**: 1747–1756.

- VİCENTE, J. A., PEIXOTO, F., LOPES, M. L., MADEIRA, V. M. (2001). Differential sensitivities of plant and animal mitochondria to the herbicide paraquat. *J Biochem Mol Toxicol.* **15**: 322–330.
- WANG, X., STAVCHANSKY, S., BOWMAN, P. D., KERWIN, S. M. (2006). Cytoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and catechol ring-fluorinated CAPE derivatives against menadione-induced oxidative stress in human endothelial cells. *Bioorg Med Chem.*, **15**; **14(14)**: 4879-87.
- WANG, Y., YANG, H., LIU, H., HUANG, J., SONG, X. (2009). Effect of staurosporine on the mobility and invasiveness of lung adenocarcinoma A549 cells: an in vitro study. *BMC Cancer*, **9**: 174.
- WANG, R., SUN, D. Z., SONG, C. Q., XU, Y. M., LIU, W., LIU, Z., DONG, X. S. (2018). Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit A (Eif2 α) inhibitor salubrinal attenuates paraquat-induced human lung epithelial-like A549 cell apoptosis by regulating the PERK-Eif2 α signaling pathway. *Toxicol In Vitro*, **46**: 58-65.
- WEI, W., MA, Z., FONTANILLA, C. V., ZHAO, L., XU, Z. C., TAGGLIABRACI, V., JOHNSTONE, B. H., DODEL, R. C., FARLOW, M. R., DU, Y. (2008). Caffeic acid phenethyl ester prevents cerebellar granule neurons (CGNs) against glutamate-induced neurotoxicity. *Neuroscience*, **155(4)**: 1098–1105.
- XU, L., WANG, Z. (2015). Chloroquine rescues A549 cells from paraquat-induced death. *Drug Chem Toxicol.*, **39(2)**: 167-73.
- YAVAŞER, R. (2011). Doğal ve sentetik antioksidan bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması. Yüksek lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- YILDIZ, F. (2010). Advances in Food Biochemistry. CRC Press, Taylor & Francis Group, London, Sy. 239-289, sayfa 313-339.
- YILMAZ, H. R., UZ, E., YUCEL, N., ALTUNTAS, I., OZCELIK, N. (2004). Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (cape) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *J Biochem Mol Toxicol.*, **18**: 234-238.
- YILMAZ, A., ELBEY, B., YAZGAN, Ü. C., DÖNDER, A., ARSLAN, N., ARSLAN, S., ALABALIK, U., ASLANHAN, H. (2016). Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on fluoxetine-induced hepatotoxicity: an experimental study. *Biomed Res Int.*, **2016**: 1247191.
- YILMAZ, İ. (2010). Karotenoidler. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **17(3)**: 223-231.
- YÜCEL, B., TOPAL, E., AKÇİÇEK, E., KÖSOĞLU, M. (2014). Propolisin insan sağlığına etkileri. *Anadolu, J. Of AARI.*, **24(2)**: 41-49.
- ZAMOCKY, M., KOLLER, F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, **72**: 19-66.
- ZERİN, T., KİM, Y. S., HONG, S. Y., SONG, H. Y. (2013). Quercetin reduces oxidative damage induced by paraquat via modulating expression of antioxidant genes in A549 cells. *J Appl Toxicol.*, **33**: 1460-1467.

- ZHANG, Y., ROHDE, L. H., WU, H. (2009). Involvement of nucleotide excision and mismatch repair mechanisms. *Current Genomics*, **10(4)**: 250-258.
- ZHANG, L., ZHANG, H., ZHENG, X., ZHAO, Y., CHEN, S., CHEN, Y., ZHANG, R., LI, Q., HU, X. (2014). Structural basis for the inhibition of AKR1B10 by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Chem Med Chem.*, **9(4)**: 706–709.
- ZHAO, J., PATI, S., REDELL, J. B., ZHANG, M., MOORE, A. N., DASH, P. K. (2012). Caffeic acid phenethyl ester protects blood-brain barrier integrity and reduces contusion volume in rodent models of traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, **29**: 1209-1218.
- ZHI, Q., SUN, H., QIAN, X., YANG, L. (2011). Edaravone, a novel antidote against lung injury and pulmonary fibrosis induced by paraquat?. *Int Immunopharmacol*, **11**: 96-102.

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

- Adı-Soyadı** : Naime ÇELİK
- Doğum yeri ve tarihi** : Afyonkarahisar, 1983
- Uyruğu** : TC.
- İletişim adresi ve telefon** : Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Atatürk Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, 02722137668

II. Eğitimi

- Doktora** : 2013 Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı
- Yüksek Lisans** : 2005 Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı
- Lisans** : 2001 Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji
- Lise** : 1998 Afyon Kocatepe Anadolu Lisesi

III. Mesleki Deneyim

- Öğretim Görevlisi** : Afyon Kocatepe Üniversitesi Atatürk Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuvar Programı, 2009-2018.
- Öğretim Görevlisi** : Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Atatürk Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuvar Programı, 2018- devam.