

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**TESTİS KANSERİNDE BLEOMİSİN'İN  
İNDÜKLEDİĞİ OKSİDATİF STRESİN VE N-ASETİL  
SİSTEİN'İN HÜCRE MEMBRAN LİPİD PROFİLİ  
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

**Ayşegül ÇÖRT**

**Doktora Tezi**

**Antalya, 2014**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**TESTİS KANSERİNDE BLEOMİSİN'İN  
İNDÜKLEDİĞİ OKSİDATİF STRESİN VE N-  
ASETİL SİSTEİN'İN HÜCRE MEMBRAN LİPİD  
PROFİLİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

**Ayşegül ÇÖRT**

**Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Tomris ÖZBEN**

Bu Çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
(Proje No. 2011.03.0122.004), TÜBİTAK-COST (SBAG 107S291-CM0603-15),  
Federation of European Biochemical Societies (FEBS) ve COST-STSM (CM0603-  
6954) Tarafından Desteklenmiştir.

“Kaynakça Gösterilerek Tezinden Yararlanılabilir.”

**Antalya, 2014**

## Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim dalında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayın ve diğer yayınlar aşağıdadır.

1. Increased Plasma Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor-1 and Myeloperoxidase Activity in Patients with Obstructive Sleep Apnea Syndrome. Hanikoglu F, Huseyinoglu N, Ozben S, Cort A, Ozdem S, Ozben T. *Int J Neurosci*. 2014 Sep 2:1-23.
2. Bleomycin induces sensitivity to TRAIL/Apo-2L-Mediated Apoptosis in Human Seminomatous Testicular Cancer Cells is Correlated with Upregulation of Death Receptors. Timur M, Cort A, Ozdemir E, Sarikcioglu SB, Sanlioglu S, Sanlioglu AD, Ozben T. *Anticancer Agents Med Chem*. 2014 Aug 29.
3. Cisplatin loaded PMMA: mechanical properties, surface analysis and effects on Saos-2 cell culture. Özben H, Eralp L, Baysal G, Cort A, Sarkalkan N, Özben T. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2013;47(3):184-92.
4. Low serum copeptin levels in patients with obstructive sleep apnea. Ozben S, Guvenc TS, Huseyinoglu N, Sanivar HS, Hanikoglu F, Cort A, Ozben T. *Sleep Breath*. 2013 Dec;17(4):1187-92.
5. N-acetyl-L-cysteine inhibits bleomycin induced apoptosis in malignant testicular germ cell tumors. Kucuksayan E, Cort A, Timur M, Ozdemir E, Yucel SG, Ozben T. *J Cell Biochem*. 2013 Jul;114(7):1685-94.
6. Effects of curcumin on bleomycin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cells. Cort A, Timur M, Ozdemir E, Ozben T. *J Physiol Biochem*. 2013 Jun;69(2):289-96.
7. Effects of N-acetyl-L-cysteine on bleomycin induced oxidative stress in malignant testicular germ cell tumors. Cort A, Ozdemir E, Timur M, Ozben T. *Biochimie*. 2012 Dec;94(12):2734-9.
8. Effects of curcumin on bleomycin-induced oxidative stress in malignant testicular germ cell tumors. Cort A, Ozdemir E, Timur M, Ozben T. *Mol Med Rep*. 2012 Oct;6(4):860-6.
9. Effects of N-acetylcystein on bleomycin-induced apoptosis in malignant testicular germ cell tumors. Cort A, Timur M, Dursun E, Kucuksayan E, Aslan M, Ozben T. *J Physiol Biochem*. 2012 Dec;68(4):555-62.
10. Synergistic anticancer activity of curcumin and bleomycin: an in vitro study using human malignant testicular germ cells. Cort A, Timur M, Ozdemir E, Kucuksayan E, Ozben T. *Mol Med Rep*. 2012 Jun;5(6):1481-6.
11. Oxidases and oxygenases in regulation of neutrophil redox pathways in Behçet's disease patients. Melikoglu MA, Kacar C, Cort A, Yucel G, Aslan M. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2012 Feb;27(1):12-7.
12. Manganese porphyrin reduces retinal injury induced by ocular hypertension in rats. Dogan S, Unal M, Ozturk N, Yargicoglu P, Cort A, Spasojevic I, Batinic-Haberle I, Aslan M. *Exp Eye Res*. 2011 Oct;93(4):387-96.
13. Suppressive effect of astaxanthin on retinal injury induced by elevated intraocular pressure. Cort A, Ozturk N, Akpınar D, Unal M, Yucel G, Ciftcioglu A, Yargicoglu P, Aslan M. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2010 Oct;58(1):121-30.
14. Effect of astaxanthin on hepatocellular injury following ischemia/reperfusion. Curek GD, Cort A, Yucel G, Demir N, Ozturk S, Elpek GO, Savas B, Aslan M. *Toxicology*. 2010 Jan 12;267(1-3):147-53.
15. Oxidative and nitrate stress markers in glaucoma. Aslan M, Cort A, Yucel I. *Free Radic Biol Med*. 2008 Aug 15;45(4):367-76.

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 12 /09 /2014

**Tez Danışmanı** : Prof. Dr.Tomris ÖZBEN  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

**Üye** : Prof. Dr.Gültekin YÜCEL  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

**Üye** : Prof.Dr. Akif ÇİFTÇİOĞLU  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Patoloji Anabilim Dalı

**Üye** : Prof. Dr.Yeşim ÖZARDA  
Uludağ Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

**Üye** : Doç.Dr. Ahter ŞANLIOĞLU  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Onay:**

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..... /..... /..... tarih ve ..... /..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

**Prof Dr. İsmail ÜSTÜNEL**  
**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Testis kanseri 15-44 yaş arası erkeklerde çok yaygındır. Bleomisin testiküler germ hücre tümörüne sahip hastalarda kemoterapi tedavisinde kullanılır. Bleomisin oksijen radikalleri meydana getirerek kanser hücrelerinde DNA zincirinin oksidatif olarak kırılmasını sağlar. Yapısal olarak büyük miktarda tekli doymamış (MUFA) ve çoklu doymamış (PUFA) yağ asitlerinden meydana gelen hücre membranları oksidatif atağa karşı oldukça hassastır. Hücre membranına zarar verebilen trans yağ asidi izomerleri hücre membranında bulunan yağ asidlerinin serbest radikal süreci sonucu izomerizasyonu ile oluşur. Antioksidanlar sağlıkta ve hastalıkta aşırı serbest radikal oluşumunu ve reaksiyonlarını önlemek için besinsel ek gıdaların içerisinde sıklıkla kullanılan katkı maddeleridir. Literatürde bleomisin ve/veya N-Asetil-L-Sistein (NAC)'in testis germ hücre tümörlerinde membran lipid profili ve oksidatif stres üzerine etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

Yağ asidi analizi için 24 saat Bleomisin, NAC, Bleomisin+NAC ile inkübe edilmiş NTERA-2 testis kanser hücrelerinde membran lipid izolasyonu, ekstraksiyon, metil esterlerine türevlendirme ve gaz kromatografi aracılığı ile karakterizasyon basamakları sırası ile uygulandı. NTERA-2 hücrelerinde tiyobarbitirik asid reaktif maddesi (TBARS), 8-izoprostan ve lipid hidroperoksid seviyelerini belirleyerek Bleomisin'in ürettiği oksidatif stres üzerine NAC'in etkisini araştırdık.

Bleomisin membranın doymuş yağ asidi (SFA) yüzdesini arttırırken, MUFA ve PUFA yüzdesinin azalmasına neden oldu. Bleomisin oleik asid ve araşidonik asid trans lipid izomerlerinin anlamlı düzeyde artmasına neden oldu. Bleomisin NTERA-2 hücrelerinde TBARS, 8-izoprostan ve lipid hidroperoksid seviyelerinin artmasına neden oldu. Bleomisin'in NAC ile birlikte inkübasyonu ise Bleomisin'in artmasını sağladığı trans yağ asidi ve oksidatif stresi azalttı.

Bulgularımıza dayanarak testis kanser hastalarında Bleomisin'in NAC ile birlikte kullanılmasından kaçınılmalı ya da en azından tedavisi sırasında dikkatle izlenmelidir. Lipidom analizi sonuçları Bleomisin'in indüklediği yağ asidi yeniden düzenlenmesinin rolü ve membranın önemini ortaya koyarken hücre cevabının ve testiküler germ hücre tümörleri gibi hastalıkların etkilenmesine yönelik lipid-tabanlı stratejilerin potansiyelini göstermektedir. Bunun sonucunda testiküler kanser hücrelerinde yağ asidi profili çalışmaları hastalık ve hastalığın ilerlemesi ile ilişkili lipid biyo-belirteçlerinin tanımlanması için kullanılabilir.

**Anahtar kelimeler:** Bleomisin, Membran Lipid Profili, N-Asetil-L-Sistein, Testiküler germ hücre tümörü.

## ABSTRACT

### Effects of Bleomycin and N-acetyl-L-cysteine on the Fatty Acid Profile in Testicular Cancer Cell Membranes

Testicular cancer is a very common cancer in males aged 15–44 years. Bleomycin is used in chemotherapy regimens in the treatment of patients having testicular germ-cell tumor. Bleomycin generates oxygen radicals, induces oxidative cleavage of DNA strand in cancer cells. Cell membranes, which are structurally made up of large amounts of mono (MUFA) and poly (PUFA) unsaturated fatty acids are highly susceptible to oxidative attack. Trans fatty acid isomers which are able to perturb cell membrane arrangement are formed by the isomerization of fatty acids in cell membranes due to an endogenous free radical process. Antioxidants are widely used as ingredients in dietary supplements in health and disease to prevent excess free radical formation and reactions. There is no study in the literature investigating the effects of Bleomycin and/or N-Acetyl-L-Cysteine (NAC) on membrane lipid profile and oxidative stress in testicular germ cell tumors.

Fatty acid analysis was performed in the NTera-2 testicular cancer cells incubated for 24h with Bleomycin, NAC, Bleomycin +NAC applying ordinary steps of membrane lipid isolation, extraction, derivatization to methyl esters and characterization by gas chromatography. We studied effects of NAC on oxidative stress produced by Bleomycin by determining thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), 8-isoprostane and lipid hydroperoxide levels in NTera-2 cells.

Bleomycin increased the saturated fatty acid (SFA) percentage of membrane lipids, whereas decreased the percentage of MUFA and PUFA. Bleomycin led to a significant increase in trans lipid isomers of oleic and arachidonic acids. Bleomycin increased 8-isoprostane, TBARS and lipid hydroperoxide levels in NTera-2 cells. Co-incubation with NAC significantly decreased trans fatty acid and oxidative stress levels increased by Bleomycin.

On the basis of our findings, we may propose that concurrent use of NAC with Bleomycin should be avoided, or at least followed carefully during conventional treatment of testicular cancer patients. The results of lipidome analysis highlight the role of the Bleomycin induced fatty acid remodeling, membrane asset and suggest the potential of lipid-based strategies for influencing cell response and fate in human diseases, such as testicular germ cell tumors. Thus, study of fatty acid profiles in testicular cancer cells may be used to define lipid biomarkers associated to disease and progression.

**Key words:** Bleomycin, Membrane lipid profile, N-Acetyl-L-Cysteine, Testicular cancer cell.

## TEŞEKKÜR

Bu araŐtırmanın alt yapısının kurulması amacı ile TÜBİTAK, projenin İtalya'da yürütölen kısmı için STSM-COST desteğini sağlayan, çalıŐmanın planlanması ve yürütölmelerini sağlayan değerli akademik danıŐmanım Sayın Prof. Dr. Tomris ÖZBEN'e, çalıŐmalarım sırasında desteğini esirgemeyen ve laboratuvarının kapılarını açan Sayın Prof.Dr.Carla Ferreri'ye, birlikte çalıŐmaktan mutluluk duyduğum bölüm hocalarım, ekip arkadaşlarım ve diğer tüm asistan arkadaşlarıma ve yardımlarını esirgemeyen Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline teŐekkürlerimi sunarım.

AyŐegöl ÇÖRT

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>TEŞEKKÜR</b>	vi
<b>İÇİNDEKİLER</b>	vii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	ix
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xi
<b>GİRİŞ</b>	1
<b>GENEL BİLGİLER</b>	4
2.1. Testis Kanseri	4
2.2. Bleomisin	5
2.3. N-Asetil Sistein	8
2.4. Yağ Asidleri	10
2.5. Membran Lipidleri	12
2.6. Trans Yağ Asidlerinin Tanımlanması ve Özellikleri	13
2.7. Trans Yağ Asidlerinin Kaynağı	15
2.7.1. Biyohidrojenasyon	15
2.7.2. Parsiyal Katalitik Hidrojenasyon	15
2.7.3. Aşırı Isı Uygulamaları	15
2.7.4. Serbest Radikaller	16
2.8. Serbest Radikallerin Lipidler Üzerine Olan Etkisi	19
2.9. 8-İzoprostan	22
2.10. TBARS	23
2.11. Lipid Hidroperoksid	24
2.12. Gaz Kromatografik Analiz	25
2.13. Amaçlar	27
<b>MATERYAL VE METOD</b>	29
3.1. Hücre Kültürü ve Kullanılan Çözeltiler	29
3.2. Hücrelerin Çoğaltılması	29
3.3. Hücrelerin Dondurulması	29
3.4. Hücrelerin Çözülmesi	30
3.5. Deney Grupları	30
3.6. Sitotoksosite Ölçümleri	31



3.7.	Membran İzolasyonu, Lipidlerin Saflaştırılması ve Metil Ester Türevlerine Çevrilmesi	31
3.8.	Gaz Kromatografik Analiz	32
3.9.	Oksidatif Stres Analizleri	32
3.9.1.	8-İsoprostan Tayini	32
3.9.2.	TBARS Tayini	35
3.9.3.	Lipid Hidroperoksid Tayini	37
3.10.	İstatistiksel Analiz	38
<b>BULGULAR</b>		<b>39</b>
4.1.	NTERA-2 Hücrelerinde Bleomisin'in Sitotoksitesisi	39
4.2.	NTERA-2 Hücrelerinin NAC Varlığında Bleomisin'in Sitotoksitesisi	40
4.3.	Gaz Kromatografik Analiz	41
4.3.1	Yağ Asidi Standartlarının Gaz Kromatografik Analizi	41
4.3.2.	Kontrol Grubu NTERA-2 Hücrelerinin Gaz Kromatografik Analizi	44
4.3.3.	Bleomisin ile İnkübe Edilen NTERA-2 Hücrelerinin Gaz Kromatografik Analizi	46
4.3.4.	NAC İle İnkübe Edilen NTERA-2 Hücrelerinin Gaz Kromatografik Analizi	48
4.3.5.	Bleomisin ve NAC ile İnkübe Edilen NTERA-2 Hücrelerinin Gaz Kromatografik Analizi	50
4.4.	NTERA-2 Hücrelerinin Membran Fosfolipidlerindeki Yağ Asitleri	52
4.5.	8-İsoprostan Analizi Sonuçları	56
4.6.	TBARS Analiz Sonuçları	57
4.7.	Lipid Hidroperoksid Analiz Sonuçları	58
<b>TARTIŞMA</b>		<b>59</b>
<b>SONUÇLAR</b>		<b>64</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>		<b>65</b>
<b>KAYNAKLAR</b>		<b>66</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>4-HNE</b>	: 4-hidroksinanenal
<b>5-FU</b>	: 5-Flourourasil
<b>H<sup>+</sup></b>	: Proton
<b>H<sub>2</sub>S</b>	: Hidrojen Sülfid
<b>NO<sub>2</sub></b>	: Nitrojen Dioksit
<b>·OH</b>	: Hidroksil Radikali
<b>R·</b>	: Karbon Merkezli Organik Radikaller
<b>ROO·</b>	: Peroksil Radikali
<b>RCOO·</b>	: Organik Peroksitler
<b>RS·</b>	: Tiyil Radikali
<b>γ-LNA</b>	: Gama Linolenik Asid
<b>AChE</b>	: Asetil Kolin Esteraz
<b>BLM</b>	: Bleomisin
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>CLA</b>	: Konjuge linoleik asid
<b>Cys·</b>	: Sisteinil Radikali
<b>DHA</b>	: Dokosaheksaenoik Asid
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>EPA</b>	: Eikasopentaenoik Asid
<b>ETS</b>	: Elektron Transport Sistemi
<b>FA</b>	: Yağ Asidi
<b>FAME</b>	: Yağ Asidi Metil Ester
<b>FBS</b>	: Fetal Sığır Serumumu
<b>GS·</b>	: Glutatyonil Radikali
<b>GSH</b>	: Glutatyon
<b>GSH-Px</b>	: Glutatyon Peroksidaz
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksid
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>MUFA</b>	: Tekli Doymamış Yağ Asidi
<b>NAC</b>	: N-asetil-L-sistein
<b>O<sub>2</sub></b>	: Moleküler Oksijen
<b>O<sub>2</sub><sup>2-</sup></b>	: Süperoksid Radikali
<b>OA</b>	: Oleik Asid
<b>ONOO·</b>	: Peroksinitrit
<b>ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Nitrozoperoksokarbonat
<b>ONOOH</b>	: Peroksinitröz Asid
<b>PBS</b>	: Fosfat Tamponu
<b>PC</b>	: Fosfatidilkolin
<b>PUFA</b>	: Çoklu Doymamış Yağ Asidi
<b>RNS</b>	: Reaktif Nitrojen Türleri
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri

**SFA** : Doymuş Yağ Asidi  
**TBARS** : Tiyobarbütirik Asid Reaktif Maddesi  
**TFA** : Trans Yağ Asidi  
**TGCT** : Testiküler Germ Hücre Tümörleri

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>		<u>Sayfa</u>
2.1.	Bleomisin'in Yapısı	7
2.2.	Doymuş, Tekli Doymamış ve Çoklu Doymamış Yağ Asidi Örnekleri	11
2.3.	Oleik asid izomerleri	13
2.4.	Linoleik Asid İzomerleri	14
2.5.	Peroksinitrit Oluşumu ve Yıkılımı	18
2.6.	Bis-allilik Pozisyon	20
2.7.	<i>cis-trans</i> İzomerizasyonu Reaksiyon Mekanizması	20
2.8.	Enzimatik Yağ asidi Transformasyonları	21
2.9.	Moleküler Oksijen Varlığında Tiyil Radikalleri	21
2.10.	Tiyil Radikallerinin Katalizlediği PUFA <i>cis-trans</i> İzomerizasyonu	22
2.11.	8-izoprostan Oluşumu	23
2.12.	MDA-TBA Ürününün Oluşumu	24
2.13.	Redüksiyon/Oksidasyon Reaksiyonları	24
2.14.	FAME Elüsyonu Çıkış Zamanı GC Bölgeleri	26
3.1.	8-izoprostan Ölçüm Şeması	33
3.2.	5-tiyo-2-Nitrobenzoik Asid Oluşumunun Mekanizması	33
3.3.	8-izoprostan Standartlarının Hazırlanması	34
3.4.	8-izoprostan Standart Grafiği	35
3.5.	TBARS Standart Grafiği	36
3.6.	Lipid Hidroperoksid Standart Grafiği	38
4.1.	Farklı dozlardaki Bleomisin ile 24,48 ve 72 saat inkübe edilen Ntera-2 hücrelerinde % canlılık	39
4.2.	Sabit Bleomisin konsantrasyonunda (400 µg/ml) değişen dozlardaki NAC ile inkübe edilen Ntera-2 hücrelerinde % canlılık	40
4.3.	Yağ asidi standartlarının çıkış (retensiyon) zamanlarına ait kromatogramlar	42
4.4.	Araşidonik asid izomerlerine ait çıkış spektrumu	43
4.5.	Kontrol grubunu membran lipid profili kromatogramı	45
4.6.	Bleomisin ile inkübe edilen Ntera-2 hücrelerine ait membran lipid profili kromatogramı.	47
4.7.	NAC ile inkübe edilen Ntera-2 hücrelerinin membran lipid profili kromatogramı	49
4.8.	Bleomisin ve NAC ile inkübe edilen Ntera-2 hücrelerinin membran lipid profili kromatogramı	51
4.9.	Bleomisin, NAC ve Bleomisin+NAC inkübasyonundan sonra doymuş, tekli (MUFA) ve çoklu (PUFA) doymamış yağ asidleri düzeylerindeki değişimler	53
4.10.	Bleomisin, NAC ve Bleomisin+NAC ile inkübe edilen Ntera-2 hücre membranlarının oleik asid trans izomeri (9t-18:1)	54

değişimleri	
<b>4.11.</b> Bleomisin, NAC ve Bleomisin+NAC ile inkübe edilen NTERA-2 hücre membranlarının araşidonik asid trans izomeri (trans-20:4) değişimleri	<b>54</b>
<b>4.12.</b> Bleomisin, NAC ve Bleomisin+NAC ile inkübe edilen NTERA-2 hücre membranlarının Palmitik asid (16:0), Stearik asid (18:0), Oleik asid (9c-18:1) ve Araşidonik asid düzeyleri	<b>55</b>
<b>4.13.</b> NAC, Bleomisin (BLM), BLM+NAC, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +NAC ile inkübe edilen NTERA-2 hücrelerindeki 8-isoprostan seviyeleri	<b>56</b>
<b>4.14.</b> Bleomycin (BLM), BLM+NAC, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +NAC ile inkübe edilen NTERA-2 hücrelerinde TBARS seviyeleri	<b>57</b>
<b>4.15.</b> Bleomycin (BLM), BLM+NAC, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +NAC ile inkübe edilen NTERA-2 hücrelerinde Lipid hidroperoksid seviyeleri	<b>58</b>

## GİRİŞ

Yaşam bilimlerinde lipid araştırmalarının çekiciliği son yirmi yılda artmıştır. Kimyasal, analitik ve biyolojik çalışmalar beslenme ile lipid metabolizması ile ilişkili sağlık durumu arasında önemli bağlantılar kurulmasını sağlamıştır. Lipidomik; lipidlerin kimyasal ve metabolik kaderini araştıran bir disiplin olarak lipid araştırmalarına başarılı bir yenilik getirerek biyolojinin bu bölümünü anlamada ihtiyaç duyulan bilimsel cevap olmuş ve lipid değişimleri ile ilişkili çalışmaları bir araya getiren kapsamlı ve dinamik bir platform olmuştur. Trigliseritler, fosfolipidler ve kolesteril esterleri gibi yağ asidi içeren yapılar birçok önemli rol ve fonksiyonlarının yanı sıra yapısal ve biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır. Lipidler artık sadece hücre aktivitesi için taşıyıcı ya da plazmada dolaşan moleküller değil reaktiviteleri ve transformasyonları biyoloji, sağlık ve hastalıklarda kritik role sahip olan moleküllerdir [1]. Yağ asidlerinin yapısı doymuş (sature) ya da doymamış (unsature) (6 çift bağa kadar) halde olabilen uzun hidrokarbon zincirine (26 C'a kadar) bağlı karboksilik asitten meydana gelir. Doğal olarak oluşan yağ asidi içeren lipidlerdeki çift bağların geometrisi özellikle cis konfigürasyonundadır. Cis geometri homeoviskoz adaptasyonda kilit özelliktir. Çünkü membran homeostazisi doymuş ve cis doymamış yapılar arasındaki hassas denge ile sürdürülür. Esansiyel oluşundan dolayı cis geometri tekli doymamış yağ asidi (monu-unsature yağ asidi, MUFA) ve çoklu doymamış yağ asidi (poli-unsature yağ asidi, PUFA) biyosentezi sırasında bölgeye-spesifik ve stereo-selektif enzimatik aktivite ile sıkıca kontrol edilir [2]. Kimyasal noktadan bakıldığında doymamış yağ asidleri metabolik fonksiyonlar ve sinyal aktivitesi sırasında da oluşan oksidatif stres ve serbest radikal süreci ile ilişkilidir. Peroksidasyon işleminden kaynaklanan transformasyon doğal lipidler üzerine gerçekleşen en kritik olay olarak görülmüştür. MUFA ve PUFA'lar kimyasal ve biyokimyasal olarak etkilenmekte ve sinyal cevabı, yaşlanma ve sağlık bozuklukları görülmektedir [3]. Son on yılda MUFA ve PUFA cis çift bağ geometrisi dikkat çekmiştir. Termodinamik olarak daha az stabil olan cis izomer yapısı doğal lipidlerde en çok görülmektedir. Bu yapının elektrofilik serbest radikal reaktivitesi izomerizasyonu değiştirebilir ve başlangıçtaki doğal geometrinin kaybına neden olabilir [4] [5]. Lipid geometrisi biyomimetik koşullar altında kimyasal ve mekanistik çalışmaları biyofizik, biyokimya, biyoloji ve tıp açısından bir araya getiren disiplinler arası bir araştırma alanıdır. Trans lipidler (TFA) sağlık üzerine etkileri iyi bilinen endüstriyel trans yağ asidleri gibi eksojen kaynaklardan vücuda girebildikleri [6] gibi ruminantların midelerinde gerçekleşen ve günlük ürünler ve ette yağ asidi izomerlerinin oluşumuna neden olan mikrobiyal biyohidrojenasyon [7] ile de alınabilirler. Farklı lipid moleküllerinin serbest radikal reaktivitesi sonucu da trans izomer oluşumu gerçekleşebilir. Biyolojik membranlar farklı uzunlukta karbon ve farklı sayıda çift bağ içeren çeşitli yağ asidlerine sahiptir. Biyofiziksel zelliklerinin biyolojik cevap ile ilişkili olması sebebiyle kritik öneme sahiptirler. Membranların biyolojik fonksiyonları temel fizik prensiplerine göre kontrol edilmektedir. alışmalar özellikle doğal kaynaklarda en bol bulunan MUFA sınıfı

oleik asidin trans izomerleri üzerine yapılmaktadır. Erime noktalarındaki büyük farklılıktan (cis izomer için 13.4 °C ve trans izomer için 44 °C, doymuş yağ asidi olan stearik asid C18:0 için 72 °C) dolayı bu geometrik değişim sonucu meydana gelen trans konfigürasyonunun cis ve doymuş yapılar ile karşılaştırıldığında fosfolipid çift tabakasının akışkanlığı üzerine olan tamamen farklı etkisinin nedenlerini anlamak kolaydır [8]. Fosfatidiletanolaminlerde bir cis açıl zincirinin trans yağ asidi ile yer değiştirilmesi lipid molekülündeki diğer açıl zincirlerinin yapısına bağlı olarak transisyon sıcaklığını 18-31 °C artırır. Cis doymamış yağ asidlerinin trans konfigürasyona değişimi membran akışkanlığının önemli düzeyde azalmasına yol açar ancak cis'lerin doymuş yağ asidleri ile değişiminden daha azdır. Serbest radikallerin etkisi ile çift bağın izomerizasyonu sonucu meydana gelen trans izomerler organizmada cis geometride bulunan doymamış yağ asidlerinin biyolojik aktivitesinin kaybına neden olurlar. Serbest radikal türleri yağ asidi kompozisyonunca en zengin hücre kompartmanı olan hücre membranını direk olarak etkiler. Fosfolipidler biyolojik membranların yapısal üniteleri olmalarının yanında membran fonksiyonunda anahtar role sahiptirler. Doymamış yağ asidleri fosfolipidlerin temel bileşenidirler. Doymamış yağ asidleri bir ya da daha fazla çift bağ sahiptirler. Çift bağ oluşturan karbon atomları cis ya da trans konfigürasyonuna sahip olabilir. Hücre membranının fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için çift bağların cis konfigürasyonunda olması gerekmektedir. Doğal olmayan trans konfigürasyonuna sahip lipidler ökaryot organizmalar tarafından sentezlenemezler ve hücre membranına zarar verebilirler. Hücre membranında bulunan yağ asidleri serbest radikal üretimine bağlı olarak trans izomerlerine dönüşebilmektedir. Kanser tedavisi sırasında kullanılan bazı kemoterapötiklerin ve radyasyon terapisinin reaktif oksijen türleri oluşturduğu bilinmektedir [9] [10] [11] [12]. Serbest radikaller, özellikle reaktif oksijen türleri (ROS) hücre ölümünün yaygın mediatörleri olarak öne sürülmüştür.

Bleomisin ROS oluşturarak DNA hasarına ve hücre ölümüne yol açan bir anti kanser ajandır. Oluşan reaktif oksijen türleri lipidlerin oksidatif degradasyonuna yol açabilir. Meydana gelen serbest radikaller hücre membranını meydana getiren lipidlerden elektron çalarak hücre hasarına yol açabilmektedir. Sonuçta serbest radikal zincir reaksiyon mekanizması sonucu meydana gelen lipid radikalleri diğer lipidler, proteinler ve nükleik asidlere elektron aktararak substratların oksidasyonuna yol açabilir. Büyük miktarda PUFA yağ asidlerinden yapılmış olan hücre membranı oksidatif atağa karşı çok hassastır. Meydana gelen değişimler membran geçirgenliği ve akışkanlığının değişmesine ve hücre metabolik fonksiyon bozukluğuna yol açabilir. Yağ asidlerinin doymamış kısımları yapısal ve fonksiyonel koşulların sürdürülmesi açısından cis izomerik konfigürasyona sahiptir.

Çalışmamızda yüksek miktarda ROS meydana getirerek anti-tümöral etkinlik gösteren Bleomisin'in testis kanseri hücrelerinin membran lipid profili üzerine olan etkisi ile güçlü bir antioksidan olan N-asetil-L sistein (NAC)'in membran lipid profili üzerinde yarattığı değişim karşılaştırılmış ve Bleomisin ve NAC'ın birlikte uygulanmasının sonuçları araştırılmıştır. Lipid profilinin belirlenmesinde en etkili metod gaz kromatografisidir. Yağ asidleri metil ester türevlerine çevrilererek gaz kromatografisi ile belirlenebilmektedir. Çalışmamızda testis kanseri hücrelerine ait membran lipid profili gaz kromatografik analiz ile belirlenmiş ve bu analiz

neticesinde membranda bulunan yağ asitleri spesifik olarak tanımlanmış ve cis-trans izomerleri yüzdeleri ile birlikte gösterilebilmiştir. Literatürde Bleomisin ve NAC'ın membran lipid profili üzerine etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu anlamda çalışmamız literatüre ışık tutacak niteliktedir. Ayrıca Bleomisin ve NAC inkübasyonu sonucu testis kanseri hücrelerinde meydana gelen oksidatif stres değişimleri de 8-İsoprostan, Lipid Hidroperoksid ve TBARS tayini yapılarak belirlenmiştir.



## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Testis Kanseri

Testis kanseri 15-35 yaş arası genç erkeklerde en yaygın görülen kanser tipidir ve erkeklerde görülen tümörlerin %1'ini oluşturmaktadır [13]. Testis kanserinin %95'ini germ hücreli tümörler oluşturmaktadır [14]. Testiküler kanserler üç gruba ayrılabilir [15]. Tip I testiküler germ hücre tümörleri (TGCTs) başlıca neonatal erkeklerde ve genç çocuklarda görülür ve benign teratomalar ve malin yolk sac tümörleri içerir [16]. Tip III TGCT spermatositik seminomlar olarak da adlandırılır, 50 yaşın üzerindeki erkekleri etkiler ve yavaş büyüyen tip B spermatogonyanın yayılmasından türer [17]. Tip II TGCTs en çok 20-40 yaş arasındaki erkekleri etkiler ancak bu tümör tipinin kökeni fetal gelişim sırasında daha erken evrededir [18]. Tüm Tip II TGCTs karsinoma in situ (CIS) adlı pre-invaziv lezyondan gelişir. CIS disfonksiyonel fetal germ hücre olarak tanımlanır [19]. Gelişen dünyada tip II TGCT insidansı son yüzyılda artmış ve 20-40 yaş arası erkeklerde en sık görülen kanser tipi haline gelmiştir [20] [21] [22]. Tip II TGCT seminoma ve nonseminoma olmak üzere başlıca iki alt gruba ayrılmaktadır. Seminoma germ hücre tümörlerinin %50'sini oluşturmaktadır ve sıklıkla 40'lı yaşlarda görülmektedir. Germ hücre tümörlerinin kalanını nonseminomatoz histoloji (embriyonal karsinom, yolk sac tümörü, koryokarsinom, ve teratoma) oluşturmaktadır ve sıklıkla 30'lu yaşlarda görülmektedir [23]. Yapılan çalışmalar testis kanserinde çevresel faktörlerin tümör gelişimi üzerine etkisinin olabileceğini ileri sürmektedir [24]. Buna ek olarak birçok genetik mutasyonun hem sporadik hem de ailesel TGCT vakalarında TGCT oranlarını olumlu yönde etkilediği keşfedilmiştir [25]. TGCT oluşumu için en önemli risk faktörleri içerisinde kriptorşidizm, ailede TGCT öyküsü, Klinefelter Sendromu, spermatik ve testiküler disgenezi, testiküler atrofi, kasık fıtığı ve hidrosel yer almaktadır [26] [27]. Daha önce testis kanseri tanısı konmuş bir hastanın diğer testisinde ikinci bir kanser gelişme riski, %2-3'dür [28]. Hastaların yaklaşık %2'si testis kanseri olan bir aile üyesine sahiptir. TGCT ile infertilite arasındaki bağlantı tip II tümürlü hastalarda azalmış fertilitate ile kanıtlanmıştır. Görülen lezyonlar erkek üreme sağlığında azalma ve artan fertilitate problemlerinin göstergeleridir [29] [30]. Tip II TGCT'nin fonksiyonel olmayan gonositlerin seminifer tübülde yerleşimi sonucu geliştiği bilinmektedir [31]. TGCT'ye zemin hazırlayan risk faktörleri erkek fetal gelişiminde aktiftir [15]. Son 50 yılda testis kanserinin insidansı giderek artmaktadır [14]. Testis kanser hastalarının %80'i, kemoterapi ve cerrahi ile tedavi edilmektedir. Erken evredeki hastalarda ise tedavi oranı %100'e ulaşmaktadır. Fakat özellikle geç teşhis edilen %20 lik dilimdeki hastalar, günümüzde hala tedavi edilememektedir [32]. Son yıllarda testis tümöründe mortalitenin azalmasının nedenleri ilerlemiş evredeki hastalarda tedavi edici kemoterapinin bulunmuş olması, erken evrede hastalığın yakalanmasındaki artış ve nonseminomlara göre seminomların daha fazla görülmesidir. Testis kanseri yüksek oranda tedavi edilebilir olmasına rağmen bu kanserin tüm aşamalarda uygun tedavinin uygulanması önemini korumaktadır.

Yerinde olmayan uygulamalar morbidite, mortalite ve tedavi yükünü arttırmaktadır [23]. Testis kanseri tedavi şekli tümörün tipine ve evresine bağlıdır. Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi olmak üzere üç temel tedavi yöntemi vardır. Cerrahi yöntem ile kanserli testisler vücuttan uzaklaştırılır. Radyoterapi ile kanser hücrelerinin hasar gömesi ve büyümesinin durdurulması sağlanmaktadır. Seminomalar radyasyona çok duyarlıdır ve cis-platinum'a dayalı kemoterapi ilaçlarına da duyarlılıkları bulunmaktadır [18]. Seminomalı hastaların cerrahi tedavileri sonrasında abdominal lenf nodları için radyoterapi uygulanır. Ancak non-seminomalar radyasyona duyarlı olmadıklarından bu tip kanserlerin tedavisinde kemoterapi kullanılır [33]. Anti-kanser ilaçlar, genellikle hastalığın vücudun başka kısımlarına metastaz yapması durumlarında tercih edilirler. Bu ilaçlar bazen tümörün cerrahi girişim öncesine kadar küçülmesini sağlamak amacıyla da kullanılabilirler [33]. Bleomisin, etoposid, ve Cisplatin (BEP) kombinasyonu, metastatik non-seminomatöz testis tümörlerinde tercih edilen en etkili tedavi kürüdür. Bleomisin, etoposid, ve cis-platinum'un beraberce kullanılması, iyileşme yüzdesini tedavi edilebilen hastalarda, %90'lara çekmiştir. Tedavi edilen testis kanserli hastaların, tedavi sonrası beklenen sağlıklı yaşam süreleri, oldukça uzundur [34]. Kanser hücreleri, kontrolsüz hücre gelişimi ve farklılaşmasını devam ettirebilmek için, yüksek düzeyde ATP'ye ihtiyaç duyarlar. Bu yüksek enerji ihtiyacı mitokondrial solunum zincirinin, ROS oluşumunu arttırmasına sebep olur [35]. Malnutrisyona bağlı enerji metabolizmasının değişmesi, pro-inflamatuar sitokinlerin aşırı üretimi, anti-neoplastik ilaçların kullanımı gibi birçok diğer mekanizma, kanser hastalarında oksidatif strese yol açar [36]. Kanser hücrelerinde oksidatif stresin, hücre proliferasyonunun stimülasyonunun, mutasyonların ve genetik instabilitenin artışı, antikanser ilaçlarına karşı hücresel duyarlılığın değişmesi gibi belirgin sonuçları olabilir. Diğer taraftan, oksidatif stresin artışı, kanser hücrelerini öldürmek için bir fırsat sağlayabilir.

## 2.2.Bleomisin

Bleomisin (BLM), 1699 da Umezewa tarafından antitümör özelliği keşfedilmiş glikopeptid yapısında bir antibiyotiktir. Bleomisin, orijinal olarak *Streptomyces verticillus* mantarından izole edilmiştir [37]. Bleomisin, germ hücreli tümörler, lenfomalar, kaposi sarkoma, servikal kanserler, baş ve boyun squamous hücreli kanserlerinin tedavisinde kullanılan doğal bir ilaçtır [38]. Derialtına, kasa veya kana kolayca verilebilmektedir. Kas içine enjeksiyondan sonra, pik kan değerleri 30-60 dakika içinde görülmektedir. Benzer dozajların kana enjeksiyonu ile en yüksek pik konsantrasyonları elde edilmektedir. İlacın yarı ömrü yaklaşık 2,5 saattir [39]. Bleomisin'in eliminasyonu başlıca böbreklerle olur. Bleomisin'in alınmasından 24 saat sonra, ilacın yaklaşık %60'ı değiştirilmemiş olarak atılır. Bleomisin, Bleomisin hidrolaz adlı bir enzimle deaktive edilir. Bu enzim başlıca karaciğer, dalak, kemik iliği ve bağırsakta bulunur. Bleomisin uygulanması bazen ölümcül yan etkiler meydana getirebilmektedir. Bleomisin'i inaktive eden enzim olan Bleomisin hidrolazın eksikliğinden dolayı Bleomisin toksisitesi, başlıca akciğer ve deride meydana gelir. Bleomisin'in alımından sonra ateş ve bazen de hipotansiyon görülebilmektedir [37]. Pulmoner toksisite, Bleomisin için doz sınırlayıcı bir yan etkidir ve bu yan etki genellikle kendini fizik muayenede öksürük, dispne, kuru inspiratuvar raller ve röntgende toraks infiltrasyonları olarak gösterir. 400 üniteden daha fazla doz alanlarda ve Bleomisin tedavisi öncesi mediastinal ya da göğüs

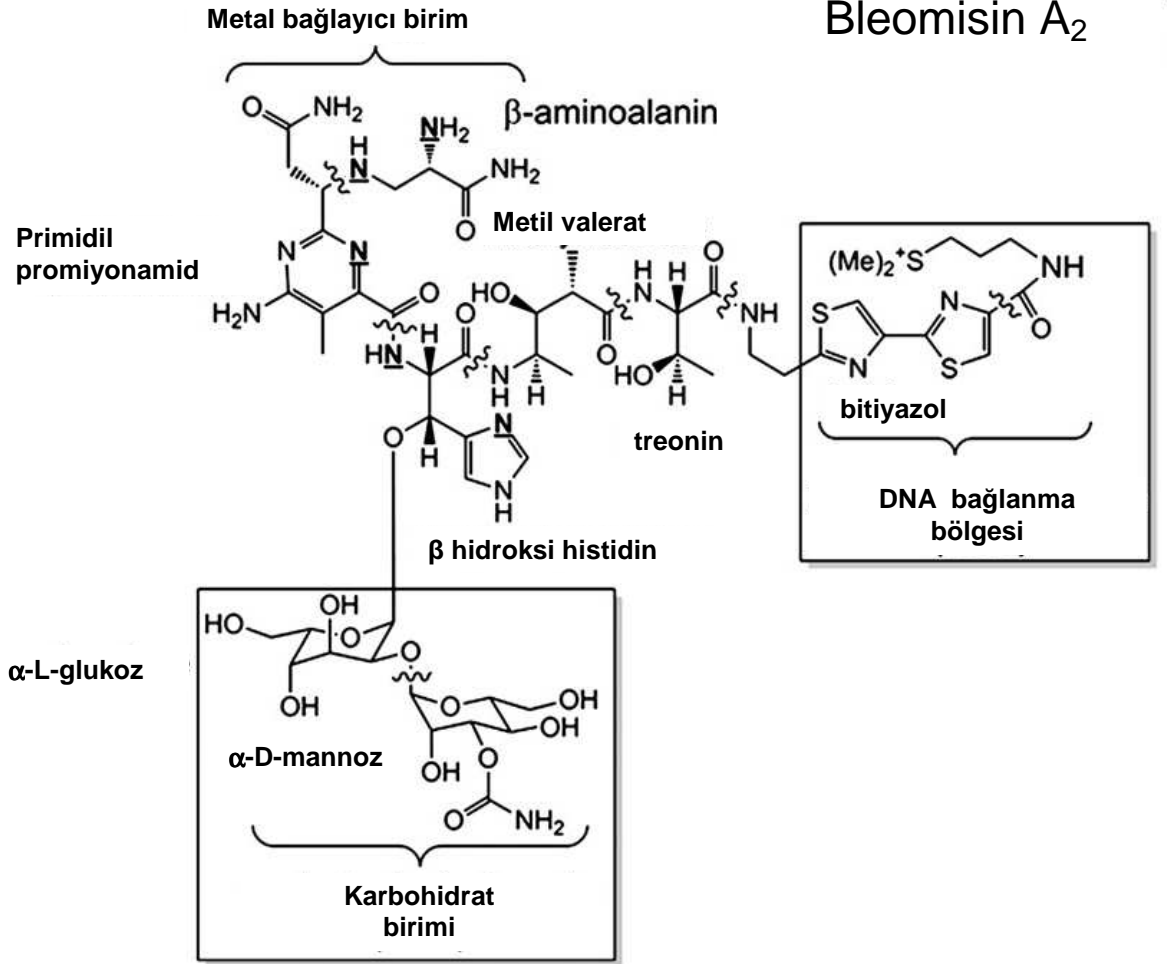
bölgesine radyoterapi uygulanmış olanlarda, pulmoner yan etkilerin görülme insidansı daha yüksektir. Nadir de olsa bazı olgularda pulmoner toksisite öldürücü olabilmektedir. Bleomisin, akciğerde pulmoner fibrozisi olumsuz etkiler, çünkü Bleomisin'i inaktive eden hidrolaz akciğerde yok denecek kadar azdır. Bu yüzden farelerde Bleomisin indüklü pulmoner fibrozis modeli, özellikle oksijen serbest radikallerinin indüklediği fibröz oluşum mekanizmasının incelenmesi için yardımcı bir araçtır [40]. Orta dereceli ateş, lokalize göğüs ağrısı ve gastrointestinal sistem şikayetleri gibi yan etkilere yol açan Bleomisin, plevra boşluğunda sınırlı emilimi nedeniyle hastalarda az oranda sistemik toksisiteye yol açar [41].

Bleomisin grubu ilaçlar 200'ün üzerinde yakın ilişkili bileşik içerirken, Bleomisin'in uygulanan formu olan Bleomisin başlıca A2 ve B2 formlarını içermektedir [42]. Bleomisin ailesi terminal amin kısmının birbirinden farklı olması ile ayrılır [43]. Demir bakır ve kobalt gibi birçok metalin, Bleomisin indüklü DNA kırılmasını desteklediği gösterilmiştir. Fakat demirin *in vivo* olarak etki gösteren başlıca metal olduğuna inanılmaktadır [44]. Bleomisin'in kimyasal yapısı Şekil 2.1'de gösterilmektedir. Bleomisin'in yapısının 4 ana bölgeden oluştuğu tespit edilmiştir. N-terminal birim: Bu birim metal bağlanmasından, oksijen aktivasyonundan ve alan selektif DNA kırılmasından sorumludur. Metilvalerat-treonin grubu. C-terminal birim. DNA'ya bağlanma afinitesini sağlayan fonksiyonel bir bitiyazol grubu içerir. Glukoz ve mannoz şekerlerini içeren bir disakkarit grubu. Disakkarit grubunun metal iyon bağlanması, hücre yüzeyinin tanınması ve bazı hücrelerde Bleomisin'in selektif birikimi üzerinde etkisinin olabileceği düşünülmektedir [42].

Bleomisin'ler, katyonik moleküllerdir ve hücre membranından Bleomisin bağlayıcı protein ile zayıfça bağlanarak hücre içine alınırlar. Alınan Bleomisin ya nükleusa transloke olur, ya da Bleomisin hidrolaz tarafından parçalanır. Bleomisin hidrolaz normal ve malign hücrelerde bulunan bir sistein proteazdır. Fakat akciğer ve deride çok az bulunmaktadır. Bleomisin, DNA'ya direkt bağlanarak ve tek ve çift zincir kırılmalarına yol açarak, büyüyen hücrelerde apoptozisi tetikler. Bu aktivite oksijen ve ferröz iyonuna bağlıdır [45].

Bleomisin'in antineoplastik etkisinin mekanizması, Bleomisin-demir kompleksinin, moleküler oksijeni, süperoksid ve hidroksil radikaline redüklemesi esasına dayanmaktadır. Bleomisin, süperoksid ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi reaktif oksijen türlerini üretir. Ayrıca Bleomisin, mitokondrilerin elektron transport sisteminde (ETS), elektron transportu sırasında yüksek düzeyde ROS ve süperoksid radikali oluşturur [9]. Oluşan bu radikaller DNA'ya atak yaparak zincir kırılmalarına yol açmaktadır ve bu da DNA-RNA-protein sentezinde (transkripsiyon ve translasyon basamakları) hasara sebep olarak anti-neoplastik etki gösterir [46]. Artmış hücresel oksidatif stres, hücrenin redoks durumunu değiştirir ve birçok reaksiyonu tetikler [47]. Oksidatif stres, geçici büyüme durması, adaptasyon, gen transkripsiyonu, sinyal iletim yollarının başlaması ve hasarlı DNA'nın onarılması gibi, birçok değişik biyolojik cevabı indükleyebilir [48] [49]. Oksijen serbest radikallerinin rolü, süperoksid dismutaz'ın, Bleomisin indüklü DNA hasarını önlediğini gösteren çalışmalarla desteklenmiştir. Kanser hücrelerinin oksidatif strese hücresel cevabı, hücrenin genetik geçmişine, içerdiği ROS tipine, oksidatif stresin yoğunluğuna ve süresine

bağlıdır [35] [50]. Yüksek oksidatif stresin hücreye zararlı olduğu bildirilmiştir, ancak düşük oksidatif stres düzeyleri hücrel proliferasyonu artırabilir. Bu da hücrel cevabın ROS'un dozuna bağlı olduğunu göstermektedir [47].



Şekil 2.1. Bleomisin'in Yapısı [51]

Bleomisin'in oluşturduğu değişimler sonucu ortama göç eden inflamatuvar hücrelerden birçok oksijen metabolitinin salındığı ve DNA kırıkları dahil bir çok yapı fonksiyonlarının ortaya çıktığı da son zamanlarda Bleomisin'in toksisitesi hakkında bildirilen gelişmelerdir. Bütün bu çalışmalara rağmen hasarın tam mekanizması tam olarak açıklanabilmiş değildir. Bleomisin, aynı zamanda hücre siklusunu etkileyen spesifik bir ilaçtır ve hücrelerin hücre siklusunun G2 fazında birikimine neden olur [40]. DNA kırılması için, DNA ile Bleomisin'in metal bağlayıcı birimi ve bitiazol kısmının etkileşimini gerektiren bir mekanizma önerilmiştir. Labil Fe(II)-BLM-O<sub>2</sub> kompleksinin, aktive edilmiş Bleomisin'e dönüşümü, DNA'yı hasara uğratar. Antikanser ilaçlarının hemen tümü, DNA sentezi üzerinden etki gösterir. Bu ilaçlar, hücreler bölünmedikleri sürece, dinlenme halindeki hücreleri öldürmezler. Kemoterapide kullanılan antikanser ilaçlarının etkinliğinde kısıtlayıcı faktör, aktif olarak bölünen hücre fraksiyonudur [52].

Antikanser ilaçlar, hücreler hızla proliferere olduklarında etkin oldukları için, hücre büyümesini yavaşlatan ya da durduran oksidatif stres, kemoterapinin etkinliğine engel olabilir. Bu da yavaş ilerleyen kanser türlerinin, kemoterapiye neden cevap vermediğini açıklamaktadır. Bunun yanında son çalışmalarda, Bleomisin'in RNA'nın alışılmamış 3 boyutlu yapısını yıktığını gösterilmiştir [43]. Deneysel çalışmalar, Bleomisin hassasiyetinin birçok nedeni olabileceğini göstermiştir. DNA tamir mekanizmasındaki bozukluklar, çift zincir kırılmalarının tamirinde gerekli olan genlerdeki mutasyonlarla ilişkilidir. Bu mutasyonlar aşırı hassasiyete yol açarlar. Çift zincir tamirine katkıda bulunan bir gen olan RAD21'in inhibisyonu, hücrelerin Bleomisin'e hassasiyetinin artmasına yol açar. Yapılan çalışmalarda, Bleomisin direncinin birçok nedeni ortaya çıkarılmıştır. Bu nedenler, Bleomisin hidrolaz aktivitesindeki artış, taşıyıcı yetersizliğinden dolayı ilacın hücreye alınmasındaki azalma, artmış DNA tamir kapasitesi ya da serbest radikallerin artmış detoksifikasyonu olabilir [53]. Bleomisin'in meydana getirdiği reaktif oksijen türleri lipid peroksidasyonuna da yol açmaktadır [54]. Günümüzde Bleomisin, çeşitli kanser tiplerinin (başlıca testis kanseri, lenfoma ve yassı hücreli kanser) tedavisinde, yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle testis kanserinin tedavisinde, Bleomisin, kemoterapinin indüksiyonunda kullanılan en önemli temel ilaçtır.

### 2.3. N-Asetil Sistein

N-asetil-L-sistein (NAC), doğal bir aminoasit olan L-sisteinin N-asetillenmiş türevidir. Sistein antioksidan etkisi olan birkaç aminoasitten biridir. NAC karaciğerde metabolize olur ve yarılanma ömrü 2-6 saattir. Tiyol içeren bir antioksidan olan NAC, glutatyon sentezi için sistein kaynağıdır. NAC canlı organizmalardan üretildiğinden ve doğal sülfür içeren amino asit türevidiğinden güçlü bir antioksidan olarak kabul edilmektedir [55]. Endojen olarak yapılabilen ve besinlerde bulunan NAC, serbest radikalleri temizleyebilen sülfidril gruplarına sahip olmasından dolayı antioksidan olarak *in vivo* ve *in vitro* olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Detoksifikasyonda rol oynadıkları gibi, oksidatif strese karşı hücreyi ve komponentlerini korurlar. Non-enzimatik endojen antioksidanların en önemlilerinden biri glutatyon (GSH)'dur [56]. Glutatyon, sistein içeren bir tripeptid olup glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. Glutatyon hücrelerde en çok bulunan protein dışı endojen tiyoldür. Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında disülfid ve sülfidril grupları arasındaki karşılıklı dönüşümler, hücresel hasara neden olmadan önce hücreden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi yok etmek için kullanılır. Bu karşılıklı dönüşümler, sülfür içeren bileşik GSH'ı redükte ve okside ederek sağlanır. Doku GSH düzeyi sadece senteze katılan enzimler tarafından düzenlenmez, tiyol içeren aminoasitlerin yeterince olması da oldukça önemlidir [57] [58]. NAC hücresel redükte GSH konsantrasyonunu arttırarak doğal antioksidan savunmayı güçlendirir. NAC, detoksifikasyonda (ağır metaller, asetaminofen içeren ilaçlar, herbisitler, CCl<sub>4</sub> ve ürethane içeren çevresel temizleyiciler, aflatoksin içeren organizmalar), akciğer hastalıklarının tedavisinde mukolitik ve antioksidan özelliğinden dolayı, kanser tedavisinde, AIDS tedavisinde ve kardiyovasküler alanda lipoprotein a düzeyinin azaltılmasında kullanılabilir [56]. N-Asetil-L-sistein'in kanser tedavisindeki yararlı etkilerinin vurgulandığı birçok yayın bulunmaktadır. Ancak buna zıt olarak, NAC' nin Cisplatin ve Doxorubicin ile kullanımının kanser tedavisi sırasında negatif etkileri olduğu bildirilmiştir [59] [60] [61]. NAC; uyarılmış insan T hücrelerinde

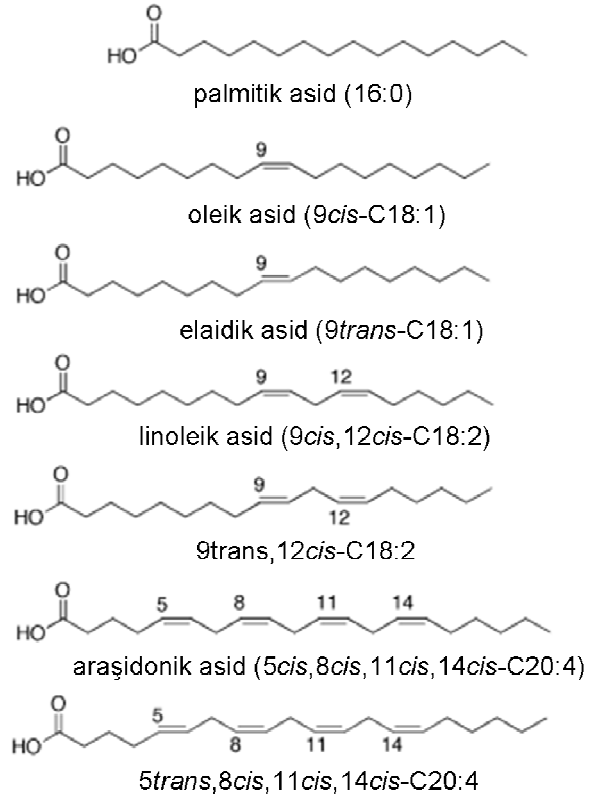
membran TNF alfa ve TNF-R ekspresyonunu arttırır. NAC, TNF-alfa ve TNF-RII ekspresyonunu hem transkripsiyon öncesi hem de transkripsiyon sonrası seviyelerini ayarlar. NAC hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamda T hücrelerinin antitümör aktivitesini arttırır. Bu özelliklerinden dolayı NAC, TNF alfa duyarlı kanser hücrelerine uygulanmasıyla antitümör potansiyeline sahiptir [62]. Kanser hastalarında antioksidan alınımının uygun olmadığı durumlar olabilir, fakat bu konu oldukça komplekstir. Birçok kemoterapötik ilaç serbest radikal oluşturur, ancak bu ilaçların, antikanser etkileri sadece serbest radikaller üzerinden değildir. Antioksidanların, kemoterapötik ajanların etkisini arttırdığına ve toksik yan etkilerini azalttığına dair pek çok yayın mevcuttur [63] [64] [65] [66] [67]. Antikanser ilaçlar uygulandığında, oluşan ROS'un tedavinin etkinliğini azaltabileceği iddia edilmektedir [9] [64] [68]. Oksidatif stres, antineoplastik ajanların, kanser hücreleri üzerinde optimal sitotoksik etkilerini göstermesi için gerekli hücresel süreçle etkileşebilir. Orta düzeydeki oksidatif stresin, antikanser ilaçlarının sitotoksik etkilerini azalttığı gösterilmiştir [9] [64]. Antineoplastik ajanların oluşturduğu yan etkilerin, antioksidanlarca önlediği gösterilmiştir. Antioksidan uygulaması, kemoterapinin yan etkileri azaltabilir ve terapiye cevabı güçlendirebilir [9]. Antioksidanların, kanser tedavisindeki etkilerini araştıran klinik çalışmalar sınırlı olmasına rağmen, bazı deneysel çalışmalarda antioksidan vitaminlerin, sadece kanser hücrelerinde selektif olarak apoptozisi indüklediği, anjiyogenez ve metastatik yayılmayı önledikleri bildirilmiştir. Bu bulgular, antioksidanların kanser tedavisinde yardımcı (adjuvant) rol oynayabileceğini düşündürmektedir [52]. Antioksidanların kanser tedavisindeki etkinliği, kullanılan ilaca bağlıdır. Bütün tedavilerde, kemoterapötik ilaçların etki mekanizması serbest radikallere bağlı olmasa bile, antioksidanlar normal hücreleri korumaktadır. Antioksidanlar, kanser hastalarında serbest radikal oluşturan sitokinlerin toksik etkilerinden normal dokuları korurlar [52]. NAC, toksisiteyi azalttığı için birkaç kemoterapi ajanıyla da uygulanmıştır [69]. İki ayrı *in vitro* çalışmasında, NAC cisplatinin sitotoksik aktivitesi inhibe etmiştir [70] [71]. Kötü huylu glioma insan hücrelerinde yapılan bir çalışmada antioksidanlar Cisplatin'li hücre kültürlerinde keskin sitotoksik ve kolojenik hücre ölümünü önlemiştir [70]. Yapılan *in vitro* çalışmalarda antioksidan tedavisi ile Bleomisin'e bağlı DNA ve hücre hasarının inhibe olduğu gösterilmiştir [72] [73]. Lipid membranlar, ROS hasarına karşı hassastırlar. Bleomisin toksisitesi, otokatalitik bir mekanizma ile hücresel membranların hasarına yol açan lipid peroksidasyonu ile ilişkilidir ve membran yıkımı toksik, reaktif metabolitlerin üretimi ve hücre ölümüne yol açabilir. Yapılan çalışmalarda Bleomisin'in bir antioksidan olan vitamin E ile farklı dokularda kombine uygulamalarının lipid peroksidasyonu artışını önemli oranda azalttığı literatürde mevcuttur [74]. Bir diğer çalışmada ise Bleomisin'in neden olduğu akciğer hasarında ROS ve nitrojen türlerinin ilişkisi bilindiğinden beri Ambroksol ve NAC gibi antioksidanlar Bleomisin'in indüklediği akciğer hasarını önlemek için kullanılmıştır [40] [75] [76].

Ratlarda Bleomisin indüklü akciğer hasarında, NAC uygulanmasının, nötrofil birikiminin önlenmesinde ve inflamatuvar olayların baskılanmasında rol oynadığı bildirilmiştir [77] [78]. Farelerde, Bleomisin'in indüklediği akciğer hasarında, NAC uygulanmasının, kemokin ve lipid hidroperoksid oluşumunu baskılayarak akut pulmoner inflamasyonu baskıladığı ve akciğer fibrozisini önlediği gözlenmiştir. Bleomisin'in uygulandığı rat modellerinde, NAC pulmoner lezyonları ve mukus

hipersekrezyonunu azaltmıştır [79]. Yapılan bir başka çalışmada erdosteine ve NAC'ın benzer antioksidan özelliklere sahip olduğu ve Bleomisin indüklü akciğer fibrozisini önlediği vurgulanmıştır [80]. Oral NAC'ın, kolon kanser hücrelerinde oxaliplatin kemoterapisinin indüklediği nöropati insidansını düşürdüğü bildirilmiştir [81]. Bach ve arkadaşları NAC'ın farelerde kolorektal kanser ksenograftlarında, 5-fluorourasil (5-FU) aktivitesini arttırdığını bulmuşlardır [82]. NAC, özofagusun squamoz hücre kanserinde kullanılan Cisplatin tedavisinin yol açtığı akut renal yetmezliği düzeltmiştir [83]. NAC, NF-κB inhibe ederek prostat kanser hücrelerinde, Cisplatin ve etopozidin etkisini arttırmıştır [84]. NAC'nin sistemik ve mukozal toksisitesinin düşük olduğu ve işitme nöronları ile saç hücrelerini, Cisplatin'in toksik etkisinden koruduğu bildirilmiştir [85]. Ozben ve grubu tarafından yapılan çalışmalarda, doksorubisin ve vinkristin uygulanan insan embriyonik böbrek (HEK293) hücrelerinde ve bu hücrelerin MRP<sub>1</sub> ile enfekte edilmiş olanlarında (293MRP), NAC'ın ilaçlara direnci ve dolayısı ile hücre canlılığını arttırdığı gösterilmiştir. NAC, bu etkisini, GSH düzeylerini artırarak göstermiştir. GSH sentezinin, L-butionin-(s,R)-sulfoksimin (BSO) tarafından inhibisyonunu takiben her iki hücrede, Doksorubisin ve Vinkristin direnci kaybolmuştur [86] [11]. Çalışmamızda güçlü bir antioksidan olan NAC'ın yüksek miktarda reaktif oksijen türleri meydana getirerek anti-tümöral etkinlik gösteren Bleomisin'in membran lipid profili üzerinde meydana getirdiği değişimler üzerine etkileri araştırılmıştır.

#### 2.4. Yağ Asitleri

Yağ asitleri (Fatty asid, FA) alifatik monokarboksilik asitleri tanımlamaktadır. Yağ asitleri yağlardan hidroliz ile serbest kalabilir [87] [88]. Yağ asitleri enerji üretimi, membran yapısı, immün hücre regülasyonu, hücre sinyalizasyonu, gen ekspresyonu ve regülasyonu gibi çok yönlü ve esansiyel hücresel role sahiptir [89] [90] [91] [92]. Çift bağ içermeyen yağ asitleri “doymuş”, “sature” (SFA) (ör. palmitik asid 16:0, araşidik asid 20:0), çift bağ içeren yağ asitleri “doymamış”, “unsature” olarak isimlendirilir [93] [92]. Zincirde bir çift bağ bulunduğu tekli doymamış yağ asidi (monoansature yağ asidi, MUFA) birden fazla çift bağ bulunduğu çoklu doymamış yağ asidi (poliunsature yağ asidi, PUFA) olarak adlandırılır. MUFA ve PUFA örneklerinin yapısı ortak isimleri, çift bağın pozisyon ve geometrisini (ör. 9cis ya da 9trans) tanımlayan kısaltmaları ile karbon zincirinin uzunluğu ve doymamış bağların toplam sayısı (C18:1) Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.2.** Doymuş, Tekli Doymamış ve Çoklu Doymamış Yağ Asidi Örnekleri

MUFA çeşitli hayvan ve bitki yağlarında doğal olarak bulunur ve SFA biyotransformasyonu ile elde edilebilir [94]. MUFA grubu omega 9 ( $\omega_9$  ya da n-9) ailesinden oleik asid (18:1) ile temsil edilir. 18 karbon ve 9. pozisyondaki (*aka*  $\Delta_9$ ; -COOH karboksilik grubu/ $\alpha$ -karbon'dan itibaren çift bağa en yakın karbon atomunun numarasını göstermektedir) *cis* konfigürasyonunda çift bağın zincir oluşturması ile meydana gelir. PUFA grubu ise 2 ana gruba ayrılır. (1) omega-3: linolenic asid 18:3, EPA 20:5 ya da DHA 22:6 (2) omega-6 linoleik asid 18:2 ya da araşidonik asid 20:4. İsimlendirme karboksil grubundan başlanarak omega-3 için 3 ya da omega-6 için 6 karbon uzaklıktaki çift bağa göre yapılır. Linolenik asid ve linoleik asid insanlar için esansiyeldir, sentezlenemez, SFA ve MUFA biyotransformasyonu ile meydana getirilemezler. Bu nedenle tercihen 1/5 oranında sebzelerden alınmaları gerekmektedir. Başarılı zincir uzama (elongasyon) ve desatürasyonlar ile PUFA'lar uzun doymamış yağ asidi zincirlerine çevrilebilir (ör. linolenik asid 18:3 EPA 20:5'ya, EPA da DHA 22:6'ya çevrilebilir). Doymamış bir yağ asidini yazmak için biyokimya, kimya ve fizyolojiye adapte birçok yol bulunmaktadır [95] [96]. Kimya terminolojisinde karbon atomları karboksil grubundan (-COOH) itibaren sayılır. Karboksil grubuna yakın olan çift bağ vurgulanır (gösterim şekli- $\Delta$ ) [95]. Ancak 1964 yılında Holman RT tarafından doymamış yağ asidlerinin biyokimya ve fizyoloji terminolojisinde adlandırılmaları için "omega nomenklatür" adlı yeni bir numaralandırma sistemi öne sürülmüştür. Bu numaralandırma sisteminde karbon atomları metil karbonundan (-CH<sub>3</sub>) itibaren sayılır.  $\omega_x$  (ör.  $\omega_3$ ) ya da n-x (n total karbon sayısı, x distal çift bağın pozisyonu) [96]. Örneğin linoleik asid (*aka cis*-9,



cis-12-oktadekadienoik asid) 18:2 9c, 12c; 18:2 Δ9, 12 ya da 18:2 (n-6) ya da 18:2 ω-6 olarak yazılabilir [93].

## 2.5. Membran Lipidleri

Plazma membranı ya da sitozolik membran olarak da bilinen hücre membranı; hücre içi ile dış ortamı ayıran biyolojik bir membrandır [97]. Hücre membranı gömülü proteinler ile birlikte fosfolipid çift tabakasından oluşur. Bu tabaka bütün membranların temel yapısal birimidir. Fosfolipidler amfipatiktirler, suda çözünen hidrofilik baş grupları intraselüler ve ekstraselüler yüzey ile ilişkili iken hidrofobik kuyruk kısımları kendilerini çevreleyen polar sıvıdan izole edilmiş haldedir. Bu yapı küresel lipid çift tabakasını (bilayer) meydana getirir. Van der Waals, elektrostatik, hidrojen bağları ve nonkovalent etkileşimler lipid çift tabakasının oluşumuna katkıda bulunur. Hidrofobik etkileşimler lipid çift tabakasının oluşumunda en büyük güce sahiptir. Lipidler suda çözünmeyen yapıya sahip moleküllerdir. Bu moleküllerin yapısal, fonksiyonel ve sinyal iletiminde çok önemli biyolojik rolleri bulunmaktadır [98]. Yaşayan organizmalarda lipidlerin dinamik olduklarının gözlenmesi sadece yapısal ve fonksiyonel rolleri olmadığını, bunların dışında *in vivo* transformasyonlar ve modifikasyonlara uğradıklarını ve bunun biyolojik sonuçlarını da göstermektedir [99]. Lipid çift tabakası genellikle iyon ve polar moleküllere geçirgen değildir. Lipid çift tabakasının hidrofilik baş ve hidrofobik kuyruk düzenlenmesi çözünmüş polar maddelerin (amino asitler, nükleik asitler, karbohidratlar, proteinler ve iyonlar) membran boyunca difüze olmasını engellerken hidrofobik moleküllerin pasif difüzyonuna izin verir. Hücre; porlar, kanallar ve kapılar gibi transmembran protein kompleksleri aracılığı ile bu maddelerin hareketini kontrol eder. Hücre membranı fosfolipidler, glikolipidler ve sterollerden oluşan üç sınıf amfipatik lipidi içerir. Her birinin miktarı hücre tipine bağlı olmakla beraber en bol olanı fosfolipidlerdir [100]. Fosfolipidlerdeki ve glikolipidlerdeki yağ zincirleri genellikle 16 ve 20 arasında karbon atomu içerirler. 16 ve 18 karbonlu yağ asitleri en fazladır.

Yağ asidlerinin uzunluğu ve doymamışlık derecesi membran akışkanlığında derin etkiye sahiptir [101] [102]. Uzun zincirli doymuş yağ asitleri membranların jel fazdan sıvı faza geçiş erime sıcaklığını yükseltirken, kısa zincirli ya da cis-doymamış yağ asitleri erime noktasını düşürmektedir. Yağ asidlerinin membran lipid yapısında neden olduğu hasar membran akışkanlığında, faz davranışında, permabilitede, membran füzyonunda, lateral basınç ve flip-flop dinamiklerinde meydana gelen değişimlere bağlıdır.

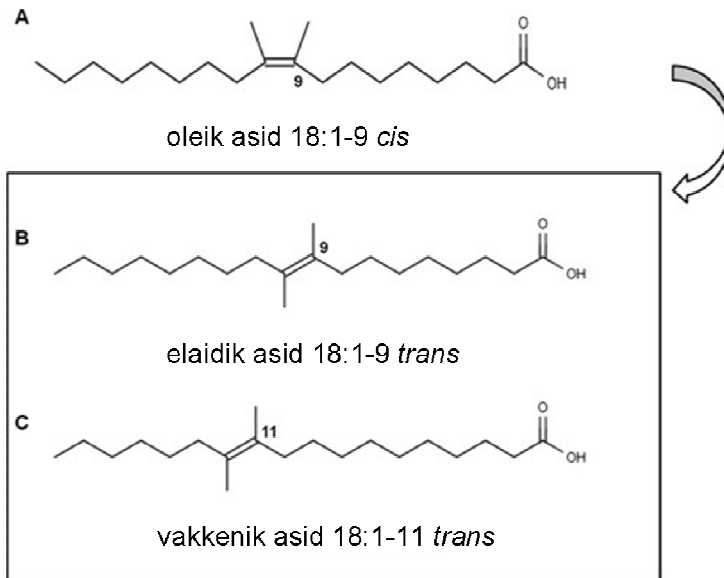
Doymamış lipidler bükülme noktalarına sahip oldukları için yağ asidlerinin sıkıca paketlenmesini önlerler bu da erime noktasının düşmesine ve membran akışkanlığının artmasına neden olur. Bazı organizmalar lipid kompozisyonlarını değiştirerek hücre membranlarının akışkanlığını düzenleyebilir buna "homeoviscous adaptasyon" adı verilir. Membran bütünlüğü hidrofobik kuyrukların non-kovalent etkileşimleri aracılığı ile bir arada tutulur. Ancak yapı rijidçe sabit değildir. Fizyolojik koşullarda hücre membranda fosfolipid molekülleri likid kristal durumdadır. Bu da lipid moleküllerinin hızla difüze olabildiğini ve buldukları tabaka boyunca lateral difüzyon yapabildiklerini göstermektedir. Ancak membran çift tabakası üzerinde fosfolipid moleküllerinin hücre içi ve hücre dışı arasında

değişimi dakikalar alan bir süreçtir. Yağ asidlerinin membranlar içerisine yerleşimi yaklaşık 3 dakika sürmektedir [103]. Lipid raftlar ve caveola hücre membranında kolesterolden zengin mikrodoman örnekleridir.

Yağ asidlerinin insan sağlığı ile olan ilişkileri büyük ilgi çekmektedir. Son yıllarda negatif kardiyovasküler etkilerinden dolayı doymuş ve trans yağ asidi alımı azaltılırken kardiyokoruyucu etkilerinden dolayı MUFA ve PUFA arttırılması beslenme önerilerinde yer almaktadır [104]. Oleik asid (OA) kan basıncının düşürülmesi ve düşük hipertansiyon insidansı ile ilişkili iken, dokosaheksaenoik asid (DHA) ve eikosapentaenoik asid (EPA) kardiyovasküler hastalık ve kansere karşı koruyucudur. Omega-6 PUFA, gama linolenik asid ( $\gamma$ -LNA) ise anti-inflamatuar özelliklere sahip olması ile bilinir. Değişen serbest yağ asidi seviyeleri patolojik durum, obezite, hipertansiyon, diabet, koroner kalp hastalığı, ateroskleroz ve kanser ile ilişkilidir. Doymuş yağ asidlerinin yüksek seviyeleri ile düşük PUFA miktarının hastalıklar ile ilişkili olduğu gözlenmiştir.

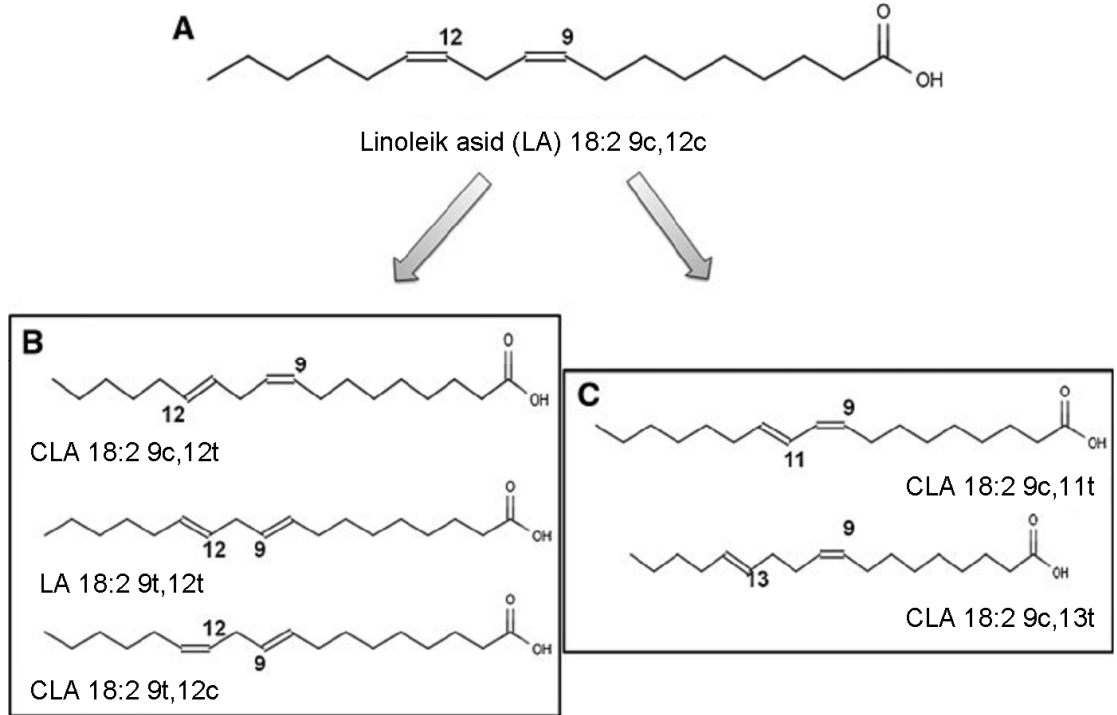
## 2.6. Trans Yağ Asidlerinin Tanımlanması ve Özellikleri

Doğal olarak meydana gelen yağ asidleri genelde cis konfigürasyonundadırlar. Bazı koşullar altında (parsiyal katalitik hidrojenasyon ya da enzimatik hidrojenasyon) yağ asidlerinde bulunan çift bağlar cis (Z)'den trans (E) konfigürasyonuna geçebilir (geometrik izomerizasyon) ya da karbon zincirinde diğer pozisyonlara yer değiştirebilir [93]. Cis konfigürasyonunda iki hidrojen atomu çift bağın bulunduğu karbon zincirinin aynı tarafındadır. Trans konfigürasyonunda ise iki hidrojen atomu birbirlerine diagonal olarak ters taraftadırlar ve karbon zincirinin düzleşmesine neden olur. Oleik asid (18:1) hem geometrik trans izomeri elaidik asid (18:1 9t) ya da pozisyonel trans izomeri vakkenik asid (18:1 11t) olarak bulunabilir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Oleik asid (*aka cis*- $\Delta^9$ -Oktadekenoik asid,  $C_{18}H_{34}O_2$  ya da 18:1-9c) izomerleri

Elaidik asid (18:1 9t) parsiyal olarak hidrojenlenmiş ürünlerde (margarin gibi endüstriyel ürünler) bolca bulunur. Vakkenik asid (18:1 11t) biyohidrojenlenmiş günlük ürünlerde (süt gibi doğal yağ ürünleri) görülür [105]. PUFA'lar çift bağlarının trans ya da cis/trans konfigürasyonunda bulunabilmesinden dolayı daha komplekslerdir. Linoleik asid (18:2-9c, 12c) cis konfigürasyonundan üç muhtemel geometrik izomeri olan 18:2 9c, 12t; 18:2 9t, 12c ya da 18:2 9t, 12t dönüşebileceği gibi iki olası pozisyonel izomeri olan 18:2 9c, 13t ya da 18:2 9c, 11t halinde de bulunabilir [105] (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Linoleik Asid İzomerleri (aka cis- $\Delta$ 9, cis-D12- Oktadekenoik asid,  $C_{18}H_{32}O_2$ , 18:2-9c, 12c)

Doğal konjuge linoleik asid (CLA), konjuge oktadekadienoik geometrik ve pozisyonel izomerlerinin ortak adıdır. 18:2 9c, 11t linoleik asid'in mikrobiyal biyohidrojenasyonu sırasında meydana gelen ana izomerdir. Endüstriyel üretimde 9c, 11t ve 10t, 12c izomerleri ana bileşenlerdir. CLA birçok üründe doğal olarak düşük düzeyde meydana gelebilir. Geviş getirenlerin et ve günlük ürünlerinde en yüksek total yağın %0.5'i kadardır. CLA; endüstride linoleik asidin (ör. ayçiçeği yağından) alkalik izomerizasyonu ile de üretilebilir ve ticari CLA olarak bahsedilir [106]. CLA makul dozlarda sağlığa olan pozitif etkilerinden dolayı alınmasına dikkat edilmesi gereken bir yağ asididir [106]. Yağ asitlerinin fiziksel-kimyasal özellikleri sağlık ve endüstriyel uygulamalarda (endüstriyel yağların hazırlanması) daha ileri sonuçlara sahiptir. Daha rijit karbon (açıl) zincirine sahip olmalarının yanı sıra TFA'ler cis yağ asitlerinden polariteleri ve daha yüksek erime noktaları ile ayrılırlar [107]. Oleik asid 18:1 9c 4 C<sup>0</sup>'de erirken trans izomerleri olan elaidik asid 18:1 9t 42-44 C<sup>0</sup> ve vakkenik asid 18:1 11t 44-45 C<sup>0</sup>'de erir [107].

## 2.7. Trans yağ asidlerinin kaynağı

TFA'ler farklı kaynaklardan gelebilir: doğal olan (biyohidrojenasyon), endüstriyel olan (katalitik hidrojenasyon) ve teknolojik/domestik aşırı ısı uygulamaları ve serbest radikallerin etkileri ile meydana gelen izomerler.

### 2.7.1. Biyohidrojenasyon

Cis yağ asidlerin TFA'lere dönüşümü hayvanların (ör. İnek, keçi) rümeninde bulunan bakteriyel flora (*aka* microbiome) tarafından enzimatik transformasyonundan kaynaklanır [108]. Aynı zamanda memelilerde meme  $\Delta 9$ -desaturase aktivitesi aracılığı ile de üretilebilir [109] [110] [111]. Doğal TFA'ler et, süt ve süttten üretilen tereyağı, peynir vb. ürünlerde farklı miktarlarda (total yağın %10'una kadar) bulunabilir [108] [112]. İlgili TFA izomerlerinin miktarı 18:1'in %30-50'si aralığında vakkenik asid (18:1 11t) olarak belirtilir [108]. Bu kantitatif varyasyon hız, laktasyon derecesi, yaş ve memelilerin (ör. geviş getirenler) sezona bağlı beslenmelerine bağlıdır [113] [114].

### 2.7.2. Parsiyal Katalitik Hidrojenasyon

Hidrojenasyonun kimyası 19. yüzyılın sonlarında Nobel ödüllü Paul Sabatier ve Alman kimyager Wilhelm Normann tarafından geliştirilmiştir. Bu endüstriyel süreç bitkisel yağları katılaştırmak, oksidasyona hassasiyetlerini azaltmak ve tatlarını arttırmak için FA'lerin redüksiyonu ile ansatürasyonuna neden olur [115] [116]. Bitkisel yağlar; margarin ve "shortenings" adı verilen yemek pişirmede, çikolata, kek ve pizza [117] [118] gibi ürünlerin üretiminde kullanılan anhidroz yağ ürünlerini üretmek için sıklıkla zirai-endüstrilerde [119] [120] [121] işleme tabi tutulur. Margarinlerdeki TFA miktarı total yağın %1-2'sinden (yüksek kalitede margarin) %60'ına (düşük kalitede margarin) kadar çeşitlilik gösterir [117]. Endüstriyel TFA'ler özellikle oleik asid 18:1 izomerleri olan 18:1 9t (elaidik asid) ve 18:1 10t'dan meydana gelir ve 18:1'in %85-95'ini oluştururlar [119]. "Shortenings" üretimi için transesterifikasyon gibi bazı endüstriyel işlemlerin kullanımı bu ürünler ve türevlerinde TFA seviyelerinin düşmesine katkıda bulunur [55, 57, 58]. Ancak bazı kısmen hidrojenlenmiş bitkisel yağlarda TFA seviyeleri yine de çok yüksektir [6].

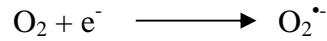
### 2.7.3. Aşırı Isı Uygulamaları

Teknolojik ısı uygulamaları (yağ rafinerisi sırasında deodorizasyon) ve evde yapılan işlemler (kızartma, barbekü ya da yüksek sıcaklıkta uzun süreli pişirme) TFA izomerlerinin oluşmasına yol açabilir [122] [123]. Çok yüksek sıcaklıklara maruz kalan yağlarda yüksek miktarda gama linoleik asid (18:2 9c, 12c) ve alfa-linolenik asid (18:3 9c, 12c, 15c) trans izomerleri oluşurken düşük miktarda da oleik asid (18:1 9c) trans izomerlerinin oluşumu gözlenir [123]. Isıya bağlı olarak oluşan TFA izomerlerinin miktarı ve doğası sıcaklığın derecesine, uygulama süresine ve ürünün kendisine (ör. süt, et, yağ) bağlıdır. Gama-linoleik asid (18:2 9t 12t) trans izomeri ürünlerin yüksek sıcaklıkta ısıtılması (200 C<sup>0</sup> de 15 dak) ya da tekrar kullanılması sonucunda bitkisel yağlarda (ör. fıstık, ayçiçeği yağı) sıklıkla bulunurken sütte az miktarda bulunur [123]. Oluşan izomerler düşük sıcaklıklarda 24 haftaya kadar stabilken (4-20 C<sup>0</sup>), gama-linoleik asid izomerizasyona alfa-linolenik asitten 12-14 kat daha az hassastır [124]. Aslında 220 C<sup>0</sup> de termal uygulamalardan kaynaklanan

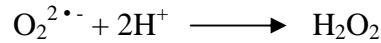
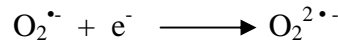
TFA'lerin total FA'lerin %1,3'ünü oluşturabileceği tahmin edilmiş fakat sıklıkla kullanılan 180 C<sup>0</sup>'de TFA'lerin %0,2 olduğu gösterilmiştir [125].

#### 2.7.4. Serbest Radikaller

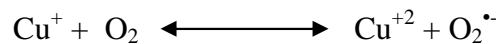
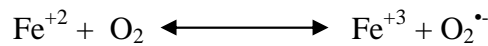
Moleküllerin dış yörüngelerinde biri diğerine zıt yönde hareket eden elektron çiftleri bulunmaktadır. Bu elektron çiftleri, molekülün kararlı kalmasını sağlar. Dış yörüngelerinde en az bir adet eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküle serbest radikal denir [126] [127] [128]. Serbest radikaller metabolizmanın yan ürünleri olarak veya belli bir amaca yönelik olarak (ör: fagositoz) hücre içerisinde sürekli üretilirler. Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur böylelikle kovalent bağın homolitik ayrılması ile radikal oluşumu gerçekleşir. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de eşleşmemiş elektron kalır. Bir molekül elektron kaybederek dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalması sonucu radikal formu oluşur. Radikal özelliği taşımayan moleküle bir elektron transferi ile dış orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşuyorsa bu tür indirgeme radikal oluşumuna neden olur [129]. Bir radikal, radikal olmayan bir moleküle reaksiyona girerse, başka bir serbest radikal oluşur. Bu özellik serbest radikallerin zincirleme reaksiyonlara girebilmelerine olanak sağlar [129]. Reaktif oksijen türleri Lipidler, DNA, karbohidratlar ve proteinler gibi biyolojik makro moleküllere hasar verebilme yeteneğine sahiptir. Bu oksijen metabolitleri ya hidroksil radikali (OH<sup>•</sup>), peroksil radikali (ROO<sup>•</sup>) gibi radikal ya da singlet oksijen, ONOO<sup>•</sup> ya da Hidrojen peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gibi reaktif radikal olmayan bileşiklerdir [130]. Süperoksit hücre içerisinde moleküler oksijenin redüksiyonu ile oluşan başlıca serbest radikaldir [131].



Süperoksit anyonu elektron fazlasını bir başka elektron alıcısına vererek tekrar moleküler oksijene (O<sub>2</sub>) oksitlenebilir. Ya da bir elektron daha alarak peroksil anyonunu (O<sub>2</sub><sup>2•-</sup>) oluşturur, bu da ortamdan iki proton alarak (H<sup>+</sup>) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumuna neden olur [132].

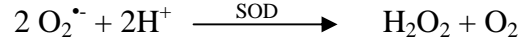


İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu O<sub>2</sub><sup>•-</sup> meydana getirebilir.

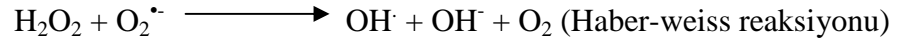


Geçiş metalleri iyonlarının oksijenle reaksiyonları geri dönüşümlü reaksiyonlardır. Süperoksit radikal anyonunun ondan meydana gelen diğer reaktif ara ürünlerin oluşumunda merkezi rol oynadığı görülür [133]. Süperoksit anyonu, hücre membranlarından kolay geçemediği için kendisi doğrudan zarar vermemektedir [134]. Süperoksitin asıl önemi, geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynağı

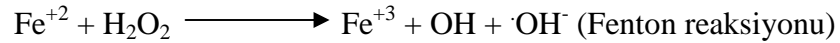
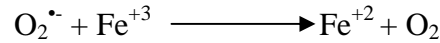
olmasıdır.  $\text{H}_2\text{O}_2$  üretimi SOD tarafından katalizlenen  $\text{O}_2^{\bullet-}$  dismutasyonu ile olmaktadır.



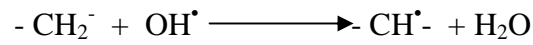
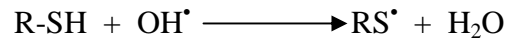
$\text{H}_2\text{O}_2$  düşük elektriksel yükü ve noniyonize özelliklerinden dolayı hücre membranlarından hızlı bir şekilde geçer. Geçiş grubu metal iyonlarının varlığında yüksek derecede reaktif serbest radikaller oluşur [134] [135]. Dış çevre de ısı, UV ışık, terapötik ilaçlar ve  $\alpha$ - ve  $\gamma$ - radyasyon gibi birçok kaynaktan ROS üretebilir [136]. Demir katalizli Haber-weiss reaksiyonu,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , askorbat, tiyoller ve diğer redüktanlar  $\text{Fe}^{+3}$ 'ü  $\text{Fe}^{+2}$ 'ye,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'yi etkili bir oksidan olan ve lipid oksidasyonuna neden olan  $\text{OH}^{\bullet}$ 'a indirgerler [131].



Haber-Weiss reaksiyonu genellikle fizyolojik durumlarda yavaştır. Fakat geçiş metalleri, metal şelatörler veya hemoproteinlerin varlığında bu reaksiyon hızlı oluşur. Bu durum Fenton reaksiyonu olarak tanımlanır. Biyolojik sistemlerde demir benzeri geçiş metalleri, demir içeren maddeler (transferrin, laktoferrin, hemogloblin) mevcuttur. Süperoksit radikali ferrik ( $\text{Fe}^{+3}$ ) demiri, ferröz ( $\text{Fe}^{+2}$ ) demire indirger. Bu sırada  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^{\bullet}$ 'a dönüşür [137].



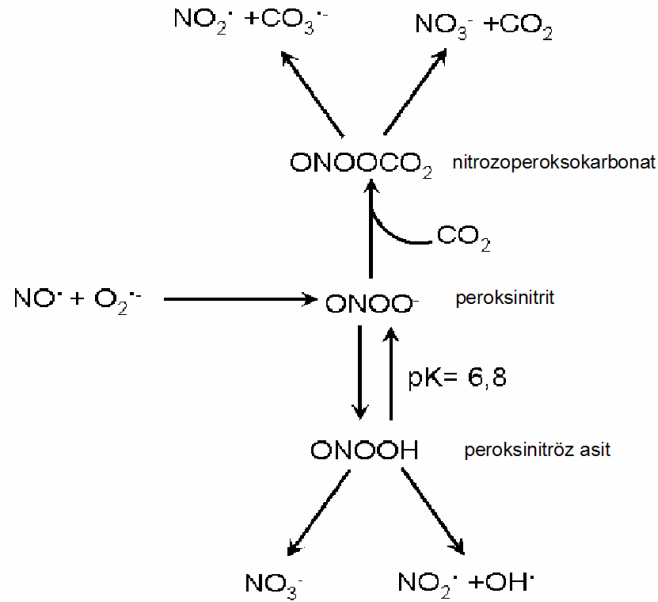
Hidroksil radikali en reaktif oksijen türevidir. Bu radikal yüksek reaktivitesinden dolayı oluştuğu yerde çevredeki hedef moleküller ile derhal reaksiyona girer. Hidroksil radikali oluştuğu yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri ( $\text{RS}^{\bullet}$ ), karbon merkezli organik radikaller ( $\text{R}^{\bullet}$ ), organik peroksitler ( $\text{RCOO}^{\bullet}$ ) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur.



Peroksil radikalleri, PUFA'dan hidrojen atomunun çıkarılması ile başlatılan lipid peroksidasyonu sırasında meydana getirilebilir [138]. Peroksil radikalleri biyolojik sistemlerde önemli difüzyon kabiliyetine sahip ve oldukça uzun ömürlü türevlerdir. Ayrıca lipid peroksidasyonunda oluşan ürünler aldehitlerdir [139]. Lipid peroksidasyonu  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  tarafından başlatılmadığında  $\text{OH}^{\bullet}$ , alkoksi radikalleri ( $\text{RO}^{\bullet}$ ) ve  $\text{ROO}^{\bullet}$  lipid peroksidasyonunun başlamasına yol açar [140]. Lipid peroksil radikalleri diğer lipitler, proteinler ve nükleik asitler ile reaksiyona girer böylece elektronların transferinin artmasına ve substratların oksidasyonuna sebep olur. Hücre membranları yapısal olarak oksidatif saldırıya oldukça hassas olan çok miktarda PUFA'dan oluşmuştur ve PUFA'da meydana gelen önemli değişiklikler; değişmiş membran akışkanlığı, geçirgenliği ve hücre metabolik disfonksiyon ile sonuçlanır [141].

Dokularda, oksidatif hasara karşı enzimatik ve nonenzimatik antioksidan mekanizmalar vardır. Peroksitler için detoksifiye sistemi Katalaz (CAT) ve Glutasyon (GSH) dur. CAT bir katalizör olarak demirin varlığında yüksek derecede bir reaktif  $\cdot\text{OH}$  (hidroksil radikali) oluşturarak  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'i yok edebilen antioksidan bir enzimdir. Glutasyon redoks siklusuna katılarak Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ile birlikte GSH,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve lipid peroksitleri toksik olmayan ürünlere dönüştürür. Bu yüzden ROS süpürücü etkiye sahip maddelerin testis fonksiyonlarını düzeltmesi muhtemeldir [142].

Süperoksit radikalının  $\text{NO}$ 'ya karşı afinitesi yüksektir. Nitrik oksit ve  $\text{O}_2^{\cdot-}$  arasındaki reaksiyon peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) adlı yeni bir molekülü meydana getirir [143]. Peroksinitrit oldukça reaktif bir moleküldür ve protein, lipid ve özellikle DNA'da yoğun hasara neden olabilir. Tiyol gruplarının oksidasyonu yoluyla direkt sitotoksik etki gösteren  $\text{ONOO}^-$ , çeşitli nitrojen oksit radikallerini ve  $\text{OH}\cdot$  oluşturarak dekompoze olabilir [143]. Nitrik oksitin metalloproteinler, protein sülfidriller ve oksijenden türeyen serbest radikaller ile reaksiyonu inflamasyon ve oksidatif strese aracılık etmesini sağlar [144]. Peroksinitritin konjuge asidi peroksinitröz asit ( $\text{ONOOH}$ ) iki yolla reaksiyon verir. İlk yol güçlü oksidan ara ürünler oluşturmaksızın nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) üretmesidir. İkinci yol ise güçlü bir oksidan olan, yağ asidi oksidasyonunu ve amino asit nitrasyonunu başlatabilen  $\text{OH}\cdot$  ve nitrojen dioksit ( $\text{NO}_2$ ) oluşturması [143]. Peroksinitrit reaktivitesi reaktif nitrozoperoksokarbonat ( $\text{ONOOCO}_2^-$ ) ara ürününün oluşumu nedeni ile  $\text{CO}_2$ 'den etkilenir. Sonuç olarak,  $\text{CO}_2$  hem  $\text{ONOO}^-$ 'i azalışını uyarır hem de moleküllerin  $\text{ONOO}^-$  aracılı nitrasyonunu 2 kata kadar artırır [145] (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Peroksinitrit Oluşumu ve Yıkılımları

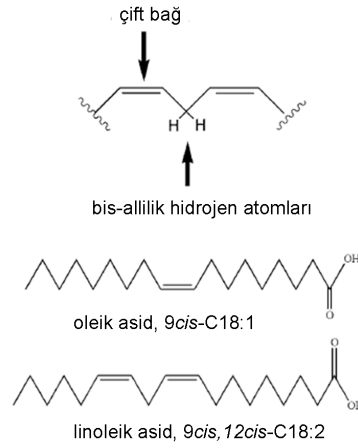
## 2.8. Serbest Radikallerin Lipidler Üzerine Olan Etkisi

Oksidatif stres sırasında üretilen ROS lipidlerin (hem hücrel membran lipidleri hem de dolaşımda bulunan lipoprotein molekülleri) peroksidasyonunu indükler ve oldukça reaktif aldehytlere meydana getirir [139]. Özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinde bulunan çift bağlar ROS atağı sonucu gelişen lipid peroksidasyonuna karşı hassastır. Oluşan son ürünler malondialdehit (MDA) ya da 4-hidroksinanenol (4-HNE) oksidatif strese patolojik moleküler süreçte iyi bilinen markırlardır [146]. 4-hidroksinanenol; konjuge çift bağlara bir hidrojen atomu ( $\text{OH}$ ,  $\text{HO}_2$ ) çıkarıp, çift bağ ( $\text{O}_2$ ) ekleyebilen reaktif türler için kolay bir hedef olan linoleik ve araşidonik asit gibi  $\omega$ -6 PUFA'dan türer [147]. Lipid peroksidasyonu MDA seviyelerinin tiyobarbitirik asit reaktif maddesinin (TBARS) kantitatif olarak ölçümü ile belirlenmesine rağmen TBARS, tiyobarbitirik asidin lipid olmayan parçalar ile reaksiyonundan dolayı membran lipid peroksidasyonunun spesifik olmayan bir markırı olarak düşünülmektedir [148]. Birçok yolak  $\text{ONOO}^-$  ve nitrojen dioksiti ( $\text{NO}_2$ ) içeren reaktif nitrojen türleri (RNS) tarafından lipid oksidasyonu ve nitrasyonunu artırır. Ansatüre yağ asitleri ve RNS arasındaki reaksiyonlar lipid oksidasyon ve nitrasyon ürün spektrumu meydana getirir [149].

Çift bağların serbest radikallere karşı olan reaktivitesi iyi bilinmektedir. Alil grubu  $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{R}$  yapısına sahip bir substituent'dir. Metilen köprüsüne ( $-\text{CH}_2-$ ) bağlı vinil grubundan ( $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ) meydana gelir. Doymuş karbon atomu üzerindeki kısım "alilik pozisyon" olarak adlandırılır. Alilik C-H bağları normal C-H bağlarından %15 daha zayıf ve reaktiftir. Bis-alilik pozisyonda; çift bağlar her iki yapıda da bulunur. 2 vinil grubuna bağlı  $\text{CH}_2$  grubuna bis-alilik (çift-alilik) ismi verilir. Çift alilik merkez üzerindeki C-H bağının bağ disosiasyon enerjisi alilik C-H bağından %10 daha azdır. Bu tür  $\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$  bağlantısı içeren bileşikler ör. linoleik asit türevleri otooksidasyona meyillidir (Şekil 2.6). Lipid peroksidasyonu bis-allylic pozisyonda gerçekleşir. Hidrojen atomunun uzaklaştırılması reaksiyon mekanizmasının başlangıç basamağıdır. Bu işlem süreci serbest radikal izomerizasyonu olarak adlandırılır. Unsatüre substrat 80:20 trans:cis oranına ulaştığında izomerik saflık kaybolur. Lipid peroksidasyonunun biyolojik ve medikal sonuçları bulunmaktadır. Serbest radikaller cis-trans çift bağ izomerizasyonuna neden olmaktadır.

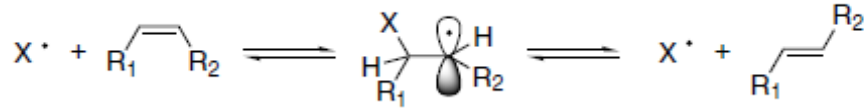
Ökaryot organizmalarda doymamış yağ asitleri cis konfigürasyonundadır. Araştırmalar, radikal stres sonucunda trans izomer oluşumunun gerçekleşebildiğini göstermiştir. Serbest radikaller cis-trans izomerizasyonuna yol açmakta ve bu izomerizasyon da biyolojik aktivite kaybına neden olmaktadır. Yapılan birçok çalışmada, serbest radikaller tarafından membran yağ asitlerinin izomerizasyonu, lipozomlar kullanılarak yapılan model çalışmaları ile aydınlatılmaya çalışılmıştır [150].





**Şekil 2.6.** Bis-allylic Pozisyon

Serbest radikaller çift bağlara karşı reaktivite göstererek cis ve trans pozisyonundaki çift bağların radikal ürünler oluşturmaya neden olabilmektedir. Bu süreç içerisinde çift bağın geometrisi değişmekte ve termodinamik açıdan daha stabil olan trans izomer oluşumu gözlenmektedir. Serbest radikal izomerizasyonu adı verilen bu olay kimyasal ve organik sentezlerde de kullanılmaktadır. Tiyil radikalleri (RS<sup>•</sup>) nedeni ile oluşan cis-trans izomerizasyonu etkili bir işlemdir (Şekil 2.7).

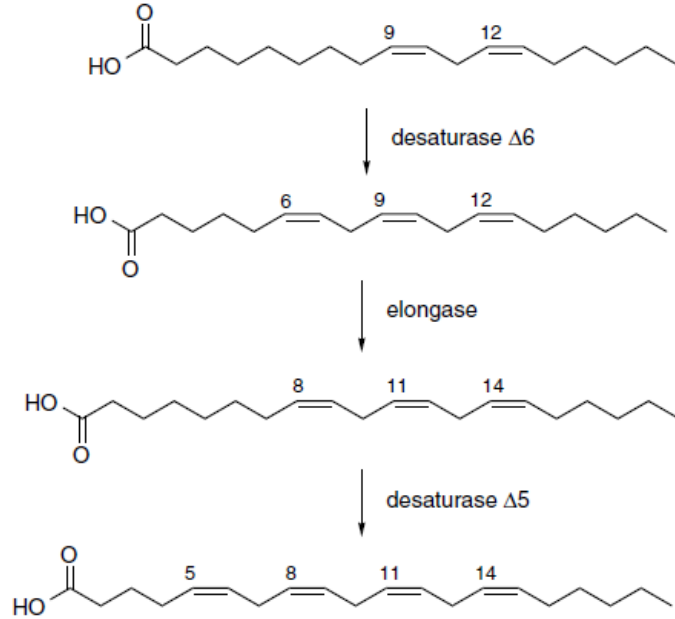


**Şekil 2.7.** cis-trans İzomerizasyonu Reaksiyon Mekanizması

Fakat NO<sub>2</sub><sup>•</sup> tarafından meydana getirilen cis-trans izomerizasyonu izomerize olan türler bakımından etkili değildir ve biyolojik ortamda bir rol oynamaz. ω-6 PUFA'lar olan metil-linoleat, γ-linolenat ve araşidonatın RS<sup>•</sup> tarafından cis-trans izomerizasyonu daha önce çalışılmıştır. İzomerizasyon birbirini takip eden basamaklar şeklinde gerçekleşir. Mono-trans oluşumunu di-trans oluşumu takip eder ve izomerik kompozisyon termodinamik stabilite ile regüle edilir. Yapılan lipozom çalışmaları membranın polar kısmına yakın çift bağların difüze olan tiyil radikal atağına karşı en fazla reaktiviteye sahip olduklarını göstermiştir [4]. Örneğin veziküllerde bulunan sahip olduğu 4 çift bağın 5 ve 8. pozisyonlarda bulunan 2 çift bağ transformasyon için tercih edilen araşidonik asid birimleri oleik ve linoleik asitten daha reaktiftir. Membran fosfolipidlerinde bulunan araşidonik asid birimleri radikal süreç aracılığı ile oluşan endojen trans izomerlerinin diyetle alınan eksojen trans izomerlerden ayrılmasında önemli bir göstergedir [151]. Sentezde öncül linoleik asitten araşidonik asid biyosentezinde çift bağ izomerizasyonunda eksojen ve endojen yolların etkileşimi Şekil 2.8'de gösterilmiştir. 11 ve 14. pozisyonundaki iki çift bağ (gıdaya bağlı olarak cis ya da trans olabilir) diyetle alınan linoleik asitten sağlanırken 5 ve 8. pozisyonlardaki iki çift bağ seçici olarak cis pozisyonunda unsatürasyon oluşturan desaturaz enzimlerince meydana getirilir.

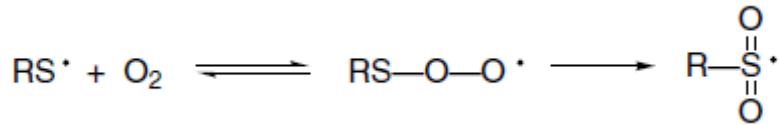
Araşidonik asidin 5 ve 8. pozisyonlarında bulunan çift bağlar membran fosfolipidlerinde saklanır ve membranlarda difüze olabilen tiyil radikallerince

izomerizasyona uğramadıkça sadece cis konfigürasyonuna sahip olabilir. Bu ω-6 yağ asidlerinin görüntülenmesi diyetle alınan trans öncüllerinin hücre membranlarına yerleşen trans yağ asidlerinin belirlendiği beslenme çalışmalarında da önemlidir.



Şekil 2.8. Enzimatik Yağ asidi Transformasyonları

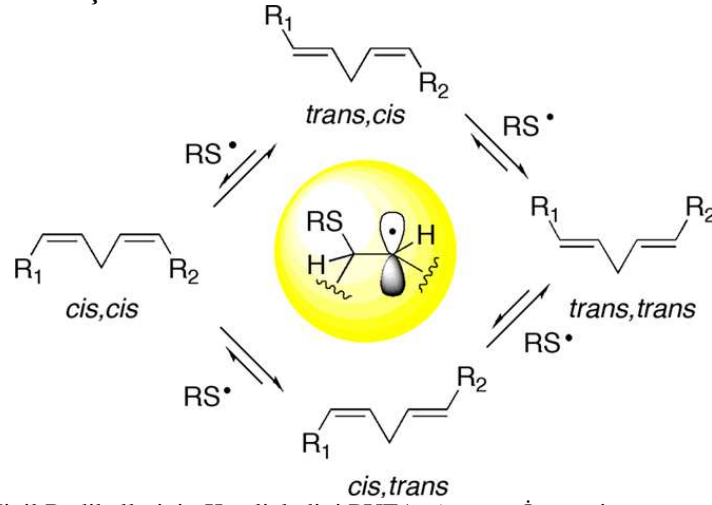
İyi oksijenlenen bir dokuda bulunandan çok az yüksek olan 0.2 mM moleküler oksijen varlığı tiyil radikalleri aracılı geometrik izomerizasyonun etkinliğini etkilenmez. Tiyil radikallerinin geri dönüşümlü olarak oksijene katıldığı ve sülfonil radikali meydana getirdiği iyi bilinmektedir (Şekil 2.9) [152]. Düşük C-H bağı disosiyasyon entalpisine sahip bis-allilik pozisyona sahip yağ asidlerinin RS• ile reaksiyonları güçlü eksotermik reaksiyonlardır. Sistein ve glutatyon çeşitli hasar yolları tarafından oluşturulan karbon-merkezli radikaller için etkili hidrojen vericileridir ve sisteinil (CyS•) ve glutatyonil (GS•) radikallerini verirler. Bu iki radikal bis-allilik pozisyonlar ile reaksiyona girer [153].



Şekil 2.9. Moleküler Oksijen Varlığında Tiyil Radikalleri

Tiyil radikallerinin %50'sinin bis-allilik hidrojeni kopardığı geri kalan RS•'in ise radikal ürün oluşturmak üzere çift bağa hidrojen eklediği gösterilmiştir ve moleküler oksijen bulunduğu zaman etkili bir şekilde karbon merkezli radikallerin temizlenmesini sağlamaktadır. Linoleik asid metil ester (9cis,12cis-C18:2; LAME) ile yapılan çalışmalar mono-trans ve di-trans izomerlerinin oluşumu ve kaybolması bu reaksiyonların basamaklar halinde olduğunu göstermiştir (Şekil 2.10) [154]. Yan reaksiyonların meydana geldiği ve konjuge dienleri içeren yan ürünlerin meydana geldiği gösterilmiştir. Bu ürünler tiyil radikallerini yakalayarak cis-trans izomerizasyonunda inhibitör gibi davranır. Bis-allilik pozisyonlardan hidrojen koparılması ve çift bağlara geri dönüşümlü olarak tiyil radikali eklenmesi arasındaki

yarışmalı yollardan dolayı reaksiyona giren reaktanların konsantrasyonu sonuç açısından büyük önem taşımaktadır.



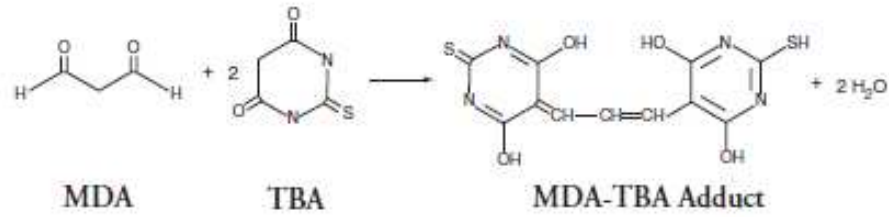
**Şekil 2.10.** Tiyil Radikallerinin Katalizlediği PUFA *cis-trans* İzomerizasyonu

Trigliseridlerde bulunan doymamış yağ asidi birimlerinin geometrik *trans* izomerlerine çevrilmesi trigliseride yeni karakteristik özellikler kazandırır. Fosfatidilkolin (PC) en yaygın bulunan fosfolipiddir. Üç karbonlu gliserol köprüsüne bağlı iki yağ asidi zinciri ile fosforil kolin birimi içerir. İki yağ asidi birimi gliserolün sn-1 ve sn-2 pozisyonlarında bağlı iken sn-3 pozisyonunda polar baş grupları bağlıdır. Organizmada önemli role sahip olan PC'de çift bağlar *cis* geometrisine sahiptir. Çift bağın geometrik özelliğinin değişmesi moleküler ve biyolojik sonuçları olan önemli bir olaydır. Tiyoller hidrojen atomu vererek ve radikal ara ürünleri yakalayarak etkili bir şekilde radikal kaskadını durdurabilirler. Ancak hidrojen atomu vermeleri sırasında tiyoller tiyil radikallerine (RS•) dönüşerek substratlarına saldırabilirler. Membranda sistein içeren proteinler bulunmaktadır. Fakat serbest sistein ve glutatyon membranda bulunmaz. Radikal stres aracılığı ile üretilen difüze olabilen tiyil radikallerinin membran doymamış lipidlerinin *cis-trans* izomerizasyonundan sorumlu oldukları düşünülmektedir. Ayrıca radikal hasarının nihayi gerçekleştiği bölge radikal atağının ilk başladığı bölgeden uzak olabilir. Hidrojen sülfid (H<sub>2</sub>S)'den türeyen radikaller (HS•) ve anyonlar (S<sup>•-</sup>, HSS<sup>•2-</sup> ve HSSH<sup>•-</sup>) da *cis-trans* izomerizasyonuna neden olabilirler [150].

### 2.9.8-izoprostan

İzoprostanlar; oksijen radikalleri ile doku fosfolipidlerinin oksidasyonu sonucu meydana gelen non-enzimatik orjinli eikozanoidlere ait bir ailedir (Şekil 2.11). Plazma ve ürede normal koşullarda gözlenebilirken oksidatif stres ile artabilirler. 8-izoprostanın (8-*iso* Prostaglandin F<sub>2α</sub>) biyolojik aktivitesinin olduğu gösterilmiştir. Güçlü bir pulmoner ve renal vazokonstriktördür [155] ve hepatorenal sendrom ve pulmoner oksijen toksisitesi nedeni olan mediatördür [156]. 8-İsoprostan antioksidan eksikliği ve oksidatif stres markeri olarak tanımlanmıştır [157]. 8-izoprostan seviyeleri ayrıca serum, plazma ve hücre örneklerinin sahip olduğu lipid içeriğinin de göstergesidir [158]. Sağlıklı gönüllülerden alınan plazma örneklerinde yaşla birlikte 8-izoprostan miktarının (40-100 pg/ml) arttığı gösterilmiştir [159].

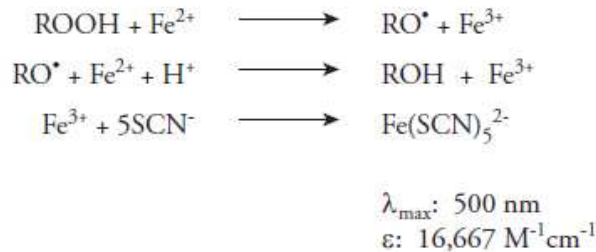




Şekil 2.12. MDA-TBA Ürününün Oluşumu

## 2.11.Lipid Hidroperoksid

Lipid peroksidasyonunun belirlenmesi patofizyolojik bozukluklarda oksidatif hasarın ölçülmesinde önemlidir [168] [169]. Lipid peroksidasyonu hem doymuş hem de doymamış lipidlerde büyük oranda reaktif ve stabil olmayan hidroperoksidlerin oluşumu ile sonuçlanır. Geleneksel lipid peroksidasyonu malondialdehit (MDA) ve PUFA hidroperoksidlerin yıkım ürünleri olan 4-hidroksinanenol (4-HNE) ölçülerek belirlenmektedir [170]. Hassas kolorimetrik ölçümler aldehitleri tayin etmek üzere geliştirilmiştir [139]. Ancak bu ölçümler non-spesifiktir ve genellikle lipid peroksidasyonunun yüksek olarak ölçülmesine yol açar. Bu ürünlerin lipid peroksidasyonunun indikatörü olarak kullanılmasında önemli ek bazı problemler bulunmaktadır. Bu ürünlerin oluşumu büyük oranda verimsizdir ve örneğin içerdiği geçiş metal iyon içeriğine göre değişim gösterir. Yalnızca PUFA'lerden türeyen hidroperoksid bu ürünler ile artar. Örneğin 4-HNE  $\omega$ -6 PUFA hidroperoksidlerden türer ve ferröz gibi geçiş metal iyonları ile katalizlenir [170]. Kolesterol ve oleik asid gibi bolca bulunan hücrel lipidlerden türeyen hidroperoksidlerin parçalanması MDA ve 4-HNE üretmez. Bu faktörler lipid peroksidasyonunun düşük olarak belirlenmesine yol açar. MDA aynı zamanda platelet enzimi olan tromboxan sentaz tarafından kan pıhtılaşması ve platelet aktivasyonu sırasında ng/ml konsantrasyonlarında üretilir. Bu da lipid peroksidasyonun aşırı yüksek bulunmasına neden olur. Kullanılan metoda bağlı olarak lipid peroksidasyonu seviyesi 0.3-30  $\mu\text{M}$  aralığındaki seviyededir. Ancak direk metod ile normal insan plazmasında seviyenin yaklaşık 0.5  $\mu\text{M}$  olduğu belirtilmiştir [171] [172]. Kullandığımız metod ferröz iyonları ile redox reaksiyonlarını kullanarak hidroperoksidleri direk olarak ölçer [173]. Stabil olmayan hidroperoksidlerin, ferröz iyonlarla reaksiyona girerek ferrik iyonları oluşturması prensibine dayanarak oluşan ferrik iyonlar tiyosiyonat (kromojen olarak) kullanılarak belirlenir (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Redüksiyon/Oksidasyon Reaksiyonları

Bu metod reaksiyon sırasında üretilen ferrik iyonların ölçümüne dayandığı için örnek içerisinde bulunan ferrik iyonlar potansiyel hata kaynağıdır. Ayrıca

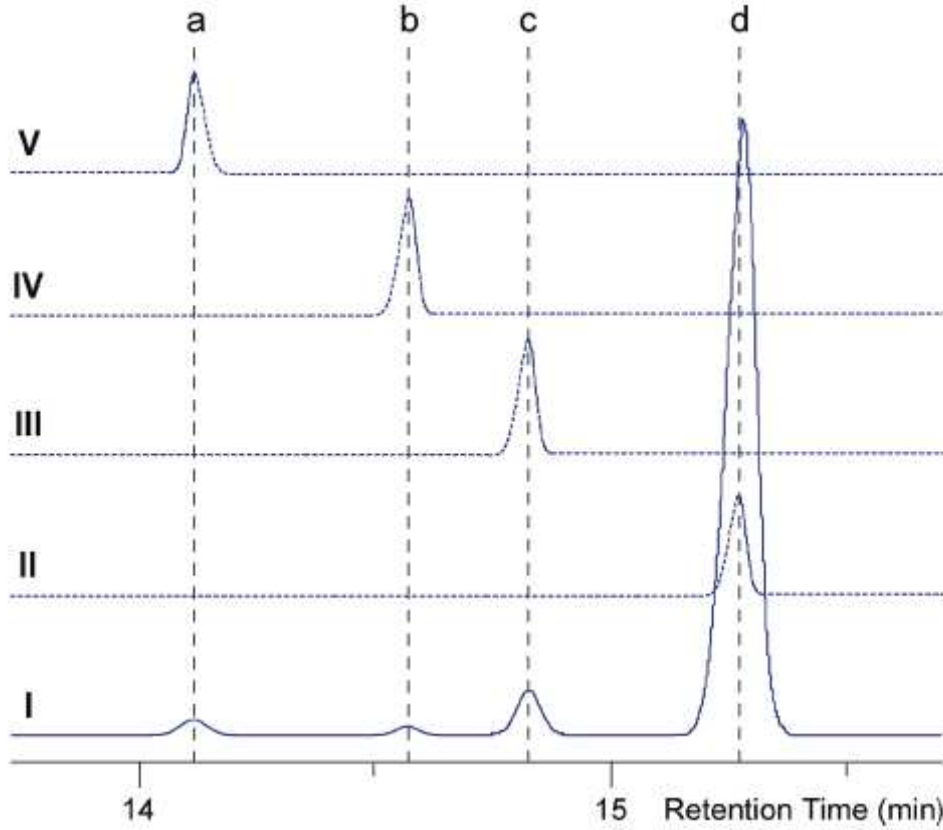
birçok biyolojik örnek ferroz iyonları ile reaksiyona girerek lipid hidroperoksidlerin yüksek ölçülmesine neden olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içerir. Bu problemler ölçümün kloroform içerisinde yapılması ile önlenir. Lipid hidroperoksidleri kloroform içerisine ekstrakte etmek ve bu ekstraktı direk olarak ölçümde kullanmak için kantitatif ekstraksiyon metodu geliştirilmiştir. Bu prosedür örnek içerisindeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ya da endojen ferrik iyonlarının neden olduğu herhangi bir interferansı elimine ederek lipid peroksidasyonu için hassas ve güvenilir ölçüm sağlar. Peroksidazları içeren birçok hücre etkili bir şekilde endojen lipid hidroperoksidleri ilgili alkollerine indirger. Peroksidaz aktivitesi hidroperoksid konsantrasyonlarını aşırı düşük ve belirlenemez seviyelere kadar indirir. Oksidatif stres koşullarında bile Lipid hidroperoksid konsantrasyonunda tespit edilebilir bir artış gerçekleşmeden önce serbest radikaller aracılığı ile hidroperoksid üretimi peroksidaz defansını durdurulmalıdır. Lipid hidroperoksidlerinin ölçülmesi ölçüm sırasında lipid peroksidasyon seviyelerinin anlık olarak görüntülenmesini sağlar.

## 2.12.Gaz kromatografik analiz

Trans izomerleri belirlenmesinde en etkili metod gaz kromatografisidir (GC). GC yağ asidi analizinde en kolay ve en hızlı tekniktir [174] [175]. GC halen farklı yağ asidlerinin pozisyonel ve geometrik izomerlerini ayırabilen tek tekniktir [176]. Özellikle kompleks karışımlarda (ör. cis, trans ve konjuge yağ asidi içeren hücre membranları) yanıtıcı piklerin oluşması olasıdır. GC analizi yağ asidi içeren lipidlerin metil ester (FAME) ya da diğer ester türevleri gibi daha uçucu türevlerine çevrilmesini gerektirir [177] [178] [179]. FAME'lerin üretimi basittir ve farklı reaksiyon koşulları tartışılarak rapor edilmiştir [174] [175]. Fosfolipidler, trigliseritler ve kolesterol esterleri baz-katalizli koşullarda FAME'lere dönüştürmek için etkili metodlar bulunmaktadır. Baz ve diğer reaksiyon parametreleri kantitatif sonuçlara sahip olmak için uygun olarak seçilmelidir. Sıkça kullanılmasına rağmen asidik transesterifikasyon okside türevler ve kuvvetli asid ve yüksek sıcaklık kullanıldığında pozisyonel izomer gibi ürünler meydana getirebilir [177]. Transesterifikasyon protokollerinin toplanıp tartışıldığı başka çalışmalar da bulunmaktadır [178]. Kütle spektrometrik analizde de en sık kullanılan yağ asidi türevleri FAME'ler ve nitrojen içeren esterlerdir (ör, 3-pyridylcarbinol ("picolinyl") esterleri, 4,4-dimethyloxazoline türevleri ve pyrrolidinler) [180]. Trans-oktadekenoik asidler insan diyetinde ruminant yağları ve parsiyal hidrojenlenmiş bitkisel yağlardan gelen kantitatif ve besinsel olarak en önemli trans yağ asidi grubunu oluşturur [179].

Karışımındaki bütün FAME komponentlerini ayırmak için kromatografik kolonun ve taşıyıcı gazın seçimi kritik rol oynar. Yağ asidi izomerlerinin GC analizi için 60-100 m uzunluğunda büyük oranda polar "cyanopolysiloxane" sabit fazlı, çeşitli polar substitüentler içeren silika kapiler kolonlar kullanılmalıdır. Bu kolonlar yağ asidi türevlerini artan karbon atomu zinciri (ör. alıkonma zamanı: C14 < C16 < C18 < C20 < C22) ve çift bağ sayısına (ör. 0 < 1 < 2...)göre ayırır. C20-C22 PUFA'lar dışında trans izomerler daima cis izomerlerden önce elüe edilir. Tam tersine nonpolar ya da daha az polar faz ile kaplı GC kolonlar tamamen farklı bir ayırım trendi gösterir [181] [182]. PUFA izomer tanımlaması için referans kütüphane kullanılması kuvvetle önerilmektedir. Bu yaklaşım ticari olarak bulunmayan izomerlerin geliştirilmesi için sentetik metodları içerir. Bu strateji ile EPA Metil Ester (EPA-ME) kütüphanesi ve mono-trans izomerleri geliştirilmiştir ve elüsyon

17trans < 14trans < 5trans = all-cis < 8trans < 11trans olarak devam etmektedir [183]. Hidrojenin taşıyıcı gaz olarak kullanıldığı bir omega-3 FAME elüsyonu GC bölgeleri örnek olarak Şekil 2.14'de gösterilmiştir. Tüm cis omega-3 yağ asitlerinin saf referansları ticari olarak bulunmaktadır. Pikler bu referanslara göre alınmıştır [183].



**Şekil 2.14.** FAME Elüsyonu Çıkış Zamanı GC Bölgeleri. C20:5 (II, pik d), C20:4 (III, pik c), ve C20:3 (V, pik a) ve EPA'nın 17 trans izomeri (IV, pik b)

Helyum ve hidrojen gaz kromatografide taşıyıcı gaz olarak kullanılmaktadır. Farklı yağ asitlerinin ve cis trans izomerlerinin ayırımında benzer performansa sahip olmasına rağmen hidrojen bazı avantajlar sunmaktadır. Helyuma nazaran GC ölçüm zamanı daha kısa ve pikler daha keskindir [184]. C18:1 ve C18:3-C20:1 bölgesinde piklerin rezolüsyonu daha iyidir bu nedenle rutin bitkisel ve hayvansal yağ analizinde hidrojen kullanılır [185] [176]. EPA-ME'yi 17trans EPA izomeri ve C20:3 ω-3'den en iyi ayırım taşıyıcı olarak hidrojen kullanılarak yapılır. Deiodize tuna yağı ile beslenmenin ardından rat karaciğer mitokondri membranlarına giren trans izomerlerin varlığının tespitinde kullanılmıştır [183]. Özellikle geometrik izomerlerin elde edilmesi için trans MUFA ve PUFA yağ asidi standartlarının hazırlanması serbest radikal sentetik metodları ile gerçekleştirilmektedir. Mono-trans araşidonat izomerleri bu yaklaşımın ilk örneğidir. İnsan üre ve platelet örneklerinin nitrojen dioksit (NO<sub>2</sub>•) [186] ile kimyasal reaksiyonu mono-trans araşidonat oluşumuna yol açar [187] [188] [189]. Serbest radikal metodolojisinin kullanılarak GC analitik koşullarını iyileştirmeye yönelik araştırmalar araşidonat izomerlerinin tanımlanmasına olanak vermiştir [181]. Bu izomerlerin insan kan plazmasında

tanımlanmasına yönelik çalışmalar farklı GC koşulları karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir [182]. Geometrik mono-trans araşidonat izomerlerinin tayin edilmesi yapıda bulunan dört çift bağın geometrisi ve pozisyonu ile bağlantılıdır. Bu izomerler radikal stres koşullarında *in vivo* izomerizasyon biyomarkırları olarak önemlidirler. 5. ve 8. pozisyon mono-trans araşidonat izomerleri fosfolipid yapısında gerçekleşen serbest radikal izomerizasyon sürecinin en avantajlı ürünleridir. 11 ve 14 pozisyonlarındaki trans izomerler ise diyetle alınan endüstriyel olarak izomerleşmiş yağlardan gelmektedir. Desaturaz enzimlerinin kemo- ve bölge-spesifik mekanizma ile çalıştığını ve lipid biyosentezi sırasında yağ asidi zincirinin spesifik pozisyonlarında özellikle cis geometri oluşturulduğunu göstermektedir. Bu nedenle 5 trans ve 8 trans izomerlerinin oluşumunun sadece endojen radikal stresin aktivitesi ile doğal olarak oluşmuş cis geometrinin dönüşümü ile meydana geldiğini işaret etmektedir. Biyolojik örneklerde araşidonat izomerlerinin belirlenmesinin önemi yüksektir. GC/MS yağ asidi analizinde altın standart teknik olarak göz önüne alınabilir. Gerçekte lipidomik analiz için güçlü bir araç olan kütle spektrometri cis ve trans geometrik izomerleri ayırt edebilme özelliğine sahip değildir. GC ile birleştirildiğinde başlangıç pik ayrımını takip eden moleküler ağırlık tanımlamasına olanak tanır [190]. Geometrik izomerlerde sınırlayıcı konu tanımlama spesifik iyonların göreceli dağılımının karşılaştırılmasına dayanırken iyon paternlerinin benzer karakteristik göstermesidir. Bu analiz özellikle geometrik izomer sayısı 2 olan monoenler ve 4 olan dienler için kullanılabilir. 2 çift bağdan fazlasına sahip olan PUFA'lar için analiz yüksek sayıda olası geometrik izomerlerin bulunabilmesinden dolayı bazı engellere sahiptir. Bakteriyel lipidlerin analizi MUFA'ların pozisyonel ve geometrik izomerlerinin çalışılması için türevlendirme prosedürünün kullanışlı olduğunu göstermiştir [191]. Bu prosedür iki basmaktan oluşmaktadır (i) çift bağlara iki CH<sub>3</sub>S ekleyen dimetil disulfid (DMDS) ile reaksiyon, (ii) fragmentasyon paterninin MS ile analizi. Böylelikle DMDS ürünleri ayrılabilir ve iki fragmenin lokalizasyonu belirlenebilir fakat çift bağın orijinal pozisyonu hakkında vecip verilemez sorular ortaya çıkar.

### 2.13.Amaçlar

Bleomisin'in kanser hücrelerinde meydana getirdiği hasarının mekanizması tam olarak açıklanabilmiş değildir. Literatürde Bleomisin'in kanser hücre membran lipid profili üzerine etkileri ile ilgili yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bleomisin aracılığı ile meydana gelen reaktif oksijen türleri doymuş, doymamış ve poliansatüre lipid dağılımında değişikliğe neden olabileceği gibi fosfolipidlere bağlı yağ asitlerinde cis-trans izomerizasyonuna da yol açabilir. Çalışmamızda Bleomisin'in NTERA-2 testis kanser hücre membranlarında meydana getirdiği lipid profili değişimlerini analiz etmeyi amaçladık. Ayrıca güçlü bir antioksidan olan NAC'ın tek başına ve Bleomisin ile birlikte inkübasyonunun meydana getireceği lipidom değişimlerini yalnızca Bleomisin ile inkübe edilen hücre grubu ile karşılaştırarak Bleomisin'in meydana getirdiği farklılıkların NAC tarafından baskılanıp baskılanmadığını yani dolaylı olarak kemoterapi sırasında antioksidan kullanımının etkilerini belirlemeyi amaçladık. Ayrıca çalışmamızda özellikle lipidler ile ilişkili oksidatif stres belirteçleri olan 8-izoprostan, lipid hidroperoksid ve TBARS düzeylerini belirleyerek Bleomisin, NAC ve birlikte inkübasyonları tarafından hücre lipidlerinde meydana gelen oksidasyon seviyelerini araştırmayı amaçladık. Çalışmamız birçok yönü ile orijinal nitelik taşımakta ve Bleomisin aracılı hücre



ölümünü moleküler düzeyde ve lipidomik olarak açıklayarak kanser hücrelerinin spesifik olarak yok edilmesine yönelik yeni stratejiler geliştirilmesine ışık tutacak niteliktedir.

## MATERYAL ve METOD

### 3.1. Hücre Kültürü ve Kullanılan Çözeltiler

A)Testis kanser hücreleri: Malign puliripotent embriyonal karsinoma hücreleri olan NTera-2 hücreleri ATCC firmasından temin edildi.

B)DMEM: ATCC'den alındı. Kullanılacağı zaman 50 ml steril, inaktive edilmiş Fetal sığır serumu ve 5 ml steril penisilin-streptomisin çözeltisi eklendi ve +4°C'de saklandı.

C)FBS (Fetal Sığır Serumu): 500 ml Sigma'dan inaktive edilmiş olarak temin edildi. 10'şer ml'lik tüplere bölünerek -20°C'de saklandı.

D)Penisilin streptomisin: Biological Industries'den 100 ml alındı. Kullanılmadığı sürece -20°C'de saklandı.

E)DMSO (Dimetil Sülfoksit): Sigma'dan 100 ml alındı. Oda ısısında saklandı.

F)Hücre dondurma çözeltisi: % 5 dimetil sülfoksit (DMSO) içeren medyum steril bir tüpte hazırlandı ve hücre pelleti üzerine 1 ml eklendi. Bu solusyon hücreler dondurulacağı zaman taze olarak hazırlandı.

G)Tripan Blue çözeltisi (%0.5'lik): Biological Industries'den hazır olarak alındı. Oda ısısında saklandı.

H)Tripsin-EDTA: Biological Industries'den hazır olarak alındı. Çözülerek kısımlara ayrıldı ve -20°C'de saklandı.

### 3.2. Hücrelerin Çoğaltılması

Testis kanser hücreleri %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin çözeltisi içeren, steril besiyerinde, +37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe kültür edilerek çoğaltıldı. Hücreler çok yoğunlaştıkları zaman, yapıştıkları flasktan kaldırılarak yeni flasklara pasajlandı. Pasajlama işleminde kazıyıcı (scraper) kullanıldı. İlk olarak medyum flaskdan uzaklaştırılarak atıldı, taze medyum eklenerek ve hücreler kazıyıcı yardımıyla flasktan kazınarak kaldırılıp yeni flasklara dağıtıldı. Hücreler, +37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe, medyum içinde inkübe edilerek üretildi.

### 3.3. Hücrelerin Dondurulması

Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere hücrelerin bir kısmı stoklandı. Bunun için hücreler uygun şekilde donduruldu. Hücreler, flasktan kazınarak kaldırıldı ve medyum eklenerek 150 x g'de 5-7 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kalan pellet, %95 tam hücre medyumunu ve %5 DMSO'dan oluşan dondurma medyumunu içerisinde tekrar süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonları, cryo tüplere dağıtıldı ve kademeli dondurma yapmak için izopropil alkol içeren dondurma kabı (freezing container) içinde 4 saat -80 °C'de tutuldu. Daha sonra cryo tüpler sıvı nitrojen tankına transfer edildi.

### 3.4. Hücrelerin Çözülmesi

Dondurulan bu hücreler deneylerde kullanılmak üzere hücreye ihtiyaç olduğunda çözüldü. Hücreleri içeren vial 37°C su banyosunda hafifçe sallanarak çözüldü. Kontaminasyon olasılığını azaltmak için suyun yüzeyinde tutuldu. Çözdürme işlemi hızlı bir şekilde yapıldı. (Yaklaşık 2 dakika). İçeriği çözülür çözülmez vial su banyosundan uzaklaştırıldı ve %70'lik alkolle temizlendi. Bu aşamadan sonraki işlemler sıkı aseptik koşullar altında yapıldı. Vial içeriği tüpe boşaltılıp üzerine damla damla medyum eklendi. 150 x g'de 7 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücre içeren pellet medyumla tekrar süspansiyon edildi ve kültür flasklarına dağıtıldı. Hücreler, 37°C'de ve %5'lik CO<sub>2</sub> ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edilerek üretildi.

### 3.5. Deney Grupları

#### A) Sitotoksikite Analizi Deney Grupları

**Grup 1. Kontrol grubu.** Sadece medyum ile inkübe edilmiş testis kanseri hücrelerinin canlılığı %100 olarak kabul edildi.

**Grup 2. Bleomisin grubu.** Bleomisin ile inkübe edilmiş testis kanseri hücrelerinde Bleomisin'in neden olduğu sitotoksikite kontrol grubu ile karşılaştırılarak belirlendi.

**Grup 3. NAC grubu.** NAC ile inkübe edilmiş testis kanseri hücrelerinde NAC'nin neden olduğu sitotoksikite kontrol grubu ile karşılaştırılarak belirlendi.

**Grup 4. Bleomisin ve NAC grubu.** Bleomisin ve NAC ile kombine inkübe edilmiş testis kanseri hücrelerinde Bleomisin ve NAC'nin neden olduğu sitotoksikite kontrol grubu ile karşılaştırılarak belirlendi.

#### B) Gaz kromatografik Analiz Deney Grupları

**Grup 1. Kontrol grubu.** Sadece medyum ile inkübe edilmiş testis kanseri hücrelerinin membran lipidlerinin izolasyonu, saflaştırılması ve metil ester türevlerine çevrilmesi ve gaz kromatografik analizi yapıldı.

**Grup 2. Bleomisin grubu.** Bleomisin ile inkübe edilmiş testis kanseri hücrelerinin membran lipidlerinin izolasyonu, saflaştırılması ve metil ester türevlerine çevrilmesi ve gaz kromatografik analizi yapıldı.

**Grup 3. NAC grubu.** NAC ile inkübe edilmiş testis kanseri hücrelerinin membran lipidlerinin izolasyonu, saflaştırılması ve metil ester türevlerine çevrilmesi ve gaz kromatografik analizi yapıldı.

**Grup 4. Bleomisin ve NAC grubu.** Bleomisin ve NAC ile kombine inkübe edilmiş testis kanseri hücrelerinin membran lipidlerinin izolasyonu, saflaştırılması ve metil ester türevlerine çevrilmesi ve gaz kromatografik analizi yapıldı.

#### C) Oksidatif Stres Çalışmaları Deney Grupları

**Grup 1. Kontrol grubu.** Sadece medyum ile inkübe edilmiş testis kanseri hücrelerinde 8-isoprostan, lipid hidroperoksid, ve TBARS düzeylerinin ölçümü yapıldı.

**Grup 2. Bleomisin grubu.** Bleomisin ile inkübe edilmiş testis kanseri hücrelerinde 8-isoprostan, lipid hidroperoksid, ve TBARS düzeylerinin ölçümü yapıldı.

**Grup 3. NAC grubu.** NAC ile inkübe edilmiş testis kanseri hücrelerinde 8-isoprostan, lipid hidroperoksid, ve TBARS düzeylerinin ölçümü yapıldı.

**Grup 4. Bleomisin ve NAC grubu.** Bleomisin ve NAC ile kombine inkübe edilmiş testis kanseri hücrelerinde 8-isoprostan, lipid hidroperoksid, ve TBARS düzeylerinin ölçümü yapıldı.

**Grup 5. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübe edilmiş testis kanseri hücrelerinde 8-isoprostan, lipid hidroperoksid, ve TBARS düzeylerinin ölçümü yapıldı.

**Grup 6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve NAC grubu.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve NAC ile kombine inkübe edilmiş testis kanseri hücrelerinde 8-isoprostan, lipid hidroperoksid, ve TBARS düzeylerinin ölçümü yapıldı.

### 3.6. Sitotoksosite Ölçümleri

Bleomisin ve NAC'in hücrelerin %50'sine sitotoksik olan konsantrasyonu (IC<sub>50</sub> dozu) MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid) testi ile belirlendi. MTT, canlı hücreler tarafından parçalanarak koyu mavi renkte formazan kristaline dönüştürülür. Oluşan mavi rengin yoğunluğu hücre canlılığının bir ölçütüdür. Sitotoksosite deneyleri 5 gün sürmektedir. Deneylerin birinci günü hücreler kazıyıcı ile kaldırıldı, medyum eklenerek 150 x g'de 7 dakika santrifüj edildi. Pellet 1 ml medyum ile tekrar süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak hücreler inverted mikroskop altında hemasitometrede sayıldı. 50 000 hücre / kuyu olacak şekilde ayarlanarak hücreler kuyulara 100 µL ekildi. 15 g Bleomisin 1 ml steril distile su ile çözüldü ve 20-700 µg/ml dozlarında, NAC ise 1-10 mM dozlarında hesaplandı. Hücrelerin kuyulara ekilmesinden 24 saat sonra medyum atılarak, belirlenen dozlardaki Bleomisin ve NAC içeren medyum kuyulara uygulandı. Hücreler inkübasyon süresince +37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi ve süre sonunda her kuyucuğa 0.01 mL MTT eklenerek 4 saat inkübasyon sürecinin sonunda, canlı hücre içeren kuyularda MTT'den oluşan MTT formazan, kuyunun dibinde siyah, ince kristaller olarak görüldü. 0.1 mL 0.04 N HCl içeren isopropanol her kuyuya eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. Absorbans ölçümü 570 nm'de ELISA plak okuyucusunda yapıldı. Kontrol grubunun absorbans değerlerinin ilaçla inkübe edilen hücrelerin absorbans değerleri ile karşılaştırılmasıyla yaşayan hücre yüzdesi hesaplanarak sonuçlar % canlılık olarak verildi.

### 3.7. Membran İzolasyonu, Lipidlerin Saflaştırılması ve Metil Ester Türevlerine Çevrilmesi

Bir gün süre ile yapışmaları beklenen hücreler 24 saat süresince Bleomisin, NAC veya Bleomisin-NAC kombinasyonu ile inkübe edildiler. Bunu takiben hücreler kazındı ve 1 ml Fosfat tamponu (PBS) içerisinde toplanıp resüspansiyon edildi. Bir ml PBS içerisinde resüspansiyon halde bulunan hücreler 1 ml saf su eklenerek vorteks aracılığı ile karıştırıldı ve 14,000xg de 15 dak +4°C de santrifüj edilerek membran peletleri elde edildi. Fosfolipid saflaştırılması ise Bligh ve Dyer metoduna [192] uygun olarak gerçekleştirildi. Cam tüplerdeki numunelere 2:1 kloroform-metanol (1 ml) eklenerek vortex yardımı ile iyice karışmaları sağlandı. Bunun ardından karışıma 500 µl distile su eklenerek altta kalan kloroform metanol kısmı cam pastör pipeti aracılığı ile temiz tüpe aktarıldı. Numunelere sodyum sülfat tuzunun eklendi ve pamuk yardımı ile filtrasyon yapıldı. Cam pastör pipeti kullanılarak aktarılan numune nitrojen gazı eşliğinde kapaklı 4 ml'lik viallere aktarıldı ve evaporatöre alındı. Oda ısısında 10 dakikalık evaporasyonla tüm sıvı faz uzaklaştırıldı. Elde edilen fosfolipid rezidüsü 1 ml 0.5 M KOH/MeOH eklenerek 10

dağ çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Böylelikle yağ asidi metil esterleri (FAME) meydana getirildi. FAME ekstraksiyonu için 2 ml *n*-heksan ve 500 µl su eklendi. Altta kalan su kısmı uzaklaştırıldı. Heksan kısmı üzerine sodyum sülfat tuzu eklenerek pamuk yardımı ile süzme işlemi gerçekleştirildi. Alınan süzöntü 4 ml'lik viallere aktararak 5 dakikalık evaporasyon aracılığı sıvı faz uçuruldu. Gaz kromatografik ölçüm aşamasına geçmek amacı ile 30 ul heksan eklenerek tüp çepeleri ve tabanının iyice teması sağlandı ve numuneler gaz kromatografi cihazında analiz edildi.

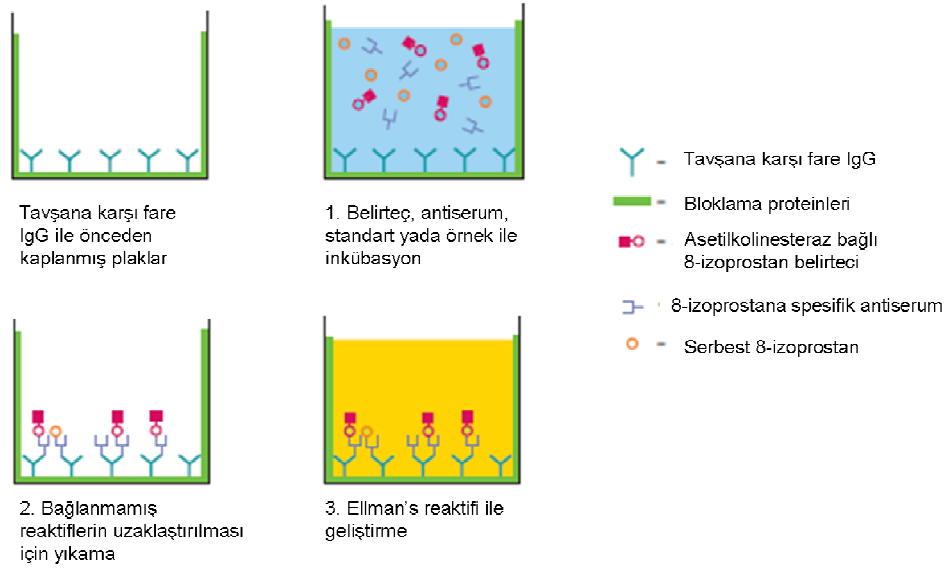
### **3.8. Gaz Kromatografik Analiz**

Gaz Kromatografik (GC) analiz için Varian CP-3800 kullanıldı. Cihaz alev iyonizasyon dedektörü ve a Rtx- 2330 kolon (90% biscyanopropyl-10% phenylcyanopropyl polysiloxane kapiller kolon; 60 m, 0.25 mm i.d., 0.20-mm film kalınlığı) ekipmanlarına sahiptir. Isı uygulamasına 160 C° 55 dak ile başlandı, dakikada 5 C° artış ile 195 C°'de 10 dak tutuldu ve dakikada 10 C° artışla 250 C°'ye getirildi. Sabit basınç 29 psi olarak uygulandı. Araşidonik asid izomerleri için ise alev iyonizasyon dedektörü ve HP-5 kolon (çapraz bağlı 5% phenylsilicone kapiller kolon; 30 m, 0.25 mm i.d., 0.25-mm film kalınlığı) ekipmanlarına sahip Agilent 5860 GC cihazı kullanıldı. Isı 150 C°'den başlatıldı 1 dak sonra dakikada 8 C° artışla 250C°'ye kadar ısıtıldı. Sabit basınç modu 13 psi olarak seçildi [151]. Bütün yağ asitleri ve izomerleri Gaz Kromatografi analizi ile belirlendi ve referanslar ile karşılaştırma yapılarak doğrulama yapıldı. Tiyil-radikal katalizli reaksiyon sonucu elde edilen MUFA ve PUFA trans izomerler referans olarak kullanıldı [193]. Hücre membranlarına ait herbir yağ asidi içeriği total yağ asidine yüzde oranı şeklinde verildi.

### **3.9. Oksidatif Stres Analizleri**

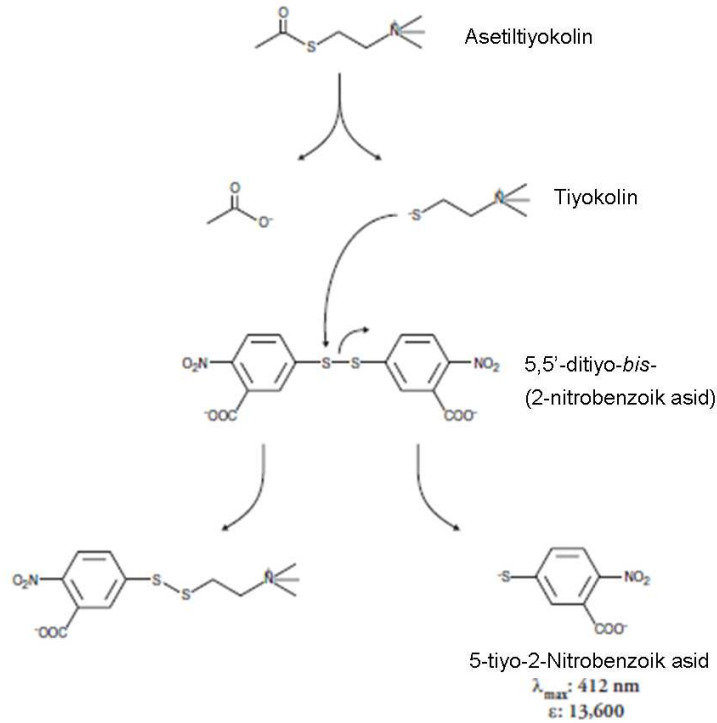
#### **3.9.1. 8-İzoprostan Tayini**

Kullandığımız ölçüm metodu 8-izoprostan ile 8-izoprostan-asetilkolinesteraz (AChE) konjugatı (8-izoprostan belirteci) arasında sınırlı sayıdaki 8-izoprostan-spesifik tavşan antiserum bağlanma bölgesi için yarışma prensibine dayanmaktadır. 8-izoprostan seviyeleri değişiklik gösterirken 8-izoprostan belirteci konsantrasyonu sabit tutuldu. Tavşan antiserumuna bağlanabilecek 8-izoprostan belirteç miktarı kuyucuk içerisinde bulunan 8-izoprostan konsantrasyonu ile ters orantılıydı. Tavşan antiserum-8-izoprostan kompleksi (hem serbest hem de tracer) daha önce kuyuya yapıştirilmiş olan tavşan IgG fare monoklonal antikoruna bağlandı. Plak bağlanmayan reaktiflerin uzaklaştırılması için yıkandı ve kuyulara AChE içeren Ellman's Reaktifi eklendi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. 8-izoprostan Ölçüm Şeması

Bu reaktif asetiltiyokolin ve 5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asid) içermektedir. AChE aracılığı ile asetiltiyokolin hidrolizi sonucunda tiyokolin meydana geldi. Tiyokolinin 5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asid) ile non-enzimatik reaksiyonu sonucu 5-tiyo-2-nitrobenzoik asid üretildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. 5-tiyo-2-Nitrobenzoik Asid Oluşumunun Mekanizması

Bu enzimatik reaksiyonun ürünü sarı renge sahipti ve 412 nm de güçlü absorbands verebilmekteydi. Spektrofotometrik olarak belirlenen bu rengin yoğunluğu kuyuya bağlanan 8-izoprostan belirteç miktarı ile doğru, inkübasyon süresince kuyuda bulunan serbest 8-izoprostan miktarı ile ters orantılı idi.

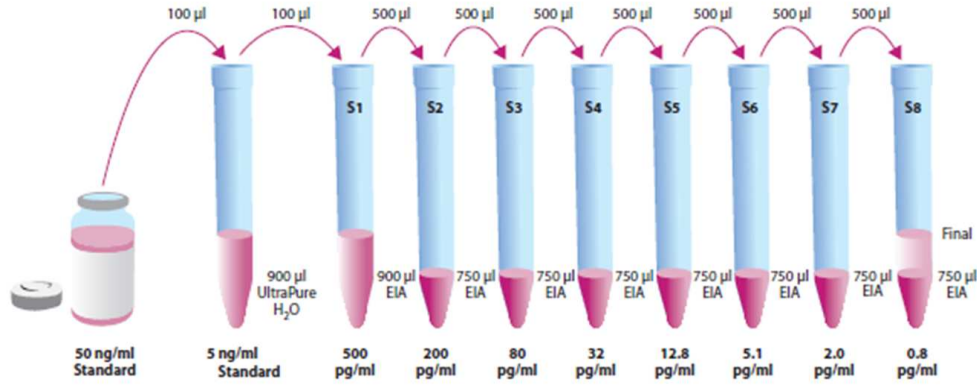
Absorbans  $\propto$  [Bağlanan 8-izoprostan belirteç]  $\propto$  1/ [8-izoprostan]

Tampon hazırlanması

EIA Tamponu: 10X tampon içeriği 90 ml saf suda çözüldü.

Yıkama Tamponu: 2.5 ml “polysorbat 20” 5 litre saf suda dilüe edilerek kullanıldı.

**Standartların hazırlanması:** 100  $\mu$ l 8-izoprostan standardı 900  $\mu$ l medyum ile dilüe edildi. Hazırlanan bu solüsyonun konsantrasyonu 5 ng/ml idi. 8 adet tüp S1-S8 arasında numaralandırıldı. S2-S8 numaralı 7 tüpe 750  $\mu$ l medyum eklendi. S1 tüpüne 900  $\mu$ l medyum ve 5 ng/ml’lik solüsyondan 100  $\mu$ l eklendi ve iyice karıştırıldı. S1 tüpü standart konsantrasyonu 500 pg/ml oldu. S1 tüpünden alınan 500  $\mu$ l S2 tüpüne aktarıldı ve iyice karıştırıldı. Ardından S2 tüpünden alınan 500 $\mu$ l S3 tüpüne aktarılarak bu işlem S8 tüpüne kadar her tüp için yapıldı (Şekil 3.3).

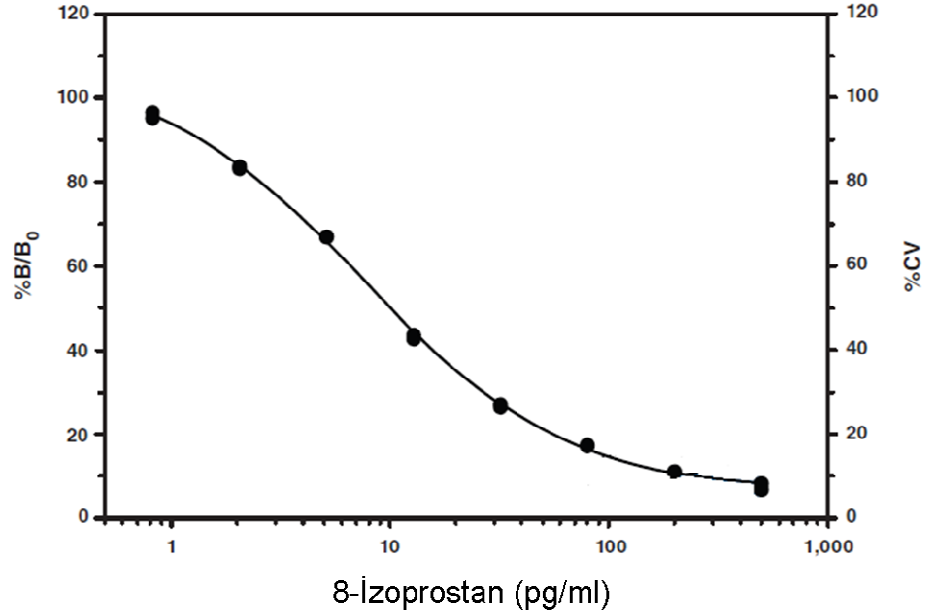


Şekil 3.3. 8-izoprostan Standartlarının Hazırlanması

96 kuyulu plak üzerinde 2 kuyu kör, 2 kuyu non-spesifik bağlanma ve 2 kuyu maksimum bağlanma için ayrıldı. Non-spesifik bağlanma ve maksimum bağlanma kuyularına 50  $\mu$ l medyum eklendi. Ayrıca non-spesifik bağlanma kuyularına 50  $\mu$ l tampon eklendi. Her bir standart kuyusuna 50  $\mu$ l standart ve her bir numune kuyusuna 50  $\mu$ l örnek eklendi. Kör ve total aktivite kuyuları dışındaki her kuyuya 50  $\mu$ l 8-izoprostan AChE belirteç eklendi. Total aktivite, non-spesifik bağlanma ve kör kuyuları dışındaki tüm kuyulara ise 50  $\mu$ l antiserum eklenerek plak 18 saat 4 C<sup>0</sup>’de inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresi sonunda kuyular boşaltıldı ve 5 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Ardından her kuyuya 200  $\mu$ l Ellman’s reaktifi eklendi. Total aktivite kuyularına ise 5  $\mu$ l belirteç eklendi ve 2 saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 405 nm’de okuma yapıldı.

**Hesaplama:** Non-spesifik bağlanma kuyularının absorbands ortalamaları alındı. Maksimum bağlanma kuyularının absorbands ortalamaları alındı. Non-spesifik bağlanma kuyularının absorbands ortalaması Maksimum bağlanma kuyularının absorbands ortalamasından çıkarıldı ve elde edilen değer doğrulanmış absorbandsı verdi. Numune ve standartların absorbands değerinden de non-spesifik bağlanma

absorbans ortalaması çıkarıldı ve her bir değer doğrulanmış absorbansa bölündü. Bulunan değerın logaritması alındı ve konsantrasyonun logaritmasına karşılık standart grafik çizildi. Standart grafiğe ait denklemden yararlanarak örneklere ait 8-izoprostan değeri pg/ml cinsinden belirlendi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. 8-izoprostan Standart Grafiği

### 3.9.2. TBARS Tayini

#### Kullanılan Reaktifler:

Tiyobarbütirik Asid

TBA Asetik Asid: 40 ml TBA Asetik Asid 160 ml saf su ile karıştırılarak kullanıldı.

TBA Sodyum Hidroksit (10X): 20 ml NaOH 180 ml saf su ile dilüe edilerek kullanıldı.

TBA Malondialdehit Standardı: 500 µM malondialdehit içermektedir.

TBA SDS Solüsyonu: Sodyum dodesisülfat solüsyonu içermektedir.

Renk Reaktifi: 530 mg TBA ve 50 ml dilüe edilmiş TBA sodyum hidroksit ile çözünme gerçekleşene kadar karıştırıldı.

Bleomisin, NAC veya Bleomisin-NAC kombinasyonu ile inkübe edilen hücreler sayılarak her numunede  $2 \times 10^7$  olacak şekilde ayrıldı. Buz üzerinde sonikasyon gerçekleştirildi. Kültür medyumunu kör olarak kullanıldı.

**Standartların hazırlanması:** 250 µl MDA standardı 750 µl su ile karıştırılarak 125 µM stok solüsyonu elde edildi. Tabloda belirtilen miktarlarda stok solüsyon su ile karıştırıldı.

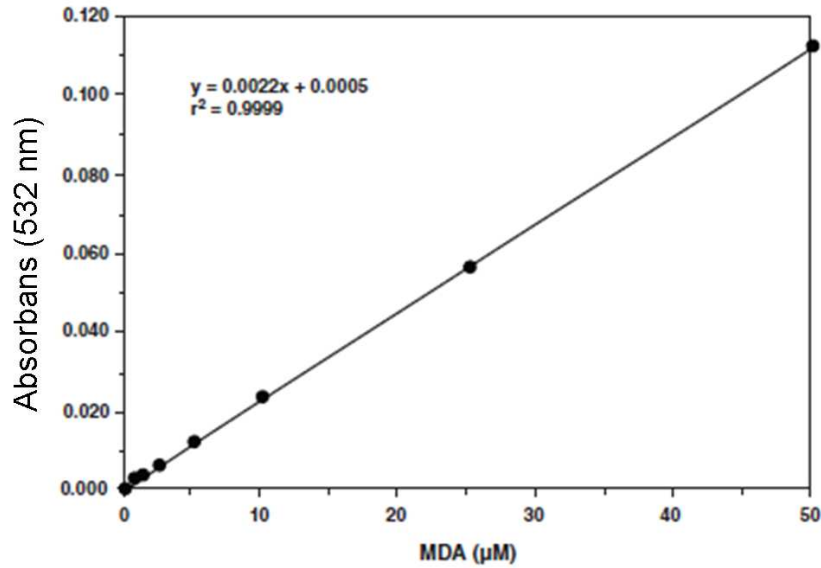


**Tablo 3.1.** TBARS Stok Solüsyon Hazırlanması

Tüp	MDA ( $\mu\text{l}$ )	Su ( $\mu\text{l}$ )	MDA konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )
A	0	1.000	0
B	5	995	0.625
C	10	990	1.25
D	20	980	2.5
E	40	960	5
F	80	920	10
G	200	800	25
H	400	600	50

Standart ve örneklerden 100  $\mu\text{l}$  alınarak 100  $\mu\text{l}$  SDS solüsyonu ile karıştırıldı. Ardından her tüpe 4 ml renk reaktifi eklendi. Ardından tüpler 1 saat boyunca kaynamaya bırakıldı. 1 saatin sonunda reaksiyonu durdurmak için tüpler buz üzerine alındı ve 10 dakika buz üzerinde bekletildi. Bekleme süresi sonunda tüpler 1,600xg'de +4<sup>0</sup>C'de 10 dakika santrifüj edildi. Ardından herbir tüpten alınan 150  $\mu\text{l}$  örnek plağa pipetlenerek absorbanslar 530-540 nm'de okundu.

**Hesaplama:** Hem standart hem de örneklere ait ortalama absorbans hesaplandı. Standart A (0  $\mu\text{M}$ )'ya ait ortalama absorbans kendisinden ve diğer tüm standart ve örneklerden çıkartıldı. Standartlara ait doğrulanmış absorbans değerleri MDA konsantrasyonuna karşı noktalar olarak işaretlenerek standart grafik elde edildi (Şekil 3.5).



**Şekil 3.5.** TBARS Standart Grafiği

Örneklerin TBARS değerleri standart eğrinin lineer regresyon eşitliğinden yararlanarak hesaplandı.

$$\text{TBARS } (\mu\text{M}) = \frac{[(\text{doğrulanmış Absorbans} - y\text{-kesişim})/\text{eğim}]}{1}$$

### 3.9.3. Lipid Hidroperoksid Tayini

Hücrelerin Bleomisin, NAC ve Bleomisin-NAC kombinasyonu ile inkübe edilmesinin ardından kültür ortamından toplanan hücreler 1,000-2,000xg'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen pellet HPLC-saflığında su içinde sonike edildi. Lipid hidroperoksidlerin kantitatif ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi amacı ile proteinlerin uzaklaştırılması prosedürü lipid hidroperoksidlerin ekstraksiyonu ile birleştirildi. Bu ekstraksiyon basamağı neredeyse tüm interferansa neden olan maddelerin örnekten uzaklaştırılmasını sağladı.

Kullanılan Reaktifler:

FTS Reaktifi 1: 0.2 M hidroklorik asid içerisinde 4.5 mM ferröz sülfat içermektedir.

FTS Reaktifi 2: Amonyum tiyosiyanatın %3 metanolik solüsyonu içermektedir.

Lipid hidroperoksid standardı: 50 µM 13-HpODE (13-hidroperoksi oktadekadienoik asid) etanolik solüsyonu içermektedir.

Ekstrakt R: Kristal yapıda 100 mg solid tartılarak test tüpüne aktarıldı ve 15 ml metanol eklenerek hazırlandı.

Trifenilfosfin: Kristal yapıda trifenilfosfin içermektedir. 2.6 mg trifenilfosfin tartılarak 1 ml kloroform-metanol içerisinde çözülerek 10 mM solüsyon hazırlandı.

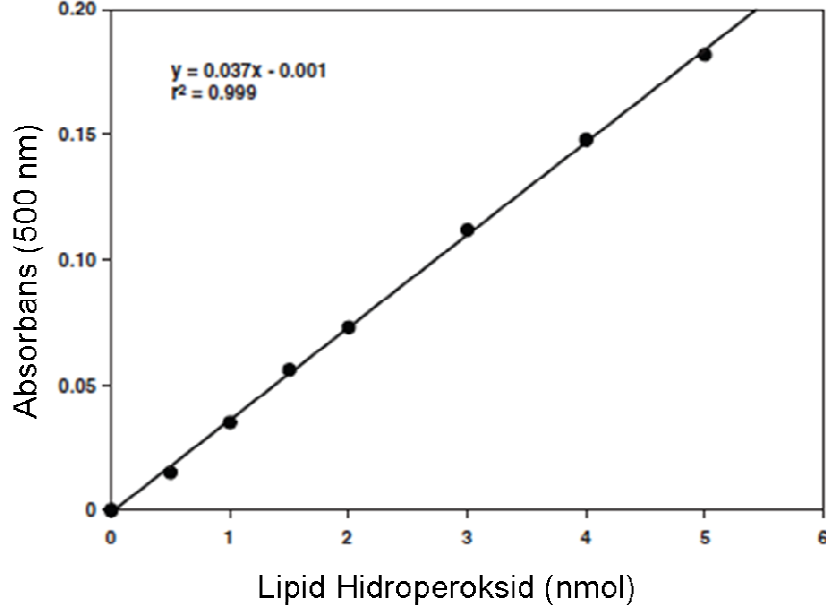
Ekstraksiyon prosedüründe: 500 µl numune cam bir tüpe alınarak metanol içinde hazırlandı ekstrat R eklenerek vorteksledi. Ardından 1 ml soğuk kloroform eklenerek hemen vortekste karıştırıldı ve 1,500xg'de 0°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst kısım su tabakası, orta kısım protein tabakası, alt kısım ise kloroform tabakası şeklinde idi. Kloroform tabakasından 700 µl pastör pipeti aracılığı ile dikkatlice ayrı bir tüpe alınarak buz üzerinde tutuldu.

**Tablo 3.2.** Hidroperoksid Standartlarının hazırlanması

Tüp	Hidroperoksid standardı (µl)	Kloroform-Metanol karışımı (µl)	Final konsantrasyon (nmol)
A	0	950	0
B	10	940	0.5
C	20	930	1.0
D	30	920	1.5
E	40	910	2.0
F	60	890	3.0
G	80	870	4.0
H	100	850	5.0

**Ölçümün yapılması:** Her bir numuneden 500 µl kloroform ekstraktı cam tüpe aktarıldı ve 450 µl kloroform-metanol karışımı ilave edildi. Eşit hacimde FTS Reaktifi 1 ve FTS Reaktifi 2 test tüpünde karıştırılarak kromojen hazırlandı. Her bir tüpe hazırlanan kromojenden 50 µl eklendi ve vorteks ile iyice karıştırıldı ve ağzı kapatılarak 5 dak oda ısısında bekletildi. Her bir tüpten 300'er µl 96 kuyulu plak üzerinde iki kuyuya aktararak dublike çalışma yapıldı. Buharlaşmanın önlenmesi amacı ile plak alüminyum folyo ile kaplandı. 500 nm'de spektrometrik ölçüm yapıldı ve hesaplamaya geçildi.

**Hesaplama:** Hem standart hem de örneklere ait ortalama absorbans hesaplandı. Standart A'ya ait ortalama absorbans kendisinden ve diğer tüm standart ve örneklerden çıkartıldı. Standartlara ait doğrulanmış absorbans değerleri standartların final hacimlerine karşı noktalar olarak işaretlenerek standart grafik elde edildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Lipid Hidroperoksid Standart Grafiği

Örneklerin hidroperoksid değerleri standart eğrinin lineer regresyon eşitliğinden yararlanarak hesaplandı.

Hidroperoksid (HPST) (nmol) = örnek absorbansı - y-kesişim / eğim

Orijinal numune hidroperoksid konsantrasyonunun hesaplaması ise:

Ölçüm için kullanılan ekstrakt hacmi = VE (ml)

Ekstraksiyon için kullanılan orijinal örnek hacmi = SV (ml)

Numune hidroperoksid konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ ) = HPST/VE x 1 ml/SV

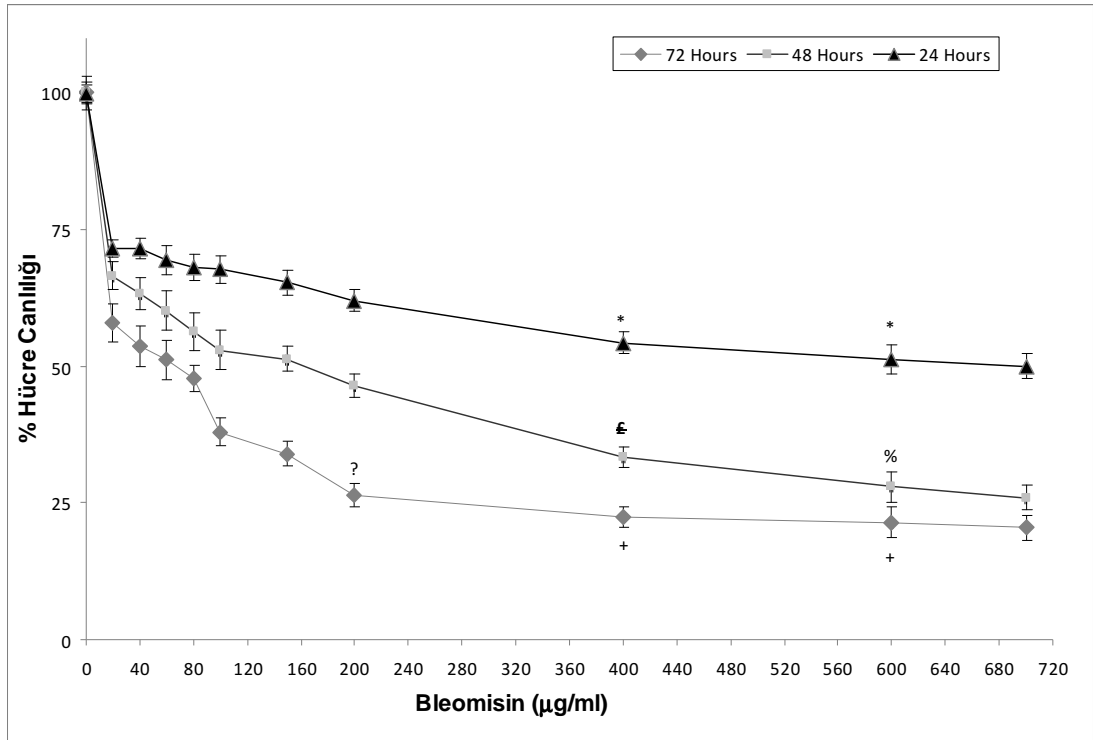
### 3.10. İstatistiksel Analiz

Elde Sonuçlar ortalama  $\pm$  Standart sapma (Mean $\pm$ SD) şeklinde verildi. İstatistiksel analiz SPSS Version 10 paket programı kullanılarak yapıldı.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Deneyler her grup için 6 tekrarlı olarak yapıldı. Gruplar arasında non-parametrik verilerin karşılaştırılması Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı.

## BULGULAR

### 4.1. NTERA-2 HÜCRELERİNDE BLEOMİSİN'İN SİTOTOKSİSİTESİ

NTERA-2 hücrelerinde Bleomisin'in 20-700 µg/ml arasında değişen dozları ile 24, 48 ve 72 süresince inkübe edildi. Hücrelerin canlılığı MTT deneyi ile saptandı. NTERA-2 hücrelerinde 6 bağımsız MTT deneyi yapıldı ve yapılan tüm deneylerin ortalaması alındı. Elde edilen değerlerle çizilen grafikten IC<sub>50</sub> değerleri her üç inkübasyon süresi için hesaplandı. 24 saat Bleomisin ile inkübe edilen hücrelerde IC<sub>50</sub> değeri 400 µg/ml, 48 saat inkübe edilen hücrelerde 100 µg/ml, 72 saat inkübe edilen hücrelerde 20 µg/ml (p<0,01) olarak bulundu (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** Farklı dozlardaki Bleomisin ile 24,48 ve 72 saat inkübe edilen NTERA-2 hücrelerinde % canlılık. n=6; ortalama ± SD

\* p<0,05 400 µg/ml ve 600 µg/ml Bleomisin dozu ile 24 saat süresince inkübe edilen hücreler 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml Bleomisin dozlarında 24 saat süresince inkübe edilen hücreler ile karşılaştırıldığında.

£ p<0,05 400 µg/ml Bleomisin dozu ile 48 saat süresince inkübe edilen hücreler 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml ve 600 µg/ml Bleomisin dozlarında 48 saat süresince inkübe edilen hücreler ile karşılaştırıldığında.

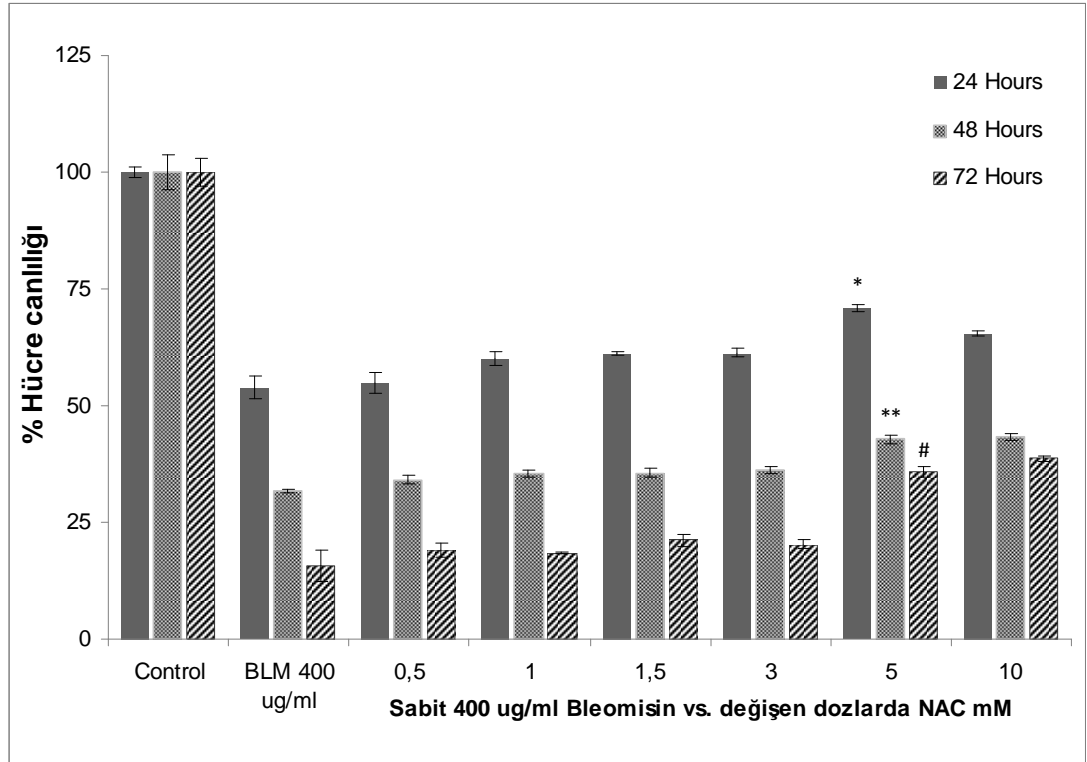
% p<0,05 600 µg/ml Bleomisin dozu ile 48 saat süresince inkübe edilen hücreler 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml, 400µg/ml Bleomisin dozlarında 48 saat süresince inkübe edilen hücreler ile karşılaştırıldığında.

?  $p < 0,005$  200  $\mu\text{g/ml}$  Bleomisin dozu ile 72 saat süresince inkübe edilen hücreler 100  $\mu\text{g/ml}$  ve 150  $\mu\text{g/ml}$  Bleomisin dozlarında 72 saat süresince inkübe edilen hücreler ile karşılaştırıldığında.

+  $p < 0,005$  400  $\mu\text{g/ml}$  ve 600  $\mu\text{g/ml}$  Bleomisin dozu ile 72 saat süresince inkübe edilen hücreler 100  $\mu\text{g/ml}$ , 150  $\mu\text{g/ml}$ , 200  $\mu\text{g/ml}$  Bleomisin dozlarında 72 saat süresince inkübe edilen hücreler ile karşılaştırıldığında.

#### 4.2. NTERA-2 Hücrelerinde NAC Varlığında Bleomisin'in Sitotoksitesisi

NTERA-2 hücreleri, sabit bleomisin konsantrasyonunda (400  $\mu\text{g/ml}$ ) 24, 48 ve 72 saat süresince, NAC'ın değişen dozları (0,5, 1, 1,5, 3, 5, 10 mM) ile inkübe edildi. NAC'ın değişen dozları ile 24 saat süre inkübe edilen hücrelerde sadece 5 mM NAC ve 400  $\mu\text{g/ml}$  Bleomisin ile inkübe edilen hücrelerin canlılığı, yalnızca Bleomisin ile inkübe edilen gruba göre belirgin olarak yüksekti ( $p < 0,01$ ). 48 saat ve 72 saat süresince 400  $\mu\text{g/ml}$  Bleomisin ile birlikte 5 mM NAC inkübasyonu yalnızca Bleomisin uygulanan grup ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde ( $p < 0,01$ ) hücre canlılığının artmasına sebep oldu. Bu sonuçlara dayanarak çalışmamızda 5 mM NAC dozu kullandık (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** Sabit Bleomisin konsantrasyonunda (400  $\mu\text{g/ml}$ ) değişen dozlardaki NAC ile inkübe edilen NTERA-2 hücrelerinde % canlılık.  $n=6$ ; ortalama  $\pm$  SD

\*  $p < 0,01$  24 saat 5 mM NAC ve 400  $\mu\text{g/ml}$  Bleomisin ile inkübe edilen hücrelerin canlılığı, 24 saat sadece 400  $\mu\text{g/ml}$  Bleomisin ile inkübe edilen hücrelerin canlılığı ile karşılaştırıldığında.

\*\*  $p < 0,01$  48 saat 5 mM NAC ve 400  $\mu\text{g/ml}$  Bleomisin ile inkübe edilen hücrelerin canlılığı, 48 saat sadece 400  $\mu\text{g/ml}$  Bleomisin ile inkübe edilen hücrelerin canlılığı ile karşılaştırıldığında.

# p <0.01 72 saat 5 mM NAC + 400 µg/ml Bleomisin ile inkübe edilen hücrelerin canlılığı, 72 saat sadece 400 µg/ml Bleomisin ile inkübe edilen hücrelerin canlılığı ile karşılaştırıldığında.

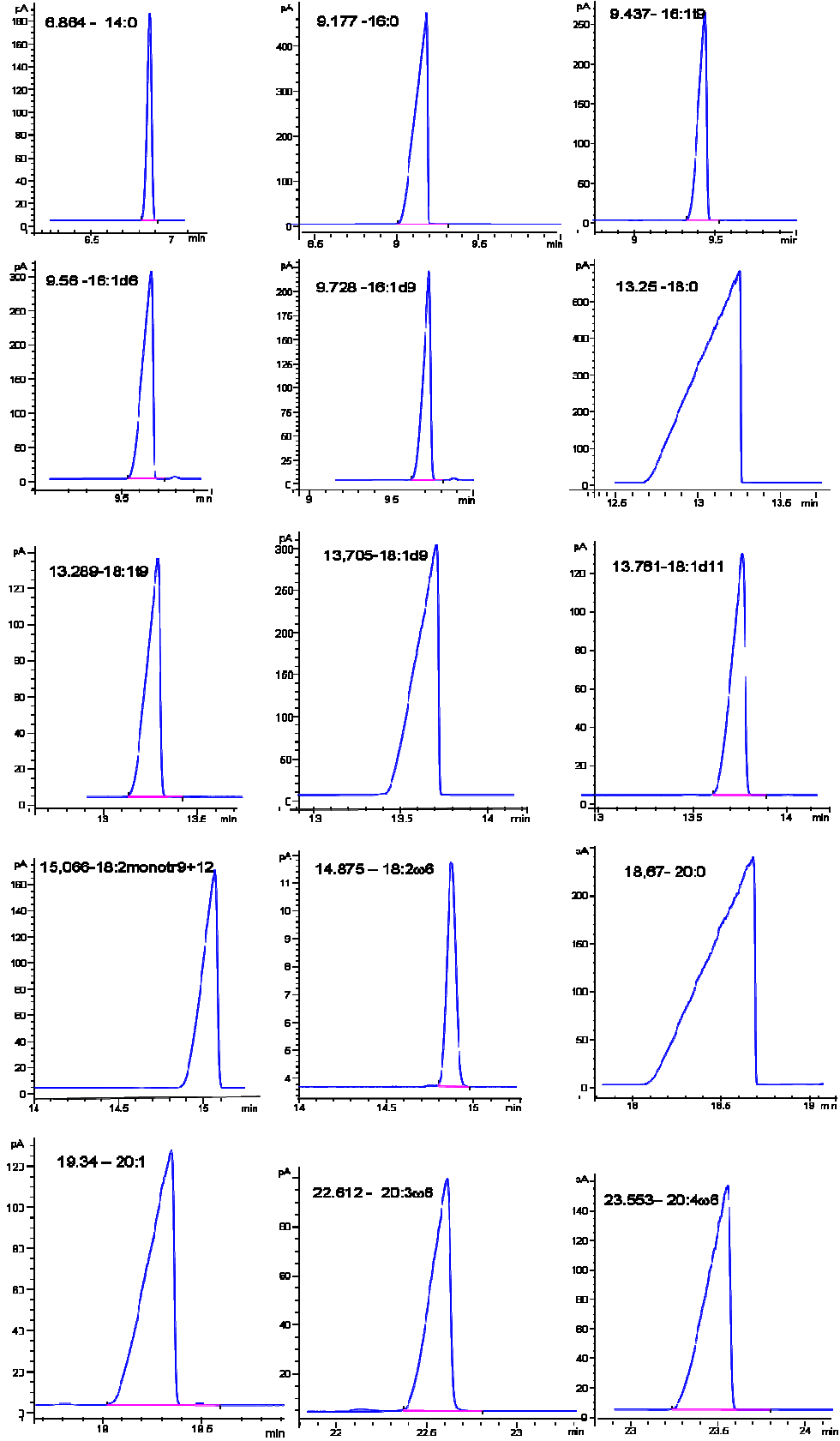
### 4.3. Gaz Kromatografik Analiz

#### 4.3.1 Yağ Asidi Standartlarının Gaz Kromatografik Analizi

Kromatografik veriler y-aksiste dedektör cevabı olarak, x-aksiste ise retensiyon (çıkış) grafiği şeklinde sunuldu ve bu grafik kromatogram olarak isimlendirildi. Bu şekilde numunede bulunan ve farklı zamanlarda elüe olan analit piklerinin spektrumu sağlandı. Retensiyon zamanı metod koşulları sabit olduğu sürece analitlerin tanımlanması için kullanıldı. Pik paternleri ise sabit koşullar altında stabildi ve analitlerin kompleks karışımlarının tanımlanmasında kullanıldı. Piklerin altında kalan alan kromatogramda bulunan analit miktarı ile orantılıydı. Matematik fonksiyonlarının kullanılması ile piklerin alanı hesaplanarak orijinal örnekteki analit konsantrasyonu hesaplandı. Testis kanseri hücrelerinin membran yağ asidi lipid profillerinin belirlenmesi amacı ile öncelikle standart olarak her bir yağ asidinin bireysel olarak çıkış zamanı gaz kromatografi cihazında belirlendi. Her bir yağ asidinin kromatogramda ilk çıkışının başlama ve bitiş zamanı, pik alanları, yükseklik, genişlik sayısal değerleri belirlendi ve Tablo 4.1’de verildi. Kromatogramlara ait grafikler ise Şekil 4.3’de gösterildi.

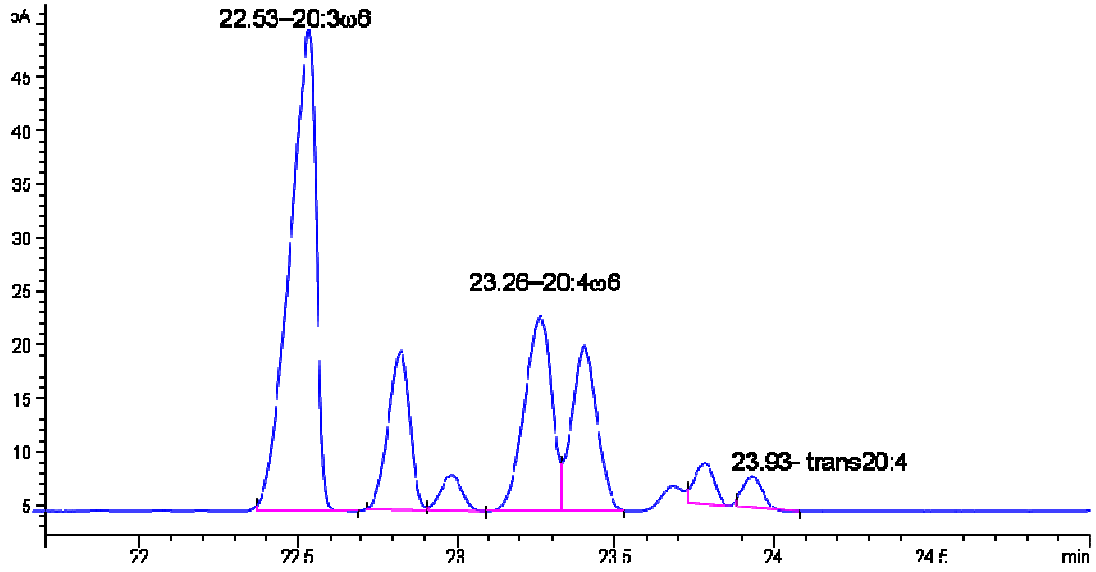
**Tablo 4.1.** Yağ Asidi Standart Piklerinin Sayısal Değerleri

	Ret. zamanı	Alan(pA*s)	yükseklik	genişlik	başlama	bitiş	alan %
14:0	6,864	333,51	180,98	0,028	6,814	6,914	100
16:0	9,117	2347,74	468,56	0,0644	9,003	9,311	100
16:1 c6	9,56	1161,54	300,79	0,0520	9,501	9,629	100
16:1 c9	9,728	710,629	217,16	0,0471	9,624	9,818	100
16:1 t9	9,437	892,588	261,90	0,0487	9,324	9,528	100
18:0	13,25	9805,83	584,29	0,2796	12,65	13,25	100
18:1 t9	13,28	653,124	132,29	0,0685	13,13	13,42	100
18:1 c9	13,705	2578,81	297,20	0,1082	13,39	13,93	100
18:1 c11	13,761	612,808	125,30	0,0680	13,60	13,89	100
18:2 trans	15,066	976,521	166,15	0,0805	14,87	15,22	100
18:2 w6	14,875	28,6888	7,9964	0,0568	14,80	14,97	100
20:0	18,67	4222,01	234,07	0,2164	18,06	19,13	100
20:1	19,34	1137,83	124,04	0,1160	19,02	19,58	100
20:3 w6	22,612	709,116	94,291	0,0987	22,37	22,81	100
20:4 w6	23,553	1395,97	152,29	0,1139	23,23	23,79	100



Şekil 4.3. Yağ asidi standartlarının çıkış (retensiyon) zamanlarına ait kromatogramlar

Ayrıca Araşidonik asid izomerlerine ait ilk çıkış başlama ve bitiş zamanı, pik alanları, yükseklik, genişlik değerleri Tablo 4.2’de ve kromatogram da Şekil 4.4’de ayrıntılı olarak verildi.



Şekil 4.4. Araşidonik Asid İzomerlerine Ait Çıkış Spektrumu

Tablo 4.2. Araşidonik Asid İzomerler Piklerinin Sayısal Değerleri

	Ret. zamanı	Alan (pA*s)	Yükseklik	Genişlik	Başlama	Bitiş	Alan %
20:3 ω6	22,531	262,157	44,948	0,0780	22,369	22,688	45,82
	22,823	70,7432	14,840	0,0696	22,717	22,907	12,36
	22,984	15,5297	3,3606	0,0699	22,907	23,094	2,714
20:4 ω6	23,263	109,908	18,317	0,0790	23,094	23,332	19,21
	23,402	85,4515	15,529	0,0811	23,332	23,528	14,93
	23,782	16,3872	3,8008	0,0602	23,730	23,881	2,864
trans 20:4	23,932	11,9725	2,9341	0,0616	23,881	24,081	2,092

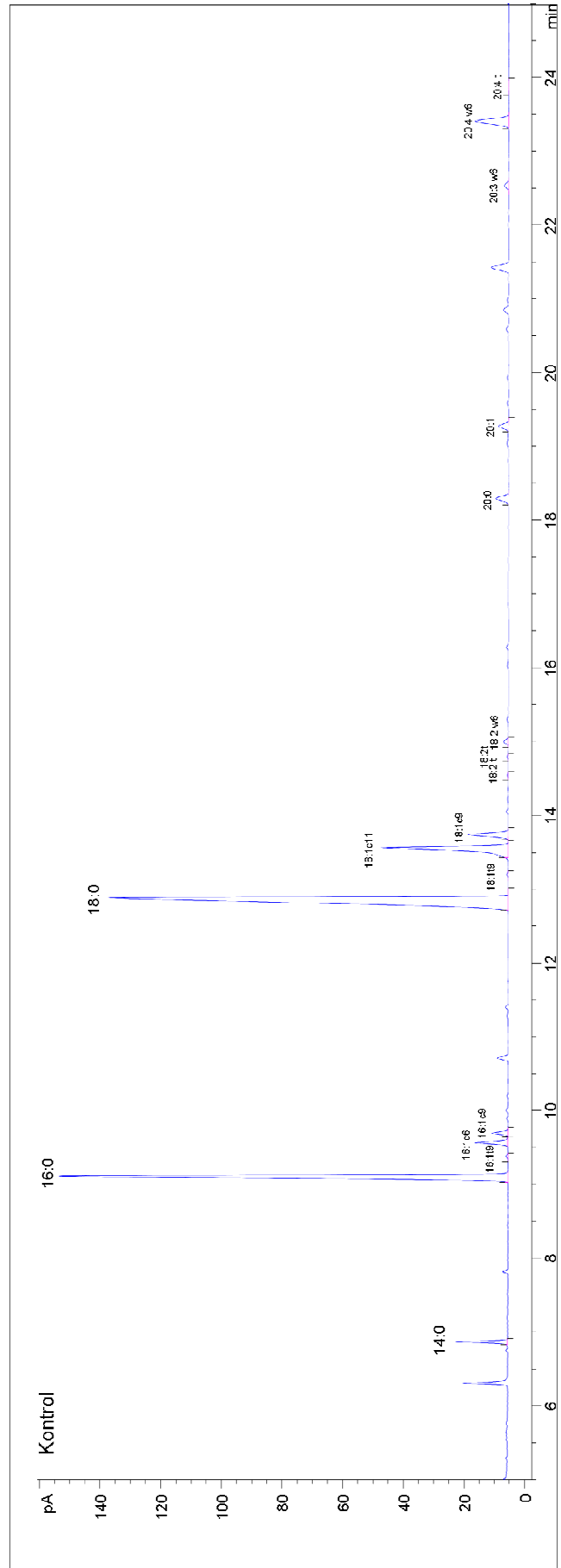


### 4.3.2. Kontrol Grubu NTERA-2 Hücrelerinin Gaz Kromatografik Analizi

Membran izolasyonu, lipidlerin saflaştırılması ve metil ester türevlerine çevrilmesi aşamalarının ardından NTERA-2 hücrelerine ait membran yağ asidi kompozisyonunu belirlemek amacı ile gaz kromatografik analizleri gerçekleştirildi. Hiçbir ilaç ile muamele edilmemiş 24 saat süresince medyumda bekletilen kontrol grubunu temsil eden bir numuneye ait retensiyon zamanı, ilk çıkışın başlama ve bitiş zamanı, pik alanları, yükseklik, genişlik değerleri Tablo 4.3'de ayrıntılı olarak verildi. Şekil 4.5'de ise kontrol grubunu temsilen bir numunenin membran lipid profilinin kromatogramı verildi.

Tablo 4.3. Kontrol Grubu Yağ Asidi Piklerinin Sayısal Değerleri

Kontrol	Rel. zamanı	Alan (pA*s)	Yükseklik	Genişlik	Başlama	Bitiş	Alan %
14:0	6,86	30,59	16,96	0,03	6,83	6,91	2,08
16:0	9,11	407,39	147,37	0,04	9,03	9,19	27,68
16:1 t9	9,38	1,93	0,69	0,05	9,31	9,43	0,13
16:1 c6	9,57	27,07	10,84	0,04	9,51	9,64	1,84
16:1 c9	9,70	12,63	5,18	0,04	9,64	9,77	0,86
18:0	12,88	683,21	131,99	0,07	12,72	13,02	46,42
18:1 t9	13,20	1,56	0,51	0,05	13,11	13,25	0,11
18:1 c9	13,56	165,18	43,03	0,06	13,43	13,67	11,22
18:1 c11	13,74	43,31	13,29	0,05	13,68	13,83	2,94
18:2 trans	14,54	1,39	0,37	0,06	14,48	14,59	0,09
18:2 trans	14,80	1,04	0,37	0,05	14,73	14,84	0,07
18:2 w6	15,00	5,15	1,51	0,06	14,92	15,07	0,37
20:0	18,29	17,29	4,13	0,07	18,21	18,41	1,17
20:1	19,28	13,10	3,22	0,07	19,19	19,40	0,89
20:3 w6	22,53	6,48	1,41	0,08	22,41	22,64	0,44
20:4 w6	23,41	53,28	11,01	0,07	23,30	23,54	3,62
trans 20:4	23,87	0,93	0,15	0,11	23,76	23,98	0,06



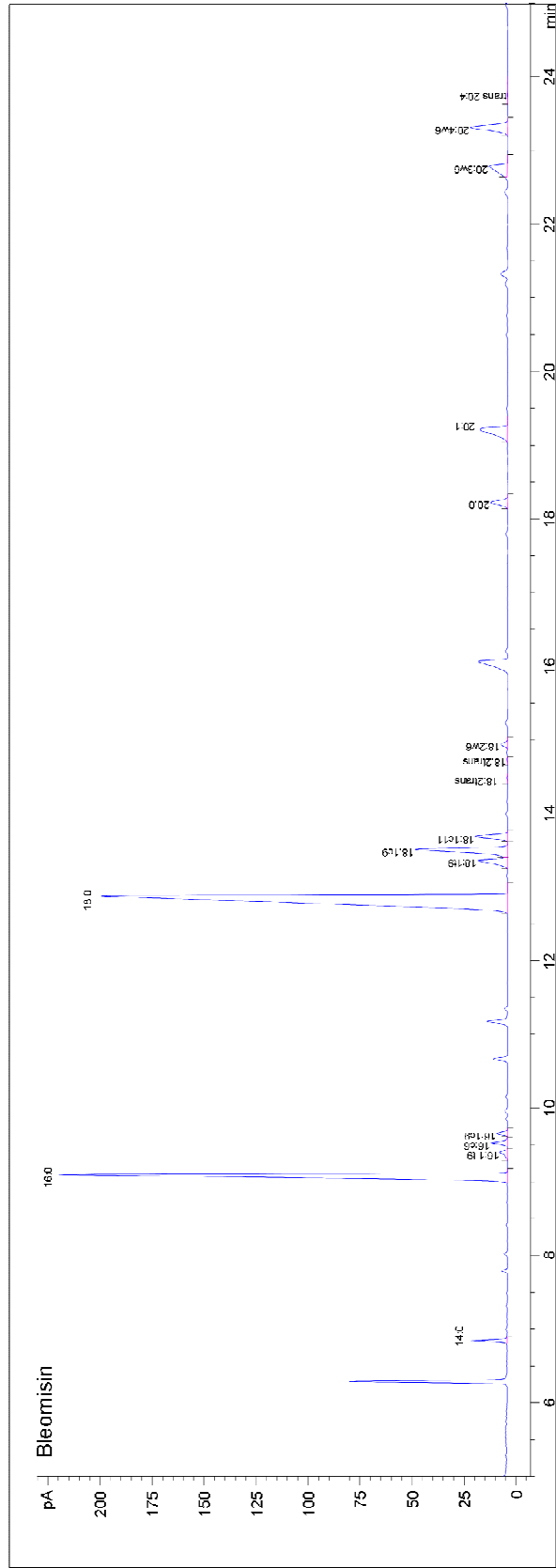
Şekil 4.5. Kontrol grubunu membran lipid profili kromatogramı.

### 4.3.3. Bleomisin ile İnkübe Edilen Ntera-2 Hücrelerinin Gaz Kromatografik Analizi

24 saat süresince 400 µg/ml Bleomisin ile inkübe edilen hücre grubuna ait numuneler arasından seçilen bir örneğe ait retensiyon zamanı, ilk çıkışın başlama ve bitiş zamanı, pik alanları, yükseklik, genişlik değerleri Tablo 4.4'de ayrıntılı olarak verildi. Şekil 4.6'da ise Bleomisin grubunu temsil eden numunenin membran lipid profili kromatogramı verildi.

**Tablo 4.4.** Bleomisin Grubu Yağ Asidi Piklerinin Sayısal Değerleri

<b>Bleomisin</b>	<b>Ret. zamanı</b>	<b>Alan (pA*s)</b>	<b>Yükseklik</b>	<b>Genişlik</b>	<b>Başlama</b>	<b>Bitiş</b>	<b>Alan %</b>
14:0	6,84	32,93	17,98	0,03	6,81	6,90	1,25
16:0	9,09	682,82	214,95	0,05	8,99	9,18	25,82
16:1 t9	9,40	12,73	3,72	0,06	9,28	9,45	0,48
16:1 c6	9,53	20,51	8,06	0,01	9,48	9,60	0,78
16:1 c9	9,66	12,87	5,24	0,04	9,61	9,73	0,49
18:0	12,88	1321,07	195,05	0,09	12,64	13,06	49,96
18:1 t9	13,36	59,44	14,51	0,06	13,25	13,40	2,25
18:1 c9	13,51	169,66	44,40	0,06	13,40	13,61	6,42
18:1 c11	13,69	52,56	15,77	0,05	13,62	13,78	1,99
18:2 trans	14,48	1,23	0,34	0,06	14,40	14,55	0,05
18:2 trans	14,73	1,03	0,33	0,05	14,66	14,78	0,04
18:2 w6	14,94	10,30	3,02	0,05	14,86	15,03	0,39
20:0	18,22	34,49	8,25	0,07	18,13	18,34	1,30
20:1	19,21	85,61	13,14	0,09	19,04	19,39	3,24
20:3 w6	22,78	56,22	8,67	0,09	22,63	22,94	2,13
20:4 w6	23,31	88,47	17,97	0,08	23,20	23,44	3,35
trans 20:4	23,76	2,41	0,27	0,15	23,62	24,00	0,09



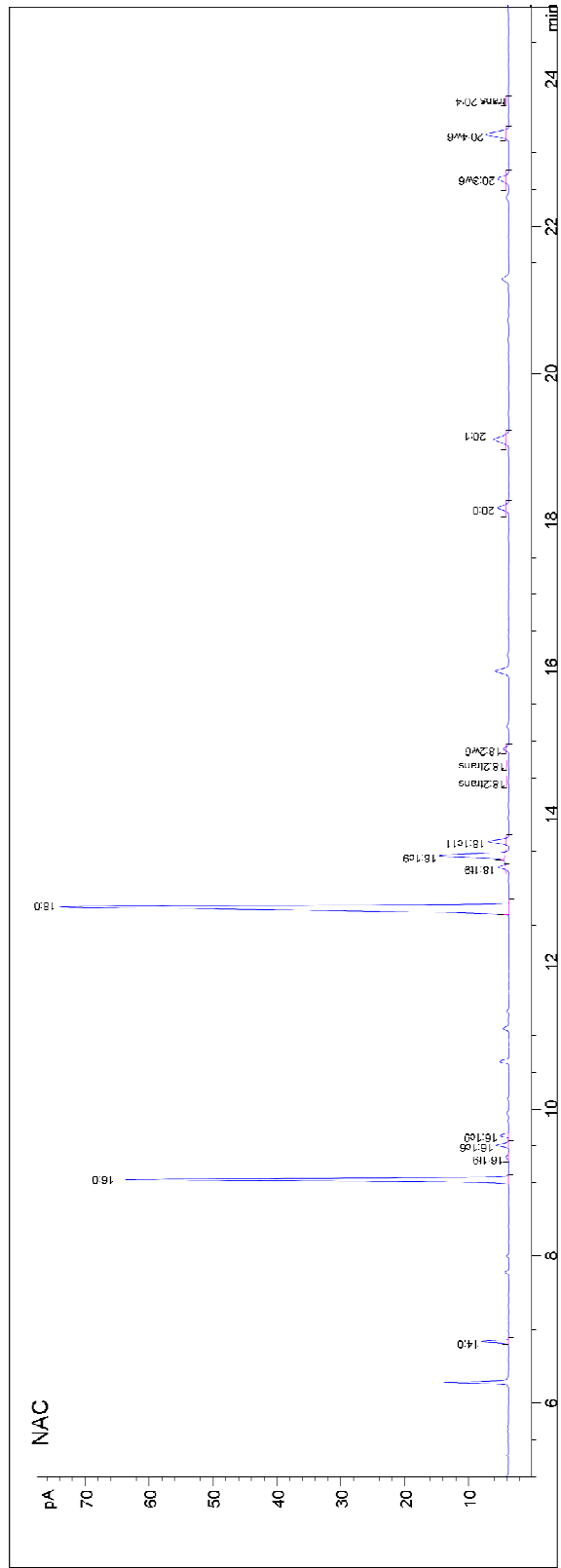
**Şekil 4.6.** Bleomisin ile inkübe edilen Ntera-2 hücrelerine ait membran lipid profili kromatogramı.

#### 4.3.4. NAC ile İnkübe Edilen NTera-2 Hücrelerinin Gaz Kromatografik Analizi

24 saat süresince 5mM NAC ile inkübe edilen NTera-2 hücrelerinin retensiyon zamanı, ilk çıkışın başlama ve bitiş zamanı, pik alanları, yükseklik, genişlik değerleri aşağıdaki Tablo 4.5’de verildi. Şekil 4.7’de ise NAC grubunu temsil eden numunenin membran lipid profili kromatogramı verildi.

**Tablo 4.5.** NAC Grubu Yağ Asidi Piklerinin Sayısal Değerleri

<b>NAC</b>	<b>Ret. zamanı</b>	<b>Alan (pA*s)</b>	<b>Yükseklik</b>	<b>Genişlik</b>	<b>Başlama</b>	<b>Bitiş</b>	<b>Alan %</b>
14:0	6,84	7,46	4,21	0,03	6,80	6,89	1,42
16:0	9,04	142,51	59,87	0,04	8,98	9,11	27,13
16:1 t9	9,34	1,38	0,44	0,05	9,27	9,40	0,26
16:1 c6	9,51	4,84	1,99	0,04	9,46	9,57	0,92
16:1 c9	9,64	3,04	1,28	0,04	9,59	9,69	0,58
18:0	12,75	270,13	70,29	0,06	12,64	12,85	51,43
18:1 t9	13,29	3,91	1,36	0,05	13,19	13,33	0,74
18:1 c9	13,45	33,91	10,57	0,05	13,38	13,53	6,46
18:1 c11	13,64	10,28	3,21	0,05	13,57	13,72	1,96
18:2 trans	14,45	0,44	0,11	0,07	14,36	14,53	0,08
18:2 trans	14,69	0,29	0,09	0,05	14,61	14,74	0,05
18:2 w6	14,90	2,87	0,85	0,06	14,83	14,96	0,55
20:0	18,18	6,98	1,69	0,07	18,05	18,27	1,33
20:1	19,10	12,11	2,28	0,09	18,96	19,22	2,31
20:3 w6	22,65	8,30	1,65	0,08	22,49	22,76	1,58
20:4 w6	23,25	16,44	3,42	0,07	23,16	23,37	3,13
trans 20:4	23,72	0,35	0,07	0,08	23,63	23,77	0,07



Şekil 4.7. NAC ile inkübe edilen Ntera-2 hücrelerinin membran lipid profili kromatogramı.

#### 4.3.5. Bleomisin ve NAC ile İnkübe Edilen NTERA-2 Hücrelerinin Gaz Kromatografik Analizi

24 saat süresince 400 µg/ml Bleomisin ve 5 mM NAC ile inkübe edilen Bleomisin+NAC grubunu temsil eden bir numuneye ait retensiyon zamanı, ilk çıkışın başlama ve bitiş zamanı, pik alanları, yükseklik, genişlik değerleri Tablo 4.6'da gösterildi. Şekil 4.8'de ise Bleomisin+NAC grubunu temsil eden numunenin membran lipid profili kromatogramı verildi.

**Tablo 4.6.** Bleomisin+NAC Grubu Yağ Asidi Piklerinin Sayısal Değerleri

Bleomisin+NAC	Ret. zamanı	Alan (pA*s)	Yükseklik	Genişlik	Başlama	Bitiş	Alan %
14:0	6,84	5,03	2,86	0,03	6,80	6,89	1,10
16:0	9,04	130,27	55,17	0,04	8,99	9,11	28,35
16:1 t9	9,34	1,01	0,35	0,05	9,28	9,38	0,22
16:1 c6	9,51	2,94	1,22	0,04	9,45	9,56	0,64
16:1 c9	9,64	1,93	0,82	0,04	9,59	9,68	0,42
18:0	12,75	243,06	63,99	0,06	12,64	12,85	52,89
18:1 t9	13,29	2,85	0,98	0,05	13,21	13,35	0,62
18:1 c9	13,45	23,66	7,33	0,05	13,38	13,54	5,15
18:1 c11	13,64	7,16	2,23	0,05	13,58	13,73	1,56
18:2 trans	14,45	0,44	0,12	0,06	14,39	14,51	0,10
18:2 trans	14,70	0,29	0,08	0,06	14,64	14,73	0,06
18:2 w6	14,90	4,25	1,25	0,06	14,83	14,97	0,93
20:0	18,18	6,39	1,53	0,07	18,05	18,26	1,39
20:1	19,09	8,56	1,65	0,09	18,97	19,22	1,86
20:3 w6	22,64	5,86	1,18	0,08	22,51	22,75	1,28
20:4 w6	23,26	15,50	3,29	0,07	23,17	23,37	3,37
trans 20:4	23,51	0,33	0,05	0,12	23,42	23,62	0,07





#### 4.4. NTera-2 Hücrelerinin Membran Fosfolipidlerindeki Yağ Asitleri

Bleomisin, NAC veya Bleomisin+NAC ile 24 saat süresince inkübe edilen NTera-2 hücrelerinin membran fosfolipid yağ asitleri ilaç inkübasyonu olmaksızın aynı koşullarda büyütülen kontrol hücreleri ile karşılaştırıldı. Kontrol olarak 24 saat medyum içinde kültüre edilen hücrelerin her bir yağ asidi için %Alan verilerinin ortalaması verildi. Değerler GC analizinde belirlenen total yağ asidi pik alanının %'si olarak verildi. n örnek sayısını gösterirken, değerler ortalama±SD olarak belirtildi. <sup>a</sup> FAME total lipid ekstraksiyonu, türevlendirmesi ve GC analizi sonucu elde edildi. <sup>b</sup> Her bir gruba ait numunelerin yağ asidi piklerinin tanımlanması standartlar aracılığı ile yapıldı. Tanımlanan pikler total piklerin %98'ine tekabül etmekteydi (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. NTera-2 Hücreleri Membran Yağ Asitlerinin %Alan Verileri

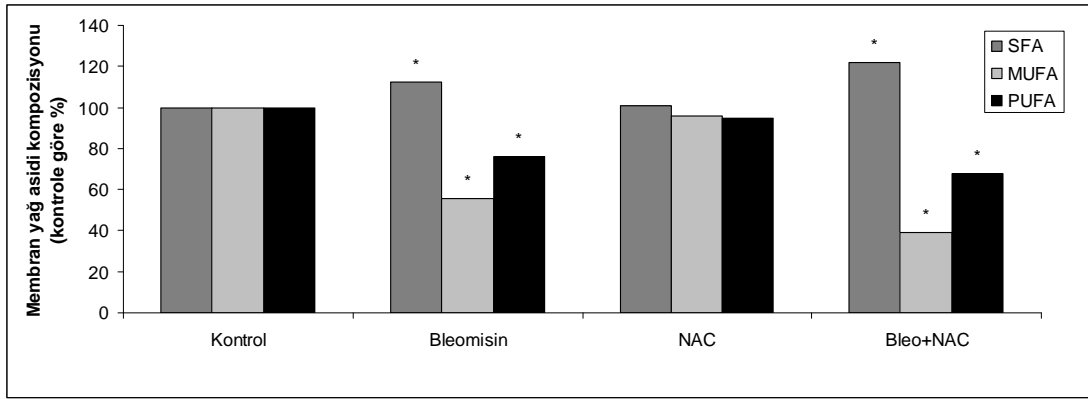
FAME <sup>a</sup>	Kontrol <sup>b</sup> n=8	Bleomisin <sup>b</sup> n=6	NAC <sup>b</sup> n=6	Bleo+NAC <sup>b</sup> n=6
14:0	2.3±0.4	1.33±0.1*	2.01±0.5	1.10±0.0***
16:0	27.4±1.5	25.94±0.2	26.73±2.2	28.32±0.2
9t-16:1	0.03±0.0	0.45±0.0***	0.13±0.0*	0.2±0.0*
6c-16:1	1.6±0.2	0.80±0.0*	1.69±0.8	0.57±0.1***
9c-16:1	1.18±0.2	0.51±0.0*	1.17±0.6	0.39±0.0*
18:0	38.52±3.0	50.38±0.6*	41.22±2.8	54.78±1.2**
9t-18:1	0.11±0.0	2.45±0.3***	0.37±0.1	0.48±0.2
9c-18:1	14.77±2.5	6.85±0.6*	13.3±7.1	4.86±0.3**
11c-18:1	3.99±0.7	2.09±0.1*	3.5±1.6	1.52±0.0**
9c, 12c-18:2	0.02±0.0	0.29±0.0***	0.14±0.0*	0.13±0.0*
18:2 w6 cis	0.65±0.3	0.43±0.1*	0.51±0.1*	0.29±0.0*
20:0	0.95±0.1	1.11±0.0	0.97±0.2	1.37±0.0*
20:1	1.06±0.3	2.37±1.2	2.07±0.7	1.46±0.6
8c, 11c, 14c-20:3	0.46±0.1	1.5±0.9*	1.25±0.8	1.28±0.1
5c, 8c, 11c, 14c-20:4	5.87±2.2	3.4±0.1*	4.87±1.6	3.18±0.2*
trans-20:4	0.03±0.0	0.09±0.0	0.05±0.0	0.07±0.0
% trans MUFA	0.14±0.0	2.9±0.2***	0.50±0.1	0.68±0.2
% trans PUFA	0.05±0.0	0.38±0.0**	0.19±0.0*	0.20±0.0*
% TOTAL trans	0.19±0.0	3.28±0.2***	0.69±0.1	0.88±0.3*
% trans/cis 18:2	3.66±0.2	68.62±8.3***	28.64±9.3**	45.04±17.1**
% trans/cis 20:4	0.61±0.2	2.66±0.1*	1.15±0.7*	2.38±1*
SFA	70.22±1.8	78.76±0.9*	70.94±3.3	85.57±1.3*
MUFA	22.61±2.3	12.63±0.4*	21.73±4.4	8.81±0.9*
PUFA	6.98±0.6	5.32±0.8*	6.64±1	4.75±0.1*
SFA/MUFA	3.10±1.8	6.24±0.3*	3.26±2.2	9.71±1.2*

\*İlaç ile inkübe edilmemiş kontrol grubundan p<0.05 anlamlı düzeyde farklı.

\*\*İlaç ile inkübe edilmemiş kontrol grubundan p<0.01 anlamlı düzeyde farklı

\*\*\* İlaç ile inkübe edilmemiş kontrol grubundan p<0.001 anlamlı düzeyde farklı

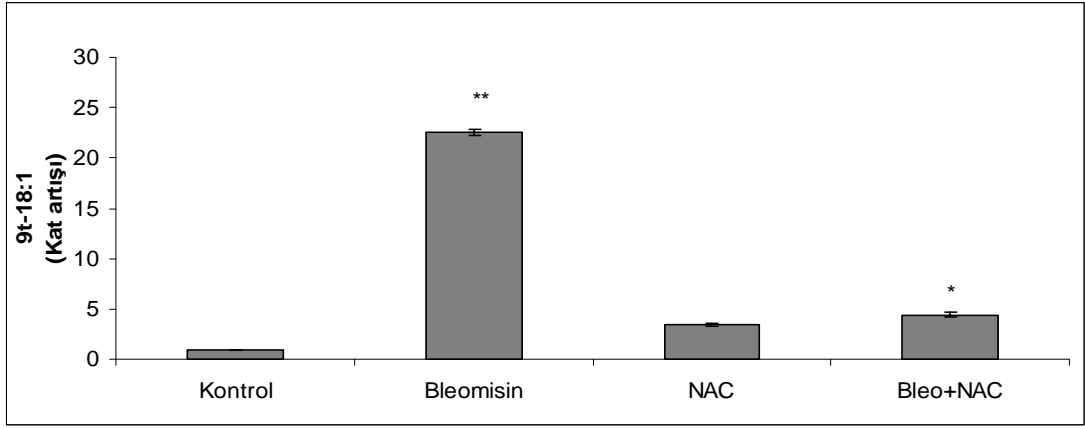
24 saat Bleomisin ve NAC ile inkübe edilen NTERA-2 hücrelerinin membran yağ asidi kompozisyonu Tablo 4.7’de gösterildi. NTERA-2 hücrelerinde 24 saat süresince sadece Bleomisin ve Bleomisin ile NAC’ın inkübasyonu miristik asidi (14:0) anlamlı düzeyde azalttı. Total doymuş yağ asidi miktarı (14:0, 16:0,18:0 ve 20:0) Bleomisin ve Bleomisin+NAC kombinasyonu ile inkübasyonda arttı. Bleomisin ve onun NAC kombinasyonu palmitoleik asid (9cis-16:1) seviyelerini kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde düşürdü ( $p<0.05$ ). 9t-16:1 seviyeleri ise kontrol ile karşılaştırıldığında Bleomisin inkübasyonu ile anlamlı düzeyde ( $p<0.001$ ) arttı. Bleomisin ve Bleomisin+NAC inkübasyonu 6c-16:1 yağ asidi seviyelerinde kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı düşüşe yol açtı ( $p<0.05$ ). Tekli doymamış yağ asitleri olan 6c-16:1, 9c-16:1, 9c-18:1 (oleik), 11c-18:1 (vakkenik) Bleomisin ve Bleomisin+NAC inkübasyonu ile anlamlı düzeyde azaldı (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9.** Bleomisin, NAC ve Bleomisin+NAC inkübasyonundan sonra doymuş, tekli (MUFA) ve çoklu (PUFA) doymamış yağ asitleri düzeylerindeki değişimler. \* $p<0.05$ kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde farklı.

Araşidonik asid (20:4) seviyeleri kontrol ile kıyaslandığında Bleomisin inkübasyonu ile anlamlı düzeyde azaldı. Omega-6 yolağında araşidonik asid prekürörleri olan linoleik (18:2) ve eikosatrienoik (20:3) asitlerin seviyeleri Bleomisin inkübasyonu ile arttı. Omega-6 ailesi üyeleri olan 18:2 w-6 ve araşidonik asid 20:4 w-6 seviyeleri ise Bleomisin etkisi ile azaldı ( $p<0.05$ ). Buna karşıt olarak Bleomisin omega-6 yağ asidi ailesinin diğer üyesi 20:3 w-6 seviyelerini arttırdı ( $p<0.05$ ). Bleomisin ve Bleomisin+NAC SFA/MUFA oranında anlamlı artışa yol açtı. Yalnızca NAC inkübasyonu ise SFA/MUFA oranını değiştirmede. Bleomisin testis kanseri hücre membranlarında SFA konsantrasyonunda önemli bir artışa, MUFA ve PUFA konsantrasyonunda ise gözle görülür bir azalmaya neden oldu. Bleomisin SFA, MUFA ve PUFA üzerinde büyük değişimlere sebep olurken, tek başına NAC anlamlı bir değişikliğe yol açmadı. Bleomisin ve NAC’ın birlikte inkübasyonu NAC’ın Bleomisin’in meydana getirdiği değişimleri baskılamadığını gösterdi.

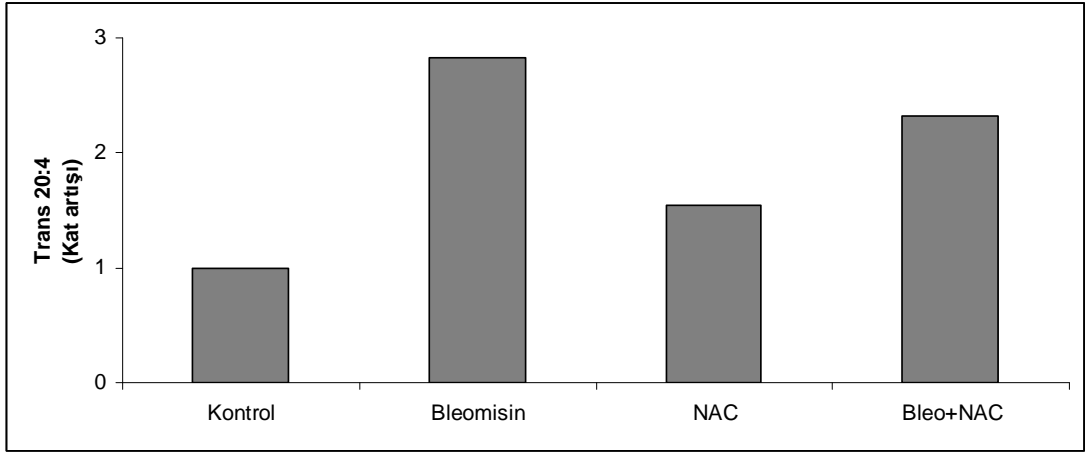
Yaptığımız kromatografik ayırım sırasında oleik asid trans izomeri (9t-18:1) (Şekil 4.10) ve araşidonik asid geometrik mono-trans izomerini (trans-20:4) (Şekil 4.11) görüntüleyerek trans yağ asitlerinin varlığını da kontrol ettik.



**Şekil 4.10.** Bleomisin, NAC ve Bleomisin+NAC ile inkübe edilen NTERA-2 hücre membranlarının oleik asid trans izomeri (9t-18:1) değişimleri. Herbir değer ortalama  $\pm$  SD olarak gösterildi.

\*  $p < 0.05$  kontrol grubundan anlamlı düzeyde farklı,

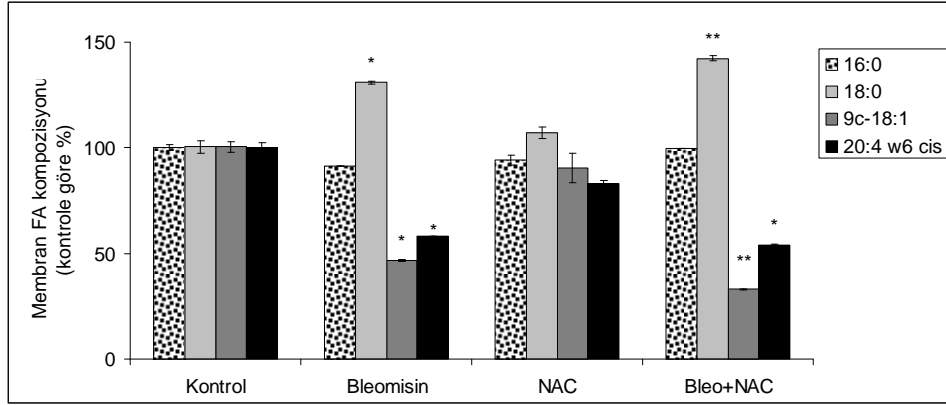
\*\*  $p < 0.001$  kontrol grubundan anlamlı düzeyde farklılığı gösterir.



**Şekil 4.11.** Bleomisin, NAC ve Bleomisin+NAC ile inkübe edilen NTERA-2 hücre membranlarının araşidonik asid trans izomeri (trans-20:4) değişimleri. Herbir değer ortalama  $\pm$  SD olarak gösterildi.

Bleomisin grubunda 9t-18:1 trans-oleik asid seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 22 kat, Bleomisin+NAC ile inkübe edilen hücreler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4 kat artış gösterdi (Şekil 4.10). Trans 20:4 araşidonik asid seviyeleri Bleomisin ve onun NAC kombinasyonunda artış gösterdi. Bleomisin ile inkübe edilen NTERA-2 hücrelerinde artan trans yağ asitleri serbest radikal stresini ve direk olarak lipid remodeling ile ilişkili doğal cis içeriğinin geometrik transformasyonunu gösterdi. NTERA-2 hücre membranları yağ asidi kompozisyonunda meydana gelen ana değişimler Bleomisin ve Bleomisin+NAC ile inkübe edilen hücre gruplarında meydana geldi. Palmitik asid (16:0) seviyeleri tüm gruplarda benzer düzeydeydi. Bleomisin ve Bleomisin+NAC ile inkübe edilen hücrelerde stearik asid (18:0) asid artışı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde idi. Araşidonik asid (20:4) içeriği kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Bleomisin (42%) ve Bleomisin+NAC (%46) grubunda anlamlı düzeyde düşük olarak gözlemlendi. 9c-18:1

oleik asid seviyesi Bleomisin ve onun NAC kombinasyonu ile önemli düzeyde azaldı (Şekil 4.12).



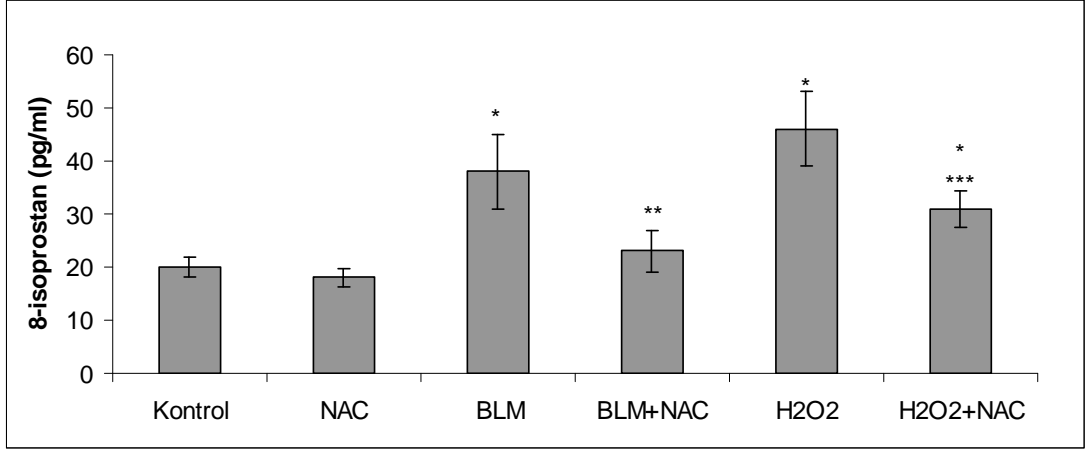
**Şekil 4.12.** Bleomisin, NAC ve Bleomisin+NAC ile inkübe edilen NTera-2 hücre membranlarının Palmitik asid (16:0), Stearik asid (18:0), Oleik asid (9c-18:1) ve Araşidonik asid düzeyleri.

\*p<0.05 kontrol grubundan anlamlı düzeyde farklı,

\*\*p<0.01 kontrol grubundan anlamlı düzeyde farklı.

#### 4.5. 8-İsoprostan Analizi Sonuçları

Ntera-2 hücrelerinde NAC, Bleomisin, Bleomisin+NAC, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NAC inkübasyonunu takiben hücresel 8-isoPGF<sub>2</sub> $\alpha$  seviyeleri ölçüldü. Bleomisin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 8-isoprostan seviyelerini kontrol ve yalnızca NAC uygulanan grup ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde arttırdı. Bleomisin+NAC ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NAC inkübasyonlarında 8-isoprostan seviyeleri yalnızca Bleomisin ve yalnızca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübe edilen gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde azaldı (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. NAC, Bleomisin (BLM), BLM+NAC, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NAC ile inkübe edilen Ntera-2 hücrelerindeki 8-isoprostan seviyeleri.

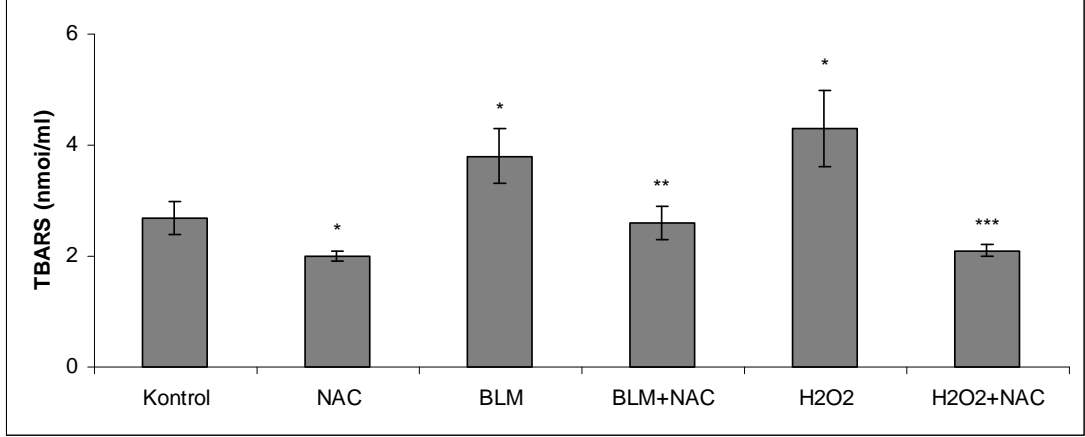
\* p<0.02 bleomycin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NAC ile inkübe edilen Ntera-2 hücreleri kontrol ve NAC grubu ile karşılaştırıldığında,

\*\* p=0.03 bleomycin+NAC ile inkübe edilen Ntera-2 hücreleri Bleomisin grubu ile karşılaştırıldığında,

\*\*\* p=0.03 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NAC ile inkübe edilen Ntera-2 hücreleri H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu ile karşılaştırıldığında.

#### 4.6. TBARS Analiz Sonuçları

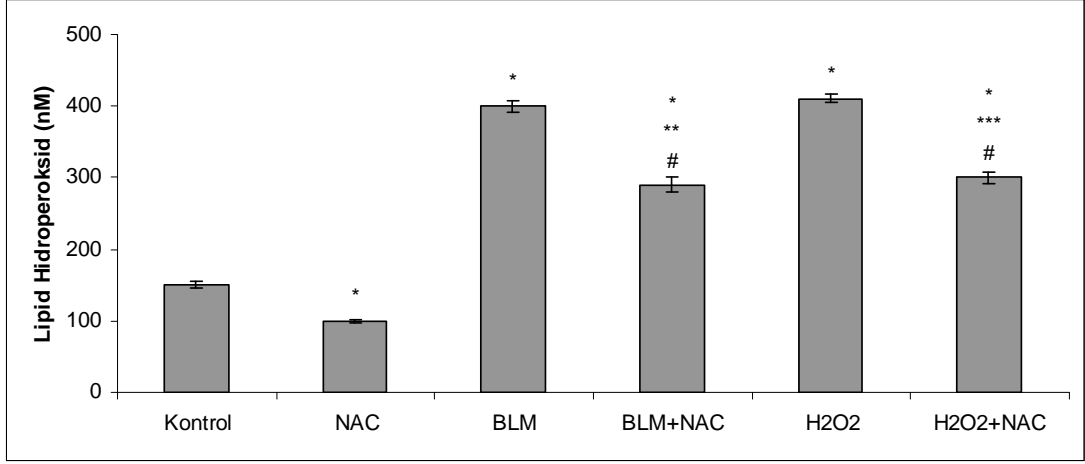
Ntera-2 hücrelerinde NAC, Bleomisin, Bleomisin+NAC, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NAC inkübasyonunu takiben TBARS seviyeleri ölçüldü. Bleomisin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübe edilen hücrelerde TBARS seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde arttı. NAC ile inkübasyon TBARS seviyelerinde düşüşe neden oldu. NAC'in Bleomisin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile kombine olarak kullanımı TBARS düzeylerini yalnızca Bleomisin ve yalnızca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile kıyaslandığında anlamlı şekilde azalttı (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** Bleomycin (BLM), BLM+NAC, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NAC ile inkübe edilen Ntera-2 hücrelerinde TBARS seviyeleri  
\* p<0.04 NAC, Bleomisin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübe edilen hücreler kontrol hücreleri ile kıyaslandığında,  
\*\* p<0.03 Bleomisin+NAC ile inkübe edilen hücreler yalnızca Bleomisin uygulanan hücreler ile kıyaslandığında,  
\*\*\* p<0.01 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NAC ile inkübe edilen hücreler yalnızca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan hücreler ile kıyaslandığında.

#### 4.7. Lipid Hidroperoksid Analiz Sonuçları

NAC inkübasyonu lipid hidroperoksid seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalttı. Bleomisin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lipid hidroperoksid düzeylerini kontrole göre anlamlı düzeyde arttırdı. Bleomisin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in NAC ile kombinasyonu lipid hidroperoksid seviyelerini Bleomisin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in tek başlarına uygulandığı gruplar ile karşılaştırıldığında önemli düzeyde azalttı (Şekil 4.15).



**Şekil 4.15.** Bleomycin (BLM), BLM+NAC, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NAC ile inkübe edilen NTERA-2 hücrelerinde Lipid hidroperoksid seviyeleri  
\* p<0.03 NAC, Bleomisin, Bleomisin+NAC, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NAC uygulanan NTERA-2 hücreleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında,  
\*\* p<0.03 Bleomisin+NAC grubu NTERA-2 hücreleri yalnızca Bleomisin uygulanan hücreler ile kıyaslandığında,  
\*\*\* p<0.03 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NAC ile inkübe edilen NTERA-2 hücreleri yalnızca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan hücreler ile kıyaslandığında,  
# p<0.03 Bleomisin+NAC, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NAC uygulanan NTERA-2 hücreleri yalnızca NAC uygulanan hücreler ile kıyaslandığında.

## TARTIŞMA

Daha önce yapmış olduğumuz çalışmalarda testis kanser hücrelerinde Bleomisin aracılı apoptotik etkileri araştırmış ve sonuçlarımızı yayınlamıştık [194] [195] [196]. Bu çalışmamızda testis kanser hücre membranlarında lipidom durumlarını araştırdık. NTera-2 hücrelerini 24, 48 ve 72 saat süresince Bleomisin'in 20-700 µg/ml aralığında değişen dozları ile inkübe ederek Bleomisin'in IC<sub>50</sub> konsantrasyonunu 24 saat için 400 µg/ml, 48 saat için 100 µg/ml ve 72 saat için 20 µg/ml olarak bulduk. 24 saat 400 µg/ml Bleomisin ile beraber inkübe edilen NAC'ın değişen dozları arasında 5 mM NAC yalnızca Bleomisin ile inkübe edilen grup ile karşılaştırıldığında hücre canlılığının en yüksek düzeyde sürdürülmesini sağladı. Bu nedenle de çalışmamızda 5 mM NAC dozu kullandık. Çalışmamızda Bleomisin'in testis hücre membranlarında lipidler açısından yol açabileceği değişimleri ve bu değişim üzerinde güçlü bir antioksidan olan NAC'ın etkilerini analiz etmeyi hedefledik. Bu amaçla 5 mM NAC varlığında ve yokluğunda 400 µg/ml Bleomisin ile inkübe edilen NTera-2 hücrelerinde membran yağ asidi kompozisyonunu ve oksidatif stres ile ilişkili belirteçler olan 8-izoprostan, TBARS ve Lipid hidroperoksid seviyelerini belirledik.

Hücre membran lipid profilinin tanımlanması kanser hücrelerinin hayatta kalabilme mekanizmalarının belirlenebilmesinde de önemlidir. Gerçekleştirdiğimiz analizler özellikle membran fosfolipidlerinin yağ asidi birimlerinin seviyelerini ve onların doğal geometrisini ortaya çıkardı. Yağ asitlerinin geometrik trans izomerleri çift bağa göre aynı tarafta iki zincir içerir. Trans izomerler hücre, hayvan ve insan modellerinde stres sırasında izomerize edici serbest radikal türleri tarafından oluşturulur [193]. Trans yağ asitleri kanser tedavisinde yeni hedef olarak görülmektedirler. Trans yağ asitlerinin yapılarının ve fonksiyonlarının tanımlanmasının yanı sıra cis ve trans lipid geometrisinin biyokimyasal önemini anlamayı amaçlayan multidisipliner çalışmalar yürütülmektedir. Yağ asitlerinin cis-trans geometrisinin değişmesi, membran fonksiyonu ve sinyalizasyonunda değişimlere yol açarak hücrel cevabı uyarır ve biyolojik sistemi hasara uğratabilir. Bleomisin etkisi sonucu ortaya çıkan membran lipid profili değişiklikleri daha önce hiç çalışılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda Bleomisin'in meydana getirebileceği membran değişikliklerini analiz etmeyi hedefledik.

Çalışmamızda hücre kültürü için standart bir protokol takip ettik. Tüm hücre grupları aynı koşullar altında hazırlandı. Membran fosfolipid yapısında iki yağ asidi kuyruğunun bulunmasından dolayı bir yağ asidi seviyesindeki değişim diğer yağ asidi rezidüsü ile korelasyon gösterebilir. Hücre membranlarının yağ asidi kompozisyonunda meydana gelen değişimler membran akışkanlığı ve geçirgenliğinde değişimlere sebep olur. Bleomisin inkübasyonundan sonra membran yağ asidi kompozisyonunda çok önemli modifikasyonlar gözlemlendi. Çalışmamızda membran yağ asidi kompozisyonu analizi ile Bleomisin'in NTera-2 hücre



membranlarında SFA yüzdesini arttırırken, MUFA ve PUFA yüzdesini azalttığını belirledik (Şekil 4.9). Araşidonik asid hücrelerin lipid yapımı ve fonksiyonuna katkıda bulunan, membran lipidomundaki en temel bileşendir [197]. Bleomisin, omega-6 yağ asidi ailesi üyeleri olan linoleik asid (18:2 w-6) ve araşidonik asid (20:4 w-6) seviyelerinin önemli düzeyde ( $p<0,05$ ) azalmasına yol açtı. Çoklu doymamış yağ asidi ailesi üyelerinin (18:2 ve 20:4) azalması Bleomisin'in meydana getirdiği oksidatif hasardan kaynaklanabilir. Araşidonik asidin (20:4) öncülleri olan linoleik (9c,12c 18:2) ve eikosatrienoik (20:3) asid ise Bleomisin inkübasyonu sonucu arttı. Bleomisin araşidonik asid trans izomeri (trans 20:4) seviyesinde de artışa neden oldu. Çalışmamızda insan testiküler kanser hücre membranlarında Bleomisin spesifik olarak elaidik asid (9t-18:1) artışına da neden oldu. Bunun nedeni, Bleomisin'in membranda oleik asitten zengin bir bölgeye yerleşmesi ve bu bölgede tiyil radikalleri oluşturmasından kaynaklanmaktadır. Bizim bulgularımıza benzer şekilde meme kanser hücrelerinde SFA olan palmitatın apoptozisi arttırdığı, MUFA sınıfı oleik asidin ise proliferasyonu arttırdığı ve palmitat aracılı apoptozise karşı koruyucu olduğu rapor edilmiştir [198]. Eksojen olarak alınan yağların aksine kanser hücrelerince endojen olarak üretilen yağ asidlerinin malign ve agresif fenotip ile ilişkili oldukları bildirilmiştir [199]. Çalışmamızda Bleomisin'e maruz kalan hücrelerin membran yağ asidi kompozisyonunda meydana gelen ana etkileri, artan trans yağ asidi üretimi ve araşidonik asitteki anlamlı azalma, yüksek SFA ve düşük MUFA ve PUFA içeriği olarak bulduk. Bleomisin'in NAC ile birlikte kullanımı SFA, MUFA ve PUFA seviyelerini kontrol düzeyine çekemedi. Bleomisin ve Bleomisin+NAC SFA/MUFA oranında anlamlı artışa yol açtı. Yalnızca NAC inkübasyonu ise SFA/MUFA oranını değiştirmede. Bleomisin SFA, MUFA ve PUFA üzerinde büyük değişimlere sebep olurken, tek başına NAC anlamlı bir değişikliğe yol açmadı. Bleomisin ve/veya NAC inkübasyonları sonrası yapılan lipidom analizleri Ntera-2 hücre membranlarında araşidonik asidin kritik rolünü ortaya koydu. Bleomisin'in NAC ile kombine inkübasyonu, membran araşidonik asid seviyelerinin azalmasına neden oldu. NAC Bleomisin tarafından oluşturulan trans lipid izomerlerini (9t-18:1 ve trans-20:4) azaltmıştır. NAC'ın bu etkileri onun antioksidatif ve antiapoptotik etkileri ile ilişkili olabilir. Elde ettiğimiz sonuçlar Bleomisin ve NAC'ın insan testiküler kanser hücrelerinde membran lipid profilinin düzenlenmesinde önemli rolü olduğunu gösterdi. Daha önce yapılan hiçbir çalışmada kemoterapi sonrası testis kanser hücrelerinde meydana gelen yağ asidi değişimleri araştırılmamıştır.

Membran lipidom profilinin belirlenmesi hücre biyolojisi deneylerinde hücrelerin karakterizasyonunun belirlenmesi ve membran yağ asidi organizasyonunun yenilendiği durumların belirlenmesinde güçlü bir araçtır. Çalışmamızın sonuçları Bleomisin'in trans lipid izomerlerinin oluşum yollarına aracılık ettiğini ve kemoterapötiklerin bu yollar aracılığı ile hücre ölümünü uyarabileceğine dair güçlü kanıtlar vermektedir. Ayrıca çalışmamız sonucu bulduğumuz, hücre membranı fosfolipidlerdeki trans lipid oluşumu ileriki çalışmalar için ilham kaynağı olabilir. Çalışmamızın sonuçları daha etkili kanser tedavi stratejilerinin tasarlanmasında da kullanılabilir.

DNA sarmalı kırıkları, çeşitli uzunluktaki zincirlere ait nükleotid bazları ve oligonükleotidler ile düşük moleküler ağırlıktaki bileşikler tiyobarbütirik asid ile

reaksiyona girer ve salınır [200]. Antioksidanlar birçok anti-kanser ilacın etkisini azaltabilir ya da önleyebilir. Bazı antioksidanlar için bu koruyucu etki onların antioksidan özelliklerinden başka aktivitelerinden kaynaklanmaktadır. Kanser hastalarının antioksidan seviyeleri onların kemoterapiye cevabında önemli rol oynayabilir. Ancak kemoterapi sırasında antioksidanlar ile destekleyici besinsel terapi lipid peroksidlerin oluşumunu azaltarak oksidatif stresin büyümei inhibe edici etkilerini yenebilir. Bu nedenle kemoterapi sırasında antioksidan kullanılması dikkatle düşünülmelidir [64]. Oksidatif stres ile ilişkili birçok hastalıkta terapötik olarak kullanılan NAC'ın kanser kemoterapisi sırasında kullanılması ve kemoterapötik ilacın hassasiyetini nasıl etkilediği iyice araştırılmalıdır.

Lipid peroksidasyonunun belirlenmesi kanserde oksidatif hasarın değerlendirilmesinde önemlidir. Bleomisin'in etkisi ile oluşan akciğer hasarında NAC'ın lipid peroksidasyonunu azaltıcı etkisi yapılan önceki çalışmalarda gösterilmiştir [201] [40]. Yayınlamış olduğumuz önceki çalışmalarımızda önemli bir antioksidan olan curcuminin testis kanser hücrelerinde Bleomisin indüklü lipid peroksidasyonunu baskıladığını gösterdik [54]. Çiftçi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada NAC'ın semen parametreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. NAC uygulanması total antioksidan kapasiteyi arttırmış ve total peroksid ve oksidatif stres indeksini azaltmıştır [202]. NAC'ın Bleomisin'in neden olduğu akciğer hasarını azalttığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [201] [203]. Daha önceki çalışmalarımızda testis kanser hücrelerinde NAC ile inkübasyonun Bleomisin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aracılı oksidatif stresi önemli düzeyde azalttığını gösterdik ve NAC'ın Bleomisin'in indüklediği apoptozisi azalttığını bulduk [194]. Bizim bulgularımıza benzer şekilde Zachwieja ve arkadaşları kültüre edilmiş T lenfositlerinde oksidatif stresin NAC tarafından inhibisyonunu bildirmişlerdir [204]. Quadrilatero ve arkadaşları farelerde NAC injeksiyonunun hücre içi glutatyon seviyelerinin sürdürülmesini sağladığını, fosfatidilserin eksternalizasyonunu ve mitokondrial membran depolarizasyonunu önlediğini göstermişlerdir [205]. NAC'ın oksidatif strese karşı iyileştirici etkileri bulunmaktadır. Ancak NAC antikanser ajan olan doksorubisin ile kullanıldığında prooksidan ve antioksidan mekanizmalar aracılığı ile hücre içi glutatyon-redoks dengesinde değişimlere neden olduğu bildirilmiştir [206]. NAC Cisplatin ile kombine edildiğinde ise nörotoksisiteyi ve kanser hücre apoptozisini inhibe etmiştir [207].

8-izoprostan güvenilir bir oksidatif stres belirteçidir. Çalışmamızda Bleomisin N<sub>T</sub>era-2 testis kanser hücrelerinde 8-izoprostan düzeylerini anlamlı düzeyde arttırdı. Testis kanser hücrelerinde Bleomisin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktivitesi sonucu 8-isoPGF2 $\alpha$  seviyesi artışını ilk kez biz bulup ortaya çıkardık. NAC ile inkübasyon Bleomisin'in neden olduğu artmış 8-izoprostan seviyelerini azalttı.

Lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde TBARS ölçümü yaygın kullanılan bir methodur. Çalışmamızda ayrıca Bleomisin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübe edilen hücrelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TBARS seviyelerinin arttırdığını gözlemledik. Çalışmamızda NAC inkübasyonunun TBARS seviyelerini kontrol ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde azalttığını saptadık. Bleomisin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> TBARS düzeylerinde anlamlı artışa neden olurken, NAC ile birlikte inkübe edildiklerinde (BLM+NAC ya da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> +NAC) TBARS düzeylerinin tek başlarına inkübasyon ile kıyaslandığında azalmasına

yol açtılar. Benzer şekilde Kelly ve arkadaşları pulmoner hasarda Bleomisin'in TBARS düzeylerini arttırdığını ve NAC ile birlikte Bleomisin uygulamasının TBARS düzeylerini azalttığını rapor etmişlerdir [201]. Çalışmamızda NAC ile inkübasyonun TBARS ve lipid hidroperoksid düzeylerini azalttığını gösterdik. Sonuçlarımız Bleomisin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkübasyonunun lipid peroksidasyonu, 8-izoprostan üretimi, lipid hidroperoksid oluşumu aracılığı ile oksidatif stres parametrelerinde anlamlı artışa neden olduğunu gösterdi.

Daha önce yapmış olduğumuz çalışmalarımızda Bleomisin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in 8-isoprostan, protein karbonil, TBARS ve Lipid hidroperoksid düzeylerini anlamlı düzeyde arttırırken antioksidan kapasite ve GSH düzeylerini önemli düzeyde azalttığını bildirmiştik. Yapılan önceki çalışmalarda Bleomisin'in ROS oluşumunu katalizlediğini ve nihayi olarak lipid peroksidasyonuna yol açtığını rapor edilmiştir [208]. Bu etkiler Bleomisin aracılı serbest radikal üretimini takip eden ikincil olaylardır. Serbest radikaller amino asit yan zincirlerini karbonil birimlerine dönüştürmektedir. Önceki yayınlarımızda 8-izoprostan ve TBARS ölçümlerine ilaveten protein oksidasyonunun genel bir göstergesi olan protein karbonil içeriğini belirledik. Çalışmamızda Bleomisin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aracılı oksidatif protein hasarını 2,4-DNPH ile işaretleme metodu kullanarak belirledik. Testis kanser hücrelerinde Bleomisin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin protein karbonil içeriği arttırması, hücre ölümüne olan yatkınlığı arttırdıklarını gösterdi [54] [209].

Antholine ve arkadaşları Fe(II)BLM varlığında tiyollerin DNA kırıklarının oranını arttırdığını rapor etmişlerdir [210]. Bu reaksiyonun sistein aracılığı ile arttırılması Fe(III)BLM 'in Fe(II)BLM'e indirgeme kabiliyetinden kaynaklanabilir. Ancak GSH'ın zincir kırılma reaksiyonunu arttırabilme yeteneği bu mekanizmaya dayandırılmaz. Çünkü zincir kırılması için birçok elektrona ihtiyaç vardır. GSH BLM-demir kompleksine bağlı redükte oksijen ara ürününe bir elektron sağlayabilir. Bu yolla elektronlar direk olarak Fe(III)BLM 'e verilmeden zincir kırıkları arttırılabilir. Bunun için GSH Fe(III)BLM–DNA kompleksine bağlanmalıdır. NAC hücre içinde GSH sentezinin öncüsü olan kuvvetli bir antioksidandır [211]. ROS birçok hücre içi oksidaz enzimleri ve mitokondriyal respirasyon ile sürekli olarak üretilir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Fenton reaksiyonları ile üretilen hidroksil radikalinin birincil öncüsüdür. Hidroksil radikali DNA, lipidler ve proteinler gibi hücrel makromoleküller için yüksek düzeyde reaktiftir. Maheshwari ve arkadaşları NAC'e maruz kalan rat testiküler germ hücreleri H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele edildiğinde apoptozis yüzdesinin önemli düzeyde azaldığını rapor etmiştir [212].

Total antioksidan kapasitesi serbest radikal üretiminin önlenmesinde ve oksidatif hasarın onarılmasında tüm total koruyucu antioksidan mekanizmaların bir göstergesidir [213]. Çalışmamızda Bleomisin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> total antioksidan kapasitenin ve GSH seviyelerinin tükenmesine neden olurken NAC ile kombine olarak kullanıldıklarında NAC total antioksidan kapasite düzeylerini arttırdı [209]. NTERA-2 hücrelerinde NAC total antioksidan kapasite seviyelerinin artması üzerinde etkilidir.

Antioksidanların geleneksel tedavilerin etkinliğini arttırdığı ve radyasyon ve kemoterapinin bazı ciddi yan etkilerini azalttığını gösteren veriler oldukça fazladır [61]. Birçok kemoterapötik ilacın ROS oluşumunu indüklemesine rağmen onların antikanser etkileri sadece serbest radikallerin oluşumuna bağımlı değildir. Kanser hücrelerinde aşırı ROS hücre büyümesini yavaşlatır ya da durdurur. Hücre

büyümesinin yavaşlaması ya da durması hücre proliferasyonu hızlı iken etkin olan antikanser ilaçlarının etkinliğini azaltır. Bu nedenle kemoterapi sırasında antioksidan takviyesi oksidatif stresin büyümei inhibe edici etkilerini yenebilir ve anti-neoplastik ajanlara cevabın sürdürülmesini sağlayabilir [61]. Böylece antioksidan takviyesi kemoterapinin pozitif etkilerinin inhibe etmeden serbest radikal aracılı yan etkilerin önlenmesine yardımcı olabilir ve kanser kemoterapisine cevabın artırılmasında güvenli ve etkili imkan sağlar. Antioksidanların etkilerinin kemoterapi ve radyasyon ile sinerjistik [195] olduğu durumlarda hastalar standart tedaviyi daha iyi tolere eder, daha az kilo kaybeder, daha iyi yaşam kalitesine sahip olur ve ek katkı maddesi almayan hastalara göre daha uzun yaşam süresine sahip olurlar. Üç antioksidanın geleneksel kanser terapisinin etkinliğini azalttığı gösterilmiştir. Bu antioksidanlardan biri Cisplatin ve Doksorubisin ile kullanılan NAC'dir [61]. Çalışmamızda testis germ tümör hücrelerinde NAC'in Bleomisin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin neden olduğu oksidatif stresi azalttığını gösterdik. Bulgularımıza dayanarak NAC'in Bleomisin ile birlikte kullanımından kaçınılmasının ya da en azından testis kanser hastalarının tedavisi sırasında dikkatle takip edilmelerinin gerektiği sonucu çıkarılabilir. Antioksidan takviyesinin yararlı, zararlı ya da nötral olması antioksidanın özelliklerine ve dozuna, kullanılan kemoterapi ilacına, tedavi edilen kanser tipine ve hastanın tükettiği diyeteye bağlıdır. Bu alanda yapılan klinik randomize çalışmalar az sayıdadır. Tek bir antioksidanın ve antioksidan kombinasyonlarının geleneksel kanser tedavisindeki etkilerinin tamamen açıklanması için iyi düzenlenmiş randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

## SONUÇLAR

Bulduğumuz deneysel verilere göre sonuçlarımızı şu şekilde özetleyebiliriz:

1. Bleomisin testis kanser hücre membranlarında doymuş yağ asidi ve yağ asidi trans izomerlerinin artmasına neden oldu.
2. Bleomisin testis kanser hücre membranlarında tekli ve çoklu doymamış yağ asidlerinin azalmasına neden oldu.
3. N-asetil sistein testis kanser hücre membranlarında Bleomisin'in neden olduğu artan trans yağ asidi izomerlerinin azalmasına neden oldu.
4. Bleomisin testis kanser hücrelerinde oksidatif stres belirteçleri olan 8-izoprostan, TBARS ve Lipid Hidroperoksid düzeylerinin artmasına neden oldu.
5. N-asetil sistein testis kanser hücrelerinde Bleomisin'in neden olduğu 8-izoprostan, TBARS ve Lipid Hidroperoksid artışını baskıladı.

## ÖZGEÇMİŞ

Ayşegül ÇÖRT, 05.03.1983 yılında Antalya’da doğdu. İlköğrenimini İstanbul Pendik Orhan Sinan Hamzaoğlu İlköğretim Okulu’nda, lise öğrenimini Pendik Lisesinde tamamladı. Yüksek öğrenimini 2005 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünde tamamladı. 2005 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğretimine başladı. 2008 yılında yüksek lisans eğitimini bitirerek doktora eğitimine başladı. 2011 yılında Doktora tez deneylerini yapmak üzere CNR-Bologna İtalya’ya görevlendirildi. 2013 yılında ise Federation of European Biochemical Societies (FEBS) ve European Molecular Biology Organization (EMBO) burslarını kazanarak Imperial College London-İngiltere’de görevli olarak bulundu. Yabancı dili İngilizcedir.

## KAYNAKLAR

1. Brown, H.A. and L.J. Marnett, *Introduction to lipid biochemistry, metabolism, and signaling*. Chem Rev, 2011. **111**(10): p. 5817-20.
2. Fox, B.G., K.S. Lyle, and C.E. Rogge, *Reactions of the diiron enzyme stearyl-acyl carrier protein desaturase*. Acc Chem Res, 2004. **37**(7): p. 421-9.
3. Yin, H., L. Xu, and N.A. Porter, *Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis*. Chem Rev, 2011. **111**(10): p. 5944-72.
4. Chatgililoglu, C. and C. Ferreri, *Trans lipids: the free radical path*. Acc Chem Res, 2005. **38**(6): p. 441-8.
5. Ferreri, C. and C. Chatgililoglu, *Geometrical trans lipid isomers: a new target for lipidomics*. Chembiochem, 2005. **6**(10): p. 1722-34.
6. Destailats, F., et al., *Trans Fatty Acids in Human Nutrition*. 2009, The Oily Press: Bridgewater.
7. Fox, P.F., P.L. McSweeney, and E. H., *Advanced Dairy Chemistry*. 3 ed. Lipids. Vol. 2. 2006, New York: Springer.
8. Cevc, G., *Biochemistry* 1991. **30**.
9. Conklin, K.A., *Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness*. Integr Cancer Ther, 2004. **3**(4): p. 294-300.
10. Lamson, D.W. and M.S. Brignall, *Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies*. Altern Med Rev, 1999. **4**(5): p. 304-29.
11. Akan, I., et al., *N-acetylcysteine enhances multidrug resistance-associated protein 1 mediated doxorubicin resistance*. Eur J Clin Invest, 2004. **34**(10): p. 683-9.
12. Quiles, J.L., et al., *Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity*. Toxicology, 2002. **180**(1): p. 79-95.
13. Kawai, K., et al., *Treatment outcome of metastatic testicular cancer at a single institution in Japan, a country with low incidence of germ cell tumor*. Jpn J Clin Oncol, 2006. **36**(11): p. 723-30.
14. Huyghe, E., P. Plante, and P.F. Thonneau, *Testicular cancer variations in time and space in Europe*. Eur Urol, 2007. **51**(3): p. 621-8.
15. McIver, S.C., et al., *The rise of testicular germ cell tumours: the search for causes, risk factors and novel therapeutic targets*. F1000Res, 2013. **2**: p. 55.
16. Frazier, A.L., C. Weldon, and J. Amatruda, *Fetal and neonatal germ cell tumors*. Semin Fetal Neonatal Med, 2012. **17**(4): p. 222-30.
17. Bahrami, A., J.Y. Ro, and A.G. Ayala, *An overview of testicular germ cell tumors*. Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(8): p. 1267-80.
18. Looijenga, L.H., et al., *Dissecting the molecular pathways of (testicular) germ cell tumour pathogenesis; from initiation to treatment-resistance*. Int J Androl, 2011. **34**(4 Pt 2): p. e234-51.

19. Kristensen, D.M., et al., *Origin of pluripotent germ cell tumours: the role of microenvironment during embryonic development*. Mol Cell Endocrinol, 2008. **288**(1-2): p. 111-8.
20. Baade, P., P. Carriere, and L. Fritschi, *Trends in testicular germ cell cancer incidence in Australia*. Cancer Causes Control, 2008. **19**(10): p. 1043-9.
21. Skakkebaek, N.E., et al., *Testicular cancer trends as 'whistle blowers' of testicular developmental problems in populations*. Int J Androl, 2007. **30**(4): p. 198-204; discussion 204-5.
22. Walschaerts, M., et al., *Doubling of testicular cancer incidence rate over the last 20 years in southern France*. Cancer Causes Control, 2008. **19**(2): p. 155-61.
23. Carver, B.S. and J. Sheinfeld, *Germ cell tumors of the testis*. Ann Surg Oncol, 2005. **12**(11): p. 871-80.
24. Richiardi, L., A. Pettersson, and O. Akre, *Genetic and environmental risk factors for testicular cancer*. Int J Androl, 2007. **30**(4): p. 230-40; discussion 240-1.
25. Matin, A. and J.H. Nadeau, *Search for testicular cancer gene hits dead-end*. Cell Cycle, 2005. **4**(9): p. 1136-8.
26. di Pietro, A., et al., *Testicular germ cell tumours: the paradigm of chemosensitive solid tumours*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(12): p. 2437-56.
27. Lutke Holzik, M.F., et al., *Genetic predisposition to testicular germ-cell tumours*. Lancet Oncol, 2004. **5**(6): p. 363-71.
28. Gilligan, T., *Testis cancer: rare, but curable with prompt referral*. Cleve Clin J Med, 2007. **74**(11): p. 817-25.
29. Aschim, E.L., et al., *Subfertility among parents of men diagnosed with testicular cancer*. Int J Androl, 2008. **31**(6): p. 588-94.
30. Paduch, D.A., *Testicular cancer and male infertility*. Curr Opin Urol, 2006. **16**(6): p. 419-27.
31. Sonne, S.B., et al., *Analysis of gene expression profiles of microdissected cell populations indicates that testicular carcinoma in situ is an arrested gonocyte*. Cancer Res, 2009. **69**(12): p. 5241-50.
32. Mizutani, Y., et al., *[Progress in therapy for testicular tumors]*. Gan To Kagaku Ryoho, 2006. **33**(2): p. 183-7.
33. Shabbir, M. and R.J. Morgan, *Testicular cancer*. J R Soc Promot Health, 2004. **124**(5): p. 217-8.
34. Huddart, R.A., et al., *Fertility, gonadal and sexual function in survivors of testicular cancer*. Br J Cancer, 2005. **93**(2): p. 200-7.
35. Pelicano, H., D. Carney, and P. Huang, *ROS stress in cancer cells and therapeutic implications*. Drug Resist Updat, 2004. **7**(2): p. 97-110.
36. Mantovani, G., et al., *Antioxidant agents are effective in inducing lymphocyte progression through cell cycle in advanced cancer patients: assessment of the most important laboratory indexes of cachexia and oxidative stress*. J Mol Med (Berl), 2003. **81**(10): p. 664-73.
37. Sleijfer, S., *Bleomycin-induced pneumonitis*. Chest, 2001. **120**(2): p. 617-24.
38. Chen, J. and J. Stubbe, *Bleomycins: new methods will allow reinvestigation of old issues*. Curr Opin Chem Biol, 2004. **8**(2): p. 175-81.



39. Antunes, L.M., et al., *Effects of the antioxidants curcumin and vitamin C on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells*. *Mutat Res*, 2000. **465**(1-2): p. 131-7.
40. Hagiwara, S.I., Y. Ishii, and S. Kitamura, *Aerosolized administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. **162**(1): p. 225-31.
41. Kessinger, A. and R.S. Wigton, *Intracavitary bleomycin and tetracycline in the management of malignant pleural effusions: a randomized study*. *J Surg Oncol*, 1987. **36**(2): p. 81-3.
42. Claussen, C.A. and E.C. Long, *Nucleic Acid recognition by metal complexes of bleomycin*. *Chem Rev*, 1999. **99**(9): p. 2797-816.
43. Sugiyama, M., et al., *The 1.6-Å crystal structure of the copper(II)-bound bleomycin complexed with the bleomycin-binding protein from bleomycin-producing *Streptomyces verticillus**. *J Biol Chem*, 2002. **277**(3): p. 2311-20.
44. Abraham, A.T., X. Zhou, and S.M. Hecht, *Metallobleomycin-mediated cleavage of DNA not involving a threading-intercalation mechanism*. *J Am Chem Soc*, 2001. **123**(22): p. 5167-75.
45. Day, R.M., et al., *Bleomycin upregulates expression of gamma-glutamylcysteine synthetase in pulmonary artery endothelial cells*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002. **282**(6): p. L1349-57.
46. Sausville, E.A., et al., *Properties and products of the degradation of DNA by bleomycin and iron(II)*. *Biochemistry*, 1978. **17**(14): p. 2746-54.
47. Cejas, P., et al., *Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer (Spain)*. *Cancer Causes Control*, 2004. **15**(7): p. 707-19.
48. Mates, J.M. and F.M. Sanchez-Jimenez, *Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000. **32**(2): p. 157-70.
49. Davies, K.J., *The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress*. *IUBMB Life*, 1999. **48**(1): p. 41-7.
50. Kong, Q., J.A. Beel, and K.O. Lillehei, *A threshold concept for cancer therapy*. *Med Hypotheses*, 2000. **55**(1): p. 29-35.
51. Liu, L.V., et al., *Definition of the intermediates and mechanism of the anticancer drug bleomycin using nuclear resonance vibrational spectroscopy and related methods*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(52): p. 22419-24.
52. Borek, C., *Dietary antioxidants and human cancer*. *Integr Cancer Ther*, 2004. **3**(4): p. 333-41.
53. Chabner, B.A., *Bleomycin in Harrison's Manual of Oncology*. 2008, McGraw-Hill Companies Inc.: New York.
54. Cort, A., et al., *Effects of curcumin on bleomycin-induced oxidative stress in malignant testicular germ cell tumors*. *Mol Med Rep*, 2012. **6**(4): p. 860-6.
55. Eklund, A., et al., *Oral N-acetylcysteine reduces selected humoral markers of inflammatory cell activity in BAL fluid from healthy smokers: correlation to effects on cellular variables*. *Eur Respir J*, 1988. **1**(9): p. 832-8.
56. Samuni, Y., et al., *The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1830**(8): p. 4117-29.

57. Kim, Y.G., et al., *Effects of cysteine on amino acid concentrations and transsulfuration enzyme activities in rat liver with protein-calorie malnutrition*. Life Sci, 2003. **72**(10): p. 1171-81.
58. Chen, H.J., S.B. Wu, and C.M. Chang, *Biological and dietary antioxidants protect against DNA nitration induced by reaction of hypochlorous acid with nitrite*. Arch Biochem Biophys, 2003. **415**(1): p. 109-16.
59. Akbas, H.S., M. Timur, and T. Ozben, *Concurrent use of antioxidants in cancer therapy: an update*. Expert Rev Clin Immunol, 2006. **2**(6): p. 931-9.
60. Ozben, T., *Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer*. FEBS Lett, 2006. **580**(12): p. 2903-9.
61. Ozben, T., *Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy*. J Pharm Sci, 2007. **96**(9): p. 2181-96.
62. Delneste, Y., et al., *N-acetyl-L-cysteine exhibits antitumoral activity by increasing tumor necrosis factor alpha-dependent T-cell cytotoxicity*. Blood, 1997. **90**(3): p. 1124-32.
63. Moss, R.W., *Should patients undergoing chemotherapy and radiotherapy be prescribed antioxidants?* Integr Cancer Ther, 2006. **5**(1): p. 63-82.
64. Conklin, K.A., *Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects*. Nutr Cancer, 2000. **37**(1): p. 1-18.
65. Lamson, D.W. and M.S. Brignall, *Antioxidants and cancer therapy II: quick reference guide*. Altern Med Rev, 2000. **5**(2): p. 152-63.
66. Lamson, D.W. and M.S. Brignall, *Natural agents in the prevention of cancer, part two: preclinical data and chemoprevention for common cancers*. Altern Med Rev, 2001. **6**(2): p. 167-87.
67. Lamson, D.W. and M.S. Brignall, *Natural agents in the prevention of cancer. Part 1: human chemoprevention trials*. Altern Med Rev, 2001. **6**(1): p. 7-19.
68. Conklin, K.A., *Cancer chemotherapy and antioxidants*. J Nutr, 2004. **134**(11): p. 3201S-3204S.
69. Slavik, M. and J.H. Saiers, *Phase I clinical study of acetylcysteine's preventing ifosfamide-induced hematuria*. Semin Oncol, 1983. **10**(1 Suppl 1): p. 62-5.
70. Roller, A. and M. Weller, *Antioxidants specifically inhibit cisplatin cytotoxicity of human malignant glioma cells*. Anticancer Res, 1998. **18**(6A): p. 4493-7.
71. Miyajima, A., et al., *N-acetylcysteine modifies cis-dichlorodiammineplatinum-induced effects in bladder cancer cells*. Jpn J Cancer Res, 1999. **90**(5): p. 565-70.
72. Galvan, L., et al., *Inhibition of bleomycin-induced DNA breakage by superoxide dismutase*. Cancer Res, 1981. **41**(12 Pt 1): p. 5103-6.
73. Cunningham, M.L., P.S. Ringrose, and B.R. Lokesh, *Inhibition of the genotoxicity of bleomycin by superoxide dismutase*. Mutat Res, 1984. **135**(3): p. 199-202.
74. Armutçu, F., et al., *Bleomisin Verilen Ratlarda Plazma ve Eritrositlerin Oksidan Ve Antioksidan Durumu: Erdostein ve Vitamin E'nin Koruyucu Rolü*. International Journal of Hematology and Oncology, 2004. **14**: p. 205-213.

75. Tamagawa, K., et al., *Inhibitory effects of a lecithinized superoxide dismutase on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(4 Pt 1): p. 1279-84.
76. Hong, J.S., et al., *Inhibition of bleomycin-induced cell death in rat alveolar macrophages and human lung epithelial cells by ambroxol*. Biochem Pharmacol, 2003. **66**(7): p. 1297-306.
77. Serrano-Mollar, A., et al., *P-selectin upregulation in bleomycin induced lung injury in rats: effect of N-acetyl-L-cysteine*. Thorax, 2002. **57**(7): p. 629-34.
78. Serrano-Mollar, A., et al., *In vivo antioxidant treatment protects against bleomycin-induced lung damage in rats*. Br J Pharmacol, 2003. **138**(6): p. 1037-48.
79. Mata, M., et al., *Oral N-acetylcysteine reduces bleomycin-induced lung damage and mucin Muc5ac expression in rats*. Eur Respir J, 2003. **22**(6): p. 900-5.
80. Yildirim, Z., et al., *Attenuation of bleomycin-induced lung fibrosis by oral sulfhydryl containing antioxidants in rats: erdosteine and N-acetylcysteine*. Pulm Pharmacol Ther, 2005. **18**(5): p. 367-73.
81. Lin, P.C., et al., *N-acetylcysteine has neuroprotective effects against oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy in colon cancer patients: preliminary data*. Support Care Cancer, 2006. **14**(5): p. 484-7.
82. Bach, S.P., et al., *The antioxidant n-acetylcysteine increases 5-fluorouracil activity against colorectal cancer xenografts in nude mice*. J Gastrointest Surg, 2001. **5**(1): p. 91-7.
83. Nisar, S. and D.A. Feinfeld, *N-acetylcysteine as salvage therapy in cisplatin nephrotoxicity*. Ren Fail, 2002. **24**(4): p. 529-33.
84. Tozawa, K., et al., *N-acetyl-L-cysteine enhances chemotherapeutic effect on prostate cancer cells*. Urol Res, 2002. **30**(1): p. 53-8.
85. Feghali, J.G., W. Liu, and T.R. Van De Water, *L-n-acetyl-cysteine protection against cisplatin-induced auditory neuronal and hair cell toxicity*. Laryngoscope, 2001. **111**(7): p. 1147-55.
86. Akan, I., et al., *Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) mediated vincristine resistance: effects of N-acetylcysteine and Buthionine sulfoximine*. Cancer Cell Int, 2005. **5**(1): p. 22.
87. *The nomenclature of lipids (Recommendations 1976) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature*. Biochem J, 1978. **171**(1): p. 21-35.
88. Fahy, E., et al., *Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S9-14.
89. Graber, R., C. Sumida, and E.A. Nunez, *Fatty acids and cell signal transduction*. J Lipid Mediat Cell Signal, 1994. **9**(2): p. 91-116.
90. Woollett, L.A., D.K. Spady, and J.M. Dietschy, *Saturated and unsaturated fatty acids independently regulate low density lipoprotein receptor activity and production rate*. J Lipid Res, 1992. **33**(1): p. 77-88.
91. Yaqoob, P., *Fatty acids as gatekeepers of immune cell regulation*. Trends Immunol, 2003. **24**(12): p. 639-45.
92. Davidson, B.C. and R.C. Cantrill, *Fatty acid nomenclature. A short review*. S Afr Med J, 1985. **67**(16): p. 633-4.

93. Ratnayake, W.M. and C. Galli, *Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper*. Ann Nutr Metab, 2009. **55**(1-3): p. 8-43.
94. Lobb K, C.C., *Fatty acids in foods and their health implications*, in *Fatty acid classification and nomenclature.* , C. CK, Editor. 2007, CRC Press: New York. p. 1-15.
95. Holman, R.T., *The slow discovery of the importance of omega 3 essential fatty acids in human health*. J Nutr, 1998. **128**(2 Suppl): p. 427S-433S.
96. Holman, R.T., *Nutritional and Metabolic Interrelationships between Fatty Acids*. Fed Proc, 1964. **23**: p. 1062-7.
97. P., S., *Bacteria in Biology*. 5 ed. Biotechnology and Medicine. 1999, New York: Wiley.
98. Merrill, A.H., Jr. and J.J. Schroeder, *Lipid modulation of cell function*. Annu Rev Nutr, 1993. **13**: p. 539-59.
99. Watson, A.D., *Thematic review series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems*. J Lipid Res, 2006. **47**(10): p. 2101-11.
100. Lodish H, Berk A, and Z. LS, *Molecular Cell Biology*. 4 ed. Scientific American Books. 2004, New York.
101. Jesse Gray, et al., *Membrane Structure*. 2002: Davidson College.
102. Epanand, R.M., et al., *Promotion of hexagonal phase formation and lipid mixing by fatty acids with varying degrees of unsaturation*. Chem Phys Lipids, 1991. **57**(1): p. 75-80.
103. Mally, M., P. Peterlin, and S. Svetina, *Partitioning of oleic acid into phosphatidylcholine membranes is amplified by strain*. J Phys Chem B, 2013. **117**(40): p. 12086-94.
104. Ibarburen, M., D.J. Lopez, and P.V. Escriba, *The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1838**(6): p. 1518-1528.
105. Fahy, E., et al., *LIPID MAPS online tools for lipid research*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(Web Server issue): p. W606-12.
106. G., D., *Analysis of fatty acids in functional foods with emphasis on w3 fatty acids and conjugated linoleic acid*. Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals, ed. H. WJ. 2002, New York: CRC Press.
107. *Handbook of Chemistry and Physics* 88 ed. Biochemistry. 2007, LLC: Taylor and Francis Group.
108. Sommerfeld, M., *Trans unsaturated fatty acids in natural products and processed foods*. Prog Lipid Res, 1983. **22**(3): p. 221-33.
109. Mosley, E.E., et al., *trans Fatty acids in milk produced by women in the United States*. Am J Clin Nutr, 2005. **82**(6): p. 1292-7.
110. Kraft, J., et al., *The conversion efficiency of trans-11 and trans-12 18:1 by Delta9-desaturation differs in rats*. J Nutr, 2006. **136**(5): p. 1209-14.
111. Griinari, J.M., et al., *Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase*. J Nutr, 2000. **130**(9): p. 2285-91.
112. Precht, D., *Variation of trans fatty acids in milk fats*. Z Ernährungswiss, 1995. **34**(1): p. 27-9.

113. Chilliard, Y., et al., *A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis*. J Dairy Sci, 2003. **86**(5): p. 1751-70.
114. de Heredia, F.P., et al., *Age-related changes in fatty acids from different adipose depots in rat and their association with adiposity and insulin*. Nutrition, 2008. **24**(10): p. 1013-22.
115. P., S., *The Nobel Prize in Chemistry 1912*, N. Foundation, Editor. 1966, Elsevier. p. 1901-1921.
116. W., N., *Process for converting unsaturated fatty acids or their glycerides into saturated compounds*. 1903.
117. Precht, D. and J. Molkentin, *Recent trends in the fatty acid composition of German sunflower margarines, shortenings and cooking fats with emphasis on individual C16:1, C18:1, C18:2, C18:3 and C20:1 trans isomers*. Nahrung, 2000. **44**(4): p. 222-8.
118. Henninger, M. and F. Ulberth, *Trans fatty acids in margarines and shortenings marketed in Austria*. Z Lebensm Unters Forsch, 1996. **203**(3): p. 210-5.
119. Perkins AG and S. C., *Octadecatrienoic fatty acid isomers of partially hydrogenated soybean oil*. J Am Oil Chem Soc, 1987. **64**: p. 1150-1155.
120. Bruhl, L., *Determination of trans fatty acids in cold pressed oils*. Eur J Med Res, 1995. **1**(2): p. 89-93.
121. Fernandez San Juan, P.M., *Study of isomeric trans-fatty acids content in the commercial Spanish foods*. Int J Food Sci Nutr, 1996. **47**(5): p. 399-403.
122. Ackman RG, Hooper SN, and H. DL, *Linolenic acid artefacts from the deodorization of oils*. J Am Oil Chem Soc, 1974. **51**: p. 42-49.
123. Sebedio JL, Grandgirard A, and P.J. . *Linoleic acid isomers in heat treated sunflower oils*. J Am Oil Chem Soc, 1988. **65**: p. 362-366.
124. Shantha NC, et al., *Conjugated linoleic acid concentrations in dairy products as affected by processing and storage*. J Food Sci, 1995. **60**: p. 695-697.
125. Rodriguez-Alcala, L.M., et al., *Changes in the lipid composition of powdered infant formulas during long-term storage*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(16): p. 6533-8.
126. Toyokuni, S., *Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology*. Pathol Int, 1999. **49**(2): p. 91-102.
127. Ferrari, R., et al., *Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium*. Am J Clin Nutr, 1991. **53**(1 Suppl): p. 215S-222S.
128. Cheeseman, K.H. and T.F. Slater, *An introduction to free radical biochemistry*. Br Med Bull, 1993. **49**(3): p. 481-93.
129. Kusterer, K., G. Pihan, and S. Szabo, *Role of lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by HCl, NaOH, or ischemia*. Am J Physiol, 1987. **252**(6 Pt 1): p. G811-6.
130. Bergamini, C.M., et al., *Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage*. Curr Pharm Des, 2004. **10**(14): p. 1611-26.
131. Freeman, B.A. and J.D. Crapo, *Biology of disease: free radicals and tissue injury*. Lab Invest, 1982. **47**(5): p. 412-26.
132. Stahl W, S.H., *Reactive oxygen species*. Research Monographs., 2002: p. 1-2.
133. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol Rev, 1979. **59**(3): p. 527-605.

134. Yu, B.P., *Cellular defenses against damage from reactive oxygen species*. *Physiol Rev*, 1994. **74**(1): p. 139-62.
135. Aruoma, O.I., et al., *Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide*. *Biochem J*, 1991. **273 ( Pt 3)**: p. 601-4.
136. Nikjoo, H., et al., *Modelling of radiation-induced DNA damage: the early physical and chemical event*. *Int J Radiat Biol*, 1994. **66**(5): p. 453-7.
137. Park JL, L.B., *Mechanisms of myocardial reperfusion injury*. *Ann Thorac Surg.*, 1999. **689**: p. 1905-1912.
138. Spiteller, G., *Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products*. *Free Radic Biol Med*, 2006. **41**(3): p. 362-87.
139. Esterbauer, H., R.J. Schaur, and H. Zollner, *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. *Free Radic Biol Med*, 1991. **11**(1): p. 81-128.
140. Kanner, J., J.B. German, and J.E. Kinsella, *Initiation of lipid peroxidation in biological systems*. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1987. **25**(4): p. 317-64.
141. Spiteller, G., *Do changes in the cell membrane structure induce the generation of lipid peroxidation products which serve as first signalling molecules in cell to cell communication?* *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2002. **67**(2-3): p. 151-62.
142. Vernet, P., R.J. Aitken, and J.R. Drevet, *Antioxidant strategies in the epididymis*. *Mol Cell Endocrinol*, 2004. **216**(1-2): p. 31-9.
143. Beckman, J.S., et al., *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(4): p. 1620-4.
144. Rubbo, H., V. Darley-Usmar, and B.A. Freeman, *Nitric oxide regulation of tissue free radical injury*. *Chem Res Toxicol*, 1996. **9**(5): p. 809-20.
145. Radi, R., A. Denicola, and B.A. Freeman, *Peroxynitrite reactions with carbon dioxide-bicarbonate*. *Methods Enzymol*, 1999. **301**: p. 353-67.
146. Poli, G. and R.J. Schaur, *4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress*. *IUBMB Life*, 2000. **50**(4-5): p. 315-21.
147. Poli, G., et al., *Oxidative stress and cell signalling*. *Curr Med Chem*, 2004. **11**(9): p. 1163-82.
148. Yeo, H.C., et al., *Assay of malondialdehyde in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry*. *Anal Biochem*, 1994. **220**(2): p. 391-6.
149. Rubbo, H., et al., *Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(42): p. 26066-75.
150. Chatgililoglu, C., et al., *Lipid geometrical isomerism: from chemistry to biology and diagnostics*. *Chem Rev*, 2014. **114**(1): p. 255-84.
151. Ferreri, C., et al., *Regioselective cis-trans isomerization of arachidonic double bonds by thiyl radicals: the influence of phospholipid supramolecular organization*. *J Am Chem Soc*, 2004. **126**(4): p. 1063-72.
152. Wardman, P., *Thiyl Radicals in Biology: Their Role as a 'Molecular Switch' Central to Cellular Oxidative Stress*, in *S-Centered Radicals*. 1999, Wiley: Chichester. p. 289-309.

153. Schoneich, C., et al., *Thiyl radical attack on polyunsaturated fatty acids: a possible route to lipid peroxidation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. **161**(1): p. 113-20.
154. Ferreri, C., et al., *Cis-trans isomerization of polyunsaturated fatty acid residues in phospholipids catalyzed by thiyl radicals*. *J Am Chem Soc*, 2001. **123**(19): p. 4459-68.
155. Banerjee, M., et al., *Effects of a novel prostaglandin, 8-epi-PGF2 alpha, in rabbit lung in situ*. *Am J Physiol*, 1992. **263**(3 Pt 2): p. H660-3.
156. Vacchiano, C.A. and G.E. Tempel, *Role of nonenzymatically generated prostanoid, 8-iso-PGF2 alpha, in pulmonary oxygen toxicity*. *J Appl Physiol* (1985), 1994. **77**(6): p. 2912-7.
157. Morrow, J.D., et al., *Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage*. *N Engl J Med*, 1995. **332**(18): p. 1198-203.
158. Morrow, J.D., et al., *A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(23): p. 9383-7.
159. Wang, Z., et al., *Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F2 alpha excretion in man*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995. **275**(1): p. 94-100.
160. Yagi, K., *Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma*. *Methods Mol Biol*, 1998. **108**: p. 101-6.
161. Armstrong, D. and R. Browne, *The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory*. *Adv Exp Med Biol*, 1994. **366**: p. 43-58.
162. Wang, L.H., A.L. Tsai, and P.Y. Hsu, *Substrate binding is the rate-limiting step in thromboxane synthase catalysis*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(18): p. 14737-43.
163. Ohkawa, H., N. Ohishi, and K. Yagi, *Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction*. *Anal Biochem*, 1979. **95**(2): p. 351-8.
164. Dawn-Linsley, M., et al., *Monitoring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs) as an assay for oxidative damage in neuronal cultures and central nervous system*. *J Neurosci Methods*, 2005. **141**(2): p. 219-22.
165. Draper, H.H., et al., *A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials*. *Free Radic Biol Med*, 1993. **15**(4): p. 353-63.
166. Scoccia, A.E., et al., *A simple method to assess the oxidative susceptibility of low density lipoproteins*. *BMC Clin Pathol*, 2001. **1**(1): p. 1.
167. Richard, M.J., et al., *Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid*. *Clin Chem*, 1992. **38**(5): p. 704-9.
168. Cross, C.E., et al., *Oxygen radicals and human disease*. *Ann Intern Med*, 1987. **107**(4): p. 526-45.
169. Halliwell, B., *Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans*. *Free Radic Res*, 1996. **25**(1): p. 57-74.

170. Pryor, W.A. and N.A. Porter, *Suggested mechanisms for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids*. Free Radic Biol Med, 1990. **8**(6): p. 541-3.
171. Warso, M.A. and W.E. Lands, *Pathophysiologic modulation of arachidonate metabolism*. Clin Physiol Biochem, 1984. **2**(2-3): p. 70-7.
172. Yamamoto, Y., et al., *Detection and characterization of lipid hydroperoxides at picomole levels by high-performance liquid chromatography*. Anal Biochem, 1987. **160**(1): p. 7-13.
173. Mihaljevic, B., B. Katusin-Razem, and D. Razem, *The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response*. Free Radic Biol Med, 1996. **21**(1): p. 53-63.
174. Juanéda, P., M. Ledoux, and J.L. Sébédio, Eur. J. Lipid Sci. Technol., 2007. **109**: p. 901.
175. Seppänen-Laakso, T., I. Laakso, and R. Hiltunen, Anal. Chim. Acta, 2002. **465**: p. 39.
176. Mossoba, M.M. and J.K.G. Kramer, *Official Methods for the Determination of Trans Fat*. 2 ed. 2009, Urbana: AOCS Press.
177. Kramer, J.K.G., et al., Lipids, 1997. **32**: p. 1219.
178. Christie, W.W., *Preparation of Ester Derivatives of Fatty Acids for Chromatographic Analysis*, in *In Advances in Lipid Methodology—Two*. 1993, Oily Press: Dundee. p. 69–111.
179. Wolff, R.L., C.C. Bayard, and R.J.J. Fabien, Am. Oil Chem. Soc., 1995. **72**: p. 1471.
180. Christie, W.W. and X. Han, *Lipid Analysis – Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis*. 4 ed. 2010, Bridgwater: Oily Press.
181. Ferreri, C., et al., *Arachidonate geometrical isomers generated by thiyl radicals: the relationship with trans lipids detected in biological samples*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(11): p. 1516-26.
182. Zghibeh, C.M., et al., *Determination of trans-arachidonic acid isomers in human blood plasma*. Anal Biochem, 2004. **332**(1): p. 137-44.
183. Ferreri, C., et al., *Trans fatty acids: chemical synthesis of eicosapentaenoic acid isomers and detection in rats fed a deodorized fish oil diet*. Chem Res Toxicol, 2012. **25**(3): p. 687-94.
184. Ratnayake WMN, Hansen SL, and K. MP, *Evaluation of the CP-Sil 88 and SP-2560 Columns Used in the Recently Approved AOCS Official Method Ce 1h-05: Determination of cis-, trans-m Saturated, Monounsaturated, and polyunsaturated Fatty Acids in Vegetable or Non-ruminant Animal Oils and Fats by Capillary GLC Method*. J Am Oil Chem Soc, 2006. **83**: p. 475-488.
185. Seibeidio, J.L. and W.M.N. Ratnayake, *Analysis of Trans Mono and Polyunsaturated Fatty Acids*, in *Trans Fatty Acids*, A.J. Dijkstra, R.J. Hamilton, and W. Hamm, Editors. 2008, Blackwell Publishing Ltd.: Oxford. p. 102-131.
186. Jiang, H., et al., J. Biol. Chem., 1999. **274**: p. 16235.
187. Berdeaux, O., et al., Chem. Phys. Lipids, 1995. **78**: p. 71.
188. Egmond, G.J.N., H.J.J. Pabon, and D.A. van Dorp, *Pays-Bas. Recl. Trav. Chim*, 1977. **96**: p. 172.
189. Murali Krishna, U., et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2001. **11**: p. 2415.



190. Ji, H., et al., *Distinguishing between cis/trans isomers of monounsaturated fatty acids by FAB MS*. Anal Chem, 2007. **79**(4): p. 1519-22.
191. Moss, C.W. and M.A. Lambert-Fair, *Location of double bonds in monounsaturated fatty acids of Campylobacter cryaerophila with dimethyl disulfide derivatives and combined gas chromatography-mass spectrometry*. J Clin Microbiol, 1989. **27**(7): p. 1467-70.
192. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can J Biochem Physiol, 1959. **37**(8): p. 911-7.
193. Ferreri, C., et al., *Trans lipid formation induced by thiols in human monocytic leukemia cells*. Free Radic Biol Med, 2005. **38**(9): p. 1180-7.
194. Cort, A., et al., *Effects of N-acetylcystein on bleomycin-induced apoptosis in malignant testicular germ cell tumors*. J Physiol Biochem, 2012. **68**(4): p. 555-62.
195. Cort, A., et al., *Synergistic anticancer activity of curcumin and bleomycin: an in vitro study using human malignant testicular germ cells*. Mol Med Rep, 2012. **5**(6): p. 1481-6.
196. Cort, A., et al., *Effects of curcumin on bleomycin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cells*. J Physiol Biochem, 2013. **69**(2): p. 289-96.
197. Kullenberg, D., et al., *Health effects of dietary phospholipids*. Lipids Health Dis, 2012. **11**: p. 3.
198. Hardy, S., Y. Langelier, and M. Prentki, *Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects*. Cancer Res, 2000. **60**(22): p. 6353-8.
199. Nomura, D.K., et al., *Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis*. Cell, 2010. **140**(1): p. 49-61.
200. Takeshita, M., et al., *Interaction of bleomycin with DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(12): p. 5983-7.
201. Teixeira, K.C., et al., *Attenuation of bleomycin-induced lung injury and oxidative stress by N-acetylcysteine plus deferoxamine*. Pulm Pharmacol Ther, 2008. **21**(2): p. 309-16.
202. Ciftci, H., et al., *Effects of N-acetylcysteine on semen parameters and oxidative/antioxidant status*. Urology, 2009. **74**(1): p. 73-6.
203. Cortijo, J., et al., *Attenuation by oral N-acetylcysteine of bleomycin-induced lung injury in rats*. Eur Respir J, 2001. **17**(6): p. 1228-35.
204. Zachwieja, J., et al., *Beneficial in vitro effect of N-acetyl-cysteine on oxidative stress and apoptosis*. Pediatr Nephrol, 2005. **20**(6): p. 725-31.
205. Quadriatero, J. and L. Hoffman-Goetz, *N-Acetyl-L-cysteine prevents exercise-induced intestinal lymphocyte apoptosis by maintaining intracellular glutathione levels and reducing mitochondrial membrane depolarization*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **319**(3): p. 894-901.
206. Finn, N.A. and M.L. Kemp, *Pro-oxidant and antioxidant effects of N-acetylcysteine regulate doxorubicin-induced NF-kappa B activity in leukemic cells*. Mol Biosyst, 2012. **8**(2): p. 650-62.
207. Park, S.A., et al., *Cisplatin-induced apoptotic cell death in mouse hybrid neurons is blocked by antioxidants through suppression of cisplatin-mediated accumulation of p53 but not of Fas/Fas ligand*. J Neurochem, 2000. **75**(3): p. 946-53.

208. Ali, E.N. and S.Z. Mansour, *Boswellic acids extract attenuates pulmonary fibrosis induced by bleomycin and oxidative stress from gamma irradiation in rats*. Chin Med, 2011. **6**: p. 36.
209. Cort, A., et al., *Effects of N-acetyl-L-cysteine on bleomycin induced oxidative stress in malignant testicular germ cell tumors*. Biochimie, 2012. **94**(12): p. 2734-9.
210. Antholine, W.E., et al., *Interactions among iron(II) bleomycin, Lewis bases, and DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(12): p. 7517-20.
211. Zafarullah, M., et al., *Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(1): p. 6-20.
212. Maheshwari, A., et al., *N-acetyl-L-cysteine counteracts oxidative stress and prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced germ cell apoptosis through down-regulation of caspase-9 and JNK/c-Jun*. Mol Reprod Dev, 2011. **78**(2): p. 69-79.
213. Koracevic, D., et al., *Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids*. J Clin Pathol, 2001. **54**(5): p. 356-61.