



**T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DELİ BAL VE GRAYANOTOKSİN-III'ÜN FARE KARACİĞERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE
İNCELENMESİ**

HÜMEYRA HAKSOY

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ GÜLGÜN ÇAKMAK ARSLAN**

DÜZCE, 2020

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DELİ BAL VE GRAYANOTOKSİN-III'ÜN FARE KARACİĞERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE
İNCELENMESİ

Hümeyra HAKSOY tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Gülgün ÇAKMAK ARSLAN

Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Gülgün ÇAKMAK ARSLAN

Düzce Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Rafiğ GURBANOV

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Pınar GÖÇ RASGELE

Düzce Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 16/01/2020

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

16 Ocak 2020

Hümeyra HAKSOY



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimimde ve bu tezin hazırlanmasında gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Gülgün ÇAKMAK ARSLAN'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca değerli katkılarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Meral KEKEÇOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Pınar GÖÇ RASGELE'ye şükranlarımı sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, başta sevgili babam Ömer HAKSOY'a ve annem Hülya HAKSOY'a yardımlarını esirgemeyen kardeşlerim ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

16 Ocak 2020

Hümevra HAKSOY

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
KISALTMALAR.....	xii
SİMGELER	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. BAL.....	1
1.2. DELİ BAL.....	2
1.3. TARİHTE DELİ BAL	3
1.4. ORMANGÜLÜ (<i>RHODODENDRON</i>) BİTKİSİ	6
1.4.1. Ülkemizde Doğal Olarak Yayılış Gösteren Ormangülleri	7
1.4.1.1. <i>Rhododendron ponticum</i> (Mor Çiçekli Ormangülü)	7
1.4.1.2. <i>Rhododendron luteum</i> (Sarı Çiçekli Ormangülü)	8
1.4.1.3. <i>Rhododendron smirnovii</i> (Pembe Çiçekli Ormangülü)	9
1.4.1.4. <i>Rhododendron caucasicum</i> (Kafkas Ormangülü)	9
1.4.1.5. <i>Rhododendron ungerii</i> (Beyaz Çiçekli Ormangülü).....	10
1.5. GRAYANOTOKSİNLER.....	11
1.6. DELİ BAL ZEHİRLENMESİ	13
1.6.1. Deli Bal Zehirlenmesi ile İlgili Klinik Araştırmalar	13
1.6.2. Deli Bal Zehirlenmesi ile İlgili Deneysel Araştırmalar	14
1.7. KARACİĞER	15
1.8. ELEKTROMANYETİK RADYASYON.....	18
1.9. SPEKTROSKOPİ.....	20
1.10. KIZİLÖTESİ (INFRARED) SPEKTROSKOPİSİ.....	20
1.11. FOURIER DÖNÜŞÜM KIZİLÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FTIR).....	23
1.12. AZALTI MIŞ TOPLAM YANSIMA (ATR)-FTIR SPEKTROSKOPİSİ..	25
1.13. ÇALIŞMANIN AMACI	26
2. GEREÇ VE YÖNTEM	29
2.1. SARF MALZEMELER.....	29
2.2. DELİ BAL VE GTX-III.....	29
2.3. HAYVANLAR	29
2.3.1. DB ve GTX-III'ün Karaciğer Dokusu Üzerindeki Doza Bağlı Etkileri..	30
2.3.2. DB ve GTX-III'ün Karaciğer Dokusu Üzerindeki Zamana Bağlı Etkileri	30
2.4. SPEKTROSKOPİ DENEYLERİ	31
2.5. ATR-FTIR SPEKTROSKOPİSİ ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN SPEKTRUM ANALİZ YÖNTEMLERİ.....	31
2.6. İSTATİKSEL ANALİZ.....	34
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	35

3.1. BULGULAR.....	35
3.1.1. Fare Karaciğeri Spektrumundaki Bantların Tanımlanması	35
3.1.2. DB ve GTX-III'ün Karaciğer Dokusu Üzerindeki Doza Bağlı Etkileri..	37
3.1.3. DB ve GTX-III'ün Karaciğer Dokusu Üzerindeki Zamana Bağlı Etkileri	55
3.2. TARTIŞMA.....	76
3.2.1. DB ve GTX-III'ün Karaciğer Dokusu Üzerindeki Doza Bağlı Etkileri..	76
3.2.2. DB ve GTX-III'ün Karaciğer Dokusu Üzerindeki Zamana Bağlı Etkileri	82
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	87
5. KAYNAKLAR.....	90
ÖZGEÇMİŞ.....	100



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Düzce’li üreticilerden temin edilen deli bal.	2
Şekil 1.2. Ormangüllerinin yeryüzündeki yayılışı	7
Şekil 1.3. <i>Rhododendron ponticum</i> (Mor Çiçekli Ormangülü).	8
Şekil 1.4. <i>Rhododendron luteum</i> (Sarı Çiçekli Ormangülü).	9
Şekil 1.5. <i>Rhododendron smirnovii</i> (Pembe Çiçekli Ormangülü).	9
Şekil 1.6. <i>Rhododendron caucasicum</i> (Kafkas Ormangülü).	10
Şekil 1.7. <i>Rhododendron ungeronii</i> (Beyaz Çiçekli Ormangülü).	11
Şekil 1.8. Grayanotoksin I, II ve III’ün genel kimyasal yapısı.	12
Şekil 1.9. İnsan karaciğerinin anatomik yapısı.	16
Şekil 1.10. Fare karaciğerinin anatomik yapısı.	16
Şekil 1.11. Karaciğer hücreleri (hepatosit, kupfer vb.).	18
Şekil 1.12. Elektromanyetik dalga.	19
Şekil 1.13. Elektromanyetik Spektrum.	19
Şekil 1.14. Enerji düzey diyagramı.	20
Şekil 1.15. Bir kızılötesi spektrumunda titreşim hareketleri.	22
Şekil 1.16. Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektrometresi.	24
Şekil 1.17. ATR-FTIR Spektroskometresi.	25
Şekil 2.1. Fare karaciğer dokusunun Amid I bantı ve bu bantın ikincil türev spektrumu.	34
Şekil 3.1. Kontrol grubuna ait bir fare karaciğerinin 4000-950 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki ATR-FTIR spektrumu.	35
Şekil 3.2. A) 3700-3025, B) 3025-2800 ve C) 1800-950 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış farelerin karaciğer dokularının ortalama ATR-FTIR spektrumları. (Spektrumlar, Amid I bantına (A) ve Amid A bantına (B ve C) göre normalize edildi).	39
Şekil 3.3. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının Amid A bantı alan değerleri (* $p<0,05$).	40
Şekil 3.4. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının CH_3 antisimetrik (A), CH_2 antisimetrik (B) ve CH_2 simetrik (C) bantları alan değerleri (* $p<0,05$).	41
Şekil 3.5. Kontrol, 25,50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının CH_3 simetrik bantı alan değerleri (** $p<0,01$).	41
Şekil 3.6. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının Amid I (A) ve Amid II (B) bantları alan değerleri (* $p<0,05$).	42
Şekil 3.7. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının CH_2 bükülme bantı alan değerleri (* $p<0,05$).	42
Şekil 3.8. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının COO^- simetrik gerilme bantı alan değerleri (** $p<0,01$).	43
Şekil 3.9. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının Amid III bantı alan değerleri (* $p<0,05$).	44
Şekil 3.10. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının PO_2^- antisimetrik gerilme bantı alan değerleri (** $p<0,01$).	44
Şekil 3.11. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının PO_2^- simetrik gerilme bantı alan değerleri (** $p<0,01$).	45
Şekil 3.12. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının C-O gerilme	

bantı alan değerleri (*p<0,05).	45
Şekil 3.13. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının C-O/Protein ve C-O/Lipit alan oranındaki değişimler (*p<0,05, **p<0,01).	48
Şekil 3.14. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının CH ₂ sim./CH ₂ sim.+anti sim. ve CH ₂ anti sim./CH ₂ sim. bant alan oranındaki değişimler (*p<0,05).	48
Şekil 3.15. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının Doymamış/Doymuş lipit bant alan oranındaki değişimler (*p<0,05).	49
Şekil 3.16. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının CH ₂ /lipit (A), Karbonil/lipit (B) ve CH ₃ /lipit (C) bant alan oranındaki değişimler (*p<0,05).	50
Şekil 3.17. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının Amid I/Amid I+II bant alan oranındaki değişimler (*p<0,05).	50
Şekil 3.18. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının Amid I/Amid II bant alan oranındaki değişimler (*p<0,05).	51
Şekil 3.19. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının Nükleik asit/Lipit (A) ve Nükleik asit/Protein (B) bant alan oranındaki değişimler (*p<0,05).	51
Şekil 3.20 Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının Lipit/Protein bant alan oranındaki değişimler (*p<0,05).	52
Şekil 3.21. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının Amid I dalga sayısı (A) ve bant genişliği (B) değerlerindeki değişimler (*p<0,05).	53
Şekil 3.22 Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının PO ₂ ⁻ antisimetrik dalga sayısı değerlerindeki değişimler (*p<0,05).	53
Şekil 3.23. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının CH ₂ antisimetrik gerilme bantının dalga sayısı (A) ve bant genişliği (B) değerlerindeki değişimler (*p<0,05,**p<0,01).	54
Şekil 3.24. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının protein ikincil yapı değerlerindeki değişimler (*p<0,05,**p<0,01).	55
Şekil 3.25. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş fare karaciğer dokularının 3700-3025 cm ⁻¹ dalga sayısı aralığındaki spektrumları (Spektrumlar CH ₂ antisimetrik gerilme bantına göre normalize edilmiştir).	56
Şekil 3.26. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Amid A bandı alan değerleri (*p<0,05, **p<0,01)...	57
Şekil 3.27. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş fare karaciğer dokularının 3025-2800 cm ⁻¹ dalga sayısı aralığındaki spektrumları (Spektrumlar CH ₂ antisimetrik gerilme bantına göre normalize edilmiştir).	58
Şekil 3.28. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH ₃ antisimetrik gerilme bantı alan değerleri (**p<0,01).	59
Şekil 3.29. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH ₂ antisimetrik gerilme bandı alan değerleri (p<0,01).	59
Şekil 3.30. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH ₂ simetrik gerilme bandı alan değerleri (*p<0,05).	60
Şekil 3.31. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH ₃ simetrik gerilme bandı alan değerleri	

(*p<0,05).....	60
Şekil 3.32. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş fare karaciğer dokularının 1800-950 cm ⁻¹ dalga sayısı aralığındaki spektrumları (Spektrumlar CH ₂ antisimetrik gerilme bantına göre normalize edilmiştir).....	61
Şekil 3.33. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Amid I bantı alan değerleri (**p<0,01).....	62
Şekil 3.34. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Amid II bantı alan değerleri (**p<0,01).....	62
Şekil 3.35. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH ₂ bükülme bantı alan değerleri (*p<0,05, **p<0,01).....	63
Şekil 3.36. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının COO ⁻ simetrik gerilme bantı alan değerleri (*p<0,05, **p<0,01).....	63
Şekil 3.37. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Amid III bantı alan değerleri (*p<0,05, **p<0,01).....	64
Şekil 3.38 Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının PO ₂ ⁻ antisimetrik germe bantı alan değerleri (**p<0,01).....	64
Şekil 3.39. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının PO ₂ ⁻ simetrik germe bantı alan değerleri (**p<0,01).....	65
Şekil 3.40. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının C-O/Protein bant alan oranındaki değişiklikler (*p<0,05).....	65
Şekil 3.41. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının C-O/Lipit bant alan oranındaki değişiklikler (*p<0,05, **p<0,01).....	66
Şekil 3.42. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH ₂ sim./CH ₂ sim.+antisim. bant alan oranındaki değişiklikler (*p<0,05, **p<0,01).....	66
Şekil 3.43. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH ₂ antisim./CH ₂ sim. bant alan oranındaki değişiklikler (*p<0,05).....	67
Şekil 3.44. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Doymamış/Doymuş lipit bant alan oranındaki değişiklikler (**p<0,01).....	67
Şekil 3.45. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH ₂ /Lipit bant alan oranındaki değişiklikler (*p<0,05, **p<0,01).....	68
Şekil 3.46. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Karbonil/Lipit bant alan oranındaki değişiklikler (**p<0,01).....	68
Şekil 3.47. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH ₃ anti./Lipit bant alan oranındaki değişiklikler (*p<0,05).....	69
Şekil 3.48. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Amid I/Amid I+II bant alan oranındaki değişiklikler (*p<0,05, **p<0,01).....	69

Şekil 3.49. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Amid I/Amid II bant alan oranındaki değişiklikler (*p<0,05, **p<0,01).....	70
Şekil 3.50. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Nükleik asit/Protein bant alan oranındaki değişiklikler (*p<0,05).....	70
Şekil 3.51. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Nükleik asit/Lipit bant alan oranındaki değişiklikler (*p<0,05).....	71
Şekil 3.52. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Lipit/Protein bant alan oranındaki değişiklikler (*p<0,05).....	71
Şekil 3.53. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Amid I dalga sayısı değerleri (*p<0,05, **p<0,01).....	72
Şekil 3.54. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Amid I bant genişliği değerleri (*p<0,05, **p<0,01).....	72
Şekil 3.55. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının PO ₂ ⁻ antisimetrik dalga sayısı değerleri (*p<0,05) ..	73
Şekil 3.56. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH ₂ antisimetrik dalga sayısı değerleri (*p<0,05, **p<0,01).....	73
Şekil 3.57. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH ₂ antisimetrik bant genişliği değerleri (*p<0,05, **p<0,01).....	73
Şekil 3.58. Kontrol, DB (A) ve GTX-III (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının protein ikincil yapı değerleri (*p<0,05, **p<0,01)...	75

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 1.1. Kızılötesi spektral bölgeler.....	21
Çizelge 2.1. Fare karaciğeri spektrumundaki bantlar için kullanılan bölgeler ve baseline noktaları.....	33
Çizelge 3.1. Fare karaciğer dokusunun infrared spektrumundaki başlıca soğurma bantları.....	36
Çizelge 3.2. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış farelerin karaciğer dokularının kızılötesi bantlarının alan değerlerinde meydana gelen değişiklikler. (Değerler, ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi * $p<0,05$; ** $p<0,01$ şeklinde gösterilmiştir).....	38
Çizelge 3.3. Bant alan oranları, bu oranları hesaplamak için kullanılan ilgili fonksiyonel gruplar ve oranın işlevi.....	47



KISALTMALAR

A.U	Arbitrary Unit (göreceli birim)
ATRFTIR	Azaltılmış Toplam Yansıma-Fourier Dönüşüm Kızılötesi
DB	Deli Bal
FTIR	Fourier Dönüşüm Kızılötesi
GTX	Grayanotoksin
IR	Kızılötesi
LC-MS	Sıvı kromatografisi- Kütle Spektrometresi
MDA	Malondialdehit
MH	Mad Honey

SİMGELER

A	Alfa
B	Beta
°C	Celcius
g	Gram
mg	Miligram
mg/kg	Miligram/kilogram
mmHg	Milimetre Civa
µg	Mikrogram



ÖZET

DELİ BAL VE GRAYANOTOKSİN-III'ÜN FARE KARACİĞERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ

Hümevra HAKSOY

Düzce Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gülgün ÇAKMAK ARSLAN

Ocak 2020, 99 sayfa

Deli bal (DB), Türkiye'nin Karadeniz Bölgesinde yaygın olarak yetişen *Rhododendron* (ormangülü) bitkisinden elde edilen özel bir baldır. İçindeki grayanotoksin (GTX) bileşiğinden dolayı insanlarda zehirlenmelere sebep olan bu bal alternatif tıpta bazı rahatsızlıkları tedavi etmek için sıklıkla kullanılmaktadır. DB'nin birçok toksik etkisinin olduğu bilinmesine rağmen, karaciğer dokusundaki biyomoleküller üzerindeki etkileri ve etki süresi henüz bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı, DB ve içindeki toksik maddenin saf hali olan GTX-III'ün karaciğer dokusunda meydana getirdiği etkilerin doza ve zamana bağlı olarak araştırılmasıdır. Çalışmanın birinci bölümünde, DB'nin doza bağlı etkilerini araştırmak amacıyla *Mus musculus* farelere üç farklı konsantrasyonda DB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III (0,01 mg/kg) uygulanmış ve 24 saat sonra bu farelerin karaciğerleri çıkartılarak Azaltılmış Toplam Yansıma-Fourier Dönüşüm Kızılötesi (ATR-FTIR) spektroskopisi ile incelenmiştir. Birinci bölümün sonuçları, 25 ve 50 mg/kg DB'nin karaciğer dokusunda glikojen miktarındaki azalma dışında herhangi anlamlı bir değişiklik meydana getirmediğini ancak 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasının glikojen miktarındaki azalmayla birlikte, doymuş lipit ve protein miktarında artışa, lipit peroksidasyonuna, membran düzeninde azalmaya, membran akışkanlığında artışa, proteinlerin ve nükleik asitlerin yapı ve konformasyonlarında değişikliklere sebep olduğunu göstermiştir. Çalışmanın ikinci bölümünde, 75 mg/kg DB ve GTX-III'ün karaciğerde meydana getirdiği zararlı etkilerin 48 saat içinde normale dönüp dönmediğini araştırmak amacıyla bu iki dozun uygulandığı fare karaciğerleri 24 ve 48 saatlik uygulama süreleri sonunda incelenmiş ve sonuçlar birbiriyle karşılaştırılmıştır. İkinci bölümün sonuçları, 48 saatlik süre sonunda, glikojen miktarındaki azalışın hem 75 mg/kg DB hem GTX-III grubunda, doymuş lipit miktarındaki artışın sadece 75 mg/kg DB grubunda normale döndüğünü, ancak lipit peroksidasyonu, protein ve nükleik asitlerin yapı ve konformasyonlarındaki, membran düzen ve akışkanlığındaki değişikliklerin normale dönmesi için 48 saatlik sürenin hiçbir grupta yeterli olmadığını göstermiştir. Tüm bu sonuçlar, DB ve GTX-III'ün karaciğer dokusunda doza bağlı yapısal ve fonksiyonel değişikliklere sebep olduğunu ve bu zararlı etkilerin hepsinin normale dönmesi için 48 saatlik sürenin yeterli olmadığını ortaya çıkarmıştır.

Anahtar sözcükler: Deli bal, FTIR Spektroskopisi, Karaciğer, Grayanotoksin.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF MAD HONEY AND GRAYANOTOXIN-III ON MOUSE LIVER AT MOLECULAR LEVEL

Hümevra HAKSOY

Düzce University

Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Biology

Master's Thesis

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Gülgün ÇAKMAK ARSLAN

January 2020, 99 pages

Mad Honey (MH), is a special honey obtained from *Rhododendron* plants which is commonly grown in the Black Sea Region of Turkey. This honey, which causes poisoning in humans due to grayanotoxin (GTX) in it, is frequently used in alternative medicine to treat some disorders. Although it is known that DB has many toxic effects, its effects on biomolecules in liver tissue and duration of action are not yet known. The aim of this study is to investigate the dose and time-dependent effects of MH and GTX-III, which is the pure form of the toxic compound in MH, on liver tissue. In the first part of the study, to investigate the dose-dependent effects of MH three different concentrations of MH (25, 50 and 75 mg/kg) and GTX-III (0.01 mg/kg) were administered to *Mus musculus* mice, liver tissues of these mice were removed after 24 hours and examined by Attenuated Total Reflection-Fourier Transformation Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy. The results of the first part showed that 25 and 50 mg/kg MH didn't cause any significant alterations in the liver tissue except a decrease in the glycogen amount but 75 mg/kg MH and GTX-III administration caused lipid peroxidation, an increase in saturated lipid amount, a decrease in membrane order, an increase in membrane fluidity, changes in the structure and conformations of proteins and nucleic acids in addition to decrease in glycogen amount. In the second part of the study, to investigate whether the harmful effects induced by 75 mg/kg MH and GTX-III on the liver returned to normal in 48 hours, the livers of mice administered these two doses were examined after 24 and 48 hours and the results were compared with each other. The results of the second part showed that the decrease in glycogen amount returned to normal values in both 75 mg/kg DB and GTX-III groups, the increase in the saturated lipid amount returned to normal values only in 75 mg/kg MH group after 48 hours. However, the 48 h-period were not sufficient to return to normal values for the lipid peroxidation, changes in the structure and conformation of proteins and nucleic acids and membrane order and fluidity in any of the groups. All these results revealed that MH and GTX-III cause dose-dependent structural and functional changes in liver tissue and the 48 h-period is not sufficient for normalization of all these harmful effects.

Keywords: Mad Honey, FTIR Spectroscopy, Liver, Grayanotoxin.

1. GİRİŞ

1.1. BAL

Bal, çekici tadı ve kolay erişilebilirliği nedeniyle, dünya çapında binlerce yıldır gıda olarak tüketilmektedir. İçinde birçok farklı biyokimyasal maddeyi barındıran bal içerdiği maddelerin türüne ve miktarına bağlı olarak tıbbi amaçlı kullanılabilir ya da zehirlenmeye sebep olabilir. Balın besin olarak kullanımını MÖ 2100-200 yıllarına kadar uzanmaktadır. Tarihsel süreçte balın geleneksel ve tamamlayıcı tıpta gastrit, peptik ülser, hipertansiyon, yara iyileşmesi, soğuk algınlığı ve diyabet için ilaç olarak kullanıldığı görülmektedir [1].

Bal, bitkilerin çiçeklerinden veya diğer canlı kısımlarından salgılanan nektarlar kullanılarak bal arıları tarafından üretilmektedir. Arının üretim sırasında kullandığı kaynağa göre; salgı ve çiçek balı olmak üzere 2 ana gruba ayrılır [2]. Çiçek balı bitki çiçeklerinin nektarından, salgı balı ise bitkilerin veya bitki üzerinde yaşayan böceklerin salgısından oluşmaktadır [2]. Bitki üzerinde yaşayan bazı böcekler, bitkilerin canlı kısımlarından yararlanarak bir salgı yaparlar. Bu salgı maddesi bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından toplanır ve bileşimleri değiştirilip petek gözlerine depo edilir. Nektarların ya da salgı maddesinden üretilen bileşiğin peteklerde beklemesi sonucu olgunlaşması ile doğal bir fonksiyonel gıda olan bal oluşmaktadır. Polen çeşitliliği balın tat ve aromasındaki çeşitliliğe neden olan faktördür. Monofloral ballarda kaynağına bağlı olarak tek bir polen türü baskın olduğu için kendine özgü bir aroma olurken polifloral ballarda tek bir bitki poleni baskın değildir. Balın isimlendirilmesi elde edildiği bitkinin adıyla yapılır [3].

