

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KAFEİNİN RAT KARACİĞERİNDE
OKSİDAN-ANTIOKSİDAN
MEKANİZMALARA ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. CANAN YILMAZ DEMİRTAŞ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. HATİCE PAŞAOĞLU

ANKARA
TEMMUZ 2009

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KAFEİNİN RAT KARACİĞERİNDE
OKSİDAN-ANTIOKSİDAN
MEKANİZMALARA ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. CANAN YILMAZ DEMİRTAŞ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. HATİCE PAŞAOĞLU

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2007-86 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
TEMMUZ 2009

İÇİNDEKİLER

Teşekkür.....	v
Kısaltmalar.....	vi
Şekil, Tablo ve Grafik Listeleri.....	vi
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kafein.....	3
2.1.1. Kafein Metabolizması	4
2.1.2. Kafeinin Organizmaya Etkileri	7
2.2. Karaciğer Anatomisi ve Fizyolojisi.....	11
2.3. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller.....	14
2.3.1. Serbest Radikal Kaynakları	16
2.3.2. Serbest Radikal Türevleri	20
2.3.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$).....	21
2.3.2.2. Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$)	22
2.3.2.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	23
2.3.2.4. Hipoklorik Asit ($HOCl$)	24
2.3.2.5. Singlet oksijen (1O_2).....	24
2.3.2.6. Perhidroksil radikali ($OOH^{\cdot}$)	25
2.3.2.7. Peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$).....	25
2.3.2.8. Nitrik Oksit ($NO^{\cdot}$)	25
2.3.2.9. Peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$).....	26
2.3.3. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu.....	27
2.4. Antioksidan Sistem.....	30
2.4.1. Nonenzimatik Yapıda Olan Antioksidanlar	33
2.4.1.1. Glutasyon (GSH)	33
2.4.2. Enzimatik Yapıda Olan Antioksidanlar.....	34

2.4.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1).....	34
2.4.2.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px; EC 1.11.1.9) ve Glutasyon Redüktaz (GR; EC.1.6.4.2).....	35
2.4.2.3. Glutasyon-S-Transferaz (GST; EC 2.5.1.8).....	37
2.4.2.4. Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6)	38
2.4.2.5. Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PDH; EC 1.1.1.49)	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	40
3.1. Deney Grupları.....	40
3.2.Kullanılan Aletler.....	42
3.3.Yöntemlerin Uygulanması.....	43
3.3.1. Lowry Protein Analizi.....	44
3.3.2. Karaciğer Dokusu Malondialdehit (MDA) Analizi.....	46
3.3.3. Karaciğer Dokusunda Glutasyon Düzeyi Analizi.....	48
3.3.4. Karaciğer Dokusunda Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini.....	50
3.3.5. Karaciğer Dokusunda Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi Tayini.....	53
3.3.6. Rat Dokularında Glutasyon-S-Transferaz Aktivitesi Tayini	55
3.3.7. Karaciğer Dokusunda Katalaz Aktivitesi Tayini.....	57
3.4.İstatistiksel Analiz.....	58
4.BULGULAR.....	58
4.1. Karaciğer Dokusu MDA Düzeyleri.....	59
4.2. Karaciğer Dokusu Glutasyon Düzeyleri.....	61
4.3. Karaciğer Dokusu SOD Aktivitesi.....	63
4.4. Karaciğer Dokusu Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi.....	65
4.5. Karaciğer Dokusu Glutasyon S Transferaz Aktivitesi.....	67
4.6. Karaciğer Dokusu Katalaz Aktivitesi.....	69

4.7. Spearman Korelasyon Analizi.....	71
5. TARTIŞMA	76
6. SONUÇ.....	86
7. KAYNAKLAR	87
8. ÖZET.....	100
9. SUMMARY.....	102
10.ÖZGEÇMİŞ.....	104

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca hayatıma çok büyük katkıları olan, her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen, tez çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimleriyle beni yetiştiren, sabır ve anlayışına hayran olduğum, öğrencisi olmaktan şeref duyduğum değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. HATİCE PAŞAOĞLU' na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında verdiği destekten dolayı başta Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU olmak üzere tüm Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri' ne saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bilgiyi paylaşmanın anlamını özümsemiş, büyük sabırla metod ve istatistik öğreten Dr. Ebru OFLUOĞLU'na, Dr. Ahmet CUMAOĞLU'na ve Dr. Burak BAHAR'a teşekkürü borç bilirim.

Eğitimim boyunca acı, tatlı birçok anı paylaştığım her durumda pozitif enerjileriyle beni motive eden Dr. Seda DUYGULU DEVAY'a, Dr. Funda GÜÇEL'e teşekkür ederim. Laboratuvarında bütün nezaketiyle her türlü işe koşturan yardımsever ve alçak gönüllü arkadaşım Ahmed HUSSEIN'e bölümümüzdeki diğer asistan arkadaşlarıma, beraber hizmet verdiğimiz tüm personelimize teşekkür ederim.

Hiçbir zaman desteğini esirgemeyen aileme, sevgi ve anlayışları için teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

Kısaltmalar

MDA : Malondialdehit

SOD : Süperoksit Dismutaz

GSH : Redükte Glutasyon

GPx : Glutasyon Peroksidaz

GST : Glutasyon S Transferaz

Şekil Listesi

Şekil 1. Kafeinin kimyasal yapısı	3
Şekil 2. İnsanlarda kafein metabolizması.....	6
Şekil 3. Oksidatif stres.....	16
Şekil 4. Memeli hücrelerinde reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin meydana gelişi....	20
Şekil 5. ROS ve RNS'nin birbirleriyle etkileşimi	27
Şekil 6. Metallerin katalizlediği lipit peroksidasyonu.....	28
Şekil 7. Lipit peroksidasyonunun kimyasal yolu.....	29
Şekil 8. Lipit peroksidasyonu ile oluşan aldehitler	30
Şekil 9. Memeli hücrelerinde antioksidan sistem.....	31
Şekil 10. Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyon.....	36
Şekil 11. Oral kafein uygulaması.....	41
Şekil 12. Rat dokularının çıkartılması.....	42

Tablo Listesi

Tablo 1. Doku Protein Tayini.....	44
Tablo 2. Doku MDA Tayini.....	47
Tablo 3. Doku Glutasyon Tayini.....	49
Tablo 4. Doku SOD Aktivitesi Tayini.....	52
Tablo 5. Doku GPx Aktivitesi Tayini.....	54
Tablo 6. Doku GST Aktivitesi Tayini.....	56
Tablo 7. Doku Katalaz Aktivitesi Tayini.....	57
Tablo 8. Karaciğer MDA Düzeyleri.....	60
Tablo 9. Karaciğer Glutasyon Düzeyleri.....	62
Tablo 10. Karaciğer SOD Aktivitesi.....	64
Tablo 11. Karaciğer Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi.....	66
Tablo 12. Karaciğer Glutasyon S Transferaz Aktivitesi.....	68
Tablo 13. Karaciğer Katalaz Aktivitesi.....	70
Tablo14. Spearman Korelasyon Analizi Sonuçları.....	71

Grafik Listesi

Grafik 1. Doku Protein Standart Grafiği.....	45
Grafik 2. Doku MDA Standart Grafiği.....	48
Grafik 3. Doku Glutasyon Standart Grafiği.....	50
Grafik 4. Karaciğer MDA (nmol/g doku) Düzeyleri.....	60
Grafik 5. Karaciğer Glutasyon (nmol GSH/mg protein) Düzeyleri.....	62
Grafik 6. Karaciğer SOD Aktivite (IU/mg protein) Düzeyleri.....	64
Grafik 7. Karaciğer Glutasyon Peroksidaz Aktivite (IU/mg protein) Düzeyleri.....	66
Grafik 8. Karaciğer Glutasyon S Transferaz Aktivite (nmol/dk/mg protein) Düzeyleri.....	68
Grafik 9. Karaciğer Katalaz Aktivite (IU/mg protein) Düzeyleri.....	70

Grafik 10. Doku MDA Düzeyleri ile Doku GPx Aktivitesi Arasındaki Korelasyon.....	72
Grafik 11. Doku MDA Düzeyleri ile Doku GST Aktivitesi Arasındaki Korelasyon.....	73
Grafik 12. Doku MDA Düzeyleri ile Doku SOD Aktivitesi Arasındaki Korelasyon.....	74
Grafik 13. Doku Katalaz Aktivitesi ile Doku GST Aktivitesi Arasındaki Korelasyon.....	75

1.GİRİŞ

Bir pürin alkaloit olan kafein doğal olarak kahvede, çayda, guarana'da ve az miktarda kakao içinde bulunur. Kafeinin, özellikle merkezi sinir sistemine etki ederek, beyine giden ve beyinden gelen mesajları hızlandırdığı; böylece kişinin daha uyanık ve aktif olmasını sağlayan bir uyarıcı olduğu bildirilmektedir. Aşırı tüketimi halinde ise kişide uyku bozukluğu, sinirlilik, endişe ve kaygı hallerine sebep olabilmektedir (1-2).

Birçok güvenilir kaynakta işaret edilen temel farmakolojik özelliklerinden; merkezi sinir sisteminde psikotropik etki göstermesi, solunum sisteminde bronkodilatasyona neden olması, kalp hızını artırıcı (pozitif inotropik) etkisi, lokomotor aktiviteyi artırması ve hafif diüretik etkisinin bulunması en önde gelenlerdir (2-4). Bu gibi etkilerinden dolayı günümüzde medikal tedavilerde ilaç olarak yerini almıştır (5-6).

Çalışmamızın konusu olan kafein, karaciğer metabolizması üzerine olan etkileri ve antioksidan özellik göstermesi nedeniyle bugün birçok araştırmacının dikkatini çekmektedir.

Kafeinin karaciğere etkisi üzerine yapılan çalışmalarda radyasyon ve diğer ajanlar tarafından artırılmış hasara karşı kafein önemli derecede koruma sağladığı, lipid peroksidasyonunu azalttığı ve antioksidan olarak reaktif oksijen türleri tarafından oluşturulmuş hasara karşı membranları koruduğu belirtilmiştir (6,7). ROS (Reaktif oksijen türleri) ve peroksil radikallerini temizlediği öne sürülmüştür (8). Moutaery ve arkadaşları (9) deneysel kafa travması oluşturulan ratlara

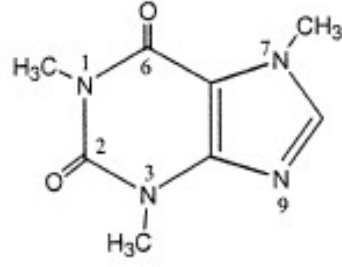
intraperitoneal yüksek doz (100-150 mg/kg) kafein uygulamasının, kortekste doza bağımlı olarak, lipid peroksidasyonunu artırdığını ve oksidatif strese neden olduğunu açıklamışlardır. Karas ve arkadaşlarının (10) yaptıkları bir çalışmada, allil-alkol ile düşük hepatotoksisite oluşturulan ratlara kafein (150 mg/kg, oral) verilmesinin karaciğerde MDA düzeylerini yükselttiğini bildirmişlerdir.

Biz çalışmamızın temel hedefi olarak, kısa süreli (14 gün) oral kafein alımının rat karaciğerinde olası antioksidan etkilerini 30 mg/kg ve 100 mg/kg olmak üzere iki farklı dozda araştırmaya çalıştık.

Kafein verilen ratların karaciğer dokularında lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeylerini ölçtük. Bunun yanında kafeinin antioksidan özelliğini incelemek için, enzimatik ve non enzimatik antioksidan sistem üzerinde araştırmalar yaptık. Karaciğer dokularında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S transferaz (GST) aktivitelerini ve glutatyon (GSH) düzeylerini ölçtük.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kafein



Şekil 1. Kafeinin Kimyasal Yapısı¹

Kafein (1,3,7 trimetilksantin) bir pürin alkoloit olarak birçok yiyecek ve içeceklerin içeriğinde bulunur (1). Kafein günümüzde her gün düzenli olarak tüketilen bir maddedir, kahve, çay, çikolata, kola ve bazı gazlı içecekler kafein ihtiva eder (11-12). Çay ve kahve beslenmemizdeki ana kafein kaynaklarıdır. Kafein uyarıcı etkileri nedeniyle yüzyıllardır kullanılan bir maddedir. Kafein bronkodilatatör etkisi (13-14), bazı analjeziklerin içeriğinde bulunması (5,6) ve yeni doğan apnea tedavisine olan etkisi (12) gibi sebeplerle tedavi amaçlı da kullanılmaktadır.

Kafeinin insan sağlığı üzerindeki etkileri 1900' lü yılların başlarında incelenmeye başlanmıştır. Kafeinin; diüretik, kas ve sinirleri uyarıcı, mide salgısını uyarıcı ve metabolik hızı artırıcı etki yaptığı, orta düzeyde alınan kafeinin (200-300mg) iştah artırıcı, uyuşukluk ve zihin yorgunluğunu giderici etkisi bildirilmiştir. Kafeinin insanda pekiştirici olduğu, tolerans ve fiziksel

bağımlılık oluşturabildiği, bu olgularda kafeinin kesilmesinin, kendini disfori, baş ağrısı, irritabilite, zihinsel konsantrasyonun azalması ve anksiyete ile belli eden hafif bir yoksunluk sendromuna neden olduğu görülmüştür (3,12).

Kahvenin yüksek miktarlarda tanen de (kateşin analogu) içerdiği, tanenin antioksidan, anti-mutajenik, anjiogenetik, antibiyotik, anti-hiperkolesterolemik, antihipertansif ve anti-inflamatuvar etkisi olduğu açıklanmaktadır (4).

Teobromin (3,7 dimetilksantin) ve ksantin, kafeinin katabolik ürünleridir. Bu ürünlerin antioksidan ve de prooksidan özellikte oldukları, antioksidan olan ürik asit ile yapısal benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir (15).

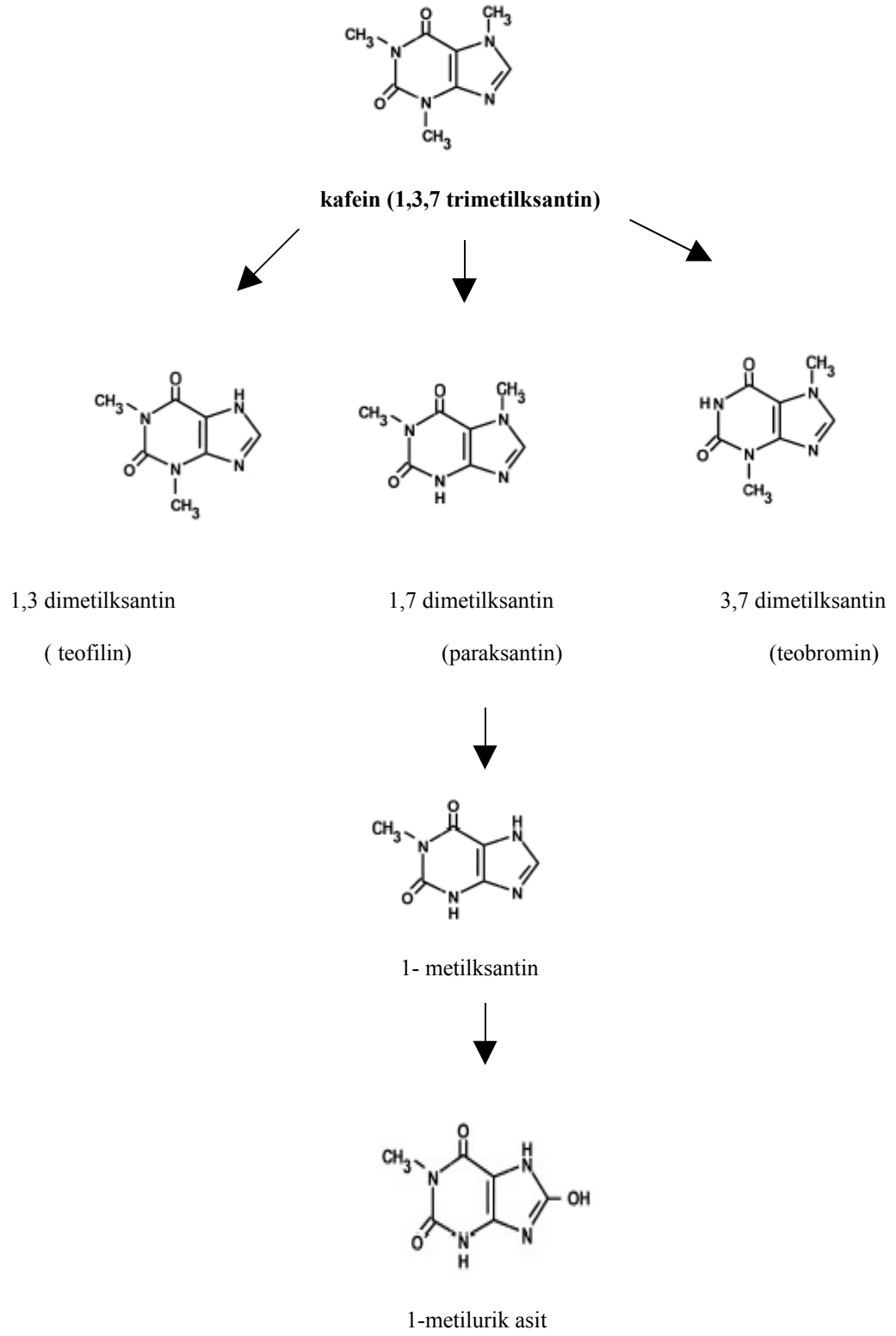
2.1.1. Kafein Metabolizması

Kafeinin oral alımından sonra, %99 'u gastrointestinal sistemden emilerek 30-120 dakika içinde plazmada en yüksek konsantrasyona ulaşır. Hidrofobik özelliğinden dolayı bütün biyolojik membranlardan kolayca geçebilme yeteneğine sahiptir. Kafeinin % 5'den daha azı metabolize olmadan idrarla atılır. Kafein plazmada en yüksek konsantrasyona ulaştıktan sonra, beyinde en az bir saat konsantrasyonu değişmeden kalır (16). İnsanda normal plazma seviyesi kafein için 5-20 µM olarak belirtilmiştir (2,17,18).

Hidrofobik özelliğinden dolayı kafein kan-beyin bariyeri ve plasental bariyeri de kolaylıkla geçebildiği, ağır kafein tüketen hamile bayanların yeni doğan bebeklerinde yüksek seviyelerde kafein tespit edildiği görülmüştür. İnsanlarda kafeinin yarı ömrü 2,5-6 saat arasında değişmekle birlikte, fare ve sıçanlarda bu sürenin 0,7-1,2 saat olduğu, fetus ve yeni doğan döneminde kafeinin yarı ömrünün, kafeinin demetilasyonu için gerekli enzimlerin noksan olması nedeniyle yaklaşık 32-149 saate uzadığı söylenmektedir (2,17).

İnsanda kafein, hepatik sitokrom P450A₂ (CYP1A₂) enzimi ile demetilasyon sonucu paraksantine (1,7 dimetilksantin) dönüşür. Kafein metabolizmasının %72-80'i bu demetilasyon basamağı ile olur. Daha az olarak da teobromine (3,7 dimetilksantin) ve teofiline (1,3 dimetilksantin) çevrilir. Aynı enzim tarafından 1,7 dimetilksantin demetilasyonu ile önce 1-metilksantin sonra da 1-metilürik asit oluşturulur (8).

Kafein, öncelikli olarak CYP1A₂ tarafından metabolize edilir, fakat N-asetiltransferaz (NAT-2) ve ksantin oksidazın da substratıdır (19). Teofilin ve paraksantin kafeinin biyolojik aktivitesi olan metabolitleridir. Teofilin, paraksantinden daha güçlü etki gösterir (2).



Şekil 2. İnsanlarda Kafein Metabolizması (8)

2.1.2. Kafeinin Organizmaya Etkileri

Kafein ve teofilin gibi metiksaninler diyetle alındıktan sonra, oluşturdukları belli başlı fizyolojik etkiler şöyle sıralanmaktadır (20) ;

Santral Sinir Sistemine Etkileri:

- Adenozin reseptörlerine antagonistik etki

(A1 reseptörlerini kompetitif olarak bloke edip adenozinin nöronları deprese etmesini engeller)

- Beyin sapındaki solunum merkezini güçlü şekilde uyarma.
- Solunum merkezinin karbondioksit duyarlılığını artırma.
- Psikostimülan etki.

Vijilans (zihinsel çevikliği), dikkati artırır, yorgunluğu azaltır.

- Yüksek dozda anksiyojenik etki.

Periferik Etkileri:

- İskelet kaslarının uyarılması sonucu lokomotor aktivitede artış
- Anti- inflamatuvar etki
- Analjezik etki
- Glukoz metabolizmasında artma
- İnsulinin lipogenetik etkisinin azaltılması

(yağ hücrelerinde norepinefrin artışıyla indüklenen lipoliz sonucu doku yağ seviyelerini ve vücut yağ depolarını azaltır)

- Hücre içi cAMP düzeylerinin artırılması
- Sitozolde Ca^{+2} seviyelerinin yükseltilmesi

Kafein ve diğ er metilksantinler, fosfodiesterazı inhibe ederler ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırır, adenosin reseptörlerine antagonist etki gösterirler. Bütün bunlar NO üretimini artırıcı etki yaparak, hücrede siklik adenosin monofosfat (cAMP) düzeylerini yükseltir (20). cAMP'nin hücresel seviyeleri adenilat siklaz ve fosfodiesteraz aktivitelerine bağlıdır. cAMP; bir çok hormonun (ACTH, katekolaminler, glukagon, tiroksin gibi) ikincil habercisidir (21). Fosfodiesterazlar, cAMP ve siklik guanozin monofosfatı (cGMP) hidrolize ederler. cAMP ve cGMP, vazoa t f intestinal peptit (VIP) ve nitrik oksit hücre içi ikincil habercilerdir (22-24).

Metilksantinler,  rik asit, adenin, guanin, hipoksantin gibi pürinlerin kimyasal yapısı ile benzerlik göstermektedir. Bu pürin molek llerleriyle ksantinlerin kimyasal benzerliği, biyokimyasal düzenleyici cAMP ile etkileşime girmeleri bakımından önem taşımaktadır (21).

Kronik kafein tüketimi hamilelik sırasında fetal gelişimi etkilemesine rağmen, embriyogenesis üzerine kafeinin etkisi tam olarak anla ılamamı tır. Yüksek doz kafeinin, gen ekspresyonunu deği tirebildiği, düşük doğum ağırlıklı bebeklere, infertiliteye, düşük riskine ve intrauterin gelişme geriliğine neden olabildiği savunulmaktadır. Düşük doğum ağırlığı ve intrauterin gelişme geriliği ile doğanlarda yetişkin dönemde hipertansiyon ve kronik kalp yetmezliği riski bulunmaktadır. Anjiotensin II, fetoplasental dolaşımda g   l  bir vazokonstr kt rd r, AT₁ ve AT₂ reseptörleri ile etki gösterir. Hayvan

modellerinde kafein ile birlikte AT₂ reseptör ekspresyonunun arttığı görülmüştür (25).

Kafein; akut ve kronik olarak growth hormon (GH), tiroksin (T₄) ve tiroid uyarıcı hormon (TSH) seviyelerini arttırabilir. Yapılan çalışmalarda kafein tüketiminin benign veya malign tiroid neoplazisine karşı koruyucu rol oynayabileceği görüşü vardır. Geçmişteki çalışmalarda uzun süre içme suyuna kafein eklenen ratlarda, neoplazinin artmadığı görülmüştür. Kafeinin tek başına T₄ seviyelerini azalttığı TSH seviyelerini ise yükselttiği belirtilmiştir. Ancak 1500 ppm (yaklaşık 140 mg/kg/gün; yüksek doz) kafein ile tiroid foliküler hücre poliferasyonu ve karaciğer hipertrofisi tespit edilmiştir (11).

İnsanda uzun süre kafein kullanımı plazma renin aktivitesini ve katekolamin seviyelerini yükseltip, renal fonksiyonların bozulmasına yol açarak renin konsantrasyonlarını arttırdığı söylenmektedir. Bunun sonucu olarak Kreatinin klirensi düşer, üriner protein atılımı artar. Kafein renal ven plazma norepinefrin konsantrasyonlarının artmasına neden olur (26-27). Yüksek konsantrasyonlarda ve kronik olarak tüketiminde myokardı uyarıp, kalp hızını arttırarak, kardiyak performans bozduğu, myokard infarktı riskini yükselttiği belirtilmiştir (4,28).

Kafein, histamin sekresyonunu düşürür. Yapılan araştırmalarda kafeinin 5-20 mM dozlarda, rat peritoneal mast hücrelerinden histaminin salınmasını önemli

derecede inhibe ettiği gösterilmiştir. Kafeinin in vitro ve in vivo olarak alerjik reaksiyonları mast hücrelerini etkileyerek inhibe ettiği belirtilmiştir (29).

Kafein insanda, C- reaktif protein (CRP) artışına neden olabilir (30). Aşırı kafein tüketimi, böbrekte kalsiyum oksalat taşı oluşumunu artırabilir (31).

Kafein, diabetik ratlarda glukoz homeostazını iyileştirmiş, glukozriyi düşürmüş ve oral glukoz toleransını iyileştirmiştir (32). Tip 2 diabet riskinin kahve tüketimi ile düştüğü belirtilmektedir (33).

Alkol tüketimiyle, viral hepatitle, kilo artışı ve glukoz metabolizmasının zayıflamasıyla oluşabilecek karaciğer hasarı riski, özellikle kafein (günde 2 kupa kahve) ile azaldığı belirtilmiştir (34).

Ratlarda uzun süre kafein uygulaması (2-12 hafta) karaciğer glukojen depolarını azaltmış, vücut yağ ağırlığını ve serum leptin seviyelerini dşrmştir (35).

Ratlarda kafein, bazal lipolizi arttırdığı (36), ntrfil aktivitesini arttırarak, superoksit üretimine etkisi olmadan myeloperoksidaz (MPO) enziminin salınmasını stimule ettiği düşünülmektedir (37).

İnsanda ve ratlarda yüksek doz kafein alınımı kan basıncını yükseltmiş, epinefrin salınmasını arttırmıştır. Bu durum yetişkin popülasyonda koroner kalp hastalığı riskini arttırmaktadır (38-40).

10-20 mg/kg kafein, ratlarda dalakta ve timusta adenozin deaminaz (ADA) aktivitesinde artmaya sebep olmuştur. Doz yükseldikçe aktivite de artmıştır. Kafeinin dalak ve timusta ADA'yı yükseltmesi immünitede rol oynadığını düşündürmektedir (41).

2.2. Karaciğer Anatomisi ve Fizyolojisi

Karaciğer; vücudun deriden sonra en büyük organı ve en büyük bezidir. Yaklaşık 1,5 kg ağırlığında olan karaciğer, diyafragmanın altında abdominal boşlukta yerleşmiştir (42). Sağ ve sol olmak üzere iki anatomik loba ayrılmıştır. Sağ lobun arka yüzeyinde caudate lob ve alt yüzeyinde quadrate lob denilen iki küçük lob daha bulunmaktadır. Karaciğer; hepatik arter ve portal venin sağ ve sol kolları tarafından beslenmektedir. Hepatik arter karaciğere genel dolaşımdan bol oksijenli kanı taşırken; portal ven sindirim sisteminin kapiller yatağından besin maddelerince zengin kanı taşır. Venöz drenaj hepatik venler içine; biliyer drenaj ise sağ ve sol hepatik kanallar içinedir. İnce bir bağ dokusu olan Glisson kapsülü karaciğerin bütün yüzeyini kaplamaktadır. Glisson kapsülü; damar ve sinir kollarıyla karaciğer parankimi için destekleyici bir yapı sağlamakta ve parankimi ikiye ayırmaktadır (43).

Karaciğer çok sayıda lobüllerden oluşmaktadır. Klasik karaciğer lobülü; vasküler, biliyer damarlar ve bağ dokusuyla ayrılmış polihedral bir yapıdır. Santral ven lobülün merkezindedir. Parankimal epitel hücrelere ait tek hücre tabakaları santral venden çıkarak yayılırlar. Sinuzoidler; karaciğer hücre tabakalarının her iki tarafına kan taşıyan vasküler kanallardır. Bunlar santral ven yakınlarında zengin intralobüler, vasküler bir ağ oluştururlar. Sinuzoidleri kaplayan hücreler ya endotelyal hücrelerdir ya da Kupffer hücreleridir. Endotelyal hücreler ile hepatositler arasındaki doku aralığı Disse aralığı olup; besin maddeleri ile kan ve karaciğerden artık ürünlerin transferini sağlayan interstisyel sıvıyı içerir (43).

Karaciğer hücreleri (hepatositler); 20-30 mikron çapında, poligonal hücrelerdir. Hematoksilen eozinle (H.E) boyanmış kesitlerde; çok sayıda mitokondri ve bir miktar düz endoplazmik retikulumun bulunması nedeniyle, hepatositin sitoplazması eozinofiliktir. Her bir hepatositin yüzeyi; diğer hepatositlerin yüzeyi ve Disse aralığı boyunca sinüzoidlerin duvarıyla temas halindedir. İki hepatositin bitişik olduğu her yerde, hücrelerin arasında safra kanalikülü olarak bilinen tübüler bir aralık bulunur. Safra kanalikülleri; safra kanal sisteminin ilk kısımlarıdır. Safra kanalikülleri karaciğer lobülünün plakları boyunca anastomoz yapan karmaşık bir ağ oluştururlar ve portal alanlarda sonlanırlar. Bu nedenle safra kanın ters yönünde, yani lobülün merkezinden çevresine doğru ilerleyerek, kübik hücrelerden oluşmuş safra kanalcıkları ya da Hering kanallarına girer. Kanalcıklar kısa bir mesafe katettikten sonra portal alanlardaki safra kanallarında sonlanırlar. Safra kanalları; kübik ya da prizmatik

epitel ile örtülüdür ve belirgin bir bağ dokusu kılıfına sahiptir. Safra kanalları; sağ ve sol hepatik kanalları oluşturarak karaciğeri terk ederler (42).

Hepatosit; bol miktarda kaba ve düz endoplazmik retikulumu sahiptir. Hepatositte kaba endoplazmik retikulum; sitoplazma içine saçılmış kümeler oluşturur, bunlar bazofilik cisimler olarak isimlendirilir. Bu yapılardaki poliribozomlarda birkaç tip protein (kan albumini, fibrinojen) sentezi yapılır. Sitoplazma içinde yaygın olarak dağılmış düz endoplazmik retikulum; çeşitli maddelerin vücuttan atılmadan önce etkisizleştirilmesi için gerekli oksidasyon, metilasyon ve konjugasyon işlemlerinden sorumludur (42).

Hepatositte bulunan diğer bir organel de lizozomlardır. Hepatosit lizozomları; hücre içi organellerin yıkımı ve dönüşümü için önemlidir. Peroksizomlar da; lizozomlar gibi enzim içeren ve hepatositlerde bol miktarda bulunan organellerdir. Peroksizomların işlevlerinden bazıları; yağ asitlerinin oksidasyonu ve bu oksidasyon sonucunda oluşan H_2O_2 ' in katalaz aktivitesi yoluyla yıkılması, pürinlerin (AMP, GMP) fazlasının ürik aside yıkılması, kolesterol, safra asitleri ve miyelin yapımında kullanılan bazı lipidlerin sentezine katılmaktır (42).

Hepatositte golgi kompleksleri de bol miktardadır. Bu organelin işlevleri arasında; lizozomların oluşturulması ve plazma proteinlerinin (örn. albumin, kompleman sisteminin proteinleri), glikoproteinlerin (örn. transferrin) ve lipoproteinlerin (örn. çok düşük dansiteli lipoproteinler; VLDL) salgılanması vardır (42).

Karaciğer; yaşam için gerekli birçok farklı fonksiyona sahiptir. Aminoasitleri, karbonhidratları, lipidleri, vitaminleri, mineralleri alır, işler ve depolar. Albumin, α ve β globulinler, pıhtılaşma faktörleri ve transport proteinleri dahil olmak üzere birçok plazma proteini karaciğer tarafından sentezlenmektedir. Karaciğer; ilaçlar ve toksinler gibi ekzojen bileşiklerin detoksifikasyonunda primer organdır. Karaciğerin diğer önemli bir fonksiyonu da bilirubinin glukuronik asitle konjugasyonudur. Karaciğer; safra asitlerinin kolesterolden sentezi ve safraya sekresyonu; böylece kolesterol metabolizmasının düzenlenmesi ve diyetel yağların absorpsiyonunun kolaylaştırılmasından da sorumludur. Karaciğer; tiroid, steroid ve diğer hormonların başlıca katabolizma yeridir ve plazma hormon düzeylerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (42).

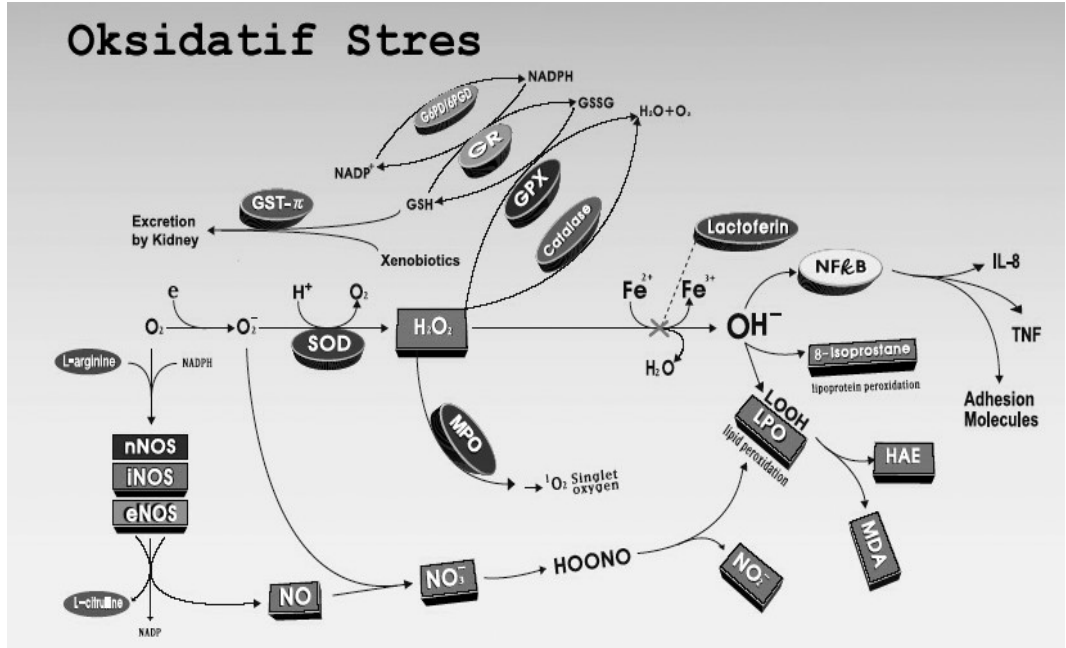
2.2. Oksidatif stres ve Serbest Radikaller

Oksijen canlılar için hayati önemi olan bir moleküldür ve hücrede enerji üretim basamaklarında kullanılır. Serbest oksijen radikalleri enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olup çok reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir (44).

Serbest radikalın en yaygın tanımı moleküler ya da atomik yörüngesinde çok reaktif olan çiftleşmemiş elektron bulunduran bir kimyasal ürün olduğu şeklindedir (45).

Bu eşleşmemiş elektron, serbest radikali karasız bir konuma getirir. Serbest radikalin kararlı, stabil bir yapıyı tekrar kazanması amacıyla elektronunu bir başka elektronla eşleştirmesi gerektiğinden bu durum serbest radikale kimyasal olarak büyük bir aktivite kazandırır (46-47).

Serbest radikaller hücrelerimizde DNA'ya, proteinlere ve lipidlere saldırarak zarar verir. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücrelerde antioksidan sistemler bulunur. Serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge olmalıdır. Eğer bu denge serbest radikaller lehine bozulursa, yani yapımdan daha yavaş nötralize edilirlse, hücrede serbest radikaller artar. Serbest radikallerin hücrede artışı ve hücre fonksiyonları üzerinde yaptıkları olumsuz etkiye (oksidatif hasara) 'oksidatif stres' denir. Dengenin prooksidan ve oksidan maddelerin lehine kayması olarak tanımlanmaktadır (44).



Şekil 3: Oksidatif Stres (www.woongbee.com)

2. 3. 1. Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikaller üç temel mekanizmayla oluşmaktadır (48):

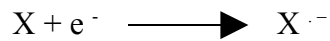
a) Kovalent bağların homolitik kırılması ile: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır ise; her iki atom üzerinde paylaşılmamış elektron kalır ve iki adet serbest radikal oluşur.



b) Normal bir molekülün elektron kaybetmesi veya heterolitik bölünmesi ile: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Askorbik asit, glutatyon (GSH) ve tokoferoller gibi hücrel antioksidanlar radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken; kendilerinin radikal formu oluşur. Bu tipteki bölünmede kovalen bağı oluşturan her iki elektron; atomların birinde kalır ve serbest radikal değil iyonlar meydana gelir.



c) Normal bir moleküle elektron transferi ile: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir. Moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi radikal formu olan superoksidin oluşumuna neden olur.

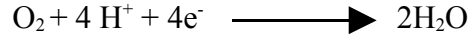


Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelir ve serbest radikallerin çoğu oksijenin indirgenmesi ile oluşur. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral, organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler. Cu^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+2} , Mo^{+3} gibi bazı geçiş metalleri de serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (49).

Serbest radikaller; normal metabolik olaylar sırasında meydana gelebildikleri gibi çok çeşitli dış etkenlere bağlı olarak da oluşabilirler (50-51). Ekzojen

kaynaklar; hava kirleticiler, doğal zararlı gazlar (ozon, oksijen ve hiperbarik oksijenin yüksek konsantrasyonları), iyonize ve non-iyonize radyasyon, ilaçlar, alkol, patojenik bakteri ve virüslerdir (52). Endojen kaynaklar ise; mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, araşidonik asit metabolizması, redoks döngüsü, fagositik hücreler (monosit ve makrofajlar, nötrofil, eozinofil) ve endotelyal hücreler gibi hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, indolamin dioksijenaz, triptofan dioksijenaz, galaktoz oksidaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz, monoamin oksidaz gibi oksidan enzimler ve otooksidasyon reaksiyonlarıdır (45). Organizmanın yapısında bulunan proteinler, serbest aminoasitler, DNA, lipidler ve nükleik asitler gibi makro moleküller bu sistemler tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin etkilerine maruz kaldıklarında hasara uğramaktadırlar (53). Oksidatif hasar oluşturan türler (reaktif oksijen türleri, nitrojen ve klorin türleri); metabolizma ürünleri, fizyolojik mediyatörler ve sinyal molekülleri olarak ortaya çıkabilirler. Serbest radikaller kalsiyum metabolizmasına etki ederek hücre içi kalsiyumun kontrolsüz yükselmesine, dolayısıyla hücrenin zarar görmesine ya da ölmesine neden olmaktadır (54). Aerobik organizmalar için O_2 esansiyel bir moleküldür. Aynı zamanda O_2 oksidan bir ajandır. Normal koşullar altında moleküler oksijenin çoğu sitokrom sistemi gibi hücre içi sistemler içinde tetravalan redüksiyona uğramaktadır. Bununla birlikte %1-2 oranında bu yoldan sızan oksijenin biyolojik yapılarda univalan redüksiyonu sonucu serbest oksijen radikalleri olarak adlandırılan bir çok reaktif ürün ortaya çıkar. Aerobik organizmalarda radikaller daha çok oksijen radikalleri şeklinde bulunmaktadır (55).

Fizyolojik koşullarda O₂'nin %98'i mitokondride bulunan sitokrom oksidaz tarafından indirgenmekte ve 4 elektron alarak suya dönüşmektedir.



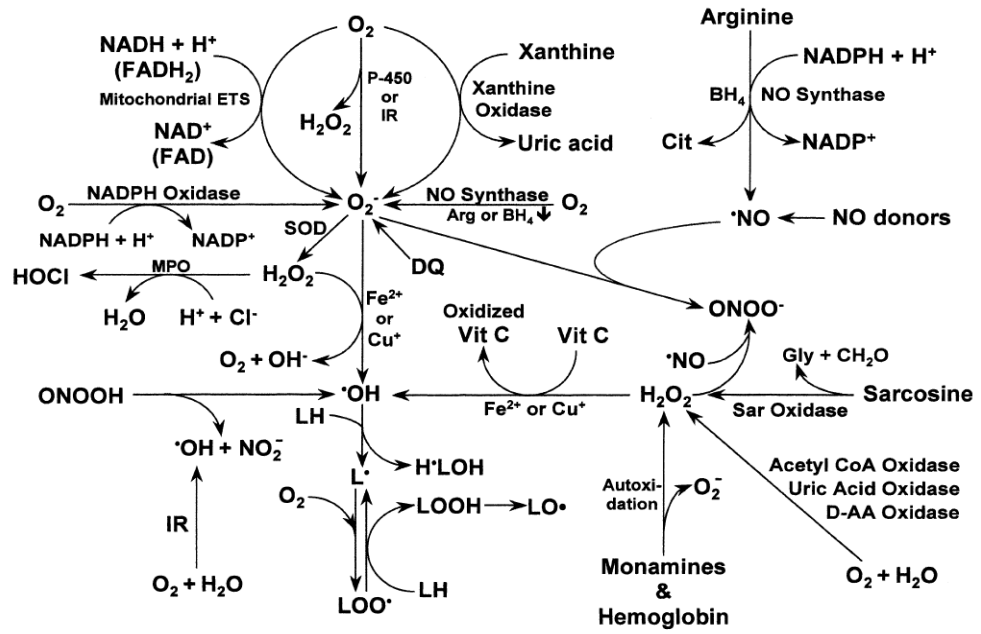
Serbest oksijen radikallerinin oluşum basamaklarında öncelikle tek elektron transferi ile moleküler oksijen süperoksit radikaline dönüşmektedir. Süperoksite iki elektronun eklenmesi ile hidrojen peroksit oluşmaktadır. Hidrojen peroksit; radikal olmamasına karşın elektron almasıyla son derece toksik olan hidroksil radikalini oluşturmaktadır. Hidroksil radikali de univalan redüksiyon ile suya dönüşmektedir. Vücutta üretilen radikaller her zaman tehlikeli ve zararlı maddeler olarak değerlendirilmemelidir. Zararlı etkilerinin yanında vücut için gerekli bir çok fonksiyonun gerçekleştirilmesinde önemli rol oynarlar (56). Steroid yapıdaki çok sayıda bileşğin üretimi, eikozanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, çok sayıda oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin etkileri ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için serbest radikal yapımı olmazsa olmaz bir koşuldur (57). Serbest radikallerin en iyi bilinen zararlı etkileri; hücre membranı, yağ asitleri ve lipoproteinlere saldırarak lipid peroksidasyonu olarak bilinen bir zincir reaksiyonunu başlatmalarıdır. Lipid peroksidasyonunun ürünleri ileri aşamalarda membran proteinlerinde de hasara yol açarak yapısal ve fonksiyonel bozuklukların ortaya çıkmasına neden olurlar (48).

2.3.2. Serbest Radikal Türevleri:

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) oluşumu için oksijen gereklidir. Serbest oksijen radikallerine süperoksit ($O_2^{\bullet}$), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$), alkoksil radikali ($RO^{\bullet}$), peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$) ve hidroperoksil radikali($OOH^{\bullet}$) örnek verilebilir.

Nitrik oksit ($NO^{\bullet}$) ve nitrojen dioksit ($NO_2^{\bullet}$) radikalleri de RNS' yi oluşturur. Oksijen ve nitrojen serbest radikalleri, hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit ($ONOO$), hipoklorik asit ($HOCl$), hipobromöz asit ($HOBr$) gibi diğer reaktiflere

dönüşebilir(Şekil4).



Şekil 4. Memeli hücrelerinde reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin meydana gelişi

(İR: İyonize radyasyon, Sit: Sitrülin, D-AA: D-Amino asit, BH₄: Tetrahidrobiopterin,

Gly: Glisin, L $\bullet$: Lipit radikali, SOD: Süperoksit dismutaz, MPO: Myeloperoksidaz)

(50)

2.3.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$)

Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu kararsız bir yapı olan süperoksit radikal anyonu meydana gelir.



Mitokondriyal elektron transport zinciri sırasında O_2 'nin otooksidasyonu sonucu oluşur. Süperoksit radikali O_2 varlığında; ksantin oksidaz'ın ksantini veya hipoksantini indirgemesiyle, NADPH'nin NADPH oksidaz ile oksidasyonu, mitokondriyal elektron transport sistemi ile NADH_2 ve FADH_2 'nin NAD ve FAD'ye dönüşümü sırasında, O_2 'nin iyonize radyasyonla, sit P_{450} ile ve arginin veya tetrahidrobiopterin eksikliğinde nitrik oksit sentazla indirgenmesiyle oluşur (58-59). Makrofajlar ve polimorf nüveli lökositler tarafından gerçekleştirilen fagositoz sırasında O_2 tüketimi artar ve bu durumda plazma membranında bulunan NADPH oksidaz tarafından $\text{O}_2^{\cdot-}$ oluşumu tetiklenir.



$\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin kimyasal davranışı nerede çözündüğüne göre değişmektedir. Suda çok reaktif değildir. Bazen bir elektron alarak, okside edici ajan olarak davranabilir. Örneğin askorbik asidi okside etmektedir (52).



Organik solventlerde daha reaktif ve tehlikelidir. Biyolojik membranlarda oluştuğunda oldukça fazla hasar meydana getirmektedir.

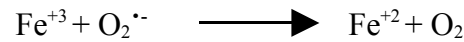
$O_2^{\cdot-}$ çeşitli organik ya da inorganik bileşiklerle de reaksiyona girebilir. Nitrik oksit ile reaksiyona girebilir. Nitrik asit ile reaksiyona girip peroksinitriti oluşturması önemlidir (60).

2.3.2.2. Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$)

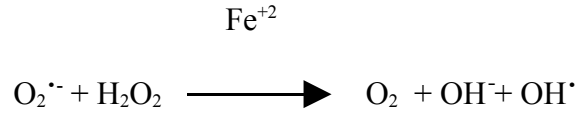
Yarılma ömrü kısa ve güçlü bir serbest radikal olan hidroksil radikali; kuvvetli hasar oluşturur. Tüm biyolojik substratlarla reaksiyona girebilme özelliğine sahiptir. Oluşan hasar üç şekilde meydana gelir.

- 1) Protein ve lipidler arası çapraz bağlar oluşturarak,
- 2) Proton çıkararak,
- 3) Elektron transferi yaparak.

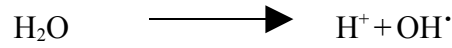
Toksik $OH^{\cdot}$ oluşumunda demir, bakır gibi bazı metal iyonları da rol oynar. Asıl olarak Fe^{+2} molekülünün de katıldığı Fenton reaksiyonu ile oluşur (61). Fe^{+3} 'ün $O_2^{\cdot-}$ ile indirgenmesi sonucu oluşan Fe^{+2} , H_2O_2 ile reaksiyona girerek $OH^{\cdot}$ radikalini meydana getirir. Bu reaksiyon 'Fenton Reaksiyonu' olarak adlandırılır.



Ayrıca demirin katalizlediği Haber-Weiss reaksiyonuyla da $OH^{\cdot}$ oluşur (62).

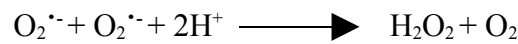
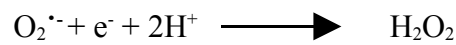
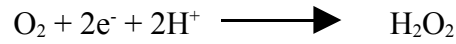


İyonize radyasyon etkisi ile de $\text{OH}^{\cdot}$ oluşur (50).



2.3.2.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Oksijen molekülünün iki elektron alarak indirgenmesi veya yapıya iki hidrojen atomunun eklenmesiyle oluşur (63). Süperoksit radikalının yapısına bir elektron katılmasıyla da meydana gelmektedir. Biyolojik sistemlerde daha sık olarak iki süperoksit molekülü, iki protonla birleşerek hidrojen peroksit ve oksijen oluşturur.



H_2O_2 bir serbest radikal olmamasına karşın yüksüz bir molekül olduğundan hücre içerisine kolaylıkla girebilir.

H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ den iki elektronun sit p450, yağ-açıl KoA oksidaz, asetil KoA oksidaz, ürik asit oksidaz, α -hidroksiasit oksidaz veya D-amino asit oksidaz ile redüksiyonu ile oluşabilir. Ayrıca monoaminler (dopamin, epinefrin,

norepinefrin), hemoglobinin otooksidasyonu ve glisin sentezinde de H_2O_2 oluşur (64).

Peroksizomlar fazla miktarda oksidaz içerdiklerinden hücrel H_2O_2 için potansiyel kaynaktır. H_2O_2 özellikle Fe ve Cu gibi geçiş metal iyonlarının varlığında kolaylıkla yıkılır. Bu yıkım sonucu en reaktif radikal olan $OH^\bullet$ oluşur (50).

2.3.2.4. Hipoklorik Asit (HOCl)

Nötrofiller, sitoplazmada bulunan myeloperoksidaz (MPO) enziminin katalizlediği reaksiyonla güçlü oksidatif bir yapı olan hipokloridi oluştururlar (65).



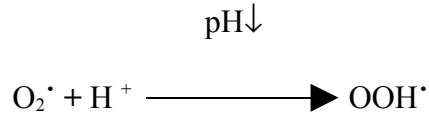
2.3.2.5. Singlet oksijen (1O_2)

Yapısında ortaklanmamış elektron bulundurmaması sebebiyle serbest oksijen radikali olmayıp reaktif oksijen türleri grubunda yer alan bir moleküldür. Singlet oksijen serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olması açısından önem taşımaktadır. 1O_2 , oksijen elektronlarının dışardan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün ters yönündeki farklı bir yörüngeye geçmesi ile

oluşabileceği gibi, $O_2^{\cdot}$ radikalinin dismutasyonu ve MPO'nun katalizlediği H_2O_2 'nin HOCl ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir (66).

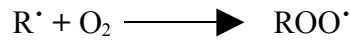
2.3.2.6. Perhidroksil radikali ($OOH^{\cdot}$)

$O_2^{\cdot}$ radikali asidik ortamda daha reaktif olup protonlanarak kendisinden daha kuvvetli bir oksidan olan $OOH^{\cdot}$ radikalini oluşturur (63).



2.3.2.7. Peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$)

$R^{\cdot}$ radikalleri hızlı bir şekilde oksijen ile reaksiyona girerek $ROO^{\cdot}$ 'yi oluştururlar (63). $ROO^{\cdot}$, lipid peroksidasyonunu başlatan radikal olup çok uzun ömürlüdür.



2.3.2.8. Nitrik Oksit

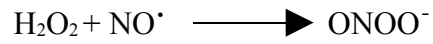
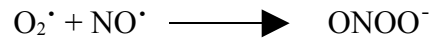
Memeli hücrelerinde NO başlıca Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ın aktivitesi sonucu sentezlenir. NOS, oksijeni kullanarak L-arjinin amino asitinden; sitrülün ve NO'yu oluşturur. Bu olay, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavin mononükleotid (FMN), flavin adenin dinükleotid (FAD), tetrahidrobiopterin (BH_4) ve kofaktör olarak bir tiyol donörüne ihtiyaç duyar (66).



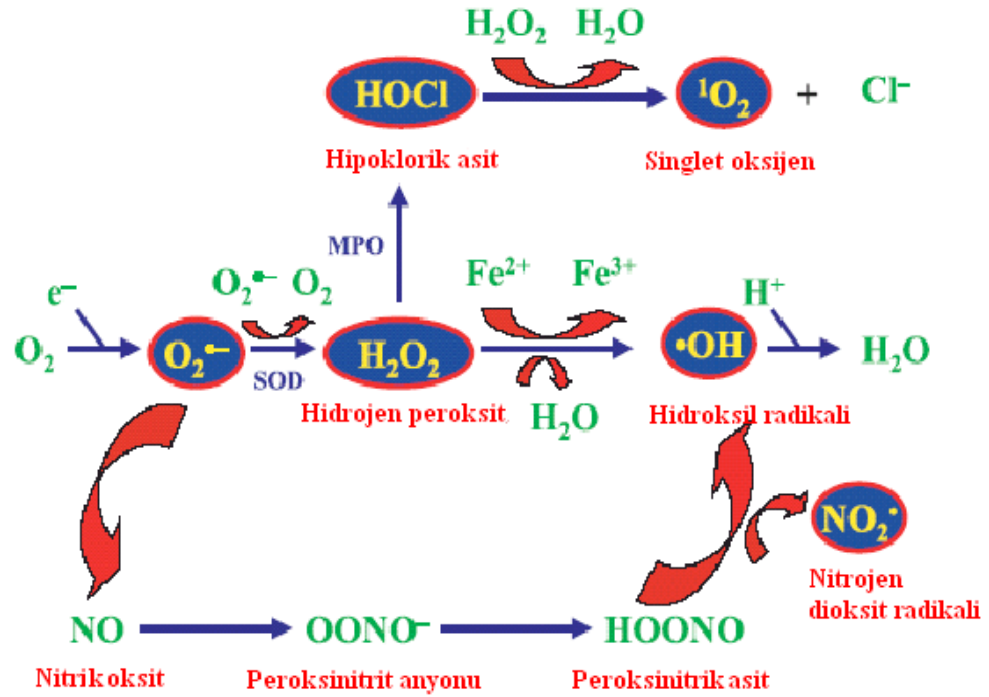
Eşleşmemiş elektronu nedeniyle bir serbest radikal türü olarak bazı memeli hücre tiplerince üretilen NO; damar tonusunun kontrolünde, platelet agregasyonunda, lökosit adezyonunda, hücre aracılı immün sitotoksitesinde, sinaptik geçirgenlikte sinyal molekülü olarak önem taşımaktadır (67).

2.3.2.9. Peroksinitrit (ONOO^-)

Süperoksit radikali veya hidrojen peroksidin $\text{NO}^{\bullet}$ ile reaksiyona girmesi ile oluşur (68).



Oluşan peroksinitrit radikalinin oksidatif potansiyeli $\text{O}_2^{\bullet}$ ve H_2O_2 'ye göre daha yüksektir (50).



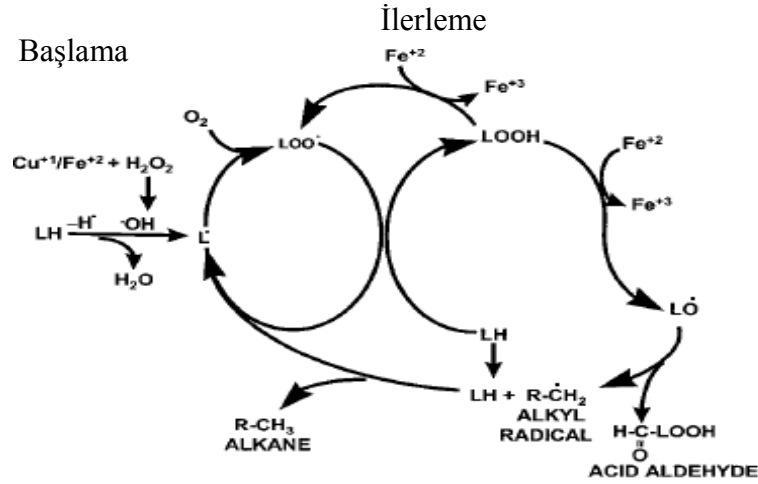
Şekil 5. ROS ve RNS'nin birbirleriyle etkileşimi (44)

2.3.3. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu

Organizmanın yaşam sürecinde karşılaştığı radikal türlerinin çeşitli olması nedeniyle, serbest radikallerin biyolojik etkilerini genellemek zordur. Oluşan serbest radikaller, ortamdan uzaklaştırılamadığı takdirde metabolik bozukluklara, hücre hasarına ve hatta ölüme yol açarlar (69). Serbest radikaller, kimyasal modifikasyonlarla protein, lipit, karbonhidrat ve DNA'da hasar oluştururlar.

Lipitler; reaktif oksijen türlerinin yıkıcı etkilerine en fazla maruz kalan biyolojik moleküllerdir. Hücre membranı serbest oksijen radikalleri ile hızla reaksiyona girebilen çoklu doymamış yağ asitlerinden oldukça zengindir. Bu yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girip peroksidasyona

neden olur (Şekil 6). Membran akışkanlığı, membran lipidlerinin yan zincirlerinde bulunan doymamış yağ asitleri ile sağlanır. Doymamış yağ asitlerinin hasarı, membran akışkanlığını azaltıcı etki gösterir.

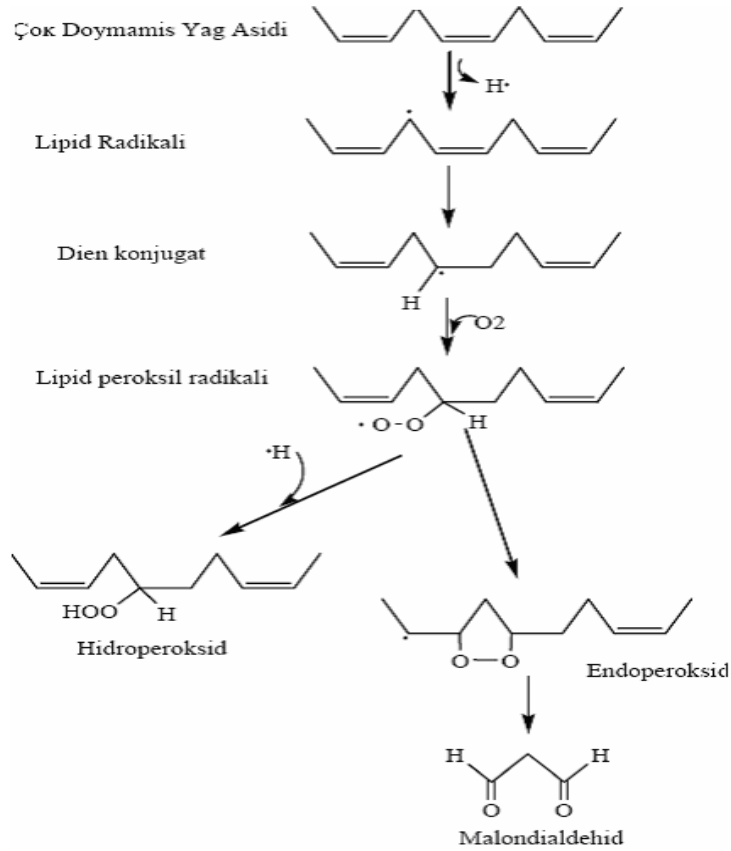


Şekil 6. Metallerin katalizlediği lipid peroksidasyonu (70)

Lipit peroksidasyonu, oksijen türevi serbest radikaller tarafından tetiklenen oksidatif stresin en önemli organik göstergelerinden birisidir. Üç karbonlu bir ketoaldehid olan Malondialdehit normal metabolik şartlarda, önce asetat veya malonata kadar okside olur, daha sonra krebs siklusu ile CO_2 'e indirgenerek atılır. Fakat aşırı lipid peroksidasyonunda MDA konsantrasyonu artar ve dokulara hasar verir (71).

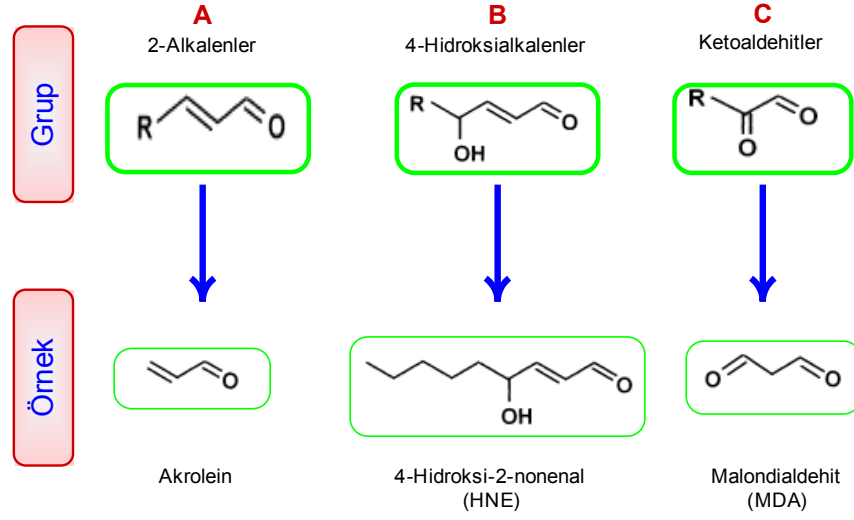
Biyolojik sistemlerdeki oksidatif stresin ölçülmesinde günümüzde en yaygın metod MDA ölçümüdür. MDA, proteinlerin lizin rezidüleriyle ve

fosfolipidlerin amin gruplarıyla reaksiyona girer (72). MDA, kolaylıkla diffüze olabildiğinden, DNA bazlarıyla da reaksiyona girerek hasara neden olabilir.



Şekil 7: Lipit Peroksidasyonunun kimyasal yolu

Peroksidasyon sonucu oluşan reaktif aldehydler; serbest radikallere göre daha stabildirler. Hücre içinde veya hücreden dışarıya çıkarak daha uzak bölgelerdeki proteinlerin serbest amino grupları, fosfolipitler ve nükleik asitlerle reaksiyona girebilirler. Bunun sonucunda molekül içi ve moleküller arası 1-amino-3-imino propen (AIP) köprüleri kurabilir ve biyolojik moleküllerde yapısal modifikasyonlar oluşturabilirler (Şekil 8).



Şekil 8. Lipid peroksidasyonu ile oluşan aldehidler (72)

2.4. Antioksidan Sistem

Antioksidan moleküller; endojen (organizma tarafından sentezlenen) veya eksojen (dışarıdan besinlerle alınan) kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin hücreye hasar vermesini engellemektedirler. Hücre dışında ve hücrede farklı organellerde yerleşerek savunma mekanizmasında rol alan biyomoleküller enzimatik yapıda olabilecekleri gibi non-enzimatik yapıda da olabilirler (73). Hücre dışı savunma; albümin, bilirubin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler SOD, GST, GPx, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidazdır (Şekil 9) (74).

- ✓ Reaktif metabolitlerin temizlenmesini veya bu radikallerin daha az aktif ve toksik olmayan ürünlere dönüşümünü sağlayarak,
- ✓ Zayıf reaktif türlerin daha zararlı türlere dönüşümü için gereksinim duyulan metal iyonlarını bağlayarak,
- ✓ Hedef molekülde oluşan hasarı onarma yoluyla,
- ✓ Hasarın çok büyük olduğunda, hasara uğramış molekülü uzaklaştırarak.

Antioksidan ajanlar, oksidan moleküllere karşı etkilerini dört yolla göstermektedirler (69):

1) Süpürücü etki gösterenler: Oluşturdukları etki ile yeni radikal oluşumunu engeller ve oluşmuş olan radikalleri daha az zararlı hale getirirler. SOD, GPx, ferritin, serüloplazmin ve metalloproteinin gibi metal bağlayıcı proteinler bu tür etkiye örnektir.

2) Giderici etki gösterenler: Oksidanlarla etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini inhibe eden bileşiklerdir. β -karoten, vitamin C ve vitamin E bu tür etkiye örnektir.

3) Zincir kırıcı etki gösterenler: Zincirleme olarak devam eden reaksiyonları belli yerlerinden kırarak, oksidan etkiyi durdururlar. Bunlara örnek olarak, bazı vitaminler, mineraller, hemoglobin, ürik asit, bilirubin ve albümin verilebilir.

4) Onarıcı etki gösterenler: Bu grupta DNA tamir enzimleri ve metiyonin sülfoksit redüktaz örnek gösterilmektedir.

2.4.1. Nonenzimatik Yapıda Olan Antioksidanlar:

Ekzojen Kaynaklı Nonenzimatik Antioksidanlar: β -karoten, vitamin C ve vitamin E.

Endojen Kaynaklı Nonenzimatik Antioksidanlar: Hemoglobin, ferritin, miyoglobin, ürik asit, bilirubin, laktoferrin, transferrin, melatonin, askorbik asit, albümin ve glutatyon.

2.4.1.1. Glutatyon (GSH)

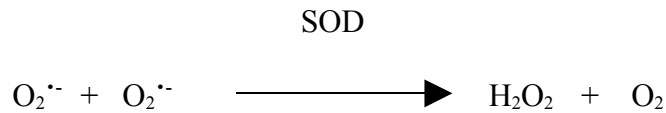
Glutatyon (γ -glutamilsisteinilglisin), organizmada tiyol grubu içeren, düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptiddir. DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücre fonksiyonları dışında başlıca antioksidan olarak hücre savunmasında da önemli rolü vardır (76). GSH'a antioksidan özelliğini sisteinin tiyol grubu kazandırır. Serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. GSH birçok enzimin kofaktörüdür (örneğin HMG CoA redüktaz). Tiroid hormon sentezinde rol oynar. Bunun dışında proteinlerdeki -SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı muhafaza eder. Demirin +2 halde tutulmasını sağlar. Böylece, protein ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller hatta rejenere olmalarını sağlar. Karaciğer vücut GSH içeriğinin en önemli kaynağını oluşturmaktadır. Ekstrasellüler mesafede çok düşük konsantrasyonlarda bulunur.

GSH, tüm memeli hücrelerinde bol miktarda (0.5-10 mM) sentezlenir. Bu sentez iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, γ -glutamilsistein sentetaz isimli enzim GSH'ın prekürsör amino asitleri olan glutamat ve sisteinden, γ -glutamilsisteinin oluşumunu katalizler. İkinci basamakta ise, glutatyon sentetaz, glisin ve γ -glutamil-sisteinden glutatyonu oluşturur. GSH negatif feed-back ile glutamilsistein oluşum hızını ve böylelikle kendi sentezini de denetler. Bu sentezde bir molekül GSH için 2 molekül ATP'nın hidrolizi gerekir (77).

2.4.2. Enzimatik Yapıda Olan Antioksidanlar:

2.4.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1)

SOD, süperoksit anyonunu hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çeviren bir metalloenzimdir.



Bu reaksiyon, süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısı olduğundan oksidatif strese karşı 'ilk savunma' olarak değerlendirilir.

Memelilerde üç çeşit SOD bulunmaktadır (78):

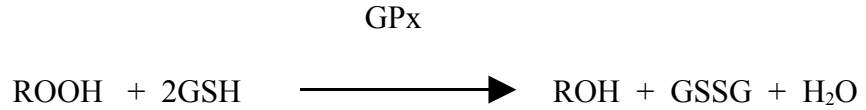
1) Sitozolik SOD (Cu-ZnSOD, SOD1): Genellikle sitozolde ve lizozomal fraksiyonlarda yer alır, fakat mitokondriyal boşlukta da bulunmaktadır. İki alt birimden oluşmaktadır. Kofaktörleri çinko ve bakırdır. Enzimin aktivitesinden bakır, stabilitesinden çinko sorumludur.

2) Mitokondrial SOD (Mn-SOD, SOD2): Mitokondride bulunur ve tetramerik yapıdadır. Kofaktörü mangandır.

3) Ekstrasellüler SOD (EC-SOD, SOD3): Tetramerik yapıdadır ve ekstrasellüler bölümlere salgılanır. Kofaktörleri çinko ve bakırdır. Ayrıca bazı bakterilerde Fe-SOD da saptanmıştır (79).

2.4.2.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx; EC.1.11.1.9) ve Glutasyon Redüktaz (GR; EC.1.6.4.2)

GPx, lipid peroksitlerini daha az toksik yağ asitlerine indirger. Kofaktör olarak glutasyonu (GSH) kullanmaktadır.

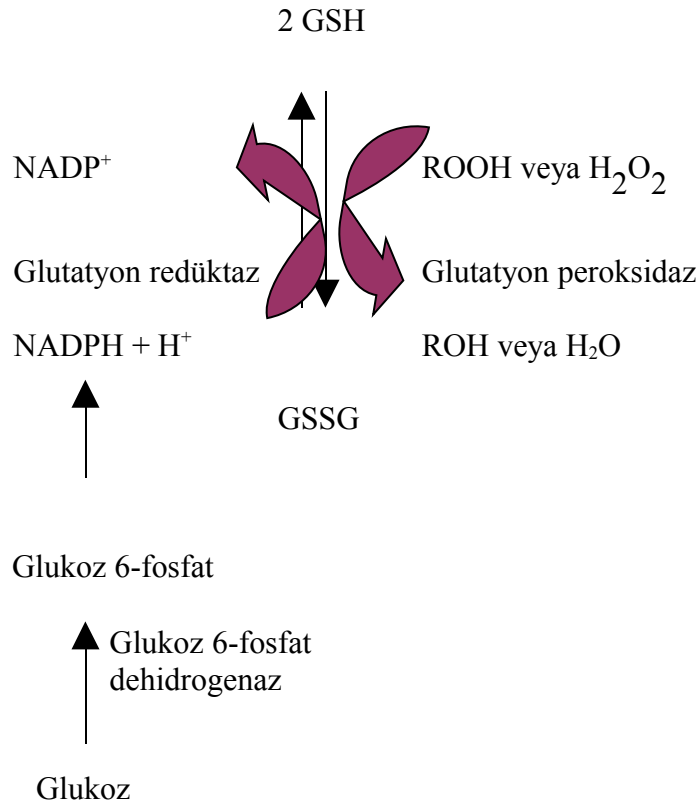


GPx, hücrede H₂O₂'nin temizlenmesinden sorumlu iki enzimden biri olup diğer enzim ise katalazdır. Glutasyon-GPx sistemi H₂O₂'nin H₂O'ya indirgenmesini katalizlerken organik hidroperoksitleri de parçalamaktadır (55).

Genel olarak GPx'ın H₂O₂'e karşı en belirgin savunma sistemi olduğu düşünülmektedir. Tetramerik yapıda olan enzim en çok karaciğer ve eritrositte aktif olarak bulunmaktadır. Kalp, akciğer ve beyinde orta, kasta ise düşük aktivitede bulunur. %60-75'i stoplazmada, %25-40'ı mitokondride yer alır.

Selenyuma bağımlı ve bağımsız iki tipi mevcuttur. Selenyuma bağımlı olan GPx (Se-GPx) sitozol ve mitokondride bulunmaktadır ve hem H_2O_2 hem de lipid hidroperoksitleri metabolize eder. Selenyumdan bağımsız olan GPx (non-Se GPx) ise sadece lipid hidroperoksitleri metabolize eder. Bu fonksiyonu ile lipid peroksidasyonunun başlamasını ve ilerlemesini önlemektedir (80).

GR; hücresel GSH redox siklusundan sorumlu olup endojen peroksitlerin detoksifikasyonu için önemlidir (81). GPx peroksitleri temizlemek için hidrojen donörü olarak GSH'a ihtiyaç duymaktadır. Okside formu olan GSSG, glutatyon redüktaz ile yeniden glutatyon dönüşmektedir. Gerekli olan NADPH pentoz fosfat yolundan sağlanmaktadır (52).



Şekil 10. Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyon

2.4.2.3. Glutasyon-S-Transferaz (GST; EC 2.5.1.8)

Glutasyon-S-transferazlar, hücrel detoksifikasyon ve transporttan sorumlu iki protein alt birimden oluşan multifonksiyonel protein ailesidir. Genel olarak üç sitozolik ve bir de mikrozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılır. GST ailesi hepatositlerdeki başlıca detoksifiye edici sistemdir (82). Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere karşı GST'ler, selenyumdan bağımsız GSH-Px aktivitesi gösterirler.



GST'ler, glutasyonun reaktif metabolitlerle konjugasyonunu sağlayarak organizmadan uzaklaşmasını sağlamaktadır (83).

Antioksidan aktivitelerine ilaveten çok önemli başka biyokimyasal fonksiyonlara da sahip olup hem, bilirubin ve bazı kortikosteroidler gibi endojen maddeleri reversibl olarak bağlayarak bunların hücre içinde transportunda görev alırlar. Bazı güçlü alkilleyici ajanlara doğrudan kovalent bağlanarak, hücrel proteinler ve makromolekülleri bu ajanların etkisinden korurlar. GST'ler LTB₄ ve prostaglandin sentezinde de rol oynarlar.

2.4.2.4. Katalaz (CAT EC 1.11.1.6)

Peroksizomlarda lokalize, dört tane hem grubu bulunan hemoproteindir. Karaciğer, böbrek ve eritrositlerde aktivitesi yüksektir. H_2O_2 'i oksijen ve suya parçalar (84).



Aynı zamanda fenol ve alkollerin de detoksifikasyonunu sağlayan katalaz; hidrojen peroksitin fenton reaksiyonları ile demir ve bakır iyonları tarafından reaktif hidroksil radikale dönüşümünü engeller (85).

2.4.2.5. Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PDH, EC 1.1.1.49)

Pentoz fosfat (heksoz monofosfat) yolunun oksidatif faz hız kısıtlayıcı enzimidir. ATP üretilmeyen bu yolun; indirgeyici reaksiyonlar (yağ asiti ve steroid biyosentezi gibi) için NADPH üretmek ve nükleik asit biyosentezi için 5 karbonlu üniteleri sağlamak gibi iki önemli işlevi vardır. Bu işlevlerinden dolayı hücrel metabolizma ve oksidatif stres arasında anahtar bir role sahiptir. Glukoz tüketimindeki ana yollar glikoliz ve pentoz fosfat yoludur. Pentoz fosfat yolu; karaciğer, böbrek, eritrosit, adrenal korteks, yağ dokusu ve laktasyondaki meme bezinde aktiftir. Eritrositlerdeki pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH; okside olmuş glutatyonun; FAD içeren flavoprotein enzimi olan glutatyon redüktaz ile

indirgenmiş glutatyona çevrilmesini sağlar. Daha sonra indirgenmiş glutatyon; glutatyon peroksidaz enzimi tarafından katalizlenen bir tepkimeyle H_2O_2 'i eritrositlerden uzaklaştırır. NADPH; tioredoksin redüktaz reaksiyonundaki indirgeyici ekivalanları sağlamakla birlikte katalaz aktivitesi için de gereklidir. G6PDH eksikliği; oksidan ajanların detoksifiye edilememesi sonucu oluşan hemolitik anemi ile karakterize X'e bağlı ressesif bir hastalıktır. İnsanlarda hastalığa neden olan en sık görülen enzim anomalisidir (86).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Deney Grupları

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2007-86 proje numarası ile desteklenmiştir. Bilimsel araştırma için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hayvan Etik Kurul'undan izin alınmıştır (G.Ü.E.T.-07.031). Deney hayvanları Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi hayvan laboratuvarı (GÜDAM)'ndan temin edilmiştir.

Çalışmada 30 adet ortalama 250 gr ağırlığında Wistar cinsi dişi rat kullanılmıştır. Ratlara 14 gün boyunca oral yolla kafein verilmiş ve deney sonunda ratlar intramuskuler ketamin (60 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) anestezisi altında sakrifiye edilmiştir. Karaciğer dokuları çıkartılarak hemen sıvı azota konulup dondurulup, deney gününe kadar -80°C de saklanmıştır. Karaciğer dokularında MDA ve GSH düzeyleri, SOD, katalaz, GPx ve GST aktiviteleri ölçülmüştür.



Şekil 11. Oral kafein uygulaması

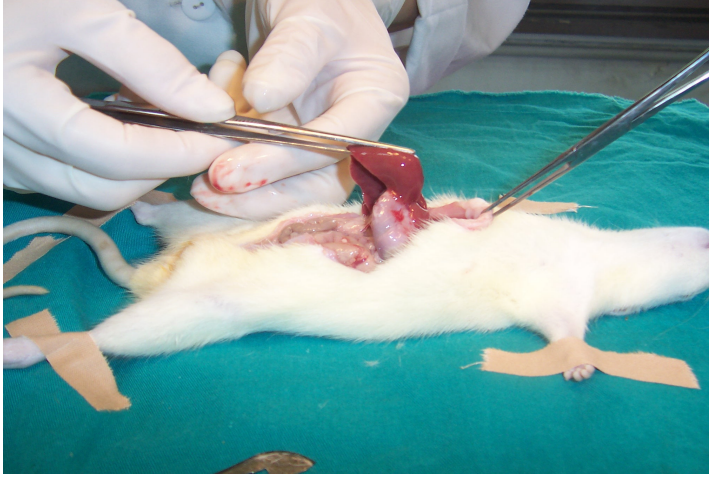
Çalışmada hayvanlar 3 eşit gruba ayrılmıştır :

Grup I -Kontrol grubu (n=10)

Grup II-Hayvanlara 14 gün boyunca oral yolla 30mg/kg kafein 1 ml distile suya karıştırılmış ve günlük doz ikiye bölünerek verilmiştir. (n=10)

Grup III-Hayvanlara 14 gün boyunca oral yolla 100mg/kg kafein 1 ml distile suya karıştırılmış ve günlük doz ikiye bölünerek kafein verilmiştir. (n=10)

Son oral kafein uygulamadan 24 saat sonra ratlar feda edilip, karaciğer dokuları çıkartılmıştır. Dokular, serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra derhal sıvı azot içinde dondurulmuştur. Karaciğer dokuları çalışma gününe kadar -80°C' de saklanmıştır.



Şekil 12. Rat dokularının çıkartılması

3.2.Kullanılan Aletler

Hassas terazi (Schimadzu, Libror, AEG 220)

Homojenizatör (Virtis-Virtisheur)

Vorteks (Heidolf Reax 200)

Benmari (Heto)

Santrifuj (Hermle Z 380K)

Soğutmalı santrifuj(Damon IEC,B-20A soğutmalı,Hermle Z 323K

Spektrofotometre (Schimadzu, UV1601)

Tecan Eliza okuyucu ve yıkayıcı

pH metre (Jenway)

3.3.Yöntemlerin Uygulanması

Karaciğer Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi

Karaciğer doku örnekleri 1/10 oranında 50 mM Tris-HCl (pH=7.4) tamponunda, buz içinde, soğukta homojenize edilmiştir. Homojenizatlar soğutmalı santrifüjde 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilip, süpernatantlardan katalaz, glutatyon S transferaz aktiviteleri, doku malondialdehit, doku protein ve doku glutatyon düzeyi tayini yapılmıştır (87).

Kalan süpernatant, kloroform/etanol karışımı ile 1/1 (v/v) oranında muamele edilip, 5000 x g'de +4°C'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatandan süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi tayini ve protein tayini yapılmıştır. Protein miktarları Lowry metodu ile ölçülmüştür (88).

3.3.1. Lowry Protein Tayini (Doku protein tayini)

Kullanılan Reaktifler:

A reaktifi : % 2'lik Na_2CO_3 içinde 0,1 N'lik NaOH

B1 reaktifi : %2'lik Na-K tartarat

B2 reaktifi: %1'lik CuSO_4

Folin ciocalteu's fenol

Standart: 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA) kullanılmıştır.

C solüsyonu: 1 ml B₁+ 1 ml B₂+ 33 ml A solüsyonu

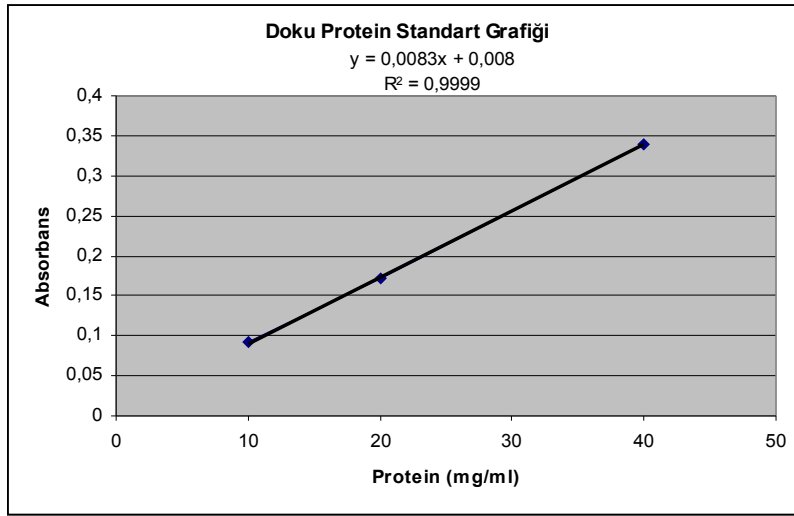
Folin reaktifi ; 1 hacim Folin ciocalteu's fenol + 1 hacim distile su

Deneyin yapılışı: (tablo1)

Tablo 1. Doku Protein Tayini

Tüpler	BSA	Numune	Distile su	C solüsyonu
Kör	-	-	100 µl	2 ml
Standart-1	10 µl	-	90 µl	2 ml
Standart-2	20 µl	-	80 µl	2 ml
Standart-3	40 µl	-	60 µl	2 ml
Numune	-	10 µl	90 µl	2 ml

Deney tüpleri vortekslendikten sonra, 15 dakika bekletilmiştir. Daha sonra deney tüplerine 200 µl folin reaktifi eklenerek iyice vortekslenip ve 1 saat karanlıkta bekletilmiştir. Tüpler 750 nm’de köre karşı okunmuştur.



Grafik1: Doku Protein Standart Grafiği

Hesaplama:

$$\text{Protein miktarı} : \frac{\text{Numune Abs}}{\text{Standart Abs}} \times \text{standart konsantrasyonu.}$$

Sonuçlar **mg/ml** olarak hesaplanmıştır.

3.3.2. Karaciğer Dokusu Malondialdehit (MDA) Analizi

Doku MDA düzeyleri Ohkawa ve arkadaşlarının (89) yöntemine göre ölçülmüştür. Bu yöntemin ilkesi; homojenattaki proteinlerin sodyum dodesil sülfat (SDS) ile bağlanmasıyla, örnekte bulunan MDA'nın tiobarbitürik asit (TBA) ile ortam pH'sı 3,5 olduğu şartlarda oluşturduğu komplekse bağlı kırmızı rengin spektrofotometrik ölçümüne dayanır.

Kullanılan Reaktifler:

% 8,1 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) : Distile su içinde hazırlanmıştır

% 0.8 Tiobarbitürik asit (TBA) : Distile su içinde hazırlanmıştır

% 20 Asetik asit : Distile su içinde hazırlanmıştır (NaOH ile pH=3,5'a ayarlanmıştır)

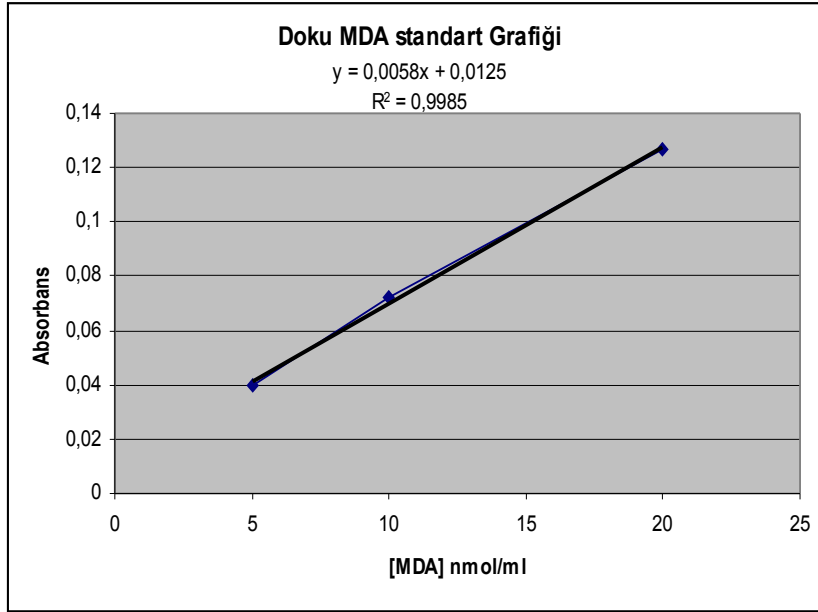
n-butanol/ piridin : (15:1 , v/v)

Tablo 2. Doku MDA Tayini

	Numune	Standart 1	Standart 2	Standart 3
Standart	-	50 µl	25 µl	12,5 µl
Distile su	150 µl	150 µl	175 µl	187,5 µl
Numune	50 µl	-	-	-
SDS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TBA	375 µl	375 µl	375 µl	375 µl
Asetik asit	375 µl	375 µl	375 µl	375 µl
Tüpler 60 dakika, 95 °C 'de su banyosunda kaynatılmıştır.				
Bundan hemen sonra örnekler soğutulularak ,				
Distile su	250	250	250	250
n-	1250	1250	1250	1250
butanol/piridin				

Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip üst faz 532 nm.'de n-butanole karşı okunmuştur.

MDA standart olarak **1,1',3,3' tetraetoksi propan** kullanılarak standart grafik elde edilmiş (grafik 2) ve örneklerin absorbans değerlerinin nmol/ml cinsinden MDA miktarı saptanmıştır.



Grafik 2: Doku MDA Standart Grafiği

Sonuçlar '**nmol/g yaş doku**' cinsinden belirlenmiştir.

3.3.3.Karaciğer Dokusunda Glutasyon Düzeyi Tayini :

Sigma Fluorometric Glutathione Assay Kit (Catalog No:CS1020) ile ölçülmüştür. Bu kit plazma membranını kolayca geçebilen serbest formda düşük floresans veren, ancak redükte glutatyonla bağlandığında GST ile katalizlenen reaksiyonda güçlü floresans oluşturan monoklorobiman (monochlorobimane) kullanmaktadır.

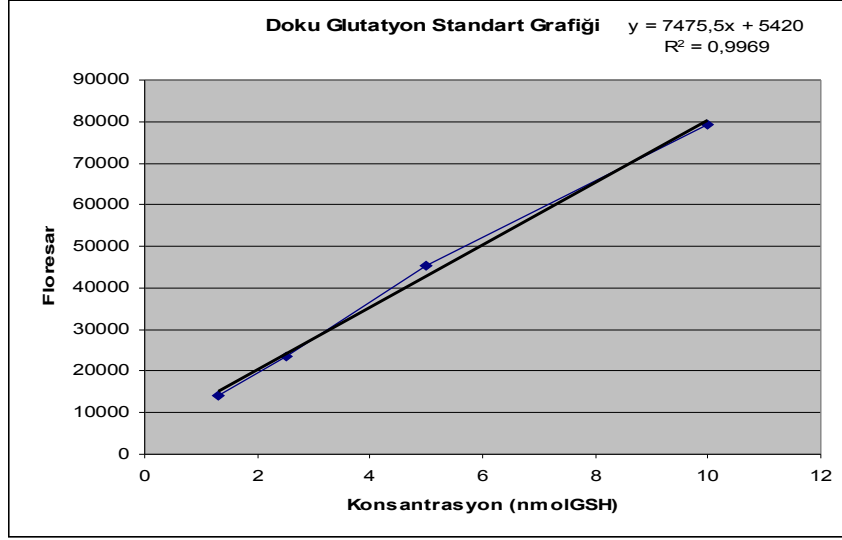
Dokular tartılarak 1/10 oranında (w/v) 0,05 M Tris-HCl (pH:7,4) tamponunda buzlu su banyosu içinde teflon uçlu homojenizatör ile homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat +4°C'de 15000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatandan redükte glutatyon çalışılmıştır. 1mM Redükte

Glutasyon (GSH) standardı assay buffer ile hazırlanıp, stok standart olarak kullanılmıştır.

Tablo 3. Doku Glutasyon (GSH) Tayini

	1mM GSH std (µl)	Serum (µl)	Assay Buffer (µl)	GST (µl)	Substrat (µl)
Kör	—	—	92,5	5	2,5
1,3 nmol GSH std	1,3	—	91	5	2,5
2,5 nmol GSH std	2,5	—	90	5	2,5
5 nmol GSH std	5	—	87,5	5	2,5
10 nmol GSH std	10	—	82,5	5	2,5
Numune	—	20	72,5	5	2,5

Florometre eksitasyon dalga boyu 390 nm, emisyon dalga boyu 478 nm olacak şekilde ayarlanmıştır.

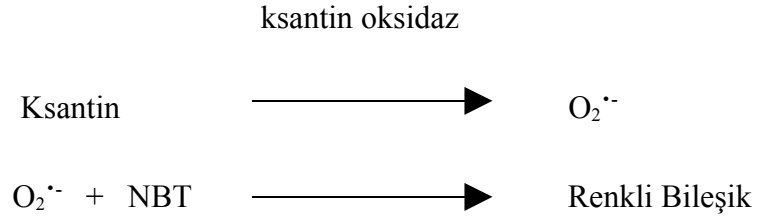


Grafik 3: Doku Glutasyon Standart Grafiği

Sonuçlar standart grafiğe göre (grafik 3) hesaplanmıştır. Doku proteinine bölünerek **nmol GSH / mg protein** cinsinden verilmiştir.

3.3.4. Karaciğer Dokusunda Süperoksid Dismutaz (SOD) Analizi

Doku SOD aktivitesi, Yi-Sun'un tanımladığı (90), ksantin ksantin oksidaz ile $O_2^{\bullet-}$ oluşturması ve bunun da NBT ile renkli bir bileşik oluşturarak bu renk şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar fazla ise $O_2^{\bullet-}$ 'yi ortadan kaldıracağı için oluşan rengin şiddeti o kadar az olacaktır.



Kullanılan Reaktifler :

Tris-HCl :0,05 M pH=7.4

Stok ksantin: 3 mmol/L

NBT: 150 μ mol/L

Na₂CO₃: 400 mmol/L

BSA: 1mg/mL

CuCl₂: 0,8 mmol/L

EDTA:0,6 mmol/L

Ksantin oksidaz (XO) enzim çözeltisi: 25 Ü 'lik enzim 1/100 (v/v) 2 M'lık amonyum sülfat çözeltisi ile dilüe edilir.

Kloroform/etanol: 3/5 (v/v)

Reaktif karışımı: 80 ml 10 kat dilüe edilmiş stok ksantin çözeltisi + 40 ml EDTA + 40 ml NBT + 24 ml Na₂CO₃ + 12 ml BSA karıştırılır.

Deneyin Yapılışı:

100 mg doku 1/10 oranında (w/v) 0,05 M Tris-HCl (pH:7,4) tamponunda buzlu su banyosu içinde teflon metal uçlu homojenizatör ile homojenize edilmiştir. 15000 x g'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant, kloroform/etanol karışımı ile 1/1 (v/v) oranında karıştırılmış, 5000 x g'de +4°C'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Enzim aktivitesi tayini (tablo 4) ve protein tayini bu süpernatandan yapılmış olup protein miktarları Lowry metodu ile ölçülmüştür.

Tablo 4. Doku SOD Tayini

	Numune	Kör
Reaktif Karışımı	2900µl	2,850 µl
Numune	--	100µl
Distile su	50µl	--
XO çözeltisi	50µl	50µl
20 dakika oda ısısında inkübasyon		
CuCl₂	1000 µl	1000 µl

560 nm'de distile suya karşı okunmuştur.

Hesaplama:

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(\text{Kör abs} - \text{Numune abs})}{\text{Kör abs}} \times 100$$

% 50 inhibisyonu 1 Ü aktivitenin sağladığı düşünülerek hesap yapılmıştır. SOD enzim tayini sonucu elde edilen sonuçlar protein miktarlarına bölünerek **U/ mg protein** olarak verilmiştir.

3.3.5. Karaciğer Dokusunda Glutatyon Peroksidaz (GPx) Analizi :

Glutatyon peroksidaz aktivitesi Paglia DE, Valentina ve arkadaşlarının (91) metoduna göre tayin edilmiştir. Bu metotda GSSG oluşum hızı 340 nm dalga boyunda, NADPH'ın NADP'ye dönmesi sonucu karışımın optik dansitesinde azalma ile tayin edilmektedir.

Kullanılan Reaktifler :

Tris-HCl : 0,05 M pH=7.4

Fosfat tamponu : 50 mM pH:7,0 Na₂HPO₄/KH₂PO₄ (5mM EDTA içeren)

NADPH : 3 mM tampon ile hazırlanır.

NaN₃ : 2 M

H₂O₂ : % 30 luk stoktan 100 mM olarak, tamponda hazırlanır.

GSH : 150 mM olacak şekilde tamponda hazırlanır.

Glutatyon Redüktaz : (200 Ü/mg protein) 1N (NH₄)₂SO₄ ile 10 kat seyreltilerek kullanılır.

Deneyin Yapılışı:

100 mg doku 1/10 oranında (w/v) 0,05 M Tris-HCl (pH=7.4) tamponunda buzlu su banyosu içinde teflon metal uçlu homojenizatör ile homojenize edilmiştir. 15000 x g'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edilip, süpernatant, kloroform/etanol karışımı ile 1/1 (v/v) oranında karıştırılmıştır. 5000 x g'de +4°C'de 30 dakika santrifüj edilmiş, enzim aktivitesi tayini (tablo 5) ve protein tayini bu süpernatandan yapılmıştır. Protein miktarları Lowry metodu ile ölçülmüştür.

Spektrofotometre 340 nm ' ye ayarlanıp, distile suya karşı sıfırlanmıştır.

Tablo 5. Doku GPx Tayini

	Numune
Fosfat tamponu + 5mM EDTA	2635 µl
NaN₃	30 µl
GSH	100 µl
NADPH	100 µl
Glutasyon Redüktaz	10 µl
Numune	25µl
H₂O₂	100µl

H₂O₂ ilave edilerek reaksiyon başlatılmış, 5 dakika boyunca 340 nm dalga boyunda numune absorbansı azalması izlenmiştir. Dakikadaki absorbans değişimi hesaplanmıştır. NADPH için molar absorpsiyon katsayısı olan

$\varepsilon = 6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak $\Delta A = a_m \cdot \Delta C \cdot l$ formülüne göre dakika başına okside olan NADPH hesaplanmıştır. Süpernatandan da Lowry metodu ile protein tayini yapılarak glutatyon peroksidaz aktivitesi **IU/mg protein** olarak verilmiştir.

3.3.6.Rat Dokularında Glutatyon-S-Transferaz Aktivitesinin Ölçümü

Glutatyon-S-transferaz aktivitesi, Habig ve arkadaşlarının (92), GSH ile 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)'nin 340 nm'de absorbans artışı ile izlenebilen bir konjugasyonla tioeter bağı oluşturmaya dayanan metodu ile çalışılmıştır.

Kullanılan Reaktifler:

Tris-HCl Tamponu (homojenizasyon tamponu): 0,05 M pH:7,4

CDNB: 25 mM (saf etanolde çözülür)

GSH: 25 mM (tamponda çözülür)

Fosfat Tamponu : 100 mM pH:6 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$

Deneyin Yapılışı:

Dokular tartılarak 1/10 oranında (w/v) 0,05 M Tris-HCl (pH:7,4) tamponunda buzlu su banyosu içinde teflon uçlu homojenizatör ile homojenize

edilmiş, elde edilen homojenat +4°C’de 15000 rpm’de 15 dakika santrifüjlenip. süpernatandan GST aktivitesi çalışılmıştır (tablo 6).

Tablo 6. Doku GST Tayini

	Numune
Fosfat Tamponu	1850 µl
CDNB	50 µl
GSH	50 µl
Numune	50 µl

Spektrofotometre distile su ile sıfırlanmıştır. Absorbans artışı köre karşı 25°C’de 5 dakika boyunca izlenmiştir. CDNB için molar absorpsiyon katsayısı olan $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kullanılarak hesap yapılmıştır. Süpernatanda Lowry yöntemi ile protein tayini yapılmıştır.

Sonuçlar **nmol/dakika/mg protein** olarak verilmiştir.

3.3.7.Karaciğer Dokusunda Katalaz Aktivitesi Tayini :

Doku katalaz aktivitesi Aebi ve arkadaşlarının (93) metoduna göre çalışılmıştır.

Kullanılan Reaktifler:

Fosfat Tamponu : 50 mM pH:7 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$

H_2O_2 Çözeltisi : %30 luk H_2O_2

Tamponlanmış H_2O_2 Çözeltisi : 50 mM pH:7 fosfat tamponunun içine çözelti absorbansı ortalama 0,500 olacak şekilde %30 luk H_2O_2 katılarak hazırlanır.

Deneyin Yapılışı:

Dokular tartılarak 1/10 oranında (w/v) 0,05 M Tris-HCl (pH:7,4) tamponunda buzlu su banyosu içinde teflon uçlu homojenizatör ile homojenize edilip. Elde edilen homojenat $+4^\circ\text{C}$ 'de 15000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiş, süpernatandan katalaz aktivitesi çalışılmıştır (tablo 7).

Tablo 7. Doku Katalaz Tayini

Numune	
Tamponlanmış H_2O_2 Çözeltisi	2995 μl
Numune	5 μl

Kör olarak, içinde H_2O_2 olmayan fosfat tamponu kullanılır.

Numune eklenir eklenmez küvet alt üst edilip absorbans değişimi 240 nm de 5 dk takip edilir. Dakikadaki absorbans azalması hesaplanır. H_2O_2 için molar absorpsiyon katsayısı olan $\epsilon = 0,040 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kullanılarak hesap yapılmıştır.

Süpernatandan da Lowry metodu ile protein tayini yapılarak sonuçlar **100 µg protein** olarak verilmiştir.

3.3. İstatistiksel Değerlendirme:

İstatistiksel hesaplamalar, istatistik paket programı SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Program, for windows 11.5) ve Microsoft Excel (for windows XP) programları ile yapılmıştır. Değerlendirmede Kruskal-Wallis varyans analizi ve gruplar arasındaki farklılığı tespit etmek için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Ayrıca gruplar spearman korelasyon analizine tabi tutulmuştur. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

- Sonuçlar tüm tablo ve grafiklerde **ortalama ± standart hata** olarak verilmiştir.

- $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

a : Grup 1 (Kontrol) ile diğer grupların karşılaştırılması

b : Grup 2 ile Grup 3'ün karşılaştırılması

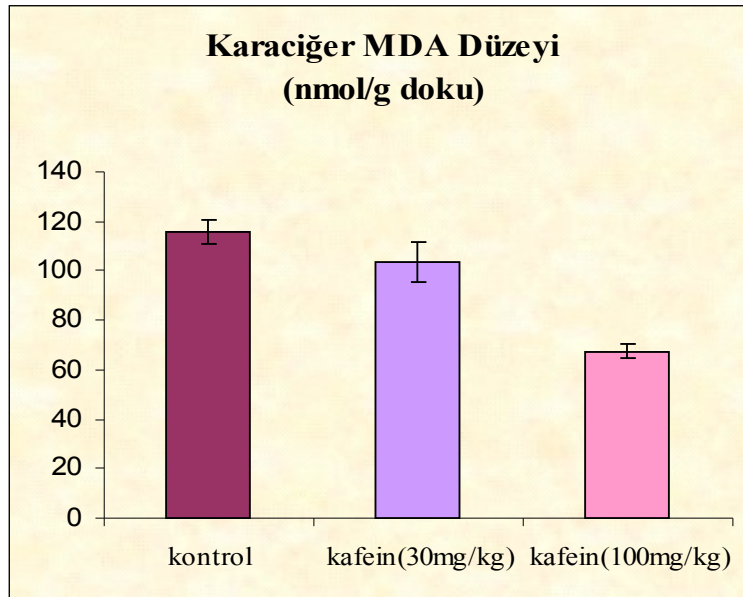
4.1.Karaciğer Dokusu MDA Düzeyleri

Karaciğer dokusu MDA düzeyleri doza bağlı olarak kafeinli gruplarda kontrole göre azalmış bulunmuştur (grafik 4).

Karaciğer dokusu MDA düzeyleri için kontrol grubu (grup 1) ile 30 mg/kg doz kafein grubu (grup 2) karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde düşme görülmekle birlikte aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,427$).

Kontrol grubunu 100 mg/kg doz kafein grubu (grup 3) ile karşılaştırdığımızda aralarında ($p=0,000$; $p<0,005$) istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur .

Grup 2 ile grup 3 arasında da anlamlı istatistiksel fark tespit edilmiştir ($p=0,003$; $p<0,05$) .



Grafik4: Karaciğer MDA düzeyleri (Ortalama $\pm$ Standart Hata)

Tablo 8: Karaciğer MDA düzeyleri (Ortalama $\pm$ Standart Hata)

MDA (nmol/g doku)		
(1) Kontrol	115,78$\pm$5,01	n=10
(2) Kafein(30 mg/kg)	103,57$\pm$7,79	n=10
(3) Kafein(100mg/kg)	67,48$\pm$2,56^{a,b}	n=10

a : p=0,000 (Grup 1 ile Grup 3'ün karşılaştırılması)

b : p=0,003 (Grup 2 ile Grup 3'ün karşılaştırılması)

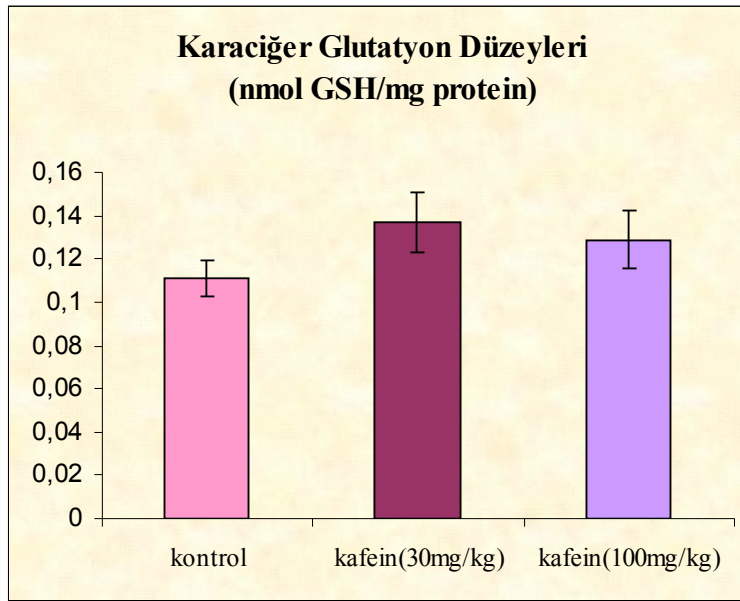
4.2.Karaciğer Dokusu Glutasyon Düzeyleri

Karaciğer dokusu glutasyon düzeyleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre kafeinli gruplarda hafif artış tespit edilmiştir, ancak gruplararası istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,005$), (grafik 5).

Kontrol grubu (grup 1) ile 30mg/kg doz kafein grubu (grup 2) karşılaştırıldığında **p=0,151**

Kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup 3) ile karşılaştırdığında
p=0,226

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırdığında **p=0,762**



Grafik 5: Karaciğer Glutasyon düzeyleri (Ortalama ± Standart Hata)

Tablo 9: Karaciğer Glutasyon düzeyleri (Ortalama ± Standart Hata)

Glutasyon (nmol GSH/mg protein)		
(1) Kontrol	0,111±0,008	n=10

(2) Kafein(30mg/kg)	0,137±0,014	n=10
(3) Kafein(100mg/kg)	0,129±0,013	n=10

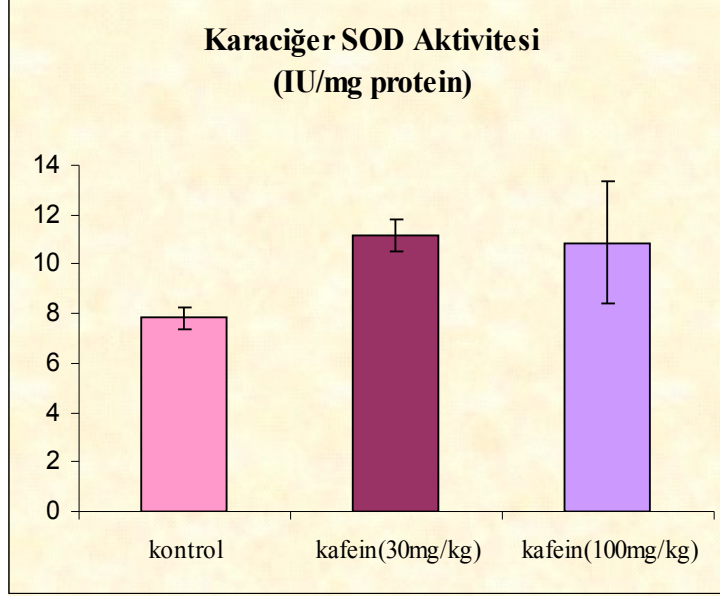
4.3.Karaciğer Dokusu SOD Aktivitesi

Karaciğer dokusu SOD aktivitesi kafeinli gruplarda kontrole göre artmış olarak bulunmuş, artışın dozla ilgisi görülmemiştir (grafik 6).

Karaciğer dokusu SOD aktivitesi için kontrol grubu (grup 1) ile 30mg/kg doz kafein grubu (grup 2) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,005$).

Kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup 3) ile karşılaştırdığımızda aralarında ($p=0,001$; $p<0,005$) önemli istatistiksel olarak fark bulunmuştur.

Grup 2 ile grup 3 arasında da anlamlı istatistiksel fark tespit edilmemiştir ($p=0,326$; $p>0,005$).



Grafik 6: Karaciğer SOD Aktivitesi (Ortalama ± Standart Hata)

Tablo 10: Karaciğer SOD Aktivitesi (Ortalama ± Standart Hata)

SOD (IU/mg protein)		
(1) Kontrol	7,82±0,43	n=10
(2) Kafein(30 mg/kg)	11,20±0,65 ^a	n=10
(3) Kafein(100mg/kg)	10,85±0,82 ^a	n=10

a : $p=0,001$ (Grup 1 ile Grup 2'nin karşılaştırılması)

a : $p=0,001$ (Grup 1 ile Grup 3'ün karşılaştırılması)

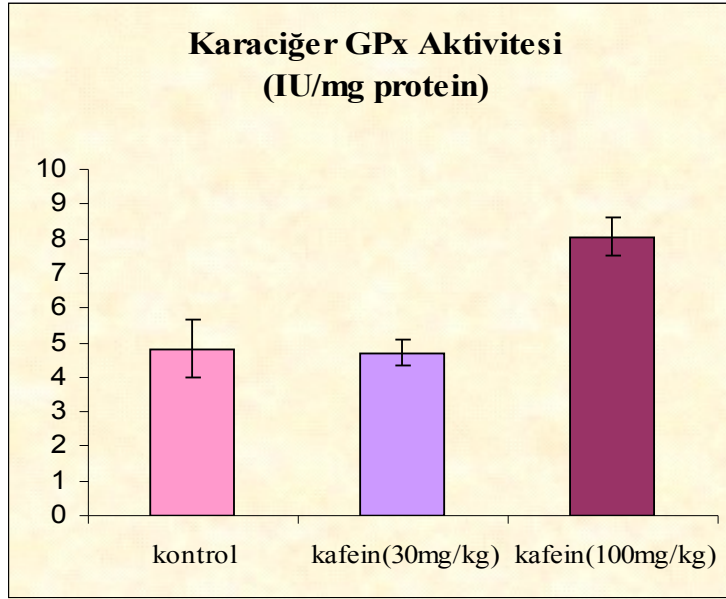
4.4.Karaciğer Dokusu Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi

Karaciğer dokusu GPx aktivitesi kafeinli gruplarda kontrole göre artmış olarak bulunmuş ancak sadece yüksek doz kafeinli gruptaki aktivite artışının anlamlı olduğu görülmüştür, (grafik 7).

Karaciğer dokusu GPx aktivitesi için kontrol grubu (grup 1) ile 30mg/kg doz kafein grubu (grup 2) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (**p=0,940**).

Kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup 3) ile karşılaştırdığımızda aralarında (**p=0,010**; $p<0,05$) istatistiksel olarak fark bulunmuştur.

Grup 2 ile grup 3 arasında da önemli istatistiksel fark tespit edilmiştir (**p=0,001**; $p<0,005$).



Grafik 7: Karaciğer Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi (Ortalama ± Standart Hata)

Tablo 11: Karaciğer Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi (Ortalama ± Standart Hata)

Glutasyon Peroksidaz (IU/mg protein)		
(1) Kontrol	4,82±0,83	n=10
(2) Kafein(30mg/kg)	4,69±0,37	n=10
(3) Kafein(100mg/kg)	8,04±0,55 ^{a,b}	n=10

a : p=0,010 (Grup 1 ile Grup 3'ün karşılaştırılması)

b : p=0,001 (Grup 2 ile Grup 3'ün karşılaştırılması)

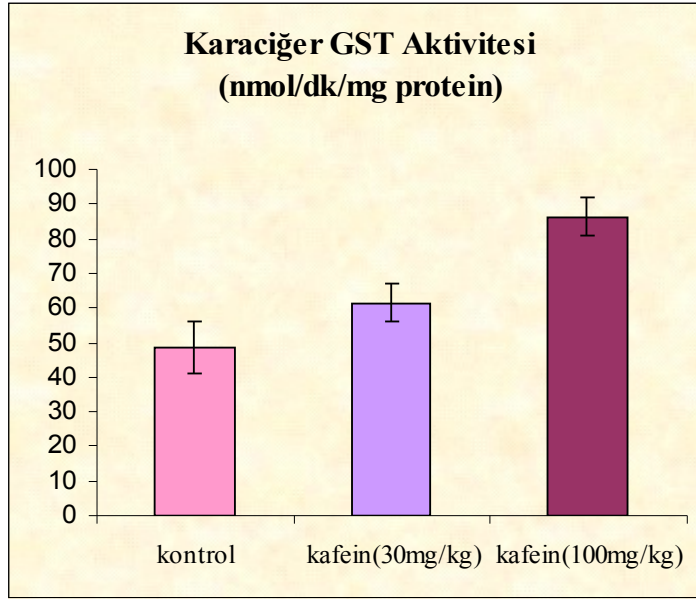
4.5.Karaciğer Dokusu Glutatyon S Transferaz Aktivitesi

Karaciğer dokusu GST aktivitesi kafeinli gruplarda kontrole göre artmış bulunmuş ve bu artışın dozla ilişkili olduğu gözlenmiştir,(grafik 8).

Karaciğer dokusu GST aktivitesi için kontrol grubu (grup 1) ile 30mg/kg doz kafein grubu (grup 2) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,151$).

Kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup 3) ile karşılaştırdığımızda aralarında ($p=0,002$; $p<0,005$) önemli istatistiksel olarak fark bulunmuştur.

Grup 2 ile grup 3 arasında da anlamlı istatistiksel fark tespit edilmiştir ($p=0,013$; $p<0,05$).



Grafik 8: Karaciğer Glutasyon S Transferaz Aktivitesi (Ortalama ± Standart Hata)

Tablo 12: Karaciğer Glutasyon S Transferaz Aktivitesi (Ortalama ± Standart Hata)

Glutasyon S Transferaz (nmol/dk/mg protein)		
(1) Kontrol	48,58±7,5	n=10
(2) Kafein(30 mg/kg)	61,47±5,4	n=10
(3) Kafein(100mg/k g)	86,37±5,7 ^{a,b}	n=10

a : p=0,002 (Grup 1 ile Grup3'ün karşılaştırılması)

b : p=0,013 (Grup 2 ile Grup 3'ün karşılaştırılması)

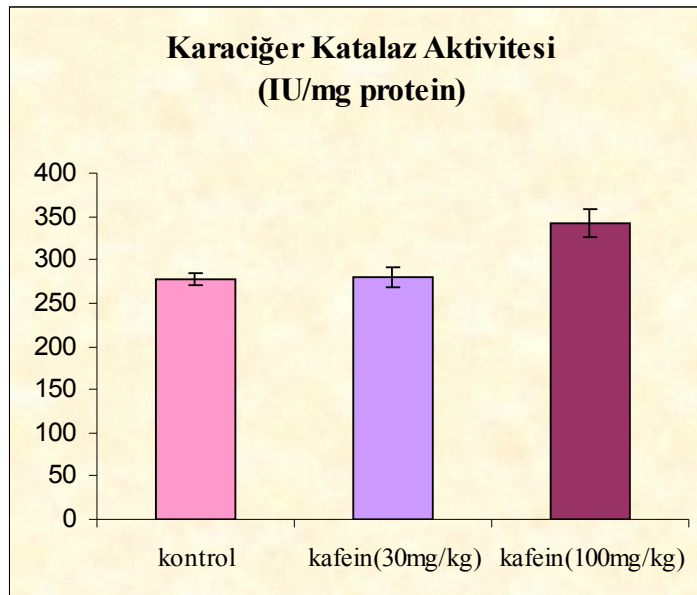
4.6.Karaciğer Dokusu Katalaz Aktivitesi

Karaciğer dokusu katalaz aktivitesi kafeinli gruplarda kontrole göre artmış olarak bulunmuş ancak sadece yüksek doz kafeinli gruptaki aktivite artışının anlamlı olduğu görülmüştür, (grafik 9).

Karaciğer dokusu Katalaz aktivitesi için kontrol grubu (grup 1) ile 30mg/kg doz kafein grubu (grup 2) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,545$).

Kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup 3) ile karşılaştırdığımızda aralarında ($p=0,007$; $p<0,05$) anlamlı istatistiksel olarak fark bulunmuştur.

Grup 2 ile grup 3 arasında da anlamlı istatistiksel fark tespit edilmiştir ($p=0,005$; $p<0,005$).



Grafik 9: Karaciğer Katalaz Aktivitesi (Ortalama $\pm$ Standart Hata)

Tablo 13: Karaciğer Katalaz Aktivitesi (Ortalama $\pm$ Standart Hata)

Katalaz (IU/mg protein)		
(1) Kontrol	277,33$\pm$7,15	n=10
(2) Kafein(30mg/kg)	280,01$\pm$11,64	n=10
(3) Kafein(100mg/kg)	342,49$\pm$16,46^{a,b}	n=10

a : p=0,007 (Grup 1 ile Grup 3'ün karşılaştırılması)

b : p=0,005 (Grup 2 ile Grup 3'ün karşılaştırılması)

4.7.Spearman Korelasyon Analizi

Parametreler arasındaki korelasyonu incelemek amacıyla yaptığımız spearman korelasyon analizi tablo 7'de gösterilmiştir.

** güçlü korelasyon

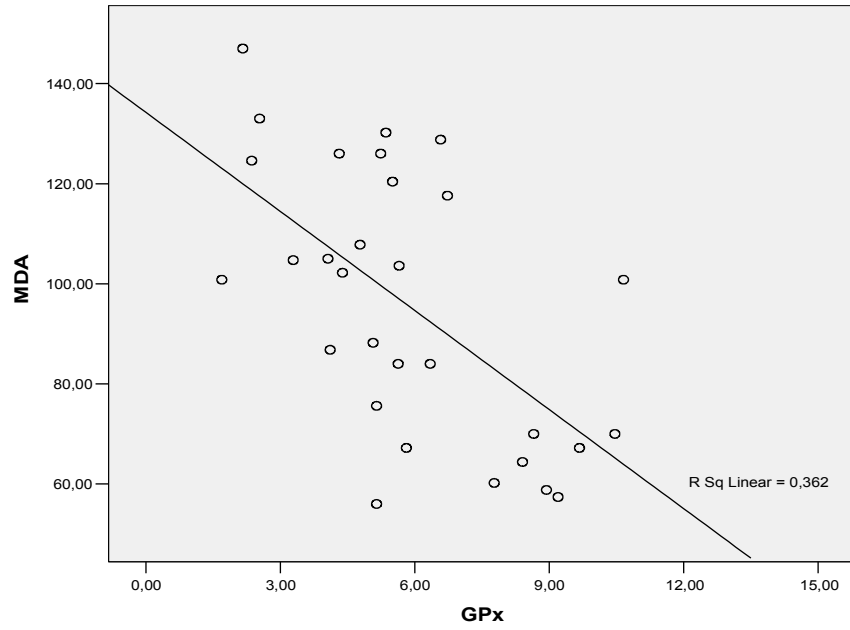
* zayıf korelasyon

Tablo 14: Spearman korelasyon analizi sonuçları

	MDA	GSH	GPx	GST	KATALAZ	SOD
MDA	-	r=-0,255 p=0,174	r=-0,561 p=0,001**	r=-0,361 p=0,050*	r=-0,266 p=0,155	r=-0,396 p=0,030*
GSH	r=-0,255 p=0,174	-	r=-0,133 p=0,483	r=0,276 p=0,140	r=-0,230 p=0,221	r=0,008 p=0,967
GPx	r=-0,561 p=0,001**	r=-0,133 p=0,483	-	r=0,261 p=0,164	r=0,268 p=0,152	r=0,360 p=0,051
GST	r=-0,361 p=0,050*	r=0,276 p=0,140	r=0,261 p=0,164	-	r=0,502 p=0,005**	r=0,265 p=0,158
KATALAZ	r=-0,266 p=0,155	r=-0,230 p=0,221	r=0,268 p=0,152	r=0,502 p=0,005**	-	r=0,223 p=0,237
SOD	r=-0,396 p=0,030*	r=0,008 p=0,967	r=0,360 p=0,051	r=0,265 p=0,158	r=0,223 p=0,237	-

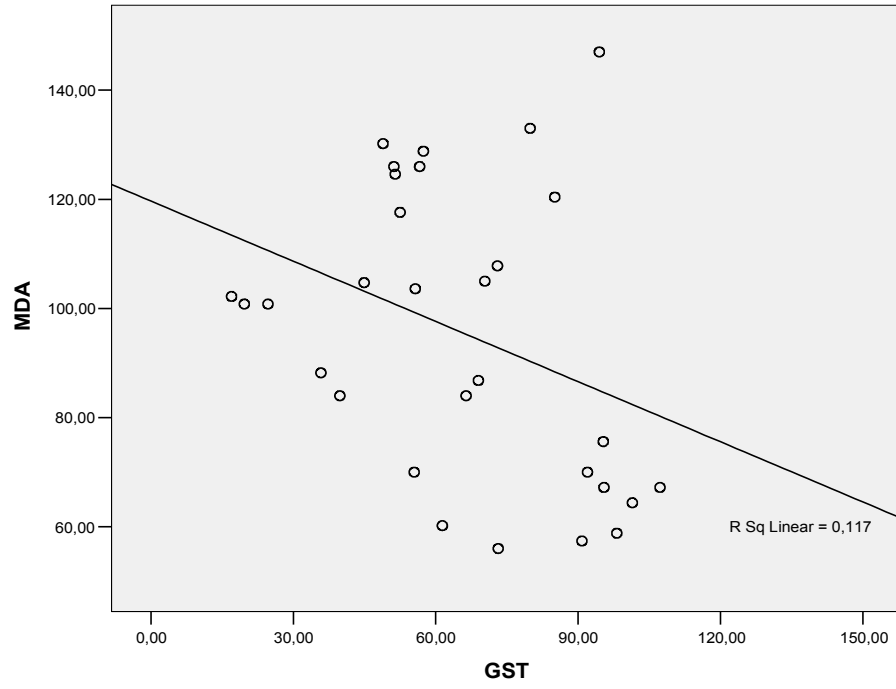
Spearman korelasyon analizi sonuçlarına göre :

- Doku MDA ile doku GPx aktivitesi arasında güçlü negatif korelasyon bulunmuştur (grafik 10). Doku MDA düzeyi azalırken GPx aktivitesi artmıştır. **r=-0,561 p=0,001****



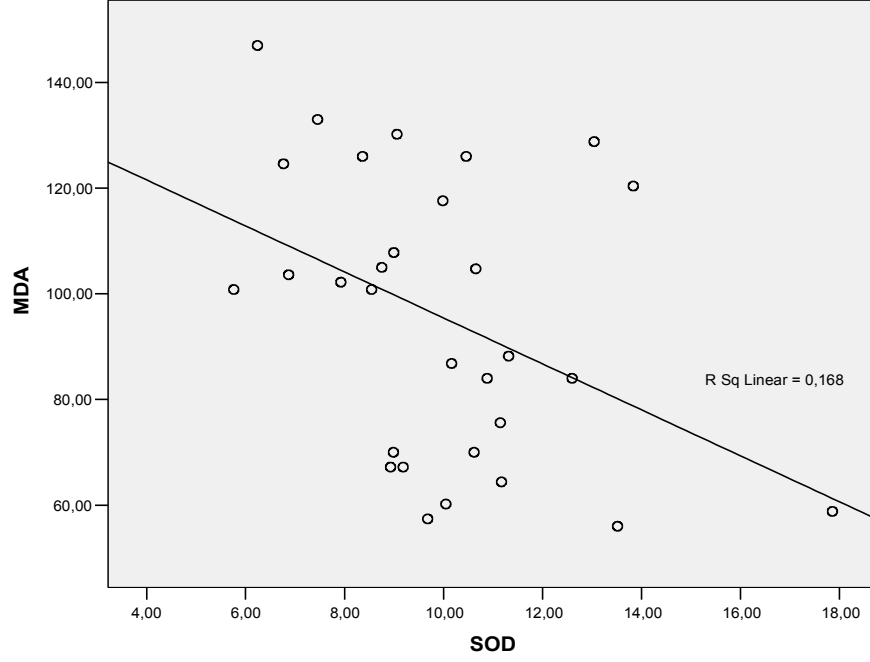
Grafik 10: Doku MDA Düzeyleri ile Doku GPx Aktivitesi arasındaki korelasyon

- Doku MDA ile doku GST aktivitesi arasında negatif korelasyon bulunmuştur (grafik 11). Doku MDA düzeyi azalırken GST aktivitesi artmıştır. **$r=-0,361$**
 $p=0,05^*$



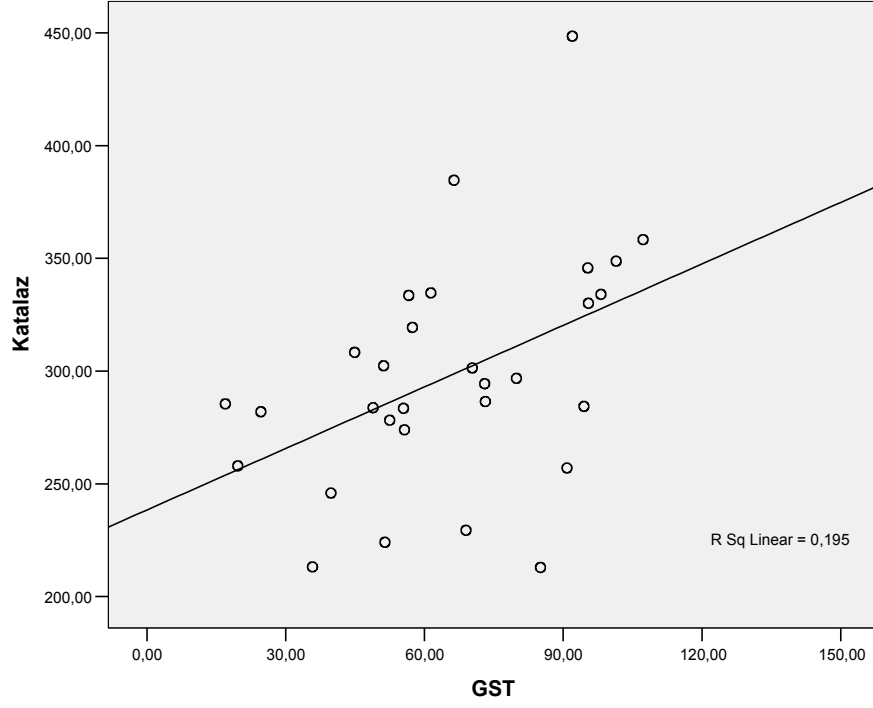
Grafik 11: Doku MDA Düzeyleri ile Doku GST Aktivitesi arasındaki korelasyon

- Doku MDA ile doku SOD aktivitesi arasında negatif korelasyon bulunmuştur (grafik 12). Doku MDA düzeyi azalırken SOD aktivitesi artmıştır. **$r=-0,396$**
 $p=0,03^*$



Grafik 12: Doku MDA Düzeyleri ile Doku SOD Aktivitesi arasındaki korelasyon

- Doku GST aktivitesi ile doku katalaz aktivitesi arasında güçlü pozitif korelasyon bulunmuştur (grafik 13). $r=0,502$ $p=0,005^{**}$



Grafik 13: Doku Katalaz Aktivitesi ile Doku GST Aktivitesi arasındaki korelasyon

5. TARTIŞMA

Kafein (1,3,7 trimetilksantin) bir pürin alkaloid olarak birçok yiyecek ve içeceklerin içeriğinde bulunur (1). Kafein günümüzde her gün düzenli olarak tüketilen bir maddedir, merkezi sinir sistemini uyardığı ve kahve, çay, çikolata, kola ve bazı gazlı içeceklerin kafein ihtiva ettiği bilinmektedir (11-12).

Kafeinin başlıca etkileri :

lokomotor aktiviteyi arttırması, yağ hücrelerinde norepinefrin artışıyla indüklenen lipoliz sonucu doku yağ seviyelerini ve vücut yağ depolarını azaltması, kas kütleini arttırması (94), hücrel cAMP düzeylerini arttırması, beyinde adenosin reseptörlerinin antagonistik etki göstermesi, sitozolik Ca^{+2} seviyelerinin yükselmesi olarak sıralanmaktadır (20), ayrıca kardiyak kası uyardığı, diüretik özellikli olduğu belirtilir (4).

Düşük doz etanol ve kafein (10mg/kg) bileşiminin (kafeinol), ratlarda distal fokal iskemiden sonra oluşan hasara karşı, beynin kortikal bölgelerini koruduğu belirtilmiştir. Etanolün tek başına felci daha kötü etkilemesine karşın, kafein ile birlikte kortikal nöronlara koruma sağladığı bildirilmiştir (95-96).

Kronik düşük doz (10 mg/kg) kafein tedavisinin ratlarda iskemik beyin hasarını ve global iskemiye azalttığı belirtilmiştir. Kronik kafeinin bu nöroprotektif etkisinin nedeni; onun adenosin reseptör yolundaki inhibitör etkisi ve adapte etme yeteneği olduğu düşünülmektedir. Akut düşük doz teofilin ratlarda, serebral hipoksi-iskemiden sonraki beyin hasarını azaltır. Kafein ve onun

metabolitlerinin iskemi tedavisinde doza ve uygulamaya, iskeminin modeline bağılı olarak farklı etkileri olabileceğı gösterilmiştir (97).

Teobromin (3,7 dimetilksantin) ve ksantin, kafeinin katabolik ürünleridir. hem antioksidan hem de prooksidan özelliğı sahip oldukları, antioksidan olan ürik asit ile yapısal benzerlik gösterdikleri söylenmektedir (15).

Ratlarla yapılan araştırmalarda, radyasyon ve diğere ajanlar tarafından artırılmış hasara karşı kafein önemli derecede koruma sağladığı, 2 mM kafeinin radyasyon öncesi ya da radyasyon sonrası hemen hemen tamamen hücrelerde radyasyonla indüklenen apoptosisi önlediğı belirtilmiştir. Milimolar konsantrasyonlarda bile kafeinin rat karaciğere mikrozomlarında lipid peroksidasyonunu azalttığı ve antioksidan olarak reaktif oksijen türleri tarafından oluşturulmuş hasara karşı membranları koruduğı belirtilmiştir (6-7).

Farelerde, oral alınan kafeinin tümör baskılayıcı genleri (p53 dahil) düzenlediğı gösterilmiştir. Ayrıca kafeinin, mutasyonu hem baskılayıcı hem de arttırıcı etkisi de belirtilmiştir. Kafein ve katabolik ürünleri olan teobromin ve ksantin yüksek bakır konsantrasyonlarında, bakır iyonlarına bağlanıp, Cu(II) 'nin Cu(I)'e dönüşmesini azaltarak, prooksidan özellik de gösterir ve oksijen radikallerine öncülük ettiğı düşünülmektedir. Ayrıca antioksidan olarak, DNA kırıklarını ve hidroksil radikallerini inhibe ettiğı bildirilmiştir (15).

Kafeinin hidroksil radikallerini ve singlet oksijeni temizlediği, lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği, LDL oksidasyonunu düşürdüğü, ayrıca protein oksidasyonu ile oluşan protein karbonillerinin seviyelerini de azaltabildiği belirtilir. Bu etkileriyle kafein, kardiyoprotektif olarak düşünülmektedir (98-99).

Farelerin içme suyuna akut dozlarda (5-15 mg/kg) kafein eklenmiş ve kemik iliğinde gama ışınlarıyla indüklenen kromozomal hasarın önemli derecede ve hızlı bir şekilde düştüğü saptanmıştır. Kafein, ROS (Reaktif oksijen türleri) ve peroksil radikallerini temizlediği görüşü desteklenmektedir. Günde iki kupa kahve içmenin bazı kanserli vakalarda ciddi gecikmiş radyasyonla indüklenen toksisiteyi azalttığı belirtilmiştir. Ayrıca kafeinin biyokimyasal etkilerinden, kimyasal ve UVB indüklü karsinogeneze korumasının altı çizilmiştir (8).

Farelerde 20 mg/kg 30gün süreyle kafein uygulaması sonrasında hepatik katalaz ve SOD aktiviteleri yükseldiği, MDA düzeyinin ise düştüğü gösterilmiştir (100).

Kafein, karaciğer metabolizması üzerine olan etkileri ve antioksidan özellik göstermesi nedeniyle bugün birçok araştırmanın konusu olmuştur. Biz çalışmamızın temel hedefi olarak, kafeinin karaciğerde olası antioksidan etkilerini araştırmaya çalıştık.

Kafein verilen ratların karaciğer dokularında lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeylerini ölçtük. Bunun yanında enzimatik ve non enzimatik antioksidan sistem üzerinde; rat karaciğer dokusunda SOD, katalaz, GPx, GST aktivitelerini ve GSH düzeylerini araştırdık.

Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonundan başlıca sorumlu organ karaciğerdir. Ksenobiyotiklerin yıkımı burada olmaktadır. Bu yüzden kafein tüketiminde öncelikle etkilenecek doku yine karaciğer olur. Serbest radikaller fizyolojik olaylarda da oluştuğu bilinmektedir. Bizim çalışmamız fizyolojik olaylarda oluşan serbest radikallere, kısa süreli (14 gün) oral kafein alımının, rat karaciğerinde etkilerini 30 mg/kg ve 100 mg/kg iki değişik dozda araştırmaktadır.

Lipid peroksidasyonu serbest radikallere bağlı hücre hasarındaki en önemli mekanizmalardan biridir. Lipid peroksidasyonu son ürünlerinden MDA oldukça zararlı bir madde olup hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin bozulması ve DNA bazlarıyla reaksiyona girerek mutajenik karakter kazanması gibi pek çok olumsuz etkiye sebep olur (101).

Araştırmamızda karaciğer dokusu MDA düzeyleri için kontrol grubu (grup 1) ile 30 mg/kg doz kafein grubu (grup 2) karşılaştırıldığında kontrole göre grup 2 MDA düzeylerinde düşme görülmekle birlikte aralarında istatistiksel olarak

anlamalı fark bulunmamıştır ($p=0,427$). Kontrol grubunu 100 mg/kg doz kafein grubu (grup 3) ile karşılaştırdığımızda aralarında ($p=0,000$; $p<0,005$) istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur. Grup 2 ile grup 3 arasında da anlamalı istatistiksel fark tespit edilmiştir ($p=0,003$; $p<0,05$).

Nikolic ve ark. (21) kafeinin beyinde L-arginin metabolizmasını etkilediğini açıklamışlardır. Çalışmada ratlara içme suyuna (3 gün, 2mg/ml) kafein eklenmiş ve sonrasında ise doz arttırılarak (7 gün, 4mg/ml) içme suyuna kafein eklenmiştir. Kafeinin, beyinde arginaz aktivitesini ve MDA seviyelerini düşürdüğünü belirtmişlerdir.

Kafein ve lipid peroksidasyonu arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların bir kısmında, kafein uygulamasıyla serum, karaciğer, kalp, beyin, böbrek gibi değişik dokularda MDA'nın önemli derecede düştüğü (6,8,98,100) belirtilmiş, fakat yapılan çalışmaların bir kısmında ise özellikle beyin dokusu ve karaciğerde yükseldiği belirtilmiştir (9-10).

Lee ve ark. (8) kafeinin, fenton reaksiyonu ile (Fe^{+2}/H_2O_2) oluşan hidroksil radikallerini temizlediğini belirtmişlerdir. Buna ek olarak kafeinin milimolar konsantrasyonlarda, rat karaciğer mikrozomlarında lipid hidroperoksitleri azaltarak, lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ve kafeinin mikrozomal lipid peroksidasyonuna karşı olan bu koruyucu özelliğinin, aynı milimolar konsantrasyondaki askorbik asidin etkisinden daha güçlü olduğunu

açıklamışlardır. Aynı araştırmacılar ayrıca farelerin içme suyuna (5-15 mg/kg) kafein eklenmesinin, kemik iliğinde gama ışınlarıyla indüklenen kromozomal hasarı önemli derecede düşürdüğünü rapor etmişlerdir.

Devasagayam ve ark. (6) da yayınladıkları bir makalenin özetinde; doz, veriliş yolu ve süresi belirtilmemekle birlikte milimolar konsantrasyonlarda bile kafeinin rat karaciğer mikrozomlarında lipid peroksidasyonunu düşürdüğünü ve antioksidan olarak reaktif oksijen türleri tarafından oluşturulmuş hasara karşı membranları koruduğunu belirtmişlerdir.

Yukawa ve ark. (102) insanda, 7 gün boyunca günde 3 kez ve 150 ml (8 g Arabik kahve) kahve tüketiminin, serum total kolesterol, LDL kolesterol, MDA seviyelerini düşürdüğünü, Lp(a), HDL kolesterol ve trigliserid seviyelerini ise değiştirmedığını açıklamışlardır.

Karas ve ark. (10) yaptıkları bir çalışmada, allil-alkol ile düşük hepatotoksisite oluşturulan ratlara kafein (150 mg/kg, oral) verilmesinin karaciğerde MDA düzeylerini yükselttiğini bildirmişlerdir.

Karaciğer dokusu SOD aktivitesi için kontrol grubu (grup 1) ile 30mg/kg doz kafein grubu (grup 2) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak önemli artış bulunmuş ($p=0,001$; $p<0,005$), kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup 3) ile karşılaştırdığımızda da iki grup arasında önemli yükselme

bulunmuştur(**p=0,001**; $p<0,005$). Grup 2 ile grup 3 arasında da anlamlı istatistiksel fark tespit edilmemiştir (**p=0,326**; $p>0,005$).

Karaciğer dokusu katalaz aktivitesi için kontrol grubu (grup 1) ile 30mg/kg doz kafein grubu (grup 2) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (**p=0,545**). Kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup 3) ile karşılaştırdığımızda aralarında (**p=0,007**; $p<0,05$) anlamlı istatistiksel olarak fark bulundu. Grup 2 ile grup 3 arasında da anlamlı istatistiksel fark tespit edildi (**p=0,005**; $p<0,005$).

Mukhopadhyay ve ark. (100) farelerde (30 gün, 20 mg/kg,) kafein uygulaması sonrasında hepatik katalaz ve SOD aktivitelerinin yükseldiğini, MDA seviyelerinin ise azaldığını açıklamışlardır.

Birkner ve ark (103) içme suyuna NaF ile birlikte kafein (50 gün,3mg/kg/gün) eklenen ratların böbrek dokusunda, kontrol grubuna göre ve içme sularına yalnız NaF eklenen ratlara göre total SOD aktivitesinde istatistiksel fark bulunmadığını, katalaz aktivitesinin düştüğünü, GPx aktivitesinin ise yükseldiğini belirtmişlerdir.

Rossowska ve ark. (104), diyetlerine kafein (20mg/kg) eklenen iki grup ratın (22 gün ve 30 gün), karaciğer ve kalp dokularında total SOD, GPx ve katalaz

aktivitelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel fark bulunmadığını belirtmişlerdir.

Karaciğer dokusu GPx aktivitesi için kontrol grubu (grup 1) ile 30mg/kg doz kafein grubu (grup 2) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (**p=0,940**). Kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup 3) ile karşılaştırdığımızda aralarında (**p=0,010**; $p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görülmüştür. Grup 2 ile grup 3 arasında da önemli istatistiksel fark tespit edilmiştir (**p=0,001**; $p<0,005$).

SOD süperoksit radikallerinin en önemli temizleyicisidir. Ancak bunun sonucunda hidrojen peroksit (H_2O_2) oluştuğu bilinmektedir. H_2O_2 bir radikal olarak kabul edilmese de organizmada hidroksil radikalının en önemli kaynağıdır. GPx ve katalaz H_2O_2 'nin katalizinde önemli olan iki enzimdir. Bizim çalışmamızda kontrol grubuna göre kafeinli gruplarda SOD, GPx ve katalaz aktivitesinde artış saptanmıştır.

Karaciğer dokusu GST aktivitesi için kontrol grubu (grup 1) ile 30mg/kg doz kafein grubu (grup 2) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (**p=0,151**). Kontrol grubunu 100mg/kg doz kafein grubu (grup 3) ile karşılaştırdığımızda aralarında (**p=0,002**; $p<0,005$) önemli istatistiksel olarak fark bulundu. Grup 2 ile grup 3 arasında da anlamlı istatistiksel fark tespit edildi (**p=0,013**; $p<0,05$).

Karaciğer dokusu glutatyon düzeyleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre kafeinli gruplarda hafif artış tespit edilmiş, ancak gruplararası istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Abraham ve ark. (105), gavaj ile 10 gün, 10ml/kg olacak şekilde kafein verilen (2,25 mg/kg, 4,5 mg/kg, 9 mg/kg) 3 grup farenin karaciğer dokularında GST aktivitesinde, kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunmadığını tespit etmişler, aynı çalışmada içme sularına da kafein eklenen (2 hafta, 70mg/100ml) farelerin karaciğer dokularında GST aktivitesinde ve sülfidril (-SH) seviyelerinde kontrol grubuna göre yine istatistiksel fark bulunmadığını belirtmişlerdir.

Glutatyon organizmada tiyol grubu içeren, düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptittir. DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitesi düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücresel işlevlerin dışında başlıca antioksidan olarak hücre savunmasında da rolü vardır. İndirgenmiş glutatyon içerdiği, tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak oksidatif hasarlardan hücreyi koruduğu bilinmektedir (106-108).

Kafeinle yapılan çalışmalarda deney modellerindeki çeşitlilik, kafeinin uygulanış tarzı, doz ve süresinin farklı oluşu ve antioksidan sistemin dokuya spesifik olması nedeniyle araştırmaların farklı sonuçlandığını düşünmekteyiz.

Fizyolojik şartlarda da organizmada radikaller oluştuğu bilinmektedir. Oksijen türevi radikaller; süperoksit radikali ve hidroksil radikali kaynak sağlayan hidrojen peroksite artışına neden olmaktadır. Bunlara bağlı lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA da artış beklenir. Çalışmamızda kontrol grubuna göre kafeinli gruplardaki MDA seviyelerinin azalması ve SOD, GPx, GST ve katalaz enzim aktivitelerinin anlamlı derecede arması; kafeinin ratlarda bu dozlarda radikal üretimini azalttığını ve antioksidan enzimler üzerinde olumlu etkisinin olduğu görüşünü desteklemektedir.

6. SONUÇ

Çalışmamızın sonuçları, kısa süreli (14 gün) düşük doz (30mg/kg) ve toksik olmayan yüksek doz (100mg/kg) oral kafein uygulamasının karaciğerde

lipit peroksidasyonunun göstergesi olan MDA'yı azalttığını göstermektedir. Kafein alımıyla rat karaciğer dokusunda SOD, katalaz, GPx ve GST gibi antioksidan enzim aktivitelerinde ise artış saptanmıştır. Karaciğer dokusu glutatyon düzeyleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre kafeinli gruplarda hafif artış tespit edilmiş, ancak gruplararası istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Kafeinin bu dozlarda; lipit peroksidasyonunu azaltması, antioksidan enzim aktivitelerini artırması ile oksidatif stresi iyileştirmesi, yapılan araştırmalarında ışığında antioksidan olabileceği görüşünü desteklemektedir. Kafeinin uygulama tarzı, dozu, süresi ve deney modellerindeki çeşitlilik yanında antioksidan sistemin dokuya özel olması nedeniyle önceki araştırmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Kafeinin antioksidan olarak uygun dozunun belirlenmesinde, etki mekanizmalarının açığa kavuşturulmasında ileri hayvan ve insan çalışmalarının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Kolaylı S, Ocak M, Kucuk M, Abbasoglu R. Does caffeine bind to metal ions? Food Chemistry 2004; 84: 383–8.

2. Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehling A, Zwartau EE. Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use. *Pharmacological Rev* 1999; 51: No. 1, 84-125.
3. Nehlig A, Boyet S. Dose-response study of caffeine effects on cerebral functional activity with a specific focus on dependence. *Brain Res* 2000; 858: 71-7.
4. Sakamoto W, Nishihira J, Fujie K, Iizuka T, Handa H, Ozaki M, Yukawa S. Effect of Coffee Consumption on Bone Metabolism. *Bone* 2001; 28: No. 3, 332-6 .
5. Deeb SA, Moutaery KA, Arshaduddin M, Biary N, Tariq M. Effect of acute caffeine on severity of harmaline induced tremor in rats. *Neurosci Lett* 2002; 325: 216-8.
6. Devasagayam TP, Kamat JP, Mohan H, Kesavan PC. Caffeine as an antioxidant; inhibition of lipid peroxidation induced by ROS. *Biochim et Biophys Acta* 1996; 1282 (1): 63-70.
7. George KC, Hebbar SA, Kale SP, Kesavan PC. Caffeine protects mice against whole-body lethal dose of γ -irradiation. *J Radiol Prot* 1999; 19: No: 2, 171-6.
8. Lee C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clin Chim Acta* 2000; 295:141-54.

9. Al Moutaery K, Al Deeb S, Ahmad Khan H, Tariq M. Caffeine impairs short-term neurological outcome after concussive head injury in rats. *Neurosurgery* 2003; 53(3): 704-11.
10. [Karas M](#), [Chakrabarti SK](#). Influence of caffeine on allyl alcohol-induced hepatotoxicity in rats. In vivo study. [J Environ Pathol Toxicol Oncol](#) 2001; 20(2): 141-54.
11. Son HY, Nishikawa A, Kanki K, Okazaki K, Kitamura Y, Lee KY, Umemura T, Hirose M. Synergistic interaction between excess caffeine and deficient iodine on the promotion of thyroid carcinogenesis in rats pretreated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Cancer Sci* 2003; 94: No. 4 , 334–7.
12. Concas A, Porcu P, Sogliano C, Serra M, Purdy PH, Biggio G. Caffeine-Induced Increases in the Brain and Plasma Concentrations of Neuroactive Steroids in the Rat. *Pharmacol Biochem Behavior* 2000; 66: No. 1, 39–45.
13. Ferrer I, Costell M, Grisolia S. Lesch-Nyhan Syndrome-Like Behavior in rats from caffeine ingestion, Changes in HGPRTase activity, urea and some nitrogen metabolism enzymes. *FEBS Letters* 1982; 141: No: 2, 275-8.
14. Cauli O, Morelli M. Caffeine and the dopaminergic system. *Behavioural Pharmacol* 2005; 16: No: 2, 63-77.
15. Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monit* 2003; 9(9). 330-5.

16. Dager SR, Layton ME, Strauss W, Richards TL, Heide A, Friedman SD, Artru AA, Hayes CE, Posse S. Human Brain Metabolic Response to Caffeine and the Effects of Tolerance. *Am J Psychiatry* 1999; 156: 229–37.
17. Tanda G, Goldberg SR. Alteration of the Behavioral Effects of Nicotine by Chronic Caffeine Exposure. *Pharmacol Biochem Behavior* 2000; 66: No. 1, 47–64.
18. Lorist MM, Tops M. Caffeine, fatigue, and cognition. *Brain and Cognition* 2003; 53: 82–94.
19. Benowitz NL, Peng M, Jacob P. Effects of cigarette smoking and carbon monoxide on chlorzoxazone and caffeine metabolism. *Clin Pharmacol & Therapeutics* 2003; 74: No:5,468-74.
20. Foukas LC, Daniele N, Ktori C, Anderson KE, Jensen J, Shepherd PR. Direct Effects of Caffeine and Theophylline on p110 and Other Phosphoinositide 3-Kinases. Differential Effects On Lipid Kinase and Protein Kinase Activities. *J Biol Chem* 2002; 277: No:40, 37124–30.
21. Nikolic J, Bjelakovic G, Stojanovic I. Effect of caffeine on metabolism of L-arginine in the brain. *Mol Cell Biochem* 2003; 244: 125–8.
22. Bruce C, Yates DH, Thomas PS. Caffeine decreases exhaled nitric oxide. *Thorax* 2002; 57: 361–3.
23. Lindaman BA, Hinkhouse MM, Conklin JL, Cullen JJ. The Effect of Phosphodiesterase Inhibition on Gallbladder Motility *in Vitro*. *J Surg Res* 2002; 105: 102–8.

24. Hashiguchi W, Nagatomo I, Akasaki Y, Uchida M, Tominaga M, Takigawa M. Influences of caffeine to nitric oxide production and zonisamide concentration in the brain of seizure-susceptible EL mice. *Psychiatry Clin Neurosci* 2001; 55 (4): 319–24.
25. Tanuma A, Saito S, Ide I, Sasahara H, Yazdani M, Gottschalk S, Nakamoto T, Abiko Y. Caffeine Enhances the Expression of the Angiotensin II Type 2 Receptor mRNA in BeWo Cell Culture and in the Rat Placenta. *Placenta* 2003; 24: 638–47.
26. Tofovic SP, Kusaka H, Rominski B, Jackson EK. Caffeine increases renal renin secretion in a rat model of genetic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33 (3): 440-50.
27. Tofovic SP, Kusaka H, Jackson EK, Bastacky SI. Renal and metabolic effects of caffeine in obese (fa/fa(cp), diabetic, hypertensive ZSF1 rats. *Ren Fail* 2001; 23(2): 159-73.
28. Berry NM, Rickards CA, Newman DG. The effect of caffeine on the cardiovascular responses to head-up tilt. *Aviat Space Environ Med* 2003; 74(7): 725-30.
29. Shin HY, Lee CS, Chae HJ, Kim HR, Baek SH, An NH, Kim MH. Inhibitory effect of anaphylactic shock by caffeine in rats. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22(6): 411-8.
30. Ganapathi MK, Mackiewicz A, Samols D, Brabenec A, Kushner I, Schultz D, Hu SI. Induction of C-reactive protein by cytokines in human hepatoma cell lines is potentiated by caffeine. *Biochem J* 1990; 269(1): 41-6.

31. Massey LK, Sutton RA. Acute caffeine effects on urine composition and calcium kidney stone risk in calcium stone formers. *J Urol* 2004; 172(2):555-8.
32. Tofovic SP, Kost CK, Jackson EK, Bastacky SI. Long-term caffeine consumption exacerbates renal failure in obese, diabetic, ZSF1 (fa-fa^{cp}) rats. *Kidney Int* 2000; 61(4): 1433–44.
33. Van Dam RM, Feskens EJM. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2002; 360:1477–78.
34. Ruhl CE, Everhart JE. Coffee and caffeine consumption reduce the risk of elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology* 2005; 128(1): 24-32.
35. Martin JV, Nolan B, Wagner GC, Fisher H. Effects of dietary caffeine and alcohol on liver carbohydrate and fat metabolism in rats. *Med Sci Monit* 2004; 10(12): 455-61.
36. Han LK, Kai F, Okuda H. Effects of long-term administration of caffeine on fat storage in ovariectomized rats. *Yakugaku Zasshi* 2004; 124(11): 841-6.
37. Sullivan GW, Luong LS, Carper HT, Barnes RC, Mandell GL. Methylxanthines with adenosine alter TNF alpha-primed PMN activation. *Immunopharmacology* 1995; 31(1): 19-29.
38. Khalil RH, Soliman MRI. Diazepam Alters caffeine-induced effects on β -endorphin levels in specific rat brain regions. *Life Sci* 1997; 61: 2485-90.

39. Lane JD, Pieper CF, Phillips-Bute BG, Bryant JE, Kuhn CM. Caffeine affects cardiovascular and neuroendocrine activation at work and home. *Psychosom Med* 2002; 64(4): 595-603.
40. Sondermeijer HP, Van Marle AGJ, Kamen P, Krum H. Acute Effects of Caffeine on Heart Rate Variability. *Am J Cardiol* 2002; 90: 906-7.
41. Bandyopadhyay BC, Poddar MK. Caffeine-induced increase of adenosine deaminase activity in mammalian lymphoid organs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1994; 16(10): 731-3.
42. Aytekin Y, Solakoğlu S. *Temel Histoloji* 2006; 332-47.
43. Aslan Diler, Tietz, ''Klinik Kimyada Temel İlkeler''. Beşinci Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık, 748-60, 2005.
44. Haddad JJ. Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 969-77.
45. Akkus I. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1.Baskı, Mimoza Yayınları, Konya 1995; 13-9.
46. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 1996; 16: 33-50.
47. Harris E.D. Regulation of antioxidant enzymes. *Faseb. J* 1992; 6: 2675-83.
48. Yao T, Esposti SD, Huang L, Amon R, Spangenberg A, and Zern MA. Inhibition of carbon tetrachloride induced liver injury by liposomes containing Vitamin E. *Am J Physiol* 1994; 30: 476-84.
49. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease, An overview. *Methods Enzymol* 1990; 186:1-85.

50. Fang Y.Z, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 872-9.
51. Kaneda H, Taguchi J, Ogasawara K, Aizawa T, Ohno M. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2002; 162: 221-5.
52. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radical in Biology and Medicine*. Third ed, Oxford University Press, Oxford 2000; 160-5.
53. Beckman K.B, Ames B.N. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 78: 547-81.
54. McCormick M, Denning G.M, Reszka GM, Bilski P, Buettner GR, Rasmussen GT, Rainsback MA, Britigan BE. Biological effects of menadione photochemistry: effects of menadione on biological systems may not involve classical oxidant production. *Biochem J* 2000; 350: 797-804.
55. Basaga HS, Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1990; 68: 989-98.
56. Sodergren E. Lipid peroxidation in vivo, Uppsala University, Uppsala, 2000.
57. Nishiyama Y, Ikeda, H, Haramaki N. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J* 1998; 135:115.
58. Gilbert DL. Fifty years of radical ideas. *Ann NY Acad Sci* 2000; 899: 1.
59. Freidovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species or what's the matter with oxygen? *Ann NY Acad Sci* 1999; 893:13.

60. Pieper GM, Siebeneich W, More-Hilton M, Roza AM. Reversal by L-Arginin of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in the endothelium of the genetic diabetic rat. *Diabetologia* 1997; 40: 910-5.
61. Agarwal R, Chase SD. Rapid fluorimetric-liquid chromatographic determination of malonaldehyde in biological samples. *J Chromatogr B* 2002; 775:121-6.
62. Chen S, Schopfer P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions a novel function of peroxidase. *Eur J Biochem* 1999; 260:726-35.
63. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Brit Med Bulletin* 1993; 149: 481-93.
64. Evans P, Halliwell B, Micronutrients: Oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 2001; 85:67.
65. Hawkins CL, Pattison DI, Davies MJ. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids* 2003; 25: 259-74.
66. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-28.
67. Mayne PD. *Clinical Chemistry in Diagnosis and Teratment*. Oxford University Press, New York, 1992.
68. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stres. *J Biol Chem* 1997; 272: 213-6.
69. Boyunağa H, Çelik C. Serbest radikaller ve hücresel denge. *Bilim Teknik Dergisi* 1996 347: 98-100.

70. Powell SR. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr* 2000; 130:1447- 54.
71. Ulusu NN, Sahilli M, Avci A, Canbolat O, Ozansoy G, Ari N, Bali M, Stefek M, Stolc S, Gajdosik A, Karasu C. Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E. *Neurochem Res* Jun 2003; 28 (6): 815-23.
72. Uchida K, 4-Hydroxy-2-Nonenal. A product and mediator of oxidative stress. *Progr Lip Res* 2003; 569:1-26.
73. Jerry P, Liu L, Zeng M, Stamler JS, An apoptotic model for nitrosative stress. *Biochemistry* 2000; 39: 1040-47.
74. Halliwell B. Antioxidant characterization: Methodology and mechanism, *Biochem Pharmacol* 1995; 49: 134-48.
75. Splettstoesser WD, Werner SP. Oxidative stress in phagocytes 'The Enemy Within'. *Microscopy Research And Technique* 2002; 57: 44-55.
76. Meister A. Glutathione, ascorbate and cellular protection. *Cancer Res Suppl* 1994; 954:1969-75.
77. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *Am J Med* 1991; 23-30.
78. Lai CC, Huang W, Askari A, Wang Y. Differential regulation of superoxide dismutase in copper deficient rat organs. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 613-20.
79. Powers SK, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity. *Med Sci Sports Exerc* 1999; 31: 987-97.

80. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, Cu-Zn superoxide dismutase for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 235-48.
81. Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res* 2005; 79:157-65.
82. Shidhu P. Protective role of zinc in nickel induced hepatotoxicity in rats. *Chemico-Biol Interact* 2004; 150:199-209.
83. Liebert J, Matlawska I, Bylka W, Murias M. Protective effect of aquilegia vulgaris on APAP induced oxidative stress in rats. *J Ethnopharm* 2005; 97:351-8.
84. Guemori L, Arthur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cunny G, Siest G. Biological variability of süperoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clin Chem* 1991; 37:1932-7.
85. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species; antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001; Dec 1, 31 (11): 1287-312
86. Felix K, Rockwood LD, Pretsch W, Nair J, Bartsch H, Bornkamm GV, Janz S. Moderate G6PD deficiency increases mutation rates in the brain on mice. *Free Radic Biol Med* 2002; 32(7): 663-73.
87. İlhan A, Akyol O, Gurel A, Armutcu F, Iraz M, Oztas E. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester against experimental allergic encephalomyelitis induced oxidative stress in rats. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: No:3, 386-94.

88. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
89. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95, 351-8.
90. Yi-Sun S, Oberly LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34:497-500.
91. Paglia DE, Valentina WN. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70:158-69.
92. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB, Glutathione-S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249(22):7130-39.
93. Aebi H. Catalase, In: H.U.Bergmeyer, (Ed): *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York and London 1974; pp: 673-7.
94. Michna L, Lu YP, Lou YR, Wagner GC, Conney AH. Stimulatory effect of oral administration of green tea and caffeine on locomotor activity in SKH-1 mice. *Life Sci* 2003; 73: 1383–92.
95. Belayev L, Khoutorova L, Zhang Y, Belayev A, Zhao W, Busto R, Ginsberg MD. Caffeinol confers cortical but not subcortical neuroprotection after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 2004; 1008: 278–83.
96. Aronowski J, Strong R, Shirzadi A, Grotta JC. Ethanol plus caffeine (caffeinol) for treatment of ischemic stroke. *Stroke* 2003; 34: 1246.

97. Strong R, Grotta JC, Aronowski J. Combination of low dose ethanol and caffeine protects brain from damage produced by focal ischemia in rats. *Neuropharmacology* 2000; 39, 515–22.
98. Yukawa GS, Mune M, Otani H, Tone Y, Liang M, Iwahashi H, Sakamoto W. Effects of Coffee Consumption on Oxidative Susceptibility of Low-Density Lipoproteins and Serum Lipid Levels in Humans. *Biochemistry (Moscow)* 2004; 69: No:1, 70-4.
99. Kamat JP, Bloor KK, Devasagayam TPA, Jayashree B, Kesavan PC. Differential modification by caffeine of oxygen-dependent and independent effects of γ -irradiation on rat liver mitochondria. *Int J Radiat Biol* 2000; 76: No: 9, 1281-8.
100. Mukhopadhyay S, Mondal A, Poddar MK. Chronic administration of caffeine: effect on the activities of hepatic antioxidant enzymes of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. *Indian J Exp Biol* 2003; 41(4):283-9.
101. Moslen MT. Reactive Oxygen Species in Normal Physiology: Cell Injury and Phagocytosis, Free Radicals in “Diagnostic Medicine” , (Armstrong D., ed), 1-15, Plenum Press 1994; New York.
102. Yukawa GS, Mune M, Otani H, Tone Y, Liang M, Iwahashi H, Sakamoto W. Effects of Coffee Consumption on Oxidative Susceptibility of Low-Density Lipoproteins and Serum Lipid Levels in Humans. *Biochemistry (Moscow)* 2004; 69:No:1, 70-4.
103. Birkner E, Grucka-Mamczar E, Zwirska-Korczala K, Zalejska-Fiolka J, Stawiarska-Pieta B, Kasperczyk S, Kasperczyk A. Influence of sodium

- fluoride and caffeine on the kidney function and free-radical processes in that organ in adult rats. Biol Trace Elem Res 2006; 109(1): 35-48.
104. Rossowska MJ, Nakamoto T. Effects of chronic caffeine feeding on the activities of oxygen free radical defense enzymes in the growing rat heart and liver. Experientia 1994; 50(5), 465-8.
105. Abraham SK, Singh SP. Anti-genotoxicity and glutathione S-transferase activity in mice pretreated with caffeinated and decaffeinated coffee. Food Chem Toxicol 1999; 37,733-9.
106. Rose WC. New aspects of glutathione biochemistry and transport selective alteration of glutathione metabolism. Nutrition Rev 1984; (42) 12: 397-410.
107. Gözükar EM. Biyokimya İ.Ü. Yayınları Malatya; 1989.
108. Meister A. Selective modification of glutathione metabolism. Science 1983; 220,472-7.

8. TÜRKÇE ÖZET

KAFEİNİN RAT KARACİĞERİNDE OKSİDAN-ANTIOKSİDAN
MEKANİZMALARA ETKİSİ

Kafein (1,3,7 trimetilksantin) bir pürin alkoloit olarak birçok yiyecek ve içeceklerin içeriğinde bulunur. Kafein günümüzde her gün düzenli olarak tüketilen bir maddedir, kahve, çay, çikolata, kola ve bazı gazlı içecekler kafein ihtiva eder. Biz çalışmamızın temel hedefi olarak, kısa süreli oral kafein alımının rat karaciğerinde olası antioksidan etkilerini iki farklı dozda araştırmaya çalıştık. Kafein verilen ratların karaciğer dokularında lipit peroksidasyon ürünü olan MDA düzeylerini ölçtük. Bunun yanında kafeinin antioksidan özelliğini incelemek için, enzimatik ve non enzimatik antioksidan sistem üzerinde araştırmalar yaptık. Karaciğer dokularında SOD, katalaz, GPx, GST aktivitelerini ve GSH düzeylerini ölçtük. Çalışmamızda 30 adet (ortalama 250 gr ağırlığında) Wistar cinsi dişi rat kullanıldı. Ratlar üç eşit gruba ayrıldı. GrupI :Kontrol grubuydu. GrupII ‘ye 30mg/kg, grupIII ‘e 100mg/kg (nontoksik yüksek doz) kafein 14 gün boyunca (kısa süreli) oral yolla verildi. Çalışmamızın sonuçları, 14 gün düşük doz (30mg/kg) ve toksik olmayan yüksek doz (100mg/kg) kafein uygulamasının, karaciğerde lipit peroksidasyonunun azalttığını göstermektedir. Kafein alımıyla rat karaciğer dokusunda SOD, katalaz, GPx ve GST gibi antioksidan enzim aktivitelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır. Karaciğer dokusu glutatyon düzeyleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre kafeinli gruplarda hafif artış tespit edilmiş, ancak gruplararası istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Spearman korelasyon analizi sonuçlarına göre doku MDA düzeyi azalırken, GPx, GST, SOD aktivitesi artmış ve güçlü negatif korelasyon görülmüştür. Doku GST aktivitesi ile doku katalaz aktivitesi arasında güçlü pozitif korelasyon bulunmuştur. Kafeinin bu dozlarda; lipit peroksidasyonunu

azaltması, antioksidan enzim aktivitelerini artırması ile oksidatif stresi iyileştirmesi, yapılan araştırmalarında ışığında antioksidan olabileceği görüşünü desteklemektedir. Kafeinin antioksidan olarak uygun dozunun belirlenmesinde, etki mekanizmalarının açığa kavuşturulmasında ileri hayvan ve insan çalışmalarının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: kafein, MDA, antioksidan enzim

9. İNGİLİZCE ÖZET

EFFECTS OF CAFFEINE ON OXIDANT-ANTIOXIDANT MECHANISMS IN THE RAT LIVER

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is a purine alkaloid which exists in a variety of foods and drinks. Today caffeine is an everyday regularly consumed substance, coffee, tea, chocolate, coke and some soft drinks contain caffeine. The main aim of our study was to compare potential antioxidant effects in rat liver at 2 different doses of short time period oral caffeine intake. We measured MDA levels, which is a product of lipid peroxidation, in rats' livers that caffeine is given. In addition, to evaluate antioxidant properties of caffeine we investigated enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems. We measured SOD, catalase, GPx and GST activities and GSH levels in liver. In our study we used 30 female Wister rats with a mean weight of 250 grams. Rats are equally divided into 3 groups. Group 1 was control. Group 2 received 30mg/kg of caffeine and group 3 received 100mg/kg caffeine (non-toxic high dose) for 14 days (short time period) orally. Our results show that 14-day low dose (30mg/kg) and non-toxic dose (100mg/kg) caffeine usage decreased lipid peroxidation in liver. Antioxidant enzyme activities in rat liver like SOD, catalase, GPx and GST showed statistically significant increase with caffeine intake. Liver glutathione level comparison to control group showed a slight increase but this was not statistically significant. Results from the Spearman analysis showed a strong negative correlation and while tissue MDA levels decreased; GPx, GST and SOD activities increased. Tissue GST activity and tissue catalase activity showed a strong positive correlation. Decreased lipid peroxidation and increased antioxidant enzyme activities which improve oxidative stress show that these doses of caffeine may be an antioxidant under the influence of these studies. In our

opinion, determining mechanism and antioxidant effect of caffeine at suitable dose requires advanced animal and human studies.

Keywords: Caffeine, MDA, Antioxidant enzymes

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Canan

Soyadı: YILMAZ DEMİRTAŞ

Doğum Yeri ve Tarihi: Vezirköprü / SAMSUN-1976

Eğitimi:

(2004 - 2009) Gazi Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyokimya A.D.

(2001-2004) Çankırı Devlet Hastanesi (Hemodiyaliz Ünitesi, Kurum Hekimliği)

(1993-1999) Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakóltesi

Yabancı Dili : İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği

Türk Klinik Biyokimya Derneği

Türk Biyokimya Derneği

Türk Tabibler Birliği (Ankara Tabib Odası)

Bilimsel Etkinlikleri:**Yurt Dışı Yayınlar**

1. Irkorucu O, Ucan BH, Cakmak GK, Tascilar O, Emre AU, Oflluoglu E, Bahadir B, Karakaya K, Demirtas C, Pasaoglu H, Ankarali H, Comert M. Effect of 2-octyl-cyanoacrylate on ischemic anastomosis of the left colon. J Invest Surg 2009 May-Jun; 22(3):188-94.
2. Irkorucu O, Ucan BH, Cakmak GK, Emre AU, Tascilar O, Oflluoglu E, Bahadir B, Karakaya K, Demirtas C, Ankarali H, Kertis G, Pasaoglu H, Comert M. Does sildenafil reverse the adverse effects of ischemia on ischemic colon anastomosis: yes, 'no'. Int J Surg 2009 Feb;7(1) :39-43.

3. Erten Y, Ebinç FA, Ebinç H, Paşaoğlu H, Demirtaş C, Taçoy G, Koç E, Derici U, Reis KA, Bali M, Arinsoy T, Sindel S. The relationship of visfatin levels to inflammatory cytokines and left ventricular hypertrophy in hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. Ren Fail 2008;30(6):617-23.
4. Ebinç FA, Erten Y, Ebinç H, Paşaoğlu H, Demirtaş C, Taçoy G, Mutluay R, Koç E, Derici U, Reis KA, Bali M, Arinsoy T, Sindel S. The relationship among asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels, residual renal function, and left ventricular hypertrophy in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. Ren Fail 2008;30(4):401-6.

Poster Sunumları

1. Effect of caffeine on brain lipid peroxidation in rats. Ofluoglu E, Pasaoglu H, Demirtas C, Pasaoglu A. 6 Ulusal Sinirbilimleri Kongresi 09-13 Nisan 2007 / Safranbolu
2. Sucak GT, Pasaoglu H, Aki Z, Ofluoglu E, Demirtas C, Haznedar R. Trombopoetic cyokine levels before-after autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. 15th Congress of Balkan Clinical Laboratory Federation 04-07 Eylül 2007 / Antalya

3. Ofluoglu E, Demirtas C, Pasaoglu H, Elbeg S, Pasaoglu A. Effect of caffeine on brain L-arginine metabolism in rats. 15th Congress of Balkan Clinical Laboratory Federation 04-07 Eylül 2007 / Antalya
4. Ofluoglu E, Pasaoglu H, Demirtas C, Elbeg S, Pasaoglu A. Effect of high dose caffeine on brain arginase and nitric oxide metabolism in rats. 15th Congress of Balkan Clinical Laboratory Federation 04-07 Eylül 2007 / Antalya
5. Erten Y, Ebinc AF, Pasaoglu H, Demirtas C, Mutluay R, Reis Altok K, Derici U, Bali M, Arınsoy T, Sindel S. Sürekli Ayaktan Periton Diyalizi (SAPD) Hastalarında Sistatin C ile Rezidüel Glomerül Filtrasyon Hızının Hesaplanması. 24.Ulusal Nefroloji Hipertansiyon Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi 15-18 Kasım 2007 / Antalya
6. Ebinc AF, Erten Y, Ebinç H, Pasaoglu H, Demirtas C, Taçoy G, Koç E, Reis Altok K, Derici U, Bali M, Arınsoy T, Sindel S. Sürekli Ayaktan Periton Diyalizi (SAPD) Hastalarında Vasküler Endotelyal Growth Faktör (VEGF) Düzeyinin Sol Ventrikül Hipertrofisi ile ilişkisi. 24.Ulusal Nefroloji, Hipertansiyon, Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi 15-18 Kasım 2007 / Antalya
7. Demirtas C, Pasaoglu H, Ofluoglu E, Hüssein A. Ratlarda kafeinin karaciğer arjinaz, nitrik oksit, malondialdehid düzeyleri üzerine etkileri. 8. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi 08-11 Mayıs 2008 / Bodrum

8. Ofluoglu E, Pasaoglu H, Demirtas C, Pasaoglu A. Ratlarda beyin antioksidan sistem üzerine kafeinin etkisi. 8. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi 08-11 Mayıs 2008 / Bodrum
9. Canbolat O, Devay SD, Demirtas C, et al. Evaluation of long term carbon tetrachloride application on liver purine metabolism in wistar albino rats: stobadine effects. FEBS Journal 275:395-395 suppl.1 Jun 2008.
10. Demirtaş C, Paşaoğlu H, Ebinç FA, Erten Y. Serum Sistatin C ile kreatinin klirensi arasındaki ilişkinin araştırılması. 9. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi 23-26 Nisan 2009 / Antalya
11. Pasaoglu H, Demirtas C, Ofluoglu E, Pasaoglu OT, Pasaoglu A. The effects of caffeine on the antioxidant capacity and AOPP levels of rat brain tissue. 3.International Congress of Molecular Medicine 5-8 May 2009 / İstanbul

Sözlü Sunumlar

1. Erten Y, Ebinc AF, Ebinç H, Pasaoglu H, Demirtas C, Taçoy G, Koç E, Derici U, Reis Altok K, Bali M, Arınsoy T, Sindel S. Hemodiyaliz (HD) ve Sürekli Ayaktan Periton Diyalizi (SAPD) Hastalarında Visfatin Düzeyinin inflamatuvar sitokinler, Leptin, ve sol ventrikül hipertrofisi ile ilişkisi. 24.Ulusal Nefroloji, Hipertansiyon, Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi 15-18 Kasım 2007 / Antalya

2. Ebinc AF, Erten Y, Ebinç H, Pasaoglu H, Koç E, Demirtas C, Taçoy G, Mutluay R, Derici U, Reis Altok K, Bali M, Arınsoy T, Sindel S. Sürekli Ayaktan Periton Diyalizi (SAPD) Hastalarında asymmetric dimethylarginine (ADMA) Düzeyinin Rezidüel Renal Fonksiyon ve Ekokardiyografik parametreler ile ilişkisi. 24.Ulusal Nefroloji, Hipertansiyon Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi 15-18 Kasım 2007 / Antalya.
3. Dibeklioglu S, Çakmak GK, Uçan BH, Taşçılar O, Bahadır B, Emre AU, İrkörücü O, Karakaya K, Paşaoğlu H, Ankaralı H, Kertiş G, Demirtaş C, Cömert M. Deneysel iskemik sol kolon anastomoz modelinde eritropoetinin anastomoz iyileşmesi üzerine etkisi. Türk Cerrahi Derneği Ulusal Cerrahi Kongresi 28-31 Mayıs 2008/Antalya.
4. İrkörücü O, Emre AU, Taşçılar O, Çakmak GK, Karakaya K, Ofloğlu E, Bahadır B, Uçan BH, Demirtaş C, Paşaoğlu H, Ankaralı H, Cömert M. Sol kolonun iskemik anastomozunda 2-octyl-cyanoacrylatın etkileri. Türk Cerrahi Derneği Ulusal Cerrahi Kongresi 28-31 Mayıs 2008/Antalya.
5. Çakmak GK, İrkörücü O, Uçan BH, Taşçılar O, Emre AU, Karakaya K, Bahadır B, Paşaoğlu H, Gül M, Kertiş G, Bayrak H, Demirtaş C, Ankaralı H, Cömert M. Deneysel sol kolon anastomozunda resveratrolün anastomoz iyileşmesine etkisi. Türk Cerrahi Derneği Ulusal Cerrahi Kongresi 28-31 Mayıs 2008/Antalya.

6. Sucak GT, Aki SZ, Pasaoglu H, Ozkurt ZN, Demirtas C, Yegin ZA, Yagci M. The role of pre-transplantation serum iron parameters and anti-oxidative potential in early posttransplant toxicities. 13th Congress of the European Hematology Association Copenhagen, Denmark June 12-15,2008.
7. Pasaoğlu H, Demirtaş C, Oflluğlu E, Hüssein A, Paşaoğlu A. Kafeinin rat beyin, Karaciğer ve Kalp okusunda oksidan stres üzerine etkileri. 20.Ulusal Biyokimya Kongresi 29 Ekim-1 Kasım 2008 / Kapadokya
8. Ebinc AF, Pasaoglu H, Mutluay R, Erten Y, Derici U, Reis Altok K, Demirtas C, Akkıyal F, Arınsoy T, Sindel S. Son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) hastalarında serum advanced oxidation protein product (AOPP) düzeyi; IL 6 ve karotis intima media kalınlığı ile ilişkisi. 25.Ulusal Nefroloji Hipertansiyon Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi 19-23 Kasım 2008 / Antalya.

Kongreler

1. 15th Congress of Balkan Clinical Laboratory Federation. 04-07 Eylül 2007 / Antalya
2. 8. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi. 08-11 Mayıs 2008 / Bodrum
3. 20.Ulusal Biyokimya Kongresi. 29 Ekim-1 Kasım 2008 / Kapadokya
4. 9.Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi 23-26 Nisan 2009 / Antalya

Kurslar

1. Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi, Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu. 11-13 Nisan 2007 /Ankara
2. Course on Evidence-Based Laboratory Medicine. 08-11 Nisan 2008 / İstanbul
3. Ankara Tıp Biyokimya Günleri. 25 Nisan 2008 / Ankara
4. Türk Klinik Biyokimya Derneği, Tıbbi Laboratuvarlarda Kalite ve Akreditasyon Kursu. 11 Mayıs 2008 / Bodrum
5. Türk Klinik Biyokimya Derneği, Tıbbi Laboratuvarlarda Kalite ve Akreditasyon Kursu. 25-28 Haziran 2008 / Hatay