Doğal tatlandırıcı maddesi olarak bilinen bal kompleks bir yapıya sahiptir. Fiziksel ve kimyasal yapısı; bitki kaynağına, nektar ve salgının yapısına, iklim koşullarına, arının bal yapma özelliğine ve saklama koşullarına göre farklılık göstermektedir [4]. Bal kimyasal olarak yaklaşık; %82 karbonhidrat, %17 su, %0,7 mineral madde, %0,3 protein ve vitamin, organik asit, fenolik bileşikler ve serbest aminoasit gibi makro ve mikro bileşenlerden oluşmaktadır [5]. Özellikle fruktoz ve glukozca zengin, şeker konsantrasyonu yüksek bir çözüldür [6]. Ayrıca yapısında sakkaroz, maltoz, izomaltoz,

nigeroz, turanoz, maltuloz, lökroz, kojibioz, neotrehalaz, gentibioz, laminariboz ve izomaltuloz gibi disakkaritler de bulunmaktadır [2].

1.2. DELİ BAL

Deli bal (DB); Fundagiller (Ericaceae) familyasına ait *Rhododendron* (Ormangülü) adı verilen bitkilerle beslenen arıların ürettiği monofloral doğal bir baldır [7]. Avrupa’da Alp Dağları, doğuda Kafkas ve Himalaya Dağları, Çin, Tibet, Nepal, Myanmar, Yeni Gine, Japonya, Endonezya, Filipinler, Kuzey Amerika ve Türkiye’de görülmektedir [8]. Ayrıca halk arasında acı bal, tutar bal olarak bilinen bu bal Türkiye’nin Karadeniz Bölgesi’nde yaygın olarak üretilmektedir [8]. Bu balın diğer ballardan farklı olarak hoş olmayan acı bir tadı vardır [9]. Diğer ballara göre geç kristalleştiği bildirilmiş olan bu bal normal ballardan daha kırmızı ve kahverengi bir renge sahiptir ve kendine has kokusu bulunmaktadır [9] (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Düzce’li üreticilerden temin edilen deli bal.

Silici ve ark. (2008) yaptıkları bir çalışmada DB’nin nem, kül, şeker, mineral madde bakımından diğer ballardan farklı olmadığını ancak diğer ballara göre daha fazla oranda bakır, kobalt, krom, nikel, selenyum, çinko, kalsiyum ve magnezyum minerallerini içerdiğini bildirmiştir [10]. Ayrıca yaptıkları başka bir çalışmada Karadeniz Bölgesi’nden temin ettikleri çeşitli DB örneklerinde özellikle organik asitler, fenoller, ketonlar ve alkollerin bulunduğu toplam 72 farklı bileşik tespit edilmiştir [8]. Yapılan çalışmalarda bu balın yüksek fenolik madde içerdiği ve bundan dolayı yüksek antioksidan, antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [8]. Bu nedenle bu

balın toksik etkilerinin yanı sıra önemli ölçüde biyoaktif özelliğe de sahip olduğu bilinmektedir [11].

DB yapısında bulunan grayanotoksin (GTX) bileşiğinden dolayı insanlarda zehirlenmelere neden olmaktadır [12]. Halk bu zehirli balın kaynatıldığında ya da bekletildiğinde zamanla toksisitenin ortadan kalkacağına ve tedavi amaçlı kullanılacağına inanır [13]. İnsanlar DB'yi birçok hastalık tedavisinde alternatif tedavi maddesi olarak tüketmektedir [14]. Bu nedenle DB zehirlenmesi sıklıkla görülmekte ve konuyla ilgili birçok klinik çalışma bulunmaktadır [14]. DB ve GTX içeren preparatlar Çin ve Hindistan'da geleneksel tıpta, Avrupa ve Amerika'da halk tarafından ilaç olarak kullanılmaktadır [14]. Günümüzde alternatif tıpta diyabet, hipertansiyon, bazı gastrointestinal bozukluklar, cinsel işlev bozuklukları, romatoid artrit, çeşitli viral enfeksiyonlar, soğuk algınlığı ve cilt rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılmaktadır [1], [15]–[20]. DB'nin tıbbi bir ürün olarak kullanılıp kullanılmayacağı tam olarak anlaşılmış olmamasına rağmen literatürde bazı hastalıklarda kullanımının faydalı olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, DB'nin diyabetik sıçanlarda kan glukozunu azalttığı [21], hipertansiyonlu sıçanlarda kan basıncını ve kalp atım hızını azalttığı [22], erkek sıçanlarda hem toplam hem de serbest testosteron seviyelerini arttırdığı [23], antimikrobiyal [8], [24], antioksidan [25] ve anti-inflamatuar [26] etkileri olduğu bildirilmiştir [27]. Ayrıca DB'nin kemik kırıklarının iyileşmesini hızlandırdığı ve GTX içeren *Rhododendron* özütünün prostat kanserini ve adeno kanser hücre kültürleri üzerinde sitotoksik etkileri olduğu gösterilmiştir [28].

1.3. TARİHTE DELİ BAL

Literatüre bakıldığında tarih kitaplarında DB hakkında birçok bilgi bulunduğu görülmektedir. M.Ö. 23-M.Ö. 79 yılları arasında yaşayan ünlü doğa bilimcisi Gaius Plinius Secundus “Natural History” adlı eserinde DB ve onun zehir özelliği ile ilgili aşağıdaki ifade yer almaktadır [29].

“... gerçekten arıların besinleri o kadar önemlidir ki; bu yüzden ballarında zehirle bile karşılaşabiliriz. Pontus'da, Herakleia'da aynı arıdan olan ballar birkaç yıl sonra öldürücü olabilmektedir.”

DB zehirlenmesi hakkında tarih kitaplarında M.Ö 430-355 arasında Atinalı tarihçi ve ordu komutanı Ksenophon ve onun askerlerinin maruz kaldığı bir durum anlatılmaktadır. Tanju Gökçel tarafından Türkçeye “Anabasis, Onbinlerin Dönüşü”

olarak çevrilen bu eserde Trabzon Kenti içerisindeki Colchianların mücadele eden Ksenophon ve askerlerinin maruz kaldığı DB zehirlenmesi ve sonrasında gelişen olaylar şu şekilde anlatılmaktadır:

“..... doruğa ulaşan Yunanlılar bol erzak dolu birçok köyde konakladılar. Bu köyde onları şaşkırtan bir tek şeyle karşılaştılar: Birçok kovan vardı ve bu kovanlardaki peteklerden bal yiyen askerler kustular, ishal oldular ve içlerinden hiçbiri ayakta duramıyordu; az yiyenler körkütük sarhoş olmuş insanlara, çok yiyenlerse azgın çılgınlara hatta can çekişen insanlara benziyorlardı. Bu durumda birçoğu bir bozgun sonrasındaymiş gibi yere serilmiş ve büyük bir umutsuzluk başlamıştı. Ertesi gün kimsenin ölmediği görülmüş ve sarhoşluk yaklaşık olarak bir gün önce başladığı saatte sona ermişti. Üçüncü ve dördüncü gün ise, müshil almış gibi bitkin düşmüş halde ayaklandılar”.

Bu bilgilerden de anlaşıldığı üzere Trabzon bölgesinde yaşayan Colchianların arıcılıkla uğraştıkları, DB ve zararlı etkilerini bildikleri ve Colchianların, bu balın bir tüketim maddesi olmasının yanı sıra onu biyolojik silah olarak da kullanan ilk topluluk oldukları görülmektedir [30]. Colchianlar dışında DB'nin biyolojik silah olarak kullanıldığını bildiren bir diğer bilgi Pontos Kralı Mithradates VI Eupator (M.Ö. 120-63) dönemine ait bilgilerdir [29]. Kral Mithradates'in doğa bilimi ve toksikoloji bilimine ilgi duyduğu ve zehirler için panzehirler ürettiği bilinmektedir. Bu alanlarda kendini geliştiren kral, Kuzey Anadolu'da Roma generali Pompeius'un ordularına karşı yolları üzerine içi DB dolu petekler yerleştirmiş ve taktiksel bir geri çekilme yapmıştır. Yolda ilerleyen Romalıların peteklerdeki balları yedikleri ve ardından bitkin düşerek kolayca etkisiz hale getirildikleri anlatılmaktadır [31].

XIX. yüzyılın ilk çeyreğinde Karadeniz Bölgesini ziyaret eden Fransız seyyah Par Le Colonel Rottiers, Trabzon şehrine geldiğinde burada bulunan Fransız Konsolosu Pierre Dupre'den DB hakkında bilgiler edindi. Dupre, kendisine bu balın *Rhododendrum poticum* (mor çiçekli ormangülü) çiçeğinden üretildiğini ve bunu yiyen insanların baygın bir halde hastanelik olduklarını anlatırken, yöre halkının bu çiçeklerin açtığı mevsimde bu baldan uzak durduklarını bildirdi. Günümüze kadar DB zehirlenmesi ile ilgili bildirilen vakaların çoğunun Türkiye'de özellikle Karadeniz Bölgesinde meydana geldiği görülmüştür [32].

DB zehirlenmeleri hakkında ayrıntılı çalışma yapan ilk bilim insanı Amerikalı Barton olmuştur. Çalışmasını 1794 yılında, Amerikan Filozoflar Topluluğu'na sunan Barton, 1802 yılında yayınladığı bu çalışmada vakanın 54 yaşında bal yiyen bir kadın olduğunu, alında yanma, yüzünde solma ve solukluk, nabızlarında düzensizlik şikâyeti ile hastaneye başvurduğunu bildirmiştir [33].

1891 yılında Plugge, Fundagiller familyasına ait bitkiler üzerinde çalışma yapmış ve bu bitkilerdeki aktif maddenin andromedotoxin (grayanotoksin) olduğunu rapor etmiştir [29].

Bunlara ek olarak, 1896'da Amerikan Eczacılar Birliğinin yıllık toplantısında konuşan Kebler'in, ondokuzuncu yüzyılda Avrupa ve Kuzey Amerika'da DB zehirlenme vakaları bildirdiği görülmektedir. Konuşmasında, Kuzey Anadolu'da, Sanni kırsalında delilik meydana getiren bir bal cinsine rastlanmıştır ve bu bal "Maenomenon" olarak adlandırmıştır. Bu zehir genel olarak ormanları bol olan yerdeki *Rhododendron* (ormangülü) çiçeklerine atfedilmiştir (Kebler). British Medical Journal'ın 1999 yılında basılan makalesinde bal zehirlenmesi anlatılır. J.P. Tournefort; Dioscorides, Diyotaras Siculus ve Aristotle, Heraklea Pontica'nın (*rhododendron*'un bir türü) yılın belli zamanlarında toplanan balın meydana getirdiği deli edici etkilerinden bahsettiği görülür [34].

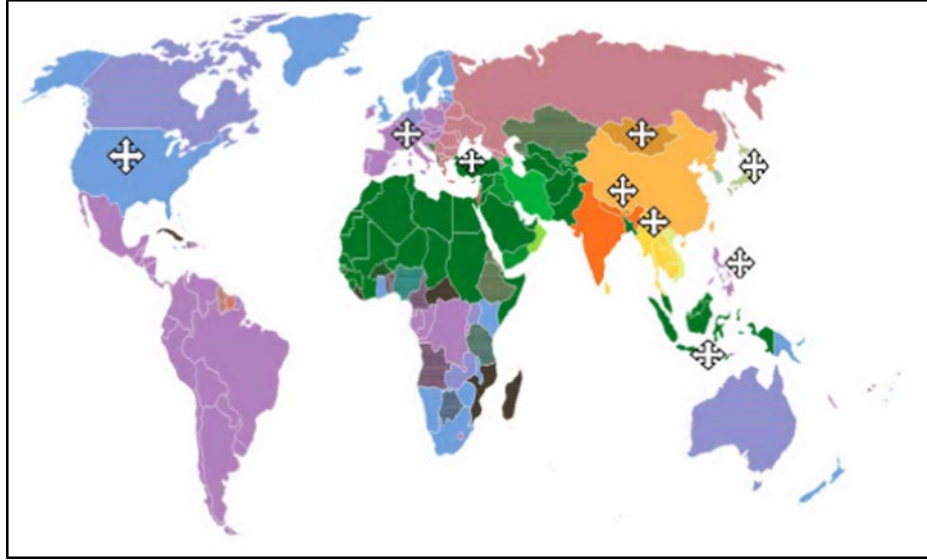
Türkiye'de DB ile ilgili çalışmaları ilk yapan Bucak (1938) olmuştur. Bu balı mikroskopik olarak incelemiş ve içindeki Ormangülü polenlerini izole etmiştir [35]. Biberoglu ve ark. 1984 ile 1986 yılları arasında yaptığı DB çalışmasında, baldan zehirlenen 16 hastayı incelemiş, bu ballarda GTX bulunduğunu rapor etmiştir [36]. Güven ve ark., (1989) yaptıkları çalışmada baldan zehirlenen 29 hastanın elektrokardiyografilerini incelemişler ve zehirlenme belirtilerinin benzer olduğunu bildirmişlerdir [37]. Dilber (2002) çalışmasında, DB'den zehirlenen 8 yaşındaki çocuğun 3 yemek kaşığı DB yedikten sonra kusma, titreme, baş dönmesi, boğaz yanması, bulantı ve bilinç kaybı şikayetiyle hastaneye başvurduğunu bildirmiştir [38]. Hastanın vücut ısısının 36.4 °C, kalp atışının 45 atım/dk, atriyal kan basıncının 85/45 mmHg olduğunu fakat bütün biyokimyasal parametrelerin normal değerlerde olduğunu bildirmiştir. Hipotansiyon ve bradikardi için 1 mg atropin uygulandığını ve çocuğun 12 saat sonra normale dönüp taburcu edildiğini rapor etmiştir [38]. Çiçek ve ark., (2004) yapmış oldukları olgu sunumlarında 58 yaşındaki erkek hastanın 150 g DB tükettikten sonra baş dönmesi, halsizlik, bulantı ve baygınlık şikayetiyle hastaneye başvurduğunu bildirmiştir. Hastada hipotansiyon (80/50 mmHg) ve bradikardi (38 atım/dk) gözlemlendiği ve hastanın 1 mg atropin ile tedavi edildiği ancak iki gün sonra normale dönüp taburcu edildiği rapor edilmiştir [39]. DB intoksikasyonu sonucu gelişen senkopu araştıran Tulmaç ve ark.,(2008) 54 yaşında bir kardiyovasküler hastayı rapor etmişlerdir. Hasta 4-5 yemek kaşığı DB yedikten sonra baş dönmesi, solunum güçlüğü ve baygınlık sonrası

baş çarpması ve bilinç kaybı şikayetiyle hastaneye başvurmuştur. 1 mg atropin sülfat uygulamasından sonra hastanın kısa bir süre içerisinde normale döndüğünü bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu zamana kadar DB zehirlenmesinde her hangi bir ölümün olmadığını da vurgulamışlardır [40]. Yaylacı ve ark., (2011) 63 yaşındaki kadın hastanın DB yedikten 2 saat sonra baş dönmesi, bulantı, nefes darlığı ve terleme şikayetleriyle hastaneye başvurduğunu bildirmiş ve hastanın klinik bulgularında kalp atımının 40 atım/dk, kan basıncının 60/40 mmHg olduğunu rapor etmiştir. Hastanın izotonik sodyum klorür çözeltisi içinde verilen 1 mg atropin uygulamasından sonra normale döndüğünü ve 16. saatte taburcu edildiğini bildirmişlerdir [41].

1.4. ORMANGÜLÜ (*RHODODENDRON*) BİTKİSİ

Fundagiller (Ericaceae) ailesine ait olan ormangülleri (*Rhododendron*) kuzey ve güney yarımkürenin ılıman bölgelerinde yayılış göstermektedir. *Rhododendron* Yunanca rhodon: gül; dendron: ağaç kelimelerinden oluşan gül ağacı anlamına gelmektedir [42]. Çalı veya ağaç formunda olan bu bitkiler genellikle yeşil, sert ve oval yapraklıdır. Ormangülü türleri ilkbaharın sonu ile sonbahar arasında çiçek açmaktadır [43] Çiçeklenme, türün özelliklerine ve buldukları yerin iklim ve yükselti şartlarına göre farklılık göstermektedir. Yılın büyük bir kısmında ya da genellikle tamamında yeşil kalan bu bitkiler, çeşitli renk ve büyüklükteki çiçeklerinden ve yeşil yapraklarından dolayı peyzaj mimari çalışmalarında önemli rol oynarken kök sistemleri sayesinde de erozyonun önlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda tercih edilmektedir [9].

Ormangülleri, Kuzey Yarımküre'nin tamamında bulunurken, Güney Yarımküre'de Asya'dan Avustralya'ya kadar geniş bir alanda yayılış göstermektedir (Şekil 1.2). Ayrıca Himalayalar'da, Nepal, Çin-Hindi Dağları, Kore, Japonya ve Tayvan yayılış gösterdiği diğer önemli alanlardır. Yapılan çalışmalara göre Borneo adasında 55, Yeni Gine adasında 164 türü olduğunu bildirilmektedir [44]. Şekil 1.2 ormangüllerinin yeryüzünde yoğun olarak görüldüğü bölgeleri göstermektedir.



Şekil 1.2. Ormangüllerinin yeryüzündeki yayılışı [34].

Ormangülleri ülkemizde deniz seviyesinden 3200 m yüksekliğe kadar, kuzey kıyılarını bir kuşak halinde kaplayan geniş bir yayılış göstermektedir. Ülkemiz bitki örtüsünde doğal olarak yetişen beş adet (*Rhododendron ponticum*, *Rhododendron luteum*, *Rhododendron ungeronii*, *Rhododendron smirnovii* ve *Rhododendron caucasicum*) doğal, dört adet melez türü bulunmaktadır. Ülkemizin nemli Kuzey ormanlarında yayılış gösteren bu bitkiler başta bal üretimi olmak üzere, değişik yörelerde farklı kullanım alanlarıyla dikkat çekmektedir. Bu bitkilere halk arasında “Komar-Kumar, Ağı-Ağu, Zifin-Çifin” gibi isimler verilmektedir [34].

1.4.1. Ülkemizde Doğal Olarak Yayılış Gösteren Ormangülleri

1.4.1.1. *Rhododendron ponticum* (Mor Çiçekli Ormangülü)

Ülkemizde en yaygın görülen doğal iki ormangülü türünden birisidir. Halk arasında mor çiçekli ormangülü olarak bilinir. Batıda Istranca Dağları'nın kuzey yamaçlarından, doğuda Hopa'ya kadar yayılış göstermektedir. Genellikle Doğu Karadeniz Bölgesinde yoğunlaşan ve baharda çiçek açıp uzun süre çiçekli kalan *Rhododendron ponticum* halk arasında “kara kumar/komar”, “kara ağü” ya da “kumar” olarak da isimlendirilmektedir [42]. Kırklareli, Kocaeli, Sakarya, Düzce, Kastamonu, Zonguldak, Ordu, Giresun, Rize ve Artvin illerinde deniz seviyesinden 2100 m'ye kadar olan yüksekliklerde doğal olarak bol miktarda yetişmektedir [34].

Çiçekleri, morumsu pembe renklidir (Şekil 1.3). Bu tür bol miktarda nektar içerir. Yaprakları parlak, yeşil ve elips şeklindedir. *Rhododendron ponticum*'un nektar, yaprak

ve polenleri bol miktarda GTX içermektedir. Uygun yetiştirme olanakları sağlandığında çalı ya da küçük ağaç formlarındadır [45]. *Rhododendron ponticum*, 1763 yılında süs bitkisi olarak kültüre alınmış, birçok ülkeye yabancı tür olarak girmiştir. Bu yolla İber Yarımadasından taşınarak girdiği İngiltere’de son derece yaygınlaşmış ve bazı alanlarda doğallaşmıştır [44], [46].



Şekil 1.3. *Rhododendron ponticum* (Mor Çiçekli Ormangülü)[34].

1.4.1.2. *Rhododendron luteum* (Sarı Çiçekli Ormangülü)

Ülkemizde en yaygın görülen doğal ikinci ormangülü türüdür. Avrupa’da, Güneybatı Asya’da ve yaygın olarak Karadeniz’de yayılış gösteren bu tür parlak sarı renkli çiçeklere sahiptir ve çiçekler 5-15 tane bir arada sürgün ucunda bulunur (Şekil 1.4). 4 metreye kadar boy alabilen çalı formlardır. Halk arasında “eğriçiçeği”, “çifin” ya da “sarı ağrı” gibi isimlerle bilinmektedir [42]. *Rhododendron luteum*, Türkiye’de bulunan diğer ormangülü türlerinden farklı olarak, kışın yapraklarını döker. Karadeniz Bölgesindeki orman altlarında ve orman sınırı üzerinde 2200 m’de geniş bir yayılım gösteren bu tür batıda Balıkesir ve Çanakkale çevresine kadar yayılmaktadır [34].



Şekil 1.4. *Rhododendron luteum* (Sarı Çiçekli Ormangülü) [34].

1.4.1.3. *Rhododendron smirnovii* (Pembe Çiçekli Ormangülü)

Pembe çiçekleri olan *Rhododendron smirnovii* 4 metreye kadar uzayabilmektedir. Koyu yeşil yaprakları ve yapraklarının alt yüzeyi tüysü yapıda olan bu bitki aromatik çalı formundadır ve Haziran-Temmuz aylarında açan parlak pembe çiçekleri bulunmaktadır (Şekil 1.5). 850-2300 m arasındaki yüksekliklerde, asidik ya da bazik zemin üzerinde, yalnız başına olabileceği gibi bazen de diğer ormangülü türleriyle birlikte yayılış göstermektedir. *Rhododendron smirnovii* dünyada sadece ülkemizin Artvin ve Rize illerinde yayılış gösteren endemik bir türdür [47].



Şekil 1.5. *Rhododendron smirnovii* (Pembe Çiçekli Ormangülü) [34].

1.4.1.4. *Rhododendron caucasicum* (Kafkas Ormangülü)

Krem rengi çiçekleri olan Kafkas Ormangülü 1 metreye kadar uzamaktadır. Yaprakları

her zaman yeşil aromatik çalı formundadır. Mayıs-Temmuz aylarında açan parlak krem rengi çiçekleri bulunmaktadır (Şekil 1.6). Kuzey yamaçlarda 1830-3000 metre yükseklikte, asidik topraklarda yetişmektedir. Kayın, kayın-kökner ya da kayın-ladin ormanlarının alt katında dağınık topluluklar oluşturdukları bilinir. En iyi yayılışı subalpin ve alpin kuşakta göstermektedirler. *Rhododendron caucasicum* ülkemizde Trabzon, Rize, Artvin ve Kars illerinde yayılış göstermektedir [48].



Şekil 1.6. *Rhododendron caucasicum* (Kafkas Ormangülü) [34].

1.4.1.5. *Rhododendron ungerii* (Beyaz Çiçekli Ormangülü)

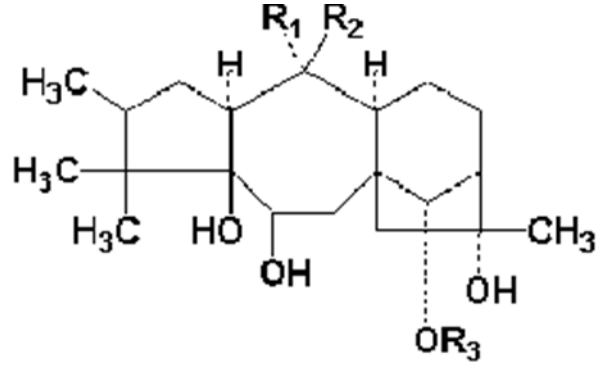
Genellikle beyaz çiçekleri olan bu tür 7 metreye kadar uzayabilmektedir. 850-2200 m arasındaki yüksekliklerde yayılış gösteren çalı ya da ağaç formundadır. Haziran-Ağustos aylarında çiçek açan beyaz (Şekil 1.7) kumar/komar olarak da bilinen *Rhododendron ungerii* ladin ve kayın ormanı altında yetişmektedir. Kafkaslar ve Kuzeydoğu Anadolu'da doğal yayılış gösteren *Rhododendron ungerii* ülkemizde kolşik alanının temsil edildiği Doğu Karadeniz'de yaygın olarak görülmektedir [49].



Şekil 1.7. *Rhododendron ungerii* (Beyaz Çiçekli Ormangülü) [34].

1.5. GRAYANOTOKSİNLER

Ormangülü gibi Fundagiller familyasında yer alan bazı bitkilerin nektar, polen ve yaprak kısımlarında bulunan grayanotoksin (GTX), toksik diterpenlerin bir grubunu oluşturmaktadır [50]. Azot içermeyen polihidroksile siklikhidrokarbonlardan oluşan bu bileşik, 2 hegzamerik ve 1 pentamerik halkadan oluşur [51]. Andromedotoksin, asetillandrometol, ve rodotoksin olarak da isimlendirilen GTX'ler, GTX-I' den türevlenir. Bu moleküllerin her biri dört izopren biriminin (C_5) bir araya gelmesiyle meydana gelen yirmi karbonlu (C_{20}) yapıdadır [52]. Şekil 1.8'de GTX'lerin genel kimyasal yapısı verilmiştir.



GRAY	R ₁	R ₂	R ₁ R ₂	R ₃
GRAY1	OH	CH ₃	-	H
GRAY2	-	-	-CH ₂	H
GRAY3	OH	CH ₃	-	Ac

Şekil 1.8. Grayanotoksin I, II ve III'ün genel kimyasal yapısı [52].

GTX zehirlenmesi, bu toksinleri içeren nektarlardan üretilen ballardan kaynaklanmaktadır. Arılar tarafından bitkilerden alınan GTX'ler, detoksifiye edilemediği için doğrudan bala karışıp zehirlenmelere yol açabilmektedir. Nektarın içerisinde bulunan GTX tipi ve miktarı türden türe değişiklik gösterebilmektedir [21].

Bilinen 60 farklı GTX çeşidi bulunmaktadır. GTX'lerin toksik değerleri moleküllerinin kararlılığına bağlıdır (Şekil 1.8). Daha kararlı moleküler yapıya sahip olan daha geç hidrolize edilmekte ve bundan dolayı daha az toksik etki göstermektedir. Buna göre GTX'lerin toksik değer sıralaması GTX-III>GTX-I>GTX-II şeklindedir [12].

GTX'lerin hücredeki toksik etkileri, hücre membranlarındaki sodyum kanallarını bloke etmesiyle gerçekleşir. Maejima ve ark. (2003) bu konuda yapılmış birçok çalışmayı derlemiş ve GTX'in voltaj bağımlı Na⁺ kanalları üzerine etkisinin 3 aşamada gerçekleştiğini rapor etmiştir [52]. Birinci aşamada, GTX voltaj bağımlı kanalların açılma fazında bu kanallara bağlanır. İkinci aşamada, kanallar modifiye olur. Üçüncü aşamada ise modifiye olan Na⁺ kanallarının aktivasyon potansiyeli hiperpolarizasyona neden olur. Bunların hepsi hücre membranında voltaj bağımlı aktivasyon veya inaktivasyona neden olmaktadır [53]. GTX'ler sodyumun geçirgenliğini artırırken kalsiyumun hücreye girişini kolaylaştırmaktadır. Böylece uyarılabilir hücreler (sinir ve kas) depolarize durumda kalırlar. GTX'ler özellikle dolaşım, solunum, sindirim ve

santral sinir sistemini etkilemektedir [54]. Ayrıca düşük dozlarda alınan GTX, bradikardi ve hipotansiyona, soluk almada düzensizlik ve derinlikte azalmaya neden olurken yüksek dozlarda alındığında taşikardi ve hipertansiyona, soluk hızlanması ve sonrasında solunumun depresyonuna neden olmaktadır [43].

1.6. DELİ BAL ZEHİRLENMESİ

1.6.1. Deli Bal Zehirlenmesi ile İlgili Klinik Araştırmalar

DB'nin belli bir dozun üzerinde tüketilmesi insanlarda zehirlenmelere sebep olmaktadır. Zehirlenme belirtilerinin genel olarak bir çay kaşığından fazla bal tüketiminden sonra gerçekleştiği ve tüketilen bal miktarına göre zehirlenme derecesinin arttığı bildirilmiştir [50], [55]. GTX'lerin absorpsiyonu ve metabolizasyonu çok hızlı olduğundan, zehirlenme belirtileri genel olarak bal tüketiminden sonraki ilk 30 dakika ile 3 saat içinde ortaya çıkmaktadır [43], [56], [57]. Eğer tedavi edilmezse en kötü zehirlenme etkileri yaklaşık 24 saat sürmekte ve tam iyileşme birkaç günde tamamlanmaktadır [15], [37], [58]. Örneğin, Jansen ve ark. (2012) DB zehirlenme etkilerinin 1-2 gün sürdüğünü rapor etmiştir [19]. Gündüz ve ark. (2008) DB zehirlenmesi teşhisi konan hastaların 2-6 saat kontrol altında tutulduktan sonra taburcu edilebileceğini bildirirken [59], Yaylacı ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada hastaların yaklaşık 27.7 ± 7.2 saat kontrol altında tutulması gerektiğini bildirmiştir [60]. Binnetoğlu ve ark. (2008) ise DB'nin etkisinin 72 saat sürdüğünü rapor etmiştir [58].

DB zehirlenmesi ile ilgili bildirilen vakaların çoğu Türkiye'nin Karadeniz Bölgesinden olmakla birlikte literatürde Kore, ABD ve farklı Avrupa ülkelerinden bildirilen vakalarda vardır [32]. DB zehirlenme vakalarının çoğu GTX'in kardiyak bulgularından kaynaklanmaktadır. Bildirilen tüm vakalarda en sık rastlanan fiziksel bulgular bradikardi ve hipotansiyondur ve diğer semptomlar genel olarak bu iki bulgu ile ilgilidir [17]. Hastalarda atriyoventriküler blok, nodal ritimler ve daha sıklıkla sinüs bradikardileri de görülmektedir. Bahsedilen kardiyovasküler etkilerin yanı sıra bulantı, kusma, salivasyon, kramp tarzı karın ağrısı gibi gastrointestinal şikayetler ve baş dönmesi, bilinç kaybı, bulanık görme, deliryum gibi nörolojik semptomlarda ortaya çıkabilmektedir [18].

DB zehirlenmesine maruz kalanların %90'ından fazlasında hipotansiyon ve bradikardi görülmektedir [56]. İkinci sıklıkta görülen semptomlar, terleme, sersemlik ve mental

durum değişikliğidir [61]. Senkop, diplopi, bulanık görme ve hipersalivasyon sık görülen diğer semptomlardır [61]. On iki farklı vaka serisi incelendiğinde, vakaların %75'inde ya non-spesifik bradiaritmi veya sinüs bradikardisi rapor edilirken, aynı serilerde; hastaların %25'inde farklı derecelerde kalp bloğu; nodal ritim, AV tam blok ve ikinci derece kalp bloğu tespit edilmiştir [59]. Karaciğerle ilgili olarak hepatotoksisite [62] ve akut hepatitis [63] olguları rapor edilmiştir. Hayvan çalışmalarında klinik olarak kan glukoz düzeyinde belirgin değişiklikler olmasına rağmen insan vakalarındaki çalışmalarda kan glikoz düzeyinde değişiklik bildirilmemiştir [64].

1.6.2. Deli Bal Zehirlenmesi ile İlgili Deneysel Araştırmalar

Literatürde DB zehirlenmesiyle ilgili sınırlı sayıda deneysel çalışma mevcuttur. Onat ve ark. (1991) DB verilmiş farelerde obezite ilişkili hipotansiyon, bradikardi ve solunum hızı depresyonu gözlemlenmişlerdir [64]. Bu çalışmada, GTX'in bradikardik etkisinin bileteral vagotomi ile ortadan kalktığı gösterilmiş ve GTX'in bradikardik etkilerinin, N.vagus ile periferal yoldan oluştuğu ispatlanmıştır. Aynı grup başka bir çalışmasında non-spesifik antimuskarinik bir ajan olan atropin ile GTX'in indüklediği bradikardinin ve respiratuar depresyonun düzeltildeğini göstermiştir [65]. Aşçıoğlu ve ark. (1995) DB ve çiçek balı kullanarak gerçekleştirdikleri araştırmalarında DB verilen kurbağa gastroknemius kasında çiçek balı verilen gruba göre daha fazla kasılma olduğunu bildirmiştir [66]. Aşçıoğlu ve ark. (1996) bir diğer çalışmasında kurbağa siyatik sinirinin potansiyel aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlardaki DB'nin etkisini incelemişlerdir [67]. Bu çalışmada DB'nin siyatik sinirde başlangıç uyarı voltajını yükselttiğini ve bu yükselişin kullanılan DB'nin dozuna bağlı olduğunu bildirmişlerdir [67]. Diğer bir çalışmada, farelere yüksek doz GTX-I verilmiş ve farelerde proteinüri ve hematüri gelişmiş fakat renal parankimde herhangi bir histolojik değişiklik meydana gelmediği bildirilmiştir [68].

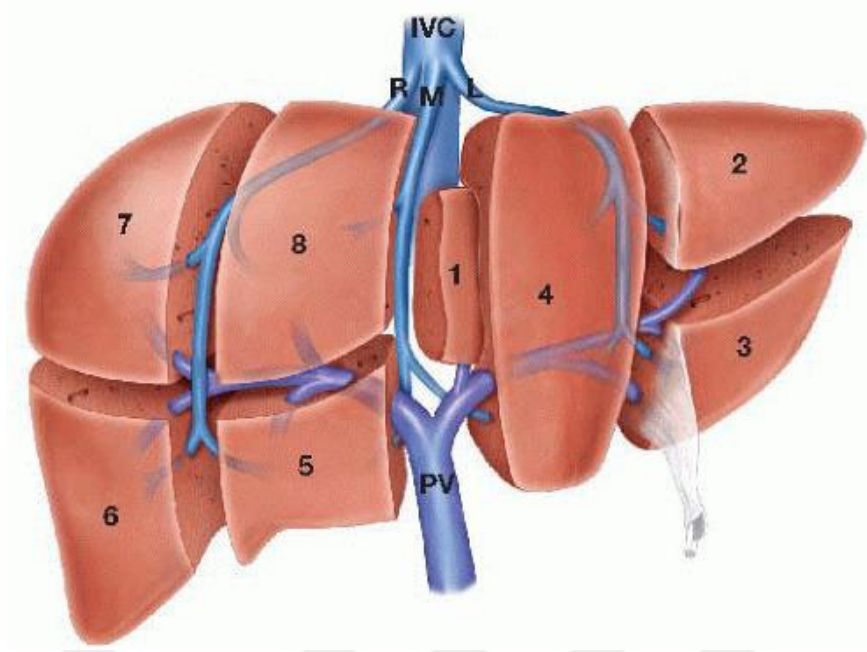
DB ve GTX'in karaciğer dokusu üzerindeki etkilerini araştıran çok az sayıda deneysel çalışma vardır. Ancak bunlar ya biyokimyasal çalışmalardır ya da ışık mikroskopu seviyesindedir [60], [68]–[70]. Örneğin, Aşçıoğlu ve ark. (2000) akut GTX-I uygulamasının bazı enzim seviyelerinde artışa ve fokal nekroz, hepatik santral venin dilatasyonu gibi toksik etkilere sebep olduğunu bildirmiştir [68]. Silici ve ark. (2014), GTX-III ve yüksek doz DB'nin lipit peroksidasyonuna sebep olduğunu göstermiş [71],

Şahin ve ark. (2016) farklı dozlardaki DB uygulamasının karaciğer enzim seviyelerinde artışa sebep olduğunu rapor etmiştir [72]. Kükner ve ark. (2016), DB ve GTX'in karaciğer üzerine etkilerini ışık mikroskopunda incelemiş ve DB uygulanan bazı grupların dokularında tıkanıklık, steatoz ve inflamatuvar hücrelerde artış görmüş; GTX uygulanan grupların sinüsoidlerinde çok çekirdekli dev hücreler tespit etmişlerdir.

1.7. KARACİĞER

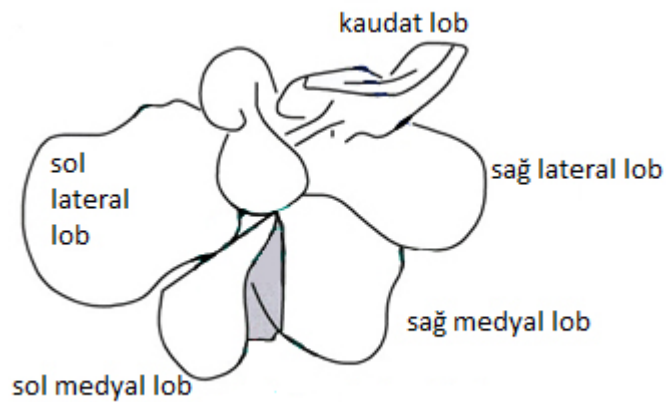
Karaciğer yetişkinlerde ortalama ağırlığı vücut ağırlığının %2'sini oluşturan, yaklaşık 1500 gr ağırlığında, periton adı verilen zarla çevrili bir parankimal organdır. Vücudun deriden sonra en büyük organı ve en büyük bezidir. Sindirim sistemine ait yardımcı bir bez olarak kabul edilir [73]. Karın boşluğunun sağ üst kısmında göğüs kafesi ve diyafram arasında korunaklı bir şekilde bulunur [74]. Damarsal yapısı gelişmiş, kan akımı yüksek, vasküler direnci düşük olan bu organ elastik ve sağlam yapısına rağmen süngerimsi yapısıyla travmalara duyarlıdır ve yaralanmaları ciddi kanamalara yol açabilir [75].

Karaciğer anatomik olarak batının ön yüzeyinde sağ ve sol olarak 2 ana lobdan meydana gelmektedir. Her lob sağda ve solda 4'er bölüm olmak üzere toplam 8 bölümden meydana gelir [76]. Bölümler arası ayırım hepatik venlerin ilişkisi, safra yolları ve arteryel anatomi göz önüne alınarak yapılmıştır [77]. Karaciğer diafragma, on iki parmak bağırsağı, kolon, sağ sürrenal bez, sağ böbrek, özefagus ve mide gibi organlara komşuluk etmektedir.



Şekil 1.9. İnsan karaciğerinin anatomik yapısı [78].

Fare karaciğeri ve insan karaciğerinin temel yapıları benzerlik göstermesine rağmen fare karaciğeri; sol lateral - sol medial, sağ lateral - sağ medial ve kaudal loblardan oluşmaktadır [79]. Farelerde safra kesesi olmadığı için uzun bir safra kanalı duodenuma kadar ulaşır. Bu anatomik farklılıktan dolayı sol lob ve orta lob, tek lob şeklindedir ve orta lob derin bir çentikle ayrılmıştır (Şekil 1.10). Fare karaciğerinin lobları, insan karaciğerindeki şu segmentlere benzetilebilir; sol lob: Segment 2, orta lob: Segment 3, 4, 5, 8 ve sağ lob: Segment 6, 7 (Şekil 1.9).



Şekil 1.10. Fare karaciğerinin anatomik yapısı [80].

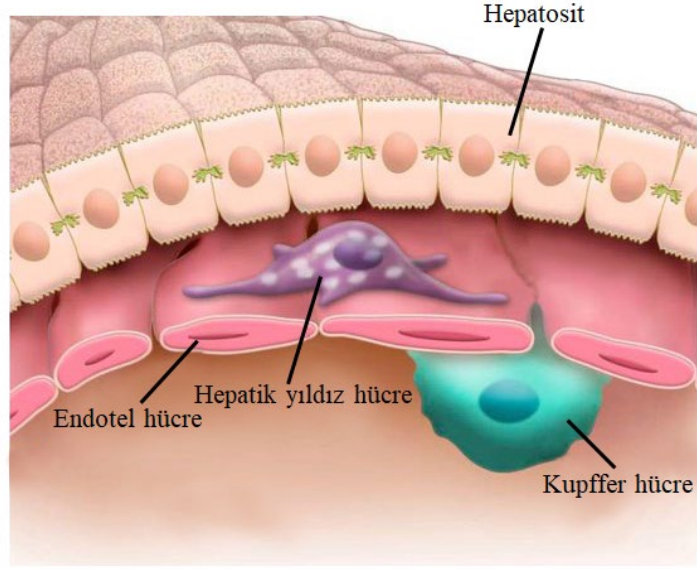
Karaciğer fizyolojik olarak birçok metabolik işlevin yerine getirildiği, bir metabolik sistemden diğerine substratları ve enerjiyi paylaşan, vücudun başka kısımlarına taşınan

maddeleri işleyip sentezleyen, çok sayıda kimyasal tepkimelerin gerçekleştiği bir organdır. Canlı organizmada bulunan safra kanalları yoluyla safrayı on iki parmak bağırsağına boşalttığından ekzokrin, glikoproteinler, fibrinojen, protrombin, albümin, globülinler gibi proteinleri ve glikozu kana doğrudan vermesinden dolayı ise endokrin bir bez olup önemli metabolik fonksiyonlarda rol oynamaktadır [81].

Karaciğerin görevleri aşağıdaki gibi özetlenebilir [82];

- Vücuda giren birçok ilacın ve zehirli maddenin meydana getirdiği toksik etkiyi azaltır veya ortadan kaldırır.
- Kandaki besin maddelerini depolar ve işler.
- Kandaki glikozu glikojene çevirir ve depolar. Glikoza ihtiyaç duyulduğu zaman depodan glikojen parçalanır ve kana glikoz salgılanır.
- Kanda bulunan birçok plazma proteinini üretir.
- Bakteri ve yıpranmış kırmızı kan hücrelerini fagosite eder.
- Yağların sindiriminde görev alan safra sıvısını salgılar ve yağların sindiriminde önemli rol alır.
- Protein, karbonhidrat ve yağların metabolizmasında birçok önemli fonksiyonu yerine getirir.
- Aminoasitleri, yağ asidine ve üreye çevirir.

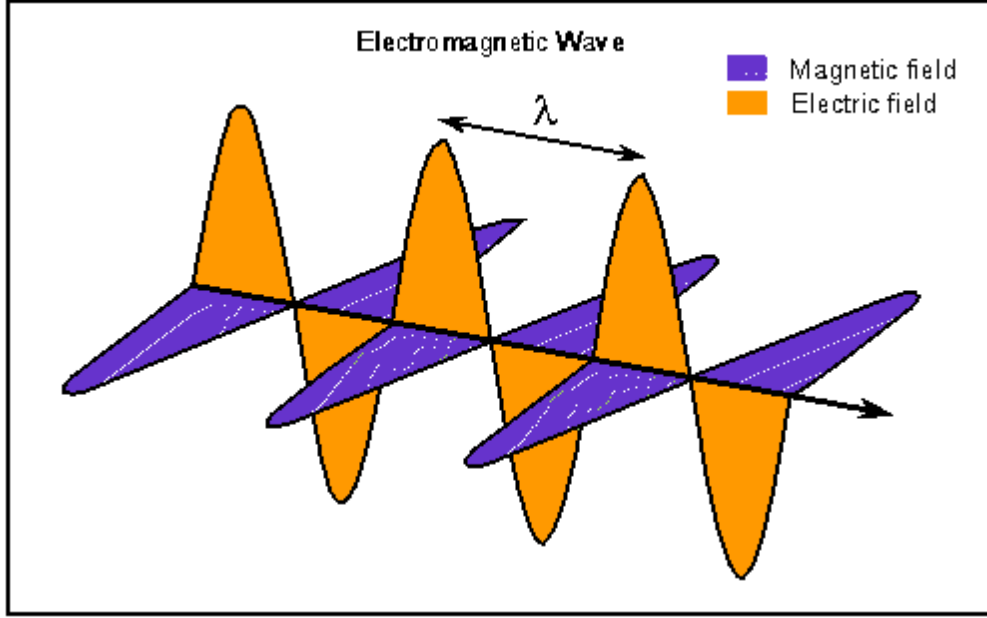
Karaciğer hücrelerinin %60-70'i hepatositlerden, %15'i Kupffer hücrelerinden ve %15'i ise fibroelastik bağ dokusu, kan damarları (damarlar ve arterler), kanallar ve sinirlerden oluşmaktadır (Şekil 1.11) [76]. 20-30 mikrometre çapında olan hepatositler yapısal, histolojik ve biyokimyasal olarak farklılıklar gösterir. Fonksiyonu gereği oldukça fazla sayıda mitokondri, endoplazmik retikulum, ribozom ve golgi cisimcikleri bulundurmaktadırlar. Hepatositler plazma proteinlerini (albümin, protrombin, fibrinojen, lipoprotein) sentezler, detoksifikasyon, safra salgılanması, konjugasyon ve glukoneogenezde rol alır [83]. Endotel hücrelerinin lümenine bakan kısmında bulunan kupffer hücreleri bakterilerin ve diğer artıkların fagositoz yoluyla kandan temizlenmesini sağlayan doku makrofajlarıdır. Başlıca fonksiyonları yaşlı eritrositleri yıkmak, hemoglobini sindirmek, immünolojik proteinleri salgılamak ve kalın bağırsaktan portal kana geçen bakterileri ortadan kaldırmaktır.



Şekil 1.11. Karaciğer hücreleri (hepatosit, kupfer vb.)[84].

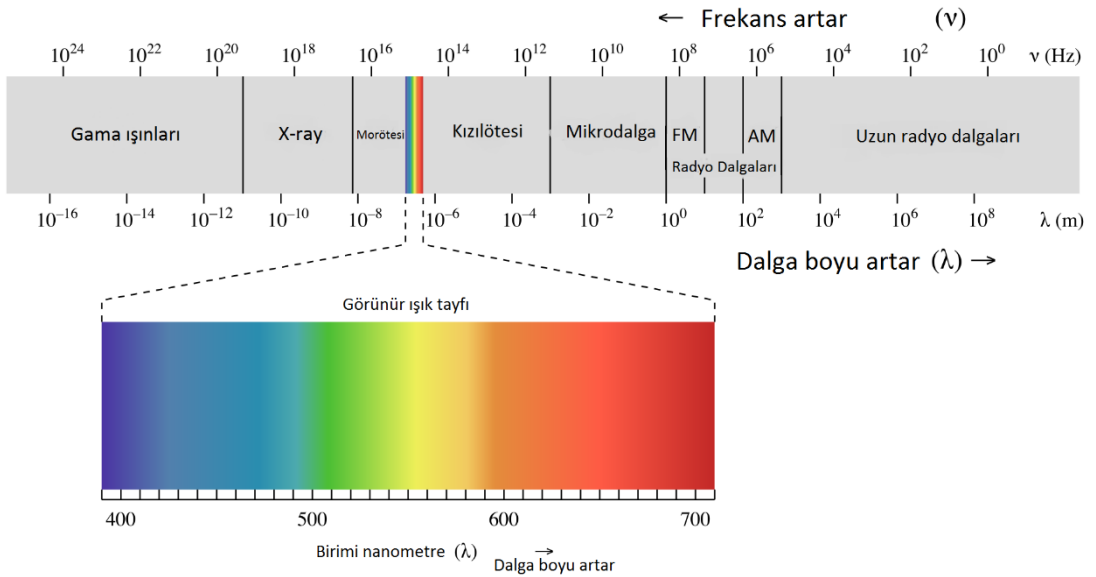
1.8. ELEKTROMANYETİK RADYASYON

Elektromanyetik radyasyon; radyasyonun hareket ettiği yöne dik bir yönde ve değişen büyüklükte bir elektriksel alandan (E) ve elektriksel alana dik açılarda yönlendirilmiş olan bir manyetik alandan (M) oluşur (Şekil 1.12) [85]. Bu ışınım, elektriksel ve manyetik alanların yüksek hızda hareket etmesinden meydana gelen bir enerji türüdür. Güneşin doğması, mikrodalga, televizyon, cep telefonu, röntgen gibi cihazların çalışması elektromanyetik dalgalar sayesinde gerçekleşir. Elektromanyetik dalgaların dalga boyu ve frekans denilen iki özelliği vardır [86]. Dalga boyu, ardı arda gelen tepe/çukurun arasındaki mesafe uzunluğudur. Frekans, dalganın saniyede yaptığı salınım sayısına denir.



Şekil 1.12. Elektromanyetik dalga [87].

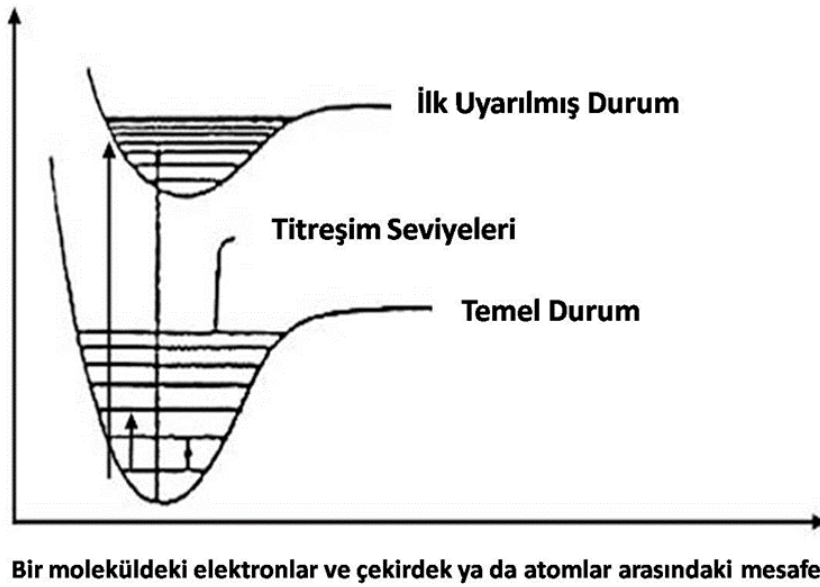
Elektromanyetik dalgalar; radyo dalgaları, mikrodalgalar, kızılötesi, görünür ışık, ultraviyole, x ışınları ve gama ışınları olmak üzere yedi gruba ayrılır [88]. Dalga boyu ve frekans değerlerine göre bu grupların sıralanıp gösterilmesi biçimine elektromanyetik spektrum denir (Şekil 1.13)[85].



Şekil 1.13. Elektromanyetik Spektrum [89].

1.9. SPEKTROSKOPİ

Spektroskopi, bir maddeyi nitel ve nicel olarak incelemek için elektromanyetik radyasyonun kullanılması olarak tanımlanır [87]. Işık madde ile etkileşime geçtiğinde maddede bir uyarılma meydana gelir. Bu uyarılma farklı şekillerde olabilir: Saçılma (yayıma yönü, yani ilerleme yönü değişir), soğurma (yani enerjisi moleküle aktarılır) veya emisyon (enerji, molekül tarafından salınır). Elektromanyetik ışığa ile maddenin etkileşimi sonucu maddede meydana gelen uyarılma; elektronlar veya atomların enerji düzeyleri arasında geçişe neden olabilir [90]. Bu geçişler kuantum mekaniği tarafından incelenir ve nicel değerler taşır [86]. Bir enerji durumundan diğerine taşınan elektron, bu geçiş sırasında enerjiye gereksinim duymaktadır. Temel durum ve ilk uyarılmış durum arasında elektron geçişleri meydana gelebilir. Şekil 1.14’de bir enerji düzey diyagramı verilmiştir. Bu şekilde, titreşim enerjisi seviyeleri ince yatay çizgiler olarak gösterilmiştir. Uzun oklar; temel durumundan ilk uyarılan duruma olası bir elektronik geçişi gösterirken, kısa oklar; temel elektronik durumdaki titreşimli bir geçişi temsil etmektedir (Şekil 1.14) [90].



Şekil 1.14. Enerji düzey diyagramı [91].

1.10. KIZILÖTESİ (INFRARED) SPEKTROSKOPİSİ

Birçok bilim dalında kantitatif ve kalitatif bir araç olarak kullanılan kızılötesi spektroskopisi, günümüz bilim insanlarının yararlanabileceği en önemli analitik

tekniklerden biridir. Kızılötesi ışınlar, 1800 yılında Wilhelm Herschel'in görünür bölgedeki renklerin sıcaklık farklarını ölçmek için hazırladığı deney düzeneğinde, güneş ışığını bir prizmadan geçirerek elde ettiği renklerin sıcaklığını ayrı ayrı termometreyle ölçmesi ve kırmızı renge yaklaştıkça termometredeki değerin yükseldiğini fark etmesiyle keşfedilmiştir [92]. Böylece görünür ışık bölgesinin dışına çıkıldıkça daha sıcak bir bölge olduğu anlaşılmıştır. Kızılötesi ışınlar elektromanyetik spektrumda görünür ışık ve mikrodalga bölgesi arasında yer alır. Dalga boyu 1000 μm ile 0.8 μm aralığında, dalga sayısı 14000 ile 4 cm^{-1} arasındadır (Çizelge 1.1). Kızılötesi ışınlar yakın, orta ve uzak kızılötesi olmak üzere 3'e ayrılır [89].

Çizelge 1.1. Kızılötesi spektral bölgeler [89].

Bölge	Dalga sayısı Aralığı (cm^{-1})	Dalgaboyu (μm)
Yakın-IR	14000-4000	0.8-2.5
Orta-IR	4000-400	2.5-25
Uzak-IR	400-4	25-1000

Kızılötesi (IR) Spektroskopisi, kızılötesi ışığın madde tarafından soğurulması esasına ve titreşim enerji seviyeleri arasındaki geçişlere dayanmaktadır. Bu teknik, moleküldeki atomların titreşimlerini temel alır. Moleküllerdeki kimyasal bağlar belirli enerji seviyelerine karşılık gelen titreşim frekanslarına sahiptir. Bu frekanslar atomların kütlesi, molekülün şekli (geometrisi) ve bağların gücüne göre belirlenir [93]. Kızılötesi ışığın soğurulması moleküldeki bağların titreşimi ve dönüşleri için gerekli miktarda dalga enerjisinin, cihaz tarafından elektromanyetik spektrumun kızılötesi bölgesinden gönderilmesiyle gerçekleşir.

Molekülleri oluşturan atomlar sürekli hareket halindedir. Kızılötesi spektrumlar, çeşitli fonksiyonel grupların karakteristik hareketleri ile üretilir. Bir molekülün kızılötesi ışınını absorbe edebilmesi için titreşim veya dönme hareketi sonucunda, molekülün dipol momentinde net bir değişme meydana gelmelidir. Dipol moment, yük merkezleri arasındaki uzaklık ve yük farkının büyüklüğündeki farka bağlıdır. Eğer molekülde titreşim ve dönme hareketleri sırasında net bir dipol moment değişimi olmazsa molekül infrared ışınını absorblayamaz. Kızılötesi ışık ile uyarılan maddenin molekülünde

ışığın soğurulması sonucu titreşme ve dönme düzeyleri uyarılır. Bir molekülde birçok olası titreşim olmasına rağmen, dipol momentinde bir değişim yaratan en önemli titreşimler gerilme (simetrik ve asimetrik) ve eğilme (makaslama, sallanma, bükme, sallanma) hareketleridir (Şekil 1.15) [91].

Titreşme hareketleri:

1) Gerilme (Stretching) Titreşimleri: İki atom arasındaki bağ eksenini boyunca atomlar arasındaki uzaklığın devamlı değişmesi söz konusudur ve 2 tiptir (Şekil 1.15).

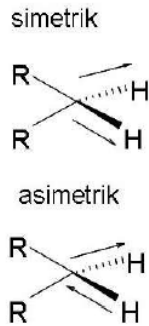
1. Asimetrik gerilme,
2. Simetrik gerilmedir.

Gerilme titreşimlerine karşılık gelen IR absorpsiyon bandı, eğilme titreşimlerine karşılık gelen IR absorpsiyon bandından daha yüksek frekanstadır.

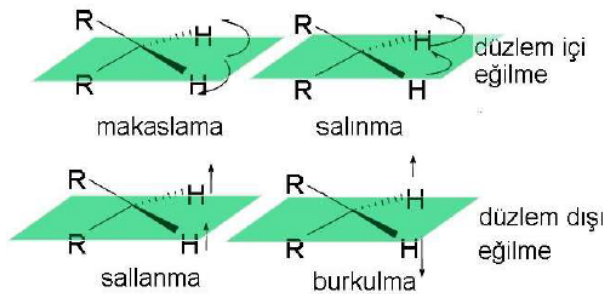
2) Eğilme (Bending, düzlem içi ve dışı): İki bağ arasındaki açının en az birinin değiştiği titreşimler olarak tanımlanmaktadır ve dört tiptir (Şekil 1.15).

1. Makaslama,
2. Sallanma,
3. Salınma,
4. Burkulma.

Gerilme (Stretching)



Eğilme (Bending)



Şekil 1.15. Bir kızılötesi spektrumunda titreşim hareketleri [91].

Kızılötesi spektroskopisi en çok organik bileşiklerin tanımlanmasında tercih edilir. Maddelerin elde edilen spektrumlarında maximum ve minimum absorpsiyon bantları

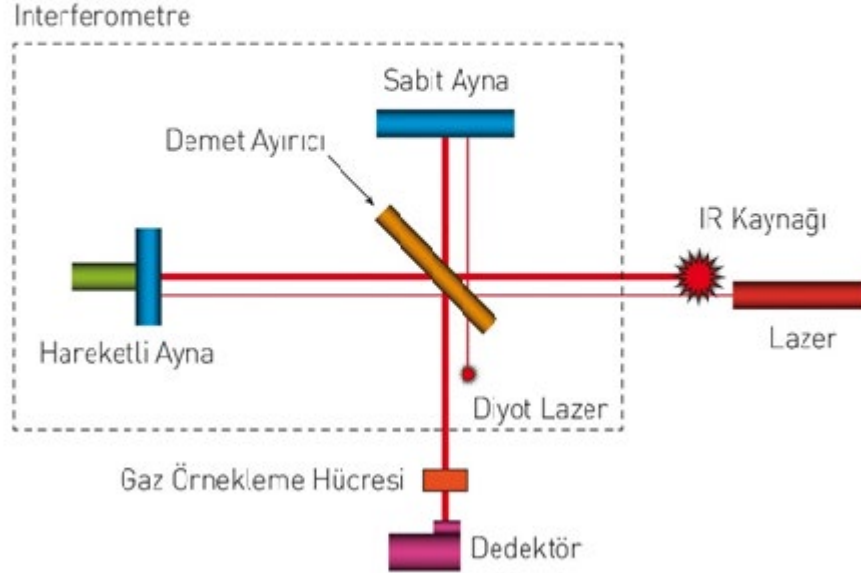
bulunur. Bu bantlar maddelerin birbirleriyle kıyaslanmasına olanak verir. Bir organik maddenin spektrumu onun fiziksel özelliklerinden biridir ve optik izomerler dışında aynı spektrumu veren farklı iki madde yoktur. Özetle her bir molekülün kızılötesi spektrumu kendine aittir ve o molekülün karakter tanımlanmasında kullanılır [85], [94].

1.11. FOURIER DÖNÜŞÜM KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FTIR)

FTIR spektrometresi, matematiksel Fourier dönüşümü ile veriyi zaman alanından frekans alanına aktaran kızılötesi spektroskopisinin gelişmiş bir tekniğidir. Işığın kızılötesi yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen analitik bir cihazdır. Kızılötesi spektrometresi çift ışın yoluna sahip olarak tasarlanmıştır. Fourier dönüşüm kızılötesi spektrometresi ise kızılötesi kaynağından gelen ışığı difraksiyon prizmaları ile kırınımına uğratarak farklı frekansta kızılötesi ışınlarına dönüştürmektedir.

FTIR spektrometresi, Michelson interferometresi kullanarak örnekten gelen sinyallerin bir interferogramını toplar ve bu interferograma Fourier Dönüşümü uygulayarak bir spektrum elde eder. İnterferometre, gelen kızılötesi ışınları bir ışın ayırıcı ile iki optik ışına ayırır. Bir ışın sabit alandaki düz bir aynaya, diğeri ışın ayırıcıdan ayrılıp çok kısa bir mesafeye hareket eden düz bir aynaya gider. İki ışın kendi aynalarından geri döner ve ışın ayırıcısında tekrar karşılaşır ve birleşirler. Birbirleriyle birleşen bu iki ışının sonucu interferometrede elde edilen bu sinyale interferogram denilmektedir (Şekil 1.16) [95]. Elde edilen interferogram Fourier dönüşüm spektrometre bilgisayarıyla absorban-frekans spektrumuna dönüştürülür.

FTIR Sistemi



Şekil 1.16. Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektrometresi [95].

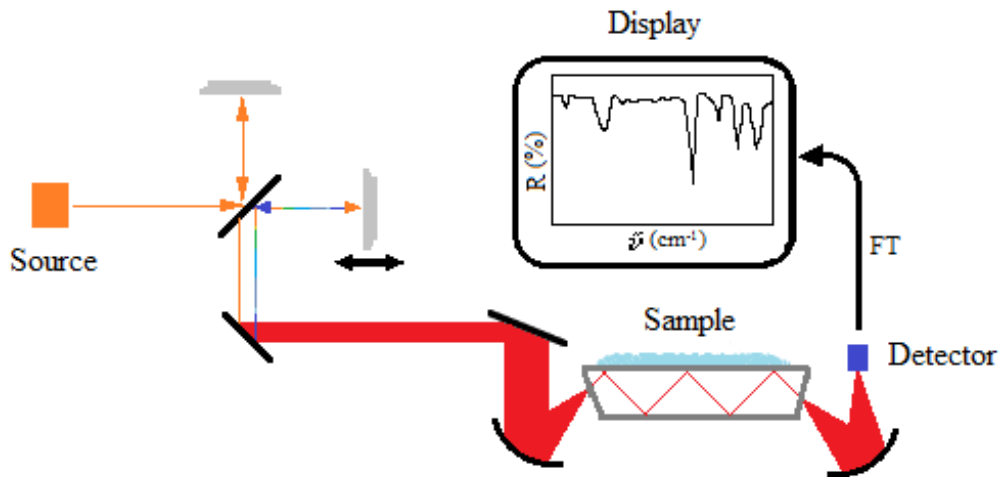
FTIR spektroskopisi incelenmek istenen makromoleküllerdeki fonksiyonel grupların titreşimlerinden kaynaklanan yapısal, kompozisyonel ve fonksiyonel bilgilerin elde edilmesini sağlayan bir tekniktir [96]. Elde edilen spektrumlarda parmak izi özelliği taşıyan bilgiler, moleküllerin fonksiyonel gruplarının tespit edilmesine ve dolayısıyla farklı yapılarının ayırt edilmesine yani karakterlerinin tanımlanmasına olanak sağlar [97]. Bu teknik kullanılarak; doku ve hücrelerde lipit, protein, DNA, RNA gibi biyomoleküllerdeki fiziksel ve yapısal değişimlerin izlenmesi mümkün olabilmektedir [98]. Fonksiyonel grupların doğru tanımlanmasının yapılması, ilgili bantların pozisyonları, sinyal şiddeti/alanı ve bant genişliği değerlerinin hesaplanmasıyla değerli bilgiler elde edilebilmektedir. Bant şiddeti/alanı maddenin konsantrasyonu hakkında, bant konumu düzen/düzensizlik ve konformasyon hakkında, bant genişliği ise dinamik hakkında bilgi verir [99]. Dolayısıyla, FTIR spektrumlarından bir bileşiğin yapısındaki bağ türleri, fonksiyonel gruplar ve dolayısı ile sistemde mevcut moleküllerin belirlenmesi, bunların konsantrasyon, kompozisyon ve konformasyonu gibi pek çok kalitatif ve kantitatif bilgi elde etmek mümkündür.

FTIR spektroskopisi; boyama, işaretleme gibi uzun örnek hazırlama prosedürlerine gerek duymayan, hızlı, hassas ve etkin sonuçların daha ucuz bir biçimde elde edilmesini sağlayan, *in vivo* ve *in vitro* koşullarda çok düşük konsantrasyondaki örneklerde de

inceleme sağlayan avantajlı bir tekniktir [100], [101]. Biyolojik çalışmalarda, biyolojik sistemlere zarar vermeden moleküler düzeyde çalışma fırsatı sunduğu için tercih edilmektedir.

1.12. AZALTILMIŞ TOPLAM YANSIMA (ATR)-FTIR SPEKTROSKOPİŐİ

ATR-FTIR spektroskopisi numune hazırlamaya gerek duymadan, örneklerin kalitatif ve kantitatif analizi için yaygın olarak kullanılan bir FTIR tekniğidir. FTIR spektroskopisine azaltılmış toplam yansima (Attenuated Total Reflectance=ATR) aksesuarının takılmasıyla elde edilir. Bir ATR aksesuarı, ışın bir numuneyle temas ettiğinde yansıyan kızılötesi ışınında meydana gelen değişiklikleri ölçmesi prensibiyle çalıŐır. Bu aksesuarın kullanımı ile kızılötesi ışınlardan kaynaklı sinyalin elde edilebilmesi için örnek ile gelen ışının çok yakın bir temasta olması gerekmektedir. Dolayısıyla, belirli bir basınç uygulanarak ATR kristali ve örnek arasında yakın temas sağlanır. Şekil 1.17'den grldğu üzere kızılötesi ışını, belirli bir açıda yüksek kırılma indisine sahip optik olarak yoğun bir kristalin üzerine yönlendirilir. Bu yansima, kristalin yüzeyi ile temas halinde olan numuneye kristal yüzeyinin ötesine uzanan bir dalga oluŐmasını sağlar. Örneğin enerjiyi emdiği bölgelerde ortaya çıkan ışın zayıflar. ZayıflatılmıŐ ışın kristale geri dönüp kristalin karşı ucundan çıkar ve kızılötesi spektrometresindeki dedektöre gelir. Detektör zayıflatılmıŐ bu ışını interferogram sinyali olarak kaydeder (Şekil 1.17). Bu sinyal kızılötesi spektrumu oluŐturmak için kullanılır.



Şekil 1.17. ATR-FTIR Spektroskopisi.

ATR için germanyum, silika, elmas, ve çinko-selenit gibi farklı ham maddelerinden oluşan birçok kristal materyal çeşitleri bulunmaktadır. Bu kristallerin materyali kullanılan örneğin özelliğine ve incelenmek istenen kızılötesi bölgesine göre seçilmektedir. Bu çalışmada, orta-IR bölgesinde kullanıma uygun olan, suya dayanıklı, düşük maliyetli Diamond/ZnSe (elmas/çinko-selenit) kristali kullanılmıştır. Bu kristal, orta-IR bölgesinde kuru, ıslak veya sulu örnekleri analiz etmek için uygundur.

Biyolojik örnekler için son derece elverişli bir yöntem olan ATR-FTIR spektroskopisi tekniğinin sağladığı avantajlar aşağıdaki gibi özetlenebilir [99]–[102];

- Örneğin ön işlemden geçirilmesine ihtiyaç duymaması,
- Örneğin fiziksel halinin önemli olmaması (katı, sıvı veya gaz olabilir),
- Kullanılan ışının örneğe zarar vermemesi (fonksiyonel ve yapısal deneyler için zararlı değildir),
- Analiz için çok az miktarlarda örneğin yeterli olması,
- Tek bir spektrumdan, fonksiyonel gruplardaki tüm değişikliklerin tespit edilebilir olması,
- Analizlerin zaman alıcı olmaması ve hızlı bir şekilde yapılması,
- Ekipmanın kullanımı için detaylı bir eğitim gerekmemesi,
- Elde edilen spektrumların FTIR spektrumlarından daha az gürültülü olması,
- Elde edilen sonuçların hem kalitatif hem de kantitatif yorumlanabilmesidir.

1.13. ÇALIŞMANIN AMACI

Literatürde DB zehirlenmesi ile ilgili birçok klinik çalışmaya rastlanabilir fakat deneysel çalışma sayısı son derece azdır. DB ve GTX'in karaciğer üzerinde toksik etkileri olduğu bilinmesine rağmen, bu dokuda meydana getirdikleri yapısal ve fonksiyonel değişiklikler henüz moleküler düzeyde bilinmemektedir. Ayrıca, literatürde DB'nin faydalı etkilerini bildiren çalışmalar da mevcut olduğundan bu maddenin toksik dozunun belirlenmesi çok önemlidir.

Karaciğer lipit, protein ve karbonhidrat metabolizmasında görevli ana organdır ve vücut homeostazisinin korunmasında önemli roller üstlenmiştir. Ayrıca birçok ilaç, kimyasal ajan ve toksik maddenin detoksifikasyonu için temel organdır [83]. Beslenmedeki

değişiklikler sonucu karaciğer metabolizmasında meydana gelen herhangi bir değişikliğin, bu dokunun yapısında önemli değişikliklere sebep olduğu bilinmektedir [103]. Biyolojik bir dokunun fonksiyonunu doğru bir şekilde yerine getirmesi yapısı ile ilişkili olduğundan, dokunun yapısında meydana gelen herhangi bir değişiklik önemli fonksiyonel değişimlere sebep olabilir.

Dokularda meydana gelen yapısal değişiklikler ATR-FTIR spektrumlarının analiz edilmesiyle doğrudan belirlenebilmektedir [101]. Hücre düzeyindeki fonksiyonel bozukluklar hücre zarı, iyon kanalları, reseptörler, organeller ve moleküllerin yapısal ve regülatör bozuklukları ve bunların birbirleriyle etkileşimleri sonucu ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla DB ve GTX-III'ün karaciğer dokusunun yapısı ve moleküler içeriğinde meydana getirdiği moleküler değişikliklerin belirlenmesi son derece önemlidir.

Zehirlenmeye sebep olan DB miktarı tam olarak bilinmemekle birlikte, zehirlenme belirtilerinin genel olarak bir çay kaşığı bal (yaklaşık 50 mg/kg) tüketiminden sonra ortaya çıktığı rapor edilmiştir [33]. Semptomlar bal tüketiminden sonraki ilk 3 saat içinde ortaya çıkmakta, en kötü belirti ve bulgular en az 24 saat sürmektedir. Henüz semptomların tam olarak ne kadar sürdüğü bilinmemekle birlikte, tam iyileşmenin birkaç gün içinde gerçekleştiği tahmin edilmektedir [14], [19]. Literatürde DB zehirlenmesindeki semptomların süresi hakkında ayrıntılı bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle, DB zehirlenme etkileri ve DB tanısı alan hastaların hastanede ne kadar süre gözlem altında tutulması gerektiğine dair tam bir fikir birliği sağlanamamıştır. DB zehirlenmesi mortalitesi düşük bir klinik durum olsa da doğru tedavi edilmeyen hastalarda mortalite riski artabilir. Bu nedenle, zehirlenme etkilerinin ne kadar sürdüğünün bilinmesi hastaların hızlı ve doğru tedavi edilebilmeleri ve ne kadar süre gözlem altında tutulmaları gerektiğine karar verilmesi açısından önemlidir.

Bu çalışmanın birinci bölümünde, DB'nin karaciğer için toksik olan dozunun ve bu dozun karaciğer dokusunda meydana getirdiği etkilerin moleküler düzeyde belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, farklı konsantrasyonlardaki DB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX'lerin en toksik tipi olan GTX-III'ün saf halinin karaciğer üzerindeki etkileri, DB uygulamasından 24 saat sonra ATR-FTIR spektroskopisi tekniği kullanılarak incelenmiştir. Birinci bölümde karaciğer için toksik olan doz belirlendikten sonra, ikinci bölümde toksik doz DB (75 mg/kg) ve GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra çıkarılan karaciğer dokuları gene aynı teknikle incelenmiştir. Çalışmamızın ikinci bölümünde, DB ve GTX-III uygulamasının karaciğer dokusundaki biyomoleküller

üzerinde 24 ve 48 saatlik süreler sonunda oluşturduğu etkiler karşılaştırılarak, toksik etkilerin 48 saat içinde normale dönüp dönmediğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu nedenle, biyolojik sistemi oluşturan makromolekülleri aynı anda, hassas ve çok hızlı bir şekilde incelemeye olanak sağlayan, ATR-FTIR spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmada; DB ve GTX-III'ün karaciğer dokusundaki biyomoleküllerin miktarları, yapıları ve fonksiyonları üzerinde, karaciğeri oluşturan hücrelerin zar akışkanlığı ve düzeninde, lipit peroksidasyon düzeyinde ve protein ikincil yapılarında meydana getirdiği değişimlerin doza ve zamana bağlı olarak araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca DB ve GTX-III'ün karaciğer hücrelerindeki lipit ve protein gibi değişik makromoleküllerin birbirlerine göre konsantrasyon oranları (lipit/protein, doymuş lipit/doymamış lipit oranı gibi) ile bu parametrelerde meydana gelen değişimlerin gösterilmesi de amaçlanmıştır. Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız DB'nin karaciğer üzerindeki etkilerini doza ve zamana bağlı olarak moleküler düzeyde ortaya koyan ilk çalışmadır.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. SARF MALZEMELER

Çalışmamızda kullanılan DB; Düzceli arıcılardan temin edilmiştir. GTX-III (Lot-H1 293B) Enzo Life Science firmasından satın alınmıştır.

2.2. DELİ BAL VE GTX-III

Kullandığımız DB'nin palinolojik analizi, uluslararası arıcılık otoriteleri tarafından geliştirilip kabul edilen bir yöntem modifiye edilerek, Düzce Üniversitesi Arıcılık Araştırma Geliştirme ve Uygulama Merkezi'nde (DAGEM) yapılmıştır [104], [105]. Yapılan bu analiz sonucunda, dominant olarak ($\geq\%96$) Ericaceae familyasına ait olan *Rhododendron ponticum* poleni içermesi nedeniyle numunemizin DB olduğu teyit edilmiştir.

Kullandığımız DB'nin içerdiği toksik madde miktarını belirlemek için, Sıvı Kromatografisi-Kütle/Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemi kullanılmıştır [106]. Analiz sonucuna göre numunemizdeki GTX-I miktarı 32 $\mu\text{g/g}$, GTX-III miktarı 8 $\mu\text{g/g}$ olarak belirlenmiştir. Numunemizde tespit ettiğimiz bu miktarlar daha önceki çalışmalarda rapor edilen ortalama toksik madde miktarlarından daha yüksektir. Örneğin, Kaplan ve ark. (2014) kullandığı DB içindeki GTX-I miktarını 13,36, GTX-III miktarını 5.95 $\mu\text{g/g}$ olarak [106], Kurtoğlu ve ark. (2014) GTX-I miktarını 20.14 $\mu\text{g/g}$, GTX-III miktarını 8.20 $\mu\text{g/g}$ olarak bildirmişlerdir [107]. Ayrıca bizim kullandığımız balda tespit edilen GTX-I ve III miktarları daha önceki deneysel çalışmalarda kullanılmış olan DB'lerin içinde tespit edilmiş olan toksik madde miktarı ile paralellik göstermektedir [69], [108], [109].

2.3. HAYVANLAR

Deney protokolü, Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (2017/2/4). Çalışmada kullandığımız *Mus musculus* türü erkek fareler (8-12 haftalık, 20-25 g), 12:12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsünde, 22 ± 2 °C'lik bir

sıcaklıkta tutulmuş, standart fare diyeti ve suyla beslenmiştir. 6 adet fare içeren 10 farklı deney grubu oluşturulmuştur.

2.3.1. DB ve GTX-III'ün Karaciğer Dokusu Üzerindeki Doza Bağlı Etkileri

DB'nin toksik doz alt sınırının 50 mg/kg olduğu bilinmektedir [110]. Çalışmamızın birinci bölümünde, DB'nin karaciğer dokusu üzerindeki etkilerini doza bağlı olarak araştırmak amacıyla farelere verilmek üzere bu toksik doz, bu dozun %50 azaltılmış konsantrasyonu olan 25 mg/kg ve %50 artırılmış konsantrasyonu olan 75 mg/kg seçilmiştir. Ayrıca bir grup hayvana GTX-III'ün saf hali verilmiştir. DB'nin distile suda çözülmesiyle hazırlanan solüsyon, farelere gram başına 0,01 ml gelecek şekilde alınarak tek doz olarak gavaj yoluyla uygulanmıştır. GTX-III'ün ise LD₅₀ dozunun (0,908 mg/kg) yaklaşık olarak onda biri oranındaki konsantrasyonu olan 0,01 mg/kg'lık dozu intraperitoneal (ip) yolla uygulanmıştır [108]. Buna göre çalışmanın birinci bölümü için 5 deney grubu oluşturulmuştur:

Grup I = Kontrol (distile su)

Grup II = 25 mg/kg DB (gavaj)

Grup III = 50 mg/kg DB (gavaj)

Grup IV = 75 mg/kg DB (gavaj)

Grup V = 0, 01 mg/kg GTX-III (ip)

DB ve GTX-III'ün fare karaciğerinde ne gibi değişiklikler meydana getirdiğini tespit etmek için, uygulamadan 24 saat sonra hayvanlar dekapite edilerek karaciğer dokuları çıkarılmış ve spektroskopik ölçümlerde kullanılabilecek kadar -80 °C'ta saklanmıştır.

2.3.2. DB ve GTX-III'ün Karaciğer Dokusu Üzerindeki Zamana Bağlı Etkileri

Çalışmamızın birinci bölümünde fare karaciğeri için toksik dozun 75 mg/kg'lık doz olduğu belirlendikten sonra, ikinci bölümde bu toksik dozun ve saf haldeki GTX-III'ün zararlı etkilerinin 48 saatte iyileşip iyileşmediği test edilmiştir. Bu amaçla çalışmanın ikinci bölümü için 5 yeni deney grubu oluşturulmuştur:

Grup I = Kontrol (distile su)

Grup II = 75 mg/kg DB (gavaj; uygulamadan 24 saat sonra dekapitasyon)

Grup III = 75 mg/kg DB (gavaj; uygulamadan 48 saat sonra dekapitasyon)

Grup IV = 0, 01 mg/kg GTX-III (ip; uygulamadan 24 saat sonra dekapitasyon)

Grup V = 0, 01 mg/kg GTX-III (ip; uygulamadan 24 saat sonra dekapitasyon)

75 mg/kg DB ve GTX-III verilmiş fareler uygulamadan 24 ve 48 saat sonra dekapite edilerek karaciğer dokuları çıkarılmış ve spektroskopik ölçümlerde kullanılana kadar -80 °C'ta saklanmıştır.

2.4. SPEKTROSKOPİ DENEYLERİ

Fare karaciğer örneklerinin ATR-FTIR spektrumları, ATR aksesuarı takılmış Spectrum Two FTIR spektrometresi (Perkin-Elmer Ltd., Beaconsfield, UK) kullanılarak elde edilmiştir. Fare karaciğerinin üç farklı bölgesinden (sol lateral, sağ lateral ve sağ medial lob) 0,5 X 0,5 X 0,1 cm büyüklüğünde örnekler kesilmiş ve bu parçalar doğrudan ATR ünitesinin elmas/çinko-selenit (Diamond/ZnSe) kristalinin üzerine yerleştirilmiştir. Suyu ortamdaki uzaklaştırmak için, kristalin üzerindeki karaciğer dokusuna 5 dakikalık süre boyunca azot gazı uygulanmış ve düzgün bir yüzey teması sağlanması için doku sıkıştırılmıştır [111], [112]. Spektrumlar oda sıcaklığında, 4000-400 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında, 4 cm⁻¹ çözünürlükte ve 64 tarama sayısı ile elde edilmiştir. Sonuçların güvenilirliğini arttırmak için her karaciğerin birbirine komşu 3 bölgesinden çekimler yapılmıştır. Dolayısıyla her bir karaciğer için toplam 9 farklı spektrum elde edilmiştir. Bu spektrumların ortalamaları alınarak detaylı analizlerde ve istatistiksel analizlerde bu ortalamalar kullanılmıştır.

Atmosferdeki CO₂ ve H₂O'dan kaynaklı soğurma bantlarının, örneğin soğurma bantlarını kamufle etmemesi için aynı şartlarda background (arka plan) spektrumu alınmıştır. Background çekimi her örnek çekimi öncesi yapılmıştır. Elde edilen bu background spektrumu örnek spektrumundan bilgisayar programı aracılığıyla çıkarılmaktadır. Bu sayede spektrumda meydana gelebilecek gürültüler büyük oranda elimine edilmektedir.

2.5. ATR-FTIR SPEKTROSKOPİSİ ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN SPEKTRUM ANALİZ YÖNTEMLERİ

Çalışmamızda fare karaciğer dokusuna ait spektrumlardaki bantların altında kalan alanlar, bu alanların birbirine oranları, bant genişlikleri ve dalga sayılarındaki

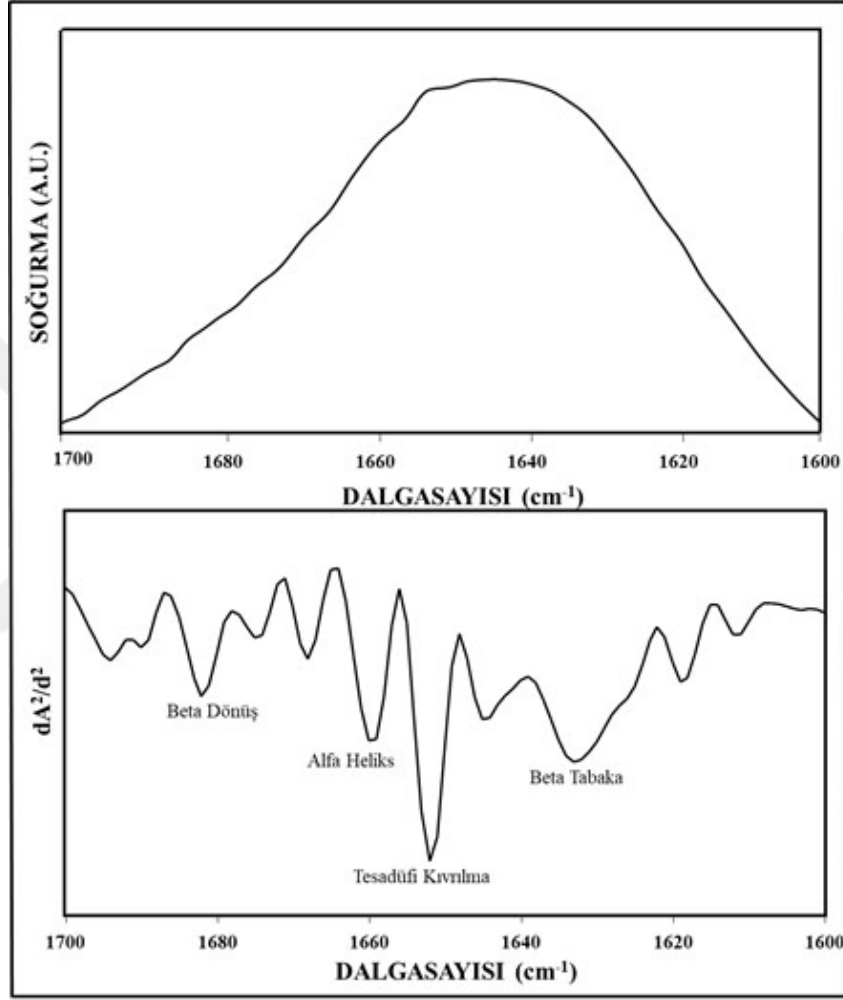
değişimler analiz edilmiştir. Bu analizlerde normalize edilmemiş ham ortalama spektrumlar kullanılmıştır. Bant alanı, bant alan oranları, bant dalga sayısı ve bant genişlikleri Spectrum 100 yazılımı (Perkin Elmer) kullanılarak ölçülmüştür. Bant genişliği ve bant dalga sayısı değerleri, bantın %75 yüksekliğinden okunmuştur. Spektral değişimlerin görsel gösterimi için ise ortalaması alınmış spektrumların baseline düzeltilmesi yapıp normalize edilmiştir. Çizelge 2.1 bant alanları hesaplanırken kullanılan spektral bölgeleri ve baseline noktalarını göstermektedir.



Çizelge 2.1. Fare karaciğeri spektrumundaki bantlar için kullanılan bölgeler ve baseline noktaları.

Kızılötesi Soğurma Bandı	Kullanılan Spektral Bölge	Baseline Noktaları
Amid A (3283 cm^{-1})	3785-3025 cm^{-1}	3790-2800 cm^{-1}
Olefinik (HC=CH) (3012 cm^{-1})	3024-2998 cm^{-1}	3024-2840 cm^{-1}
CH ₃ antisimetrik gerilim (2961 cm^{-1})	2990-2947 cm^{-1}	2990-2840 cm^{-1}
CH ₂ antisimetrik gerilim (2927 cm^{-1})	2947-2880 cm^{-1}	2990-2840 cm^{-1}
CH ₃ simetrik gerilim (2874 cm^{-1})	2880-2864 cm^{-1}	2990-2840 cm^{-1}
CH ₂ simetrik gerilim (2854 cm^{-1})	2864-2840 cm^{-1}	2990-2840 cm^{-1}
Karbonil (C=O) gerilim (1743 cm^{-1})	1775-1720 cm^{-1}	1800-900 cm^{-1}
Amid I (1640 cm^{-1})	1720-1584 cm^{-1}	1800-900 cm^{-1}
Amid II (1545 cm^{-1})	1584-1481 cm^{-1}	1800-900 cm^{-1}
CH ₂ bükülme (1453 cm^{-1})	1481-1430 cm^{-1}	1800-900 cm^{-1}
COO- simetrik gerilim (1398 cm^{-1})	1430-1363 cm^{-1}	1800-900 cm^{-1}
Amid III (1308 cm^{-1})	1330-1275 cm^{-1}	1800-900 cm^{-1}
PO ₂ antisimetrik gerilme (1237 cm^{-1})	1275-1183 cm^{-1}	1800-900 cm^{-1}
PO ₂ simetrik gerilme (1081 cm^{-1})	1137-1066 cm^{-1}	1800-900 cm^{-1}
C-O gerilme (1041 cm^{-1})	1066-979 cm^{-1}	1800-900 cm^{-1}
C-N ⁺ -C gerilme (972 cm^{-1})	979-952 cm^{-1}	1800-900 cm^{-1}

Protein ikincil yapısındaki değişimleri belirlemek için 1700-1600 cm^{-1} aralığında bulunan Amid I bantı kullanılmıştır. Ayrışmamış bantlardan oluşan Amid I bantına ikincil türev vektör normalizasyon yöntemi uygulanarak protein ikincil yapı değişimleri belirlenmiştir. Analizler OPUS^{NT} yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Bruker Optics, Reinstetten, Germany). Şekil 2.1. Fare karaciğer dokusunun Amid I bantı ve bu bantın ikincil türev spektrumu.



Şekil 2.1. Fare karaciğer dokusunun Amid I bantı ve bu bantın ikincil türev spektrumu.

2.6. İSTATİKSEL ANALİZ

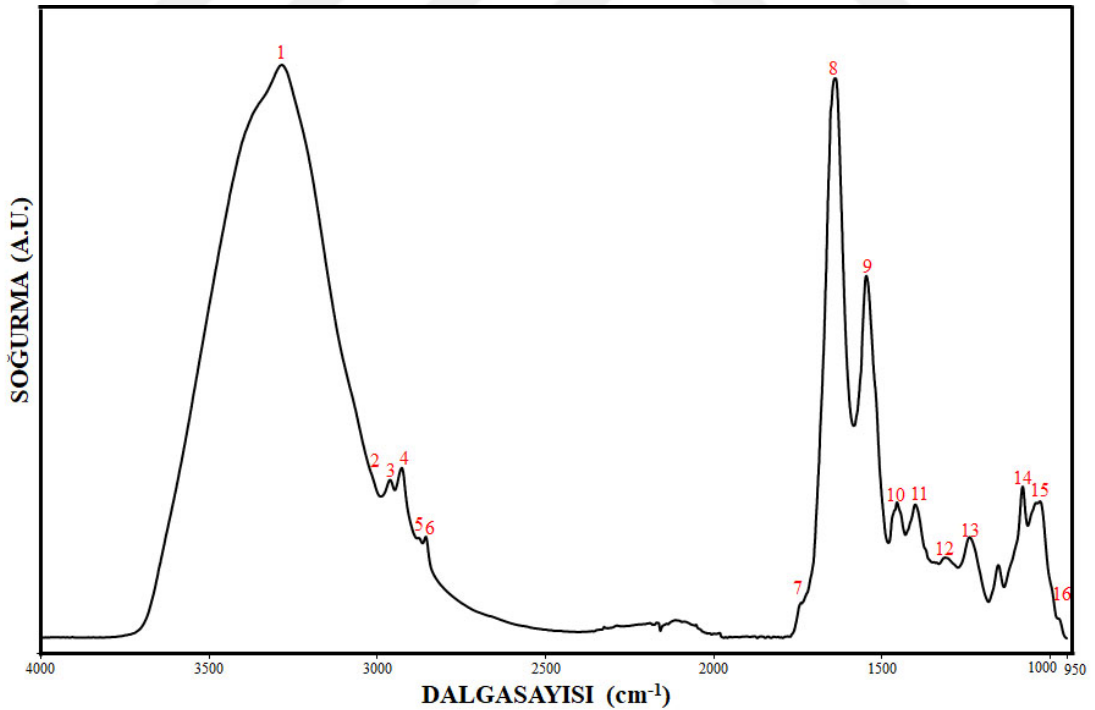
Doza ve zamana bağlı DB ve GTX-III uygulanan gruplar ile kontrol grupları arasındaki değişimlerin istatistiksel olarak anlamlılığının hesaplanması için Mann Whitney-U testi kullanılmıştır. Sonuçlar "ortalama \pm standart sapma" olarak verilmiştir. p değeri 0,05'ten küçük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş, anlamlılık derecesi * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ olarak belirtilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. BULGULAR

3.1.1. Fare Karaciğeri Spektrumundaki Bantların Tanımlanması

ATR-FTIR spektroskopisi biyomoleküllerin içindeki fonksiyonel gruplara ait soğurma bantlarını görüntüleyerek dokunun moleküler yapısı hakkında bilgiler elde edilmesini sağlayan özel bir tekniktir. Karaciğer spektrumu, proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar ve lipitlerdeki fonksiyonel gruplardan kaynaklanan birçok karakteristik soğurma bantı içeren karmaşık bir spektrumdur. Spektrumdaki her bir bant belirli bir bağ ya da bağ grubuna atfedilmektedir [113]. Şekil 3.1’de kontrol grubuna ait bir fare karaciğeri spektrumunun 4000-950 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki ATR-FTIR spektrumu gösterilmektedir. Şekilde başlıca soğurma bantları numaralandırılmış ve bu bantların literatüre göre tanımları Çizelge 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1. Kontrol grubuna ait bir fare karaciğeri spektrumunun 4000-950 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki ATR-FTIR spektrumu.

Çizelge 3.1. Fare karaciğer dokusunun infrared spektrumundaki başlıca soğurma bantları [110], [114]–[116].

BANT NO #	DALGA SAYISI (cm ⁻¹)	TANIM
1	3283	Amid A: Çoğunlukla proteinlerin N-H gerilmesi, polisakkaritlerin O-H gerilmesi ve moleküller arası H bağlanması
2	3012	Olefinik HC=CH titreşim gerilme: Doymamış lipitler
3	2961	CH₃ antisimetrik gerilme: Lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler
4	2927	CH₂ antisimetrik gerilme: Çoğunlukla lipitler, az miktarda proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler
5	2874	CH₃ simetrik gerilme: Çoğunlukla proteinler, az miktarda lipitler, karbonhidratlar ve nükleik asitler
6	2854	CH₂ antisimetrik gerilme: Çoğunlukla lipitler, az miktarda proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler
7	1743	Karbonil ester (C=O) gerilme: Çoğunlukla Trigliseritler ve kolesterol esterlerde ester fonksiyonel gruplar
8	1640	Amid I: Proteinlerin C=O gerilmesi(80 %)
9	1545	Amid II: Proteinler (60% N-H bending, 40% C-N stretching)
10	1453	CH₂ bükülme: Çoğunlukla lipitler, az miktar proteinler
11	1398	COO⁻ simetrik gerilme: Yağ asitleri ve amino asit yan grupları
12	1308	Amid III: Proteinler (40%C-N gerilme, 30% N-H bükülme, 20% C-C gerilme)
13	1237	PO₂ antisimetrik gerilme: Çoğunlukla nükleik asitler ve az miktar fosfolipitler
14	1081	PO₂⁻ simetrik gerilme: Nükleik asitler ve fosfolipitler C—O gerilme: Polisakkaritler, glikolipitler
15	1041	C—O gerilme: Polisakkaritler, glikolipitler
16	971	C-N⁺-C gerilme: Nükleik asitler, RNA'nın riboz-fosfat ana zincir titreşimleri

Şekilde 3283 cm⁻¹ dalga sayısında bulunan ve Amid A bantı olarak isimlendirilen bant (#1), proteinlerdeki N-H titreşimlerinden, polisakkaritler ve sudaki O-H gerilme titreşimlerinden ve moleküller arası H bağlanmasından kaynaklanmaktadır [117]. 3025-2800 cm⁻¹ dalga sayısı aralığındaki C-H gerilme bölgesi olarak adlandırılan bölgede bulunan bantlar dokuların lipid içeriği hakkında bilgi vermektedir. 3012 cm⁻¹ dalga sayısında (#2) görülen bant olefinik=C-H gruplarındaki C-H gerilme titreşimlerinden sinyal aldığı için sistemin doymamış lipid miktarı hakkında bilgi verir [118]. 2961 cm⁻¹ (#3) ve 2927 cm⁻¹ (#4)'de meydana gelen bantlar CH₃ ve CH₂ antisimetrik gerilme

titreşimlerinden, 2874 cm^{-1} (#5) ve 2854 cm^{-1} (#6) dalga sayılarındaki bantlar ise CH_3 ve CH_2 gruplarının simetrik gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. CH_3 antisimetrik, CH_2 antisimetrik ve CH_2 simetrik bantları doymuş lipitlerden sinyal alırken, CH_3 simetrik bantı ağırlıklı olarak proteinlerden sinyaller almaktadır [110]. 1800-950 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki bölge kolesterol esterleri, trigliseritler, proteinler, nükleik asitler, vb. birçok molekülden kaynaklanan farklı spektral bantlar içermektedir. Parmak izi bölgesi olarak adlandırılan bu bölgede 1743 cm^{-1} dalga sayısında bulunan karbonil ester gerilme bantı (#7), çoğunlukla trigliserit ve kolesterol esterlerinden kaynaklanmaktadır [119]. 1640, 1545 ve 1308 cm^{-1} dalga sayısında gözlemlenen amid I (#8), amid II (#9) ve amid III (#12) bantları proteinlerden sinyal alan bantlardır. CH_2 bükülme bantı (#10) olarak isimlendirilen 1453 cm^{-1} dalga sayısında bulunan bant çoğunlukla lipit ve az miktarda proteinlerdeki CH_2 titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 1398 cm^{-1} 'de görülen COO^- simetrik gerilme bantı (#11) sistemdeki yağ asitleri ve aminoasitlerden sinyal alan bir banttır. Bu nedenle CH_2 bükülme bantı gibi sistemdeki lipit ve proteinlerle ilgili bilgi elde etmemize yardımcı olmaktadır. Şekildeki spektrumunun 1300-900 cm^{-1} dalga sayısı aralığında gördüğümüz bantlar ise daha çok nükleik asit, fosfolipit ve karbonhidratlar gibi moleküllerde meydana gelen titreşimlerden kaynaklanmaktadır. 1237 ve 1081 cm^{-1} 'de ortaya çıkan PO_2^- antisimetrik (#13) ve PO_2^- simetrik bantları (#14), çoğunlukla nükleik asitler ve fosfolipitlerdeki fosfat gruplarından kaynaklanmaktadır [99]. Bu nedenle bu bantlar sistemdeki nükleik asit ve membranlarda bulunan fosfolipitler hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca 1081 cm^{-1} 'de bulunan PO_2^- simetrik gerilme titreşim bantı (#14), glikojen içindeki C-O gerilme titreşimlerinden de sinyal almaktadır. Benzer şekilde 1041 cm^{-1} 'deki bantta (#15) glikojen içindeki C-O gerilme titreşimlerinden kaynaklanır. C-O gerilme bantı adı verilen bu bant esas olarak glikojenden sinyal aldığı için ana glikojen bantı olarak bilinir [99]. Şekilde 971 cm^{-1} dalga sayısında ortaya çıkan C-N⁺-C gerilme bantı (#16) nükleik asitlerden sinyal alan bir banttır.

3.1.2. DB ve GTX-III'ün Karaciğer Dokusu Üzerindeki Doza Bağlı Etkileri

Çalışmamızın ilk bölümünde DB'nin doza bağlı etkilerini araştırmak amacıyla 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış fare karaciğerleri uygulamadan 24 saat sonra incelenmiştir. ATR-FTIR spektrumunda bantların altında kalan alan ve/veya sinyal şiddetleri o fonksiyonel gruba ait molekülün dokudaki miktarı hakkında bilgi vermektedir [99]. Tablo 2'de kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış

farelerin karaciğer dokularının kızılötesi bantlarının alan değerlerinde meydana gelen değişiklikler gösterilmektedir.

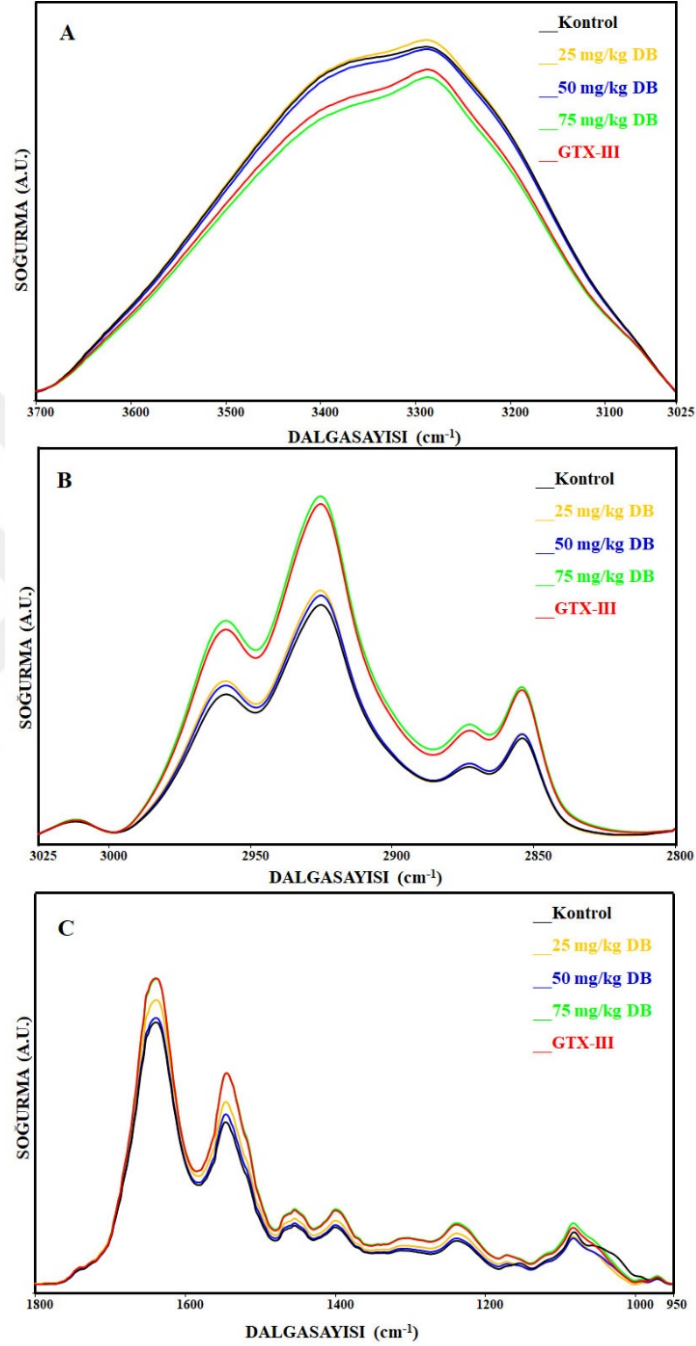
Çizelge 3.2. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış farelerin karaciğer dokularının kızılötesi bantlarının alan değerlerinde meydana gelen değişiklikler.

(Değerler, ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ şeklinde gösterilmiştir).

Bant No	Kontrol	25 mg/kg DB	50 mg/kg DB	75 mg/kg DB	GTX-III
1	90.675 \pm 2.120	91.546 \pm 2.886	89.528 \pm 2.839	86.473 \pm 2.803*	87.461 \pm 1.564*
2	0.0218 \pm 0.001	0.0216 \pm 0.001	0.0220 \pm 0.003	0.0203 \pm 0.003	0.0221 \pm 0.002
3	0.326 \pm 0.035	0.333 \pm 0.030	0.321 \pm 0.031	0.396 \pm 0.024*	0.383 \pm 0.028*
4	0.693 \pm 0.075	0.735 \pm 0.061	0.708 \pm 0.084	0.803 \pm 0.037*	0.791 \pm 0.062*
5	0.051 \pm 0.011	0.056 \pm 0.013	0.055 \pm 0.020	0.091 \pm 0.025**	0.085 \pm 0.012**
6	0.123 \pm 0.018	0.133 \pm 0.019	0.131 \pm 0.026	0.151 \pm 0.016*	0.150 \pm 0.012*
7	0.470 \pm 0.034	0.486 \pm 0.033	0.471 \pm 0.033	0.526 \pm 0.062	0.520 \pm 0.046
8	16.956 \pm 0.623	17.406 \pm 0.888	17.155 \pm 0.780	18.695 \pm 1.409*	18.523 \pm 1.115*
9	9.256 \pm 0.563	9.721 \pm 0.806	9.566 \pm 0.921	10.851 \pm 1.143*	10.575 \pm 1.306*
10	2.275 \pm 0.183	2.405 \pm 0.221	2.328 \pm 0.270	2.600 \pm 0.273*	2.566 \pm 0.117*
11	2.611 \pm 0.180	2.840 \pm 0.295	2.755 \pm 0.350	3.505 \pm 0.430**	3.381 \pm 0.236**
12	1.563 \pm 0.111	1.665 \pm 0.193	1.641 \pm 0.166	1.901 \pm 0.215*	1.926 \pm 0.241*
13	2.465 \pm 0.263	2.796 \pm 0.332	2.693 \pm 0.418	3.656 \pm 0.584**	3.513 \pm 0.314**
14	1.968 \pm 0.269	1.796 \pm 0.215*	1.845 \pm 0.324*	2.501 \pm 0.331	2.318 \pm 0.174
15	1.543 \pm 0.170	0.951 \pm 0.061*	1.136 \pm 0.297*	1.326 \pm 0.131*	1.266 \pm 0.155*
16	0.075 \pm 0.016	0.068 \pm 0.017	0.066 \pm 0.012	0.108 \pm 0.029	0.083 \pm 0.012

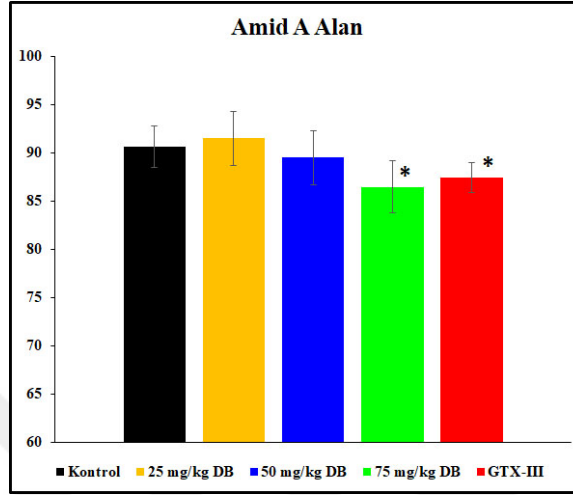
Şekil 3.1 ve Çizelge 3.1'den görüldüğü üzere fare karaciğer spektrumu birçok soğurma bantından oluşan karmaşık bir spektrumdur. Bu nedenle spektral analizler üç farklı dalga sayısı aralığında gerçekleştirilmiştir. Spektral analizlerde kullandığımız dalga

sayısı aralıkları; 3700-3025 cm^{-1} , 3025-2800 cm^{-1} (C-H gerilme bölgesi) ve 1800-950 cm^{-1} (parmak izi bölgesi) şeklindedir. Şekil 3.2; kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış fare karaciğeri dokularının ortalama ATR-FTIR spektrumlarının bu 3 bölgesini göstermektedir.



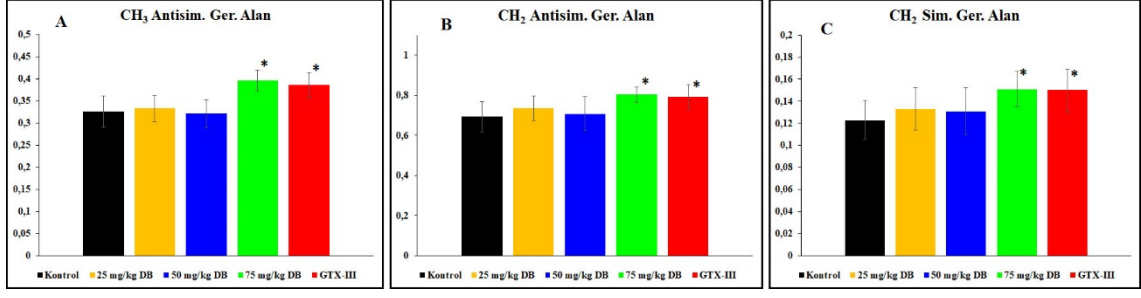
Şekil 3.2. a) 3700-3025, b) 3025-2800 ve c) 1800-950 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış farelerin karaciğer dokularının ortalama ATR-FTIR spektrumları. (Spektrumlar, Amid I bantına (a) ve Amid A bantına (b ve c) göre normalize edildi).

Şekil 3.3'te, Amid A bantının alan değerlerindeki değişimler bar diyagramı olarak verilmiştir. Şekil 3.2.a ve 3.3'ten görüldüğü üzere bu bantın altında kalan alan 25 ve 50 mg/kg DB uygulanmış gruplarda herhangi anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Ancak 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış gruplarda bantın altında kalan alan anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$).



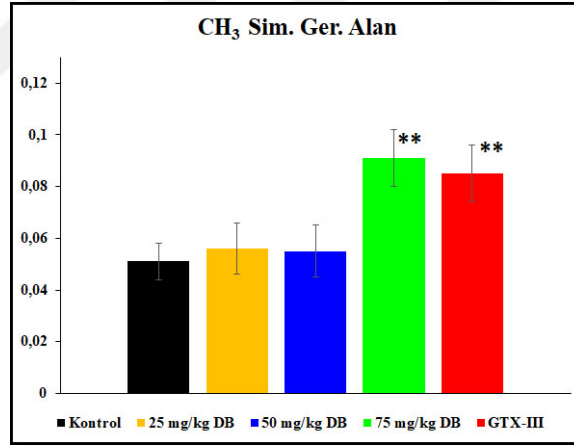
Şekil 3.3. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının Amid A bantı alan değerleri (* $p<0,05$).

Şekil 3.4'te doymuş lipidlerden kaynaklanan bantların (CH_3 antisimetrik, CH_2 antisimetrik ve CH_2 simetrik gerilme) altında kalan alan değerlerindeki değişimler bar diyagramı olarak verilmiştir. Bu şekillerden ve şekil 3.2.b'den görüldüğü üzere bu bantların altında kalan alan değerleri 25 ve 50 mg/kg DB uygulanan gruplarda herhangi bir anlamlı değişiklik göstermemiş fakat 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış gruplarda bantların altında kalan alan değerleri anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). Bu sonuç, 25 ve 50 mg/kg DB uygulaması sonucu fare karaciğerindeki doymuş lipid miktarında herhangi anlamlı bir değişim olmadığını fakat 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulaması sonucu doymuş lipid miktarında artma olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).



Şekil 3.4. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının a) CH₃ antisimetrik, b) CH₂ antisimetrik ve c) CH₂ simetrik bantları alan değerleri (*p<0.05).

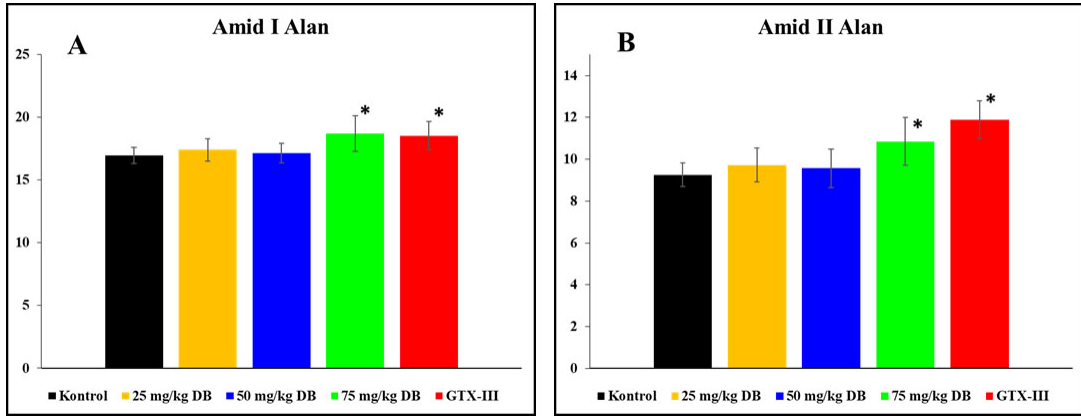
C-H gerilme bölgesinde bulunan fakat ağırlıklı olarak proteinlerden sinyal alan 2874 cm⁻¹ dalga sayısındaki CH₃ simetrik gerilme bantının altında kalan alan değerindeki değişimler bar diyagramı olarak Şekil 3.5'te verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış gruplarda bu bantın altında kalan alan anlamlı derecede artmış (p<0.01) fakat 25 ve 50 mg/kg DB uygulanmış gruplarda bu bantın alan değerinde herhangi bir anlamlı değişiklik meydana gelmemiştir. Bu sonuç, 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulaması sonrasında fare karaciğerinin protein miktarında artış olduğunu göstermektedir (p<0.01).



Şekil 3.5. Kontrol, 25,50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının CH₃ simetrik bantı alan değerleri (**p<0.01).

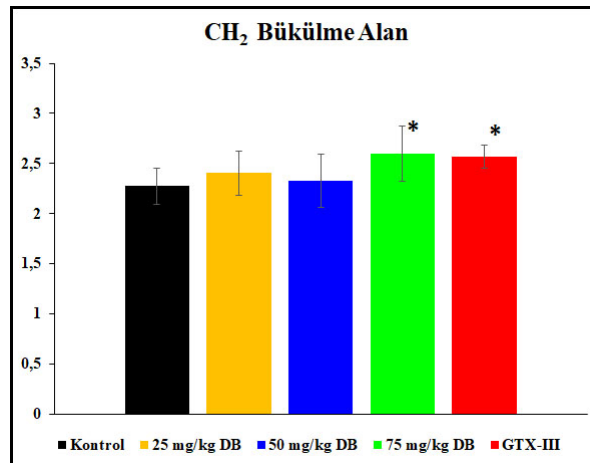
Çalışmamızda analiz edilen diğer bölge olan parmak izi bölgesindeki 1640 ve 1545 cm⁻¹'de gözlenen Amid I ve Amid II bantlarında meydana gelen değişimler protein içeriğindeki değişimler hakkında bilgi elde etmek için kullanılmaktadır [120]. Şekil 3.6'da bu iki bantın altında kalan alan değerlerindeki değişimler bar diyagramı olarak verilmiştir. Bu bar diyagramlarından görüldüğü üzere bu bantların altında kalan alan değerleri, 25 ve 50 mg/kg DB uygulanan gruplarda herhangi bir anlamlı değişiklik

göstermemiş ancak 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış gruplarda anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). Bu sonuç, 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış fare karaciğeri dokusunda protein miktarında artış olduğu anlamına gelmektedir.



Şekil 3.6. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının a) Amid I ve b) Amid II bantları alan değerleri ($*p<0.05$).

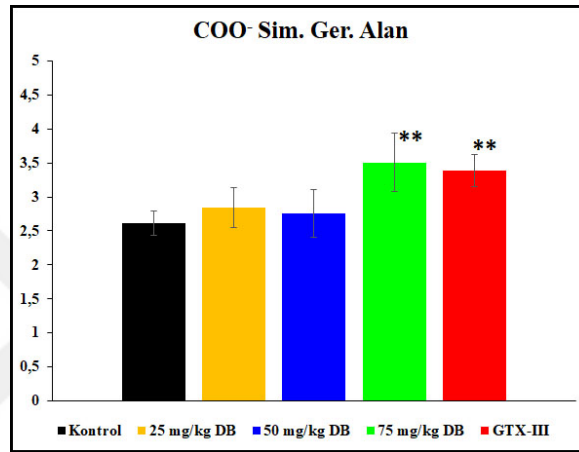
Şekil 3.7’de lipit ve proteinlerdeki CH_2 gruplarından sinyaller alan bir bant olan CH_2 bükülme bantının altında kalan alan değerlerindeki değişimler bar diyagramı olarak verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere bu bantın altında kalan alan 25 ve 50 mg/kg DB uygulanan gruplarda herhangi bir anlamlı değişiklik göstermemiş ancak 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış gruplarda anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$).



Şekil 3.7 Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının CH_2 bükülme bantı alan değerleri ($*p<0.05$).

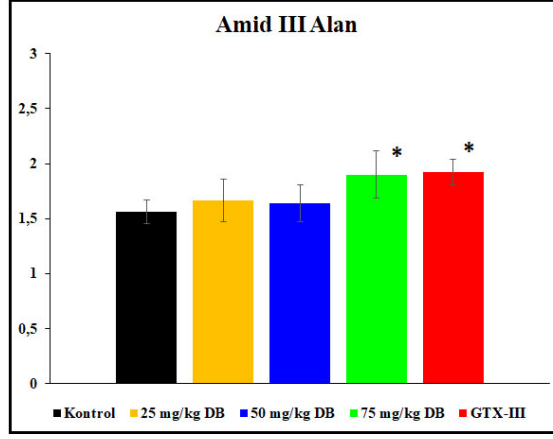
Parmak izi bölgesinde görülen bantlardan biri de 1398 cm^{-1} dalga sayısında ortaya çıkan COO^- simetrik gerilme bantıdır. Bu banta ait alan değerlerindeki değişiklikleri gösteren bar diyagramı Şekil 3.8’de verilmiştir. COO^- simetrik gerilme bantı yağ asitleri ve amino

asitlerden sinyaller almaktadır [121]. Şekil 3.8'den görüldüğü üzere bu bantın altında kalan alan değeri 25 ve 50 mg/kg DB uygulanmış gruplarda herhangi anlamlı değişiklik göstermemiştir. Aynı şekilde görüldüğü gibi 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış gruplarda bantın altında kalan alan anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). CH_2 bükülme ve COO^- simetrik gerilme bantı için elde ettiğimiz sonuçlar daha önceki lipid ve protein bantlarının alan analizlerinden elde edilmiş olan 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış grupların sistemdeki lipid ve protein miktarında artmalara sebep olduğu sonucunu desteklemektedir.



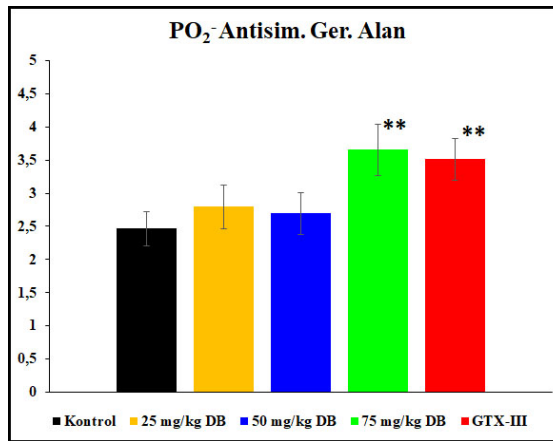
Şekil 3.8. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının COO^- simetrik gerilme bantı alan değerleri (** $p<0.01$).

Amid III bantı parmak izi bölgesinde 1308 cm^{-1} dalga sayısında ortaya çıkan protein kaynaklı banttir. Amid III bantı %40 oranında C-N gerilme %30 oranında N-H bükülme ve %20 oranında da C-C gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır [115]. Bu bantın alan değerlerindeki değişimlerin bar diyagramı Şekil 3.9'da verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere bu bantın altında kalan alan değeri 25 ve 50 mg/kg DB uygulanan gruplarda herhangi anlamlı bir değişiklik göstermemiş fakat 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış gruplarda anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). Bu sonuç, 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulaması sonucu fare karaciğer dokusundaki protein miktarının arttığı bulgusunu desteklemektedir.



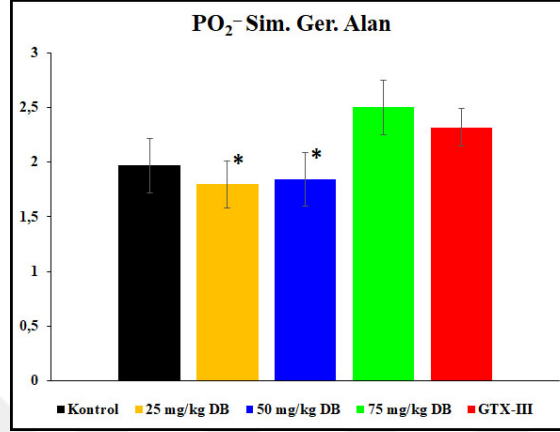
Şekil 3.9 Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının Amid III bantı alan değerleri (* $p < 0.05$).

1237 ve 1081 cm^{-1} 'de ortaya çıkan PO_2^- antisimetrik ve simetrik gerilme bantları nükleik asitler ve fosfolipitler gibi fosfat içeren bileşiklerden sinyaller almaktadır. Fosfat simetrik gerilme bantının glikojen bantları tarafından maskelendiği ancak fosfat antisimetrik bantının fosfolipitlerden ziyade nükleik asitlerden kaynaklandığı bilinmektedir [117]. Bu nedenle çalışmamızda nükleik asitlerin konsantrasyon yapı ve konformasyon değişimleri hakkında bilgi sahibi olabilmek için fosfat antisimetrik bantı kullanılmıştır. Şekil 3.10'da PO_2^- antisimetrik bantının alan değerindeki değişimler bar diyagramı olarak verilmiştir. Bu şekilden görüldüğü üzere PO_2^- antisimetrik gerilme bantının altında kalan alan değeri 25 ve 50 mg/kg DB uygulanmış gruplarda herhangi anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış gruplarda bu bantın altında kalan alan anlamlı derecede artmıştır ($p < 0.01$). Bu artış nükleik asit miktarlarında meydana gelen artışları göstermektedir.



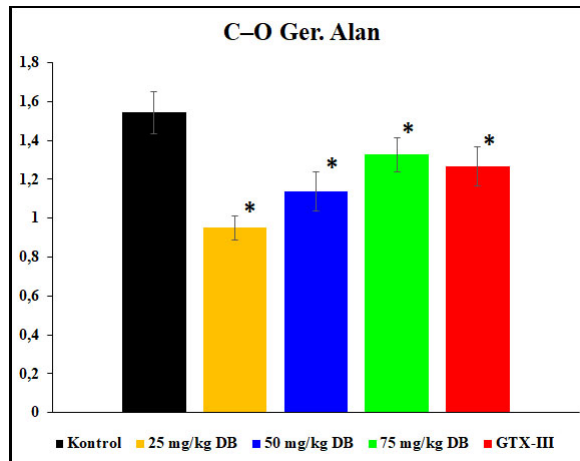
Şekil 3.10. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının PO_2^- antisimetrik gerilme bantı alan değerleri (** $p < 0.01$).

Şekil 3.11’de glikojen tarafından maskelenebilen 1081 cm⁻¹’deki PO₂⁻ simetrik bantının alan değerlerindeki değişimler bar diyagramı olarak verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere bu bantın altında kalan alan değeri 25 ve 50 mg/kg DB uygulanan gruplarda anlamlı derecede azalmış (p<0.05) fakat 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış grupların alan değerlerinde anlamlı herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.



Şekil 3.11. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının PO₂⁻ simetrik gerilme bantı alan değerleri (**p<0.01).

1041 cm⁻¹’de ortaya çıkan ve ana glikojen bandı olan C-O gerilme bantının alan değerlerindeki değişimler bar diyagramı olarak Şekil 3.12’de verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere bu bantın altında kalan alan değeri 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış bütün uygulama gruplarında anlamlı derecede azalmıştır (p<0.05).



Şekil 3.12. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının C-O gerilme bantı alan değerleri (*p<0,05).

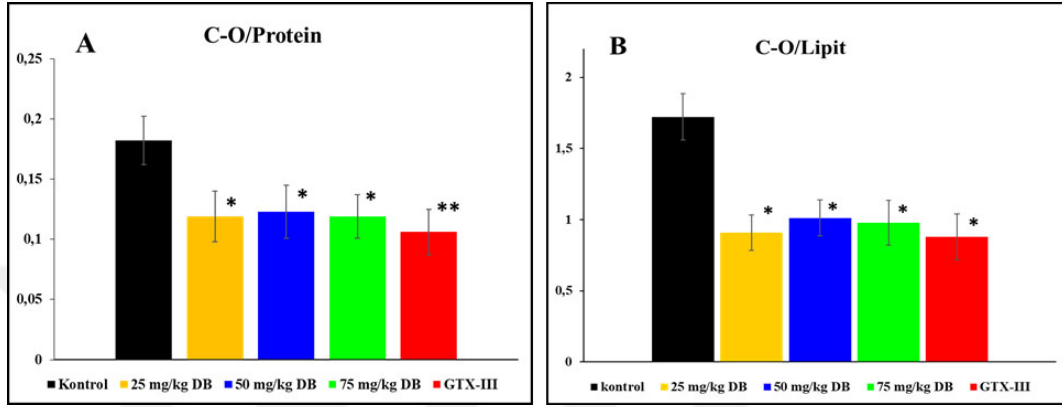
Spektral analizlerde bant alanı analizlerine ek olarak, bazı spesifik kızılötesi bantların alan oranları da kullanılmaktadır [118]. Alan oranlarının analizi, örnek miktarı gibi deney koşullarındaki farklılıklardan kaynaklanabilen hataları ortadan kaldırabileceğinden, FTIR spektroskopisi çalışmalarında büyük öneme sahiptir. Bu çalışmada kullanılan bant alanı oranları, bu oranları hesaplamak için kullanılan ilgili fonksiyonel gruplar ve oranın dokudaki hangi parametreyle ilgili bilgi verdiği (işlevi) Çizelge 3.3'te verilmiştir.



Çizelge 3.3. Bant alan oranları, bu oranları hesaplamak için kullanılan ilgili fonksiyonel gruplar ve oranın işlevi [110], [114]–[116].

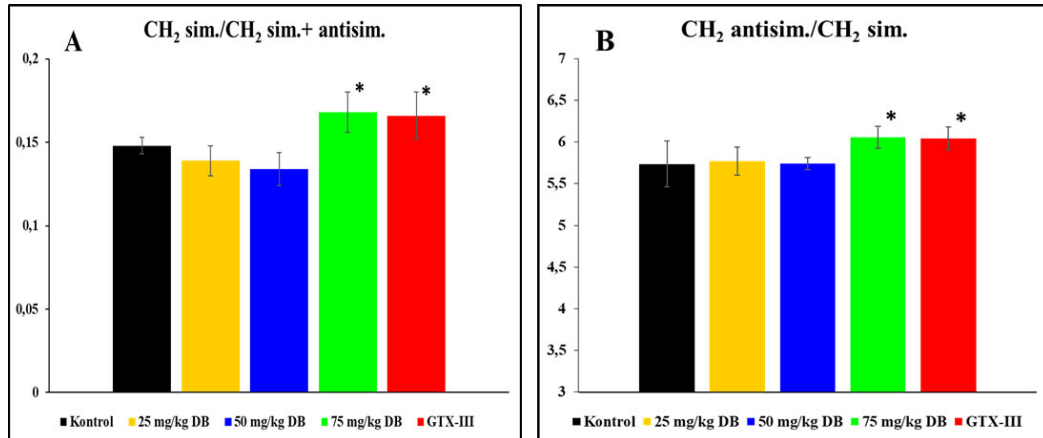
Bant Alan Oran	Fonksiyonel Gruplar	İşlevi
C-O/Protein	C-O gerilme (# 15)/Amid II (# 9)	Sistemdeki glikojen konsantrasyonu
C-O/Lipit	C-O gerilme (# 15)/CH ₃ antisimetrik ger. (# 3) + CH ₂ antisimetrik ger. (# 4) + CH ₂ simetrik ger. (# 6)	
CH ₂ sim./CH ₂ sim.+ antisim.	CH ₂ simetrik ger. (# 6) / CH ₂ simetrik ger. (# 6) + CH ₂ antisimetrik ger. (# 4)	Sistemdeki doymuş lipit konsantrasyonu
CH ₂ antisim./CH ₂ sim.	CH ₂ antisimetrik ger. (# 4)/CH ₂ simetrik ger. (# 6)	
Doymamış/Doymuş Lipit	Olefinic=CH gerilme (# 2)/ CH ₃ antisimetrik ger. (# 3) + CH ₂ antisimetrik ger. (# 4) + CH ₂ simetrik ger. (# 6)	Sistemin doymamışlık seviyesi
CH ₂ /Lipit	CH ₂ antisimetrik ger. (# 4)/ CH ₃ antisimetrik ger. (# 3) + CH ₂ antisimetrik ger. (# 4) + CH ₂ simetrik ger. (# 6)	Lipitlerin zincir uzunluğu
Karbonil/Lipit	Karbonil ester gerilme (# 7)/ CH ₃ antisimetrik ger. (# 3) + CH ₂ antisimetrik ger. (# 4) + CH ₂ simetrik ger. (# 6)	Sistemin karbonil durumu
CH ₃ /Lipit	CH ₃ antisimetrik ger. (# 3) / CH ₃ antisimetrik ger. (# 3) + CH ₂ antisimetrik ger. (# 4) + CH ₂ simetrik ger. (# 6)	Sistemdeki metil konsantrasyonu
Amid I/Amid I + II	Amid I (# 8)/Amid I (# 8) + Amid II (# 9)	Sistemdeki protein konsantrasyonu
Amid I/Amid II	Amid I (# 8)/Amid II (# 9)	Protein yapısındaki değişiklikler
Nükleik asit/Lipit	PO ₂ antisimetrik ger (# 13) / CH ₃ antisimetrik ger. (# 3) + CH ₂ antisimetrik ger. (# 4) + CH ₂ simetrik ger. (# 6)	Sistemdeki nükleik asit konsantrasyonu
Nükleik asit/Protein	PO ₂ antisimetrik ger. (# 13)/Amid II (# 9)	

Sistemdeki glikojen miktarındaki değişiklikleri analiz etmek için kullandığımız oran değerlerinde meydana gelen değişimler Şekil 3.13'te bar diyagramı olarak verilmiştir. Bu oran değerleri 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanan grupların hepsinde anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). Bu sonuç, DB'nin bütün dozları ve GTX-III uygulamalarından sonra fare karaciğer dokularında glikojen konsantrasyonunun azaldığı sonucunu desteklemektedir.



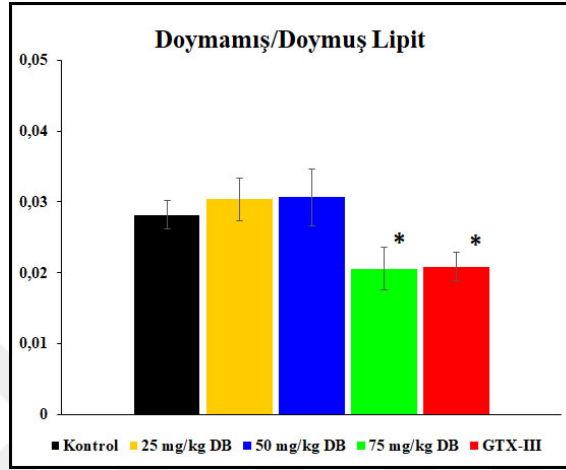
Şekil 3.13. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının C-O/Protein ve C-O/Lipit alan oranındaki değişimler (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).

Sistemin doymuş lipit konsantrasyonundaki değişiklikleri incelemek için ayrıca CH_2 sim./ CH_2 sim.+ antisim. ve CH_2 antisim./ CH_2 sim. oranları hesaplanmıştır [122]. Bu oranlardaki değişimler Şekil 3.14'te bar diyagramı olarak verilmiştir. Bu oranlar 25 ve 50 mg/kg DB uygulanmış gruplarda anlamlı bir değişiklik göstermezken, 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış gruplarda anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). Bu sonuç, 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış grupların fare karaciğer dokusundaki doymuş lipit içeriğinde artış olduğu sonucunu desteklemektedir.



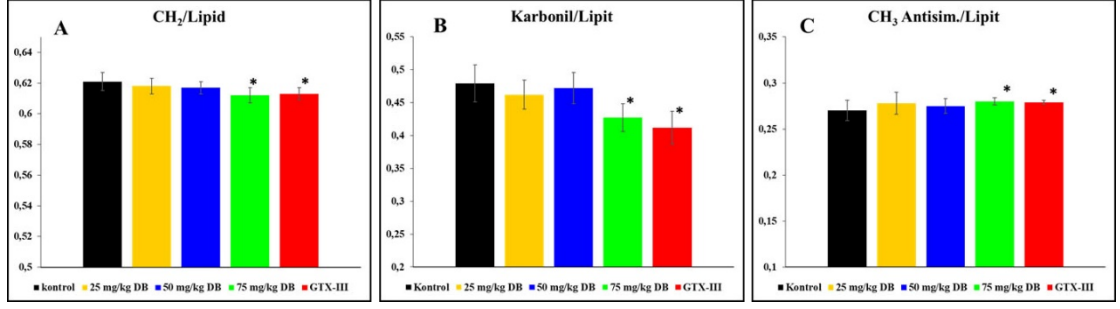
Şekil 3.14. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının a) CH_2 sim./ CH_2 sim.+anti sim. ve b) CH_2 anti sim./ CH_2 sim. bant alan oranındaki değişimler (* $p<0,05$).

Sistemin doymamış lipid seviyesinde meydana gelen değişiklikleri belirlemek için, olefinik=CH bantının alanı doymuş lipid bantlarının alan toplamına bölünmüştür. [120]. Bu oranın bar diyagramından (Şekil 3.15) görüldüğü üzere 25 ve 50 mg/kg DB uygulanmış gruplarda anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiş ancak 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış gruplarda bu oran anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). Bu azalma doymamış lipid miktarında azalma olduğu sonucunu ortaya koymaktadır.



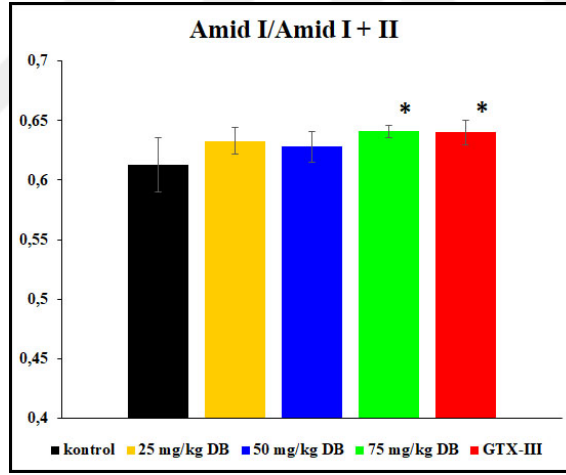
Şekil 3.15. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının Doymamış/Doymuş lipid bant alan oranındaki değişimler (* $p<0,05$).

Bazı spesifik lipid fonksiyonel gruplarının toplam lipid içeriğine oranlarının hesaplanmasıyla lipidlerin yapısındaki ve bileşimindeki değişiklikler değerlendirilebilmektedir. Çalışmamızda fosfolipitlerin zincir uzunluğunda meydana gelen değişiklikleri değerlendirmek için CH_2 /lipit oranı, sistemin karbonil durumunu belirlemek için karbonil/lipit oranı, dokudaki metil konsantrasyonundaki değişiklikleri değerlendirmek için de CH_3 /lipit oranı hesaplanmıştır [120]. Bu oran değerlerinde meydana gelen değişikliklerin gösterildiği bar diyagramları Şekil 3.16'da verilmiştir. Şekil 3.16'dan görüldüğü üzere bu oran değerleri 25, 50 mg/kg DB uygulanmış gruplarda anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Aynı şekillerden, 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanan gruplarda CH_2 /lipit ve karbonil/lipit oranlarının anlamlı derecede azaldığı ($p<0.05$), CH_3 /lipit oranının anlamlı derecede arttığı görülmektedir ($p<0.05$)



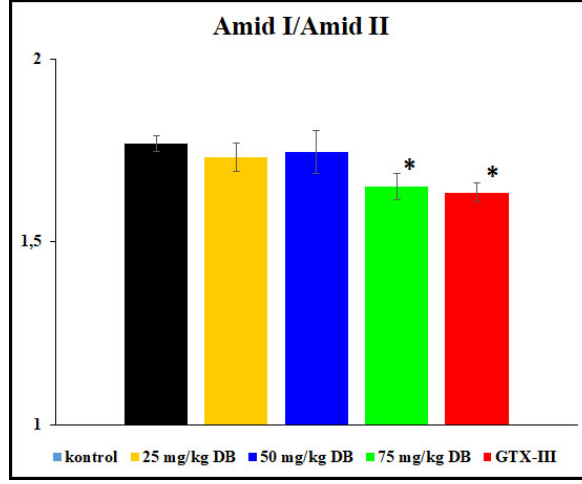
Şekil 3.16. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının a) CH₂/lipit, b) Karbonil/lipit ve c) CH₃/lipit bant alan oranındaki değişimler (*p<0,05).

Sistemin protein miktarında meydana gelen değişiklikleri belirlemek için ayrıca Amid I bantının alanı Amid I ve II bantlarının alanları toplamına bölünmüştür [122]. Bu oran değerinde meydana gelen değişiklikler Şekil 3.17’de verilmiştir. Bu şekilden de görüldüğü üzere 25 ve 50 mg/kg DB uygulanan grupların oran değerlerinde anlamlı bir değişiklik görülmezken, 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış grupların oran değerleri anlamlı şekilde artmıştır (p<0.05). Bu artış protein miktarında artış olduğu sonucunu desteklemektedir.



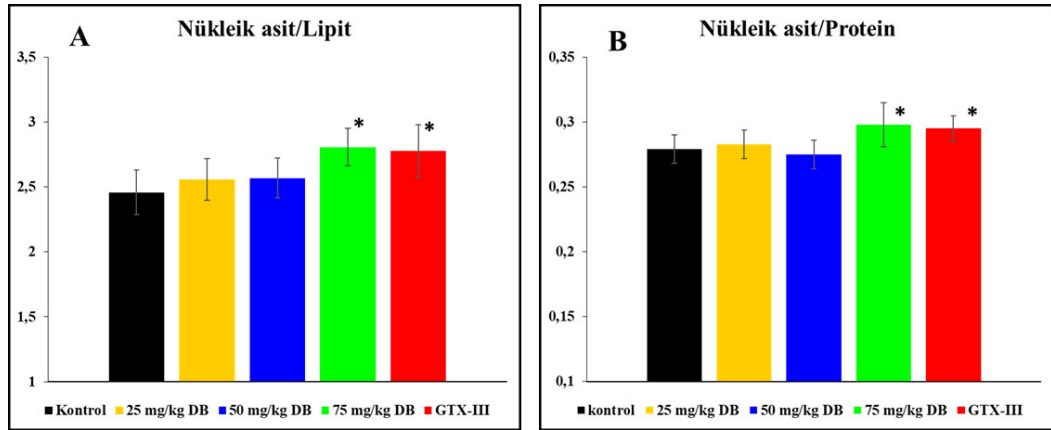
Şekil 3.17. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının Amid I/Amid I+II bant alan oranındaki değişimler (*p<0,05).

Amid I ve II bantları farklı protein titreşimlerinden kaynaklandığı için, amid I bantının alanının amid II bantının alanına bölünmesiyle elde edilen oran proteinlerdeki yapısal değişiklikler hakkında bilgi edinmek için kullanılmaktadır [121]. Bu oran değerindeki değişimler Şekil 3.18’de bar diyagramı olarak verilmiştir. Şekilden de görüldüğü üzere 25 ve 50 mg/kg DB uygulanmış gruplarda anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Fakat 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış grupların amid I/amid II oranı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (p<0.05).



Şekil 3.18. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının Amid I/Amid II bant alan oranındaki değişimler (*p<0,05).

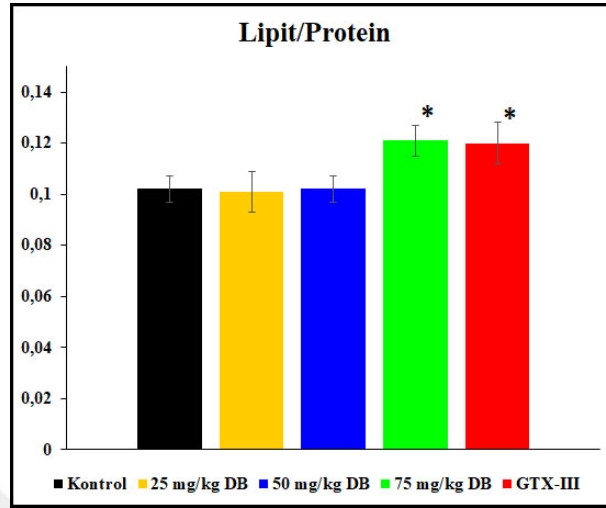
Nükleik asit içeriği hakkında bilgi edinmek ve nükleik asitlerle ilgili bulgularımızın doğruluğunu test etmek için nükleik asit/lipit ve nükleik asit/protein oranları hesaplandı [115]. Bu oran değerlerinde meydana gelen değişimler Şekil 3.19'da gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü üzere 25 ve 50 mg/kg DB uygulanan gruplarda herhangi anlamlı değişiklik meydana gelmemiş ancak 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış grupların oran değerleri anlamlı derecede azalmıştır (p<0.05). Bu sonuçlar bize 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış grupların nükleik asit miktarı, yapısı ve konformasyonunda değişiklikler olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.19. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının a) Nükleik asit/Lipit ve b) Nükleik asit/Protein bant alan oranındaki değişimler (*p<0,05).

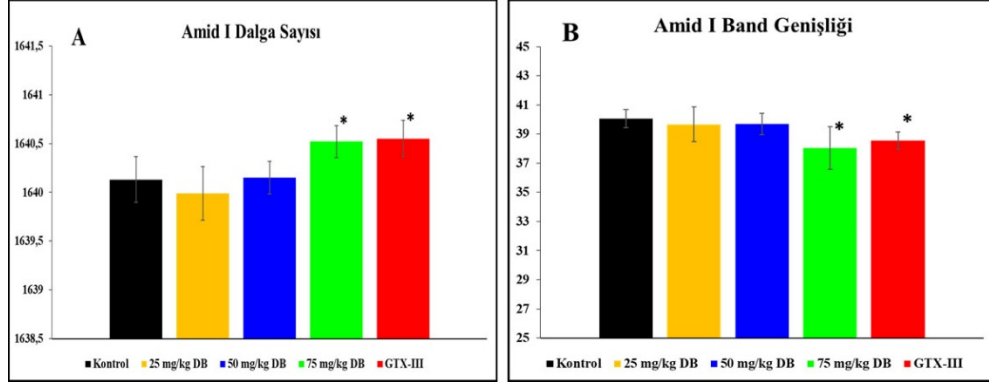
Çalışmamızda son olarak biyolojik sistemlerdeki lipitlerin ve proteinlerin konsantrasyonunu, membran yapısını ve fonksiyonunu etkileyen kritik bir faktör olan lipit/protein oranı incelenmiştir. Şekil 3.20'den görüldüğü üzere 25 ve 50 mg/kg DB

uygulanmış grupların oran değerinde herhangi bir anlamlı değişiklik görülmezken, 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış grupların lipit/protein oranı anlamlı şekilde artmıştır ($p<0.05$).



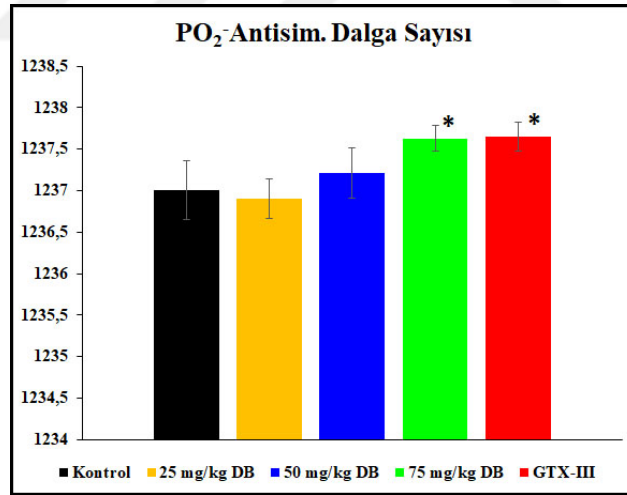
Şekil 3.20 Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının Lipit/Protein bant alan oranındaki değişimler ($*p<0,05$).

Tüm analizlere ek olarak bazı bantların dalga sayısı ve bant genişliği değerlerinde meydana gelen değişiklikler hesaplanmıştır. Amid I bantının dalga sayısı ve bant genişliğindeki değişimler protein konformasyonunda meydana gelen değişiklikler hakkında bilgi vermektedir [123]. Amid I bantının dalga sayısı değerinde 25 ve 50 mg/kg DB uygulanmış gruplarda anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiş ancak 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış gruplarda anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 3.21A). Aynı fonksiyonel bantın, bant genişliği değerine bakıldığında 25 ve 50 mg/kg DB uygulanmış gruplarda anlamlı bir değişiklik meydana gelmediği ancak 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış gruplarda anlamlı şekilde azalma meydana geldiği görülmüştür ($p<0.05$) (Şekil 3.21B). Bu parametrelerde meydana gelen değişiklikler 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulaması sonucu proteinlerin yapı, kompozisyon ve konformasyonunda değişiklikler meydana geldiği sonucunu ortaya koymaktadır.



Şekil 3.21. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının a) Amid I dalga sayısı ve b) Bant genişliği değerlerindeki değişimler (*p<0,05).

PO₂⁻ antisimetrik gerilme bantının dalga sayısında meydana gelen değişiklikler bar diyagramı olarak Şekil 3.22’de verilmiştir. Şekle baktığımızda 25 ve 50 mg/kg DB uygulanan gruplarda herhangi bir anlamlı değişiklik olmadığı ancak 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı artışlar olduğu görülmektedir (p<0.05) (Şekil 3.22). Bu sonuç bize nükleik asitlerin hidrojen bağlama kapasitesinin azaldığını ve bu gruplardaki nükleik asitlerde konformasyonel değişiklikler meydana geldiğini göstermektedir.

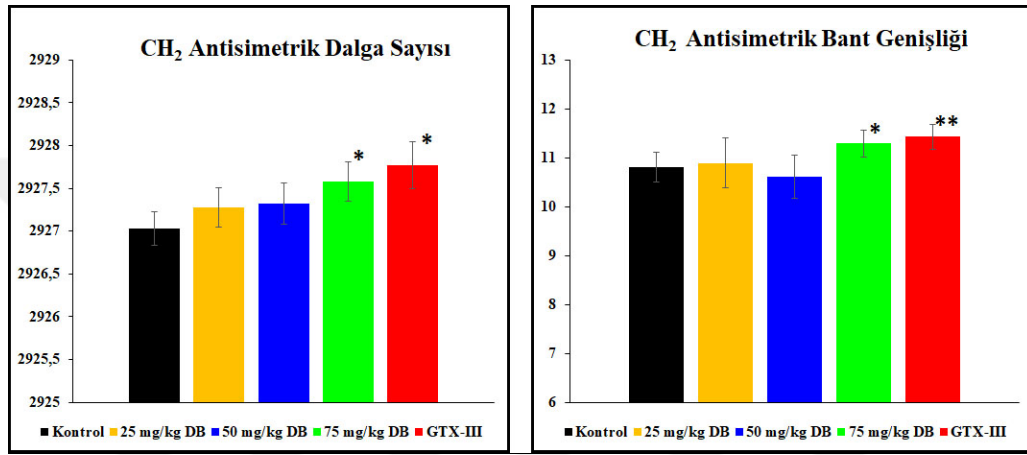


Şekil 3.22 Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının PO₂⁻ antisimetrik dalga sayısı değerlerindeki değişimler (*p<0,05).

CH₂ antisimetrik gerilme bantının dalga sayısı ve bant genişliği sırasıyla membranların düzen/düzensizlik durumu ve akışkanlığı hakkında bilgi elde etmek için kullanılmaktadır [118].

Şekil 3.23’den görüldüğü gibi, 25 ve 50 mg/kg DB uygulanmış grupların dalga sayısı ve

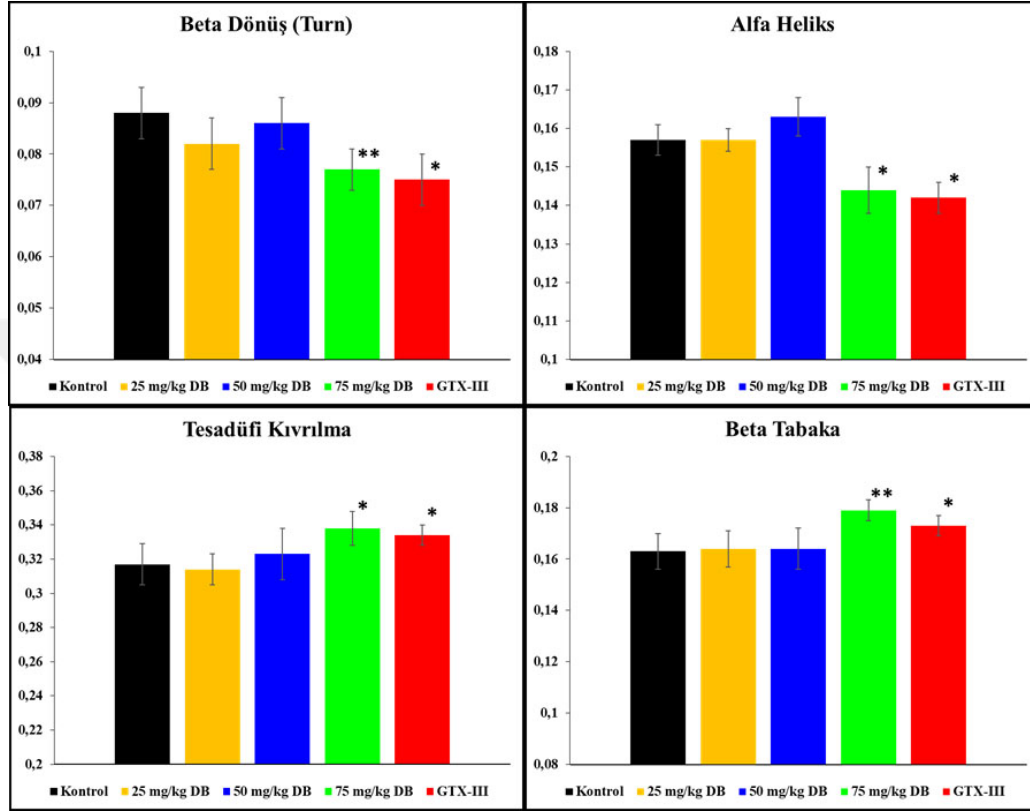
bant genişliği değerlerinde anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. Ancak, aynı şekilde 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış grupların dalga sayısı değerlerinin arttığı görülmektedir ($p<0.05$). Bu artış membran düzeninin azaldığını ve bu gruplarda lipidlerin açıl zincir esnekliğinin arttığını göstermektedir [124]. Bu bantın bant genişliğine bakıldığında benzer şekilde 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarında anlamlı bir artış olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar bize 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasının karaciğer dokusunda membran düzeninde azalmaya ($p<0.05$, $p<0.01$) ve membran akışkanlığında artışa neden olduğunu göstermektedir [124].



Şekil 3.23. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının a) CH₂ antisimetrik gerilme bantının dalga sayısı, b) Bant genişliği değerlerindeki değişimler (* $p<0,05$,** $p<0,01$).

Çalışmamızda karaciğer dokusundaki proteinlerin ikincil yapılarındaki değişimleri analiz edebilmek için Amid I bantına ikincil türev vektör normalizasyonu uygulanmıştır [120]. FTIR spektrumunda 1700-1600 cm^{-1} aralığında bulunan Amid I bantı sadece proteinlerden sinyal alan ayrışmamış bantlar içermektedir. Bu banta uygulanan vektör normalizasyon yöntemiyle karakteristik bileşenler daha detaylı bir şekilde tanımlanmaktadır. Şekil 3.24'te 1700-1600 cm^{-1} 'deki kontrol ve uygulama gruplarının fare karaciğeri ikincil türev spektrumundaki değişimler bar diyagramı olarak verilmiştir. İkincil türev spektrumunda proteinlerdeki beta dönüş (turn) yapıları 1684 cm^{-1} 'de, alfa-heliks yapıları 1659 cm^{-1} 'de, tesadüfi kıvrılma yapıları 1651 cm^{-1} 'de, beta-tabaka yapıları 1633 cm^{-1} 'de negatif bantlar olarak tanımlanmaktadır [101]. Şekil 3.24'ten görüldüğü üzere; 25 ve 50 mg/kg DB uygulanmış grupların protein ikincil yapılarında bir değişiklik meydana gelmemiştir. Aynı şekilde 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış grupların protein ikincil yapı değerlerine bakıldığında beta dönüş (turn) ve alfa-heliks

yapılarında anlamlı bir azalma ($p<0.05$, $p<0.01$), tesadüfi kıvrılma ve beta tabaka yapılarında ise anlamlı bir artma meydana geldiği gözlenmiştir ($p<0.05$, $p<0.01$). Bu sonuçlar bize; 25 ve 50 mg/kg DB uygulamasının protein ikincil yapısında bir değişiklik meydana getirmediğini ancak 75mg/kg DB ve GTX-III uygulandığında fare karaciğer dokusunda protein ikincil yapıda denatürasyon olabileceğini göstermektedir.

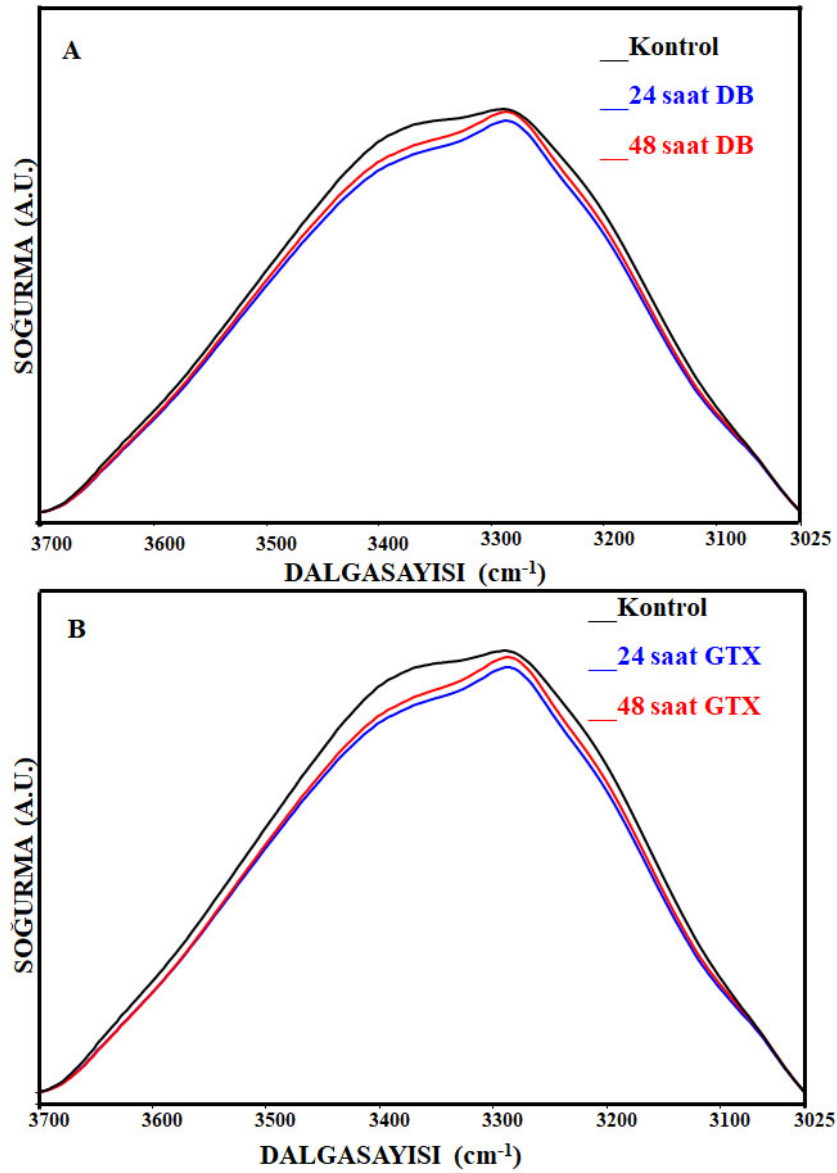


Şekil 3.24. Kontrol, 25, 50 ve 75 mg/kg DB ve GTX-III gruplarının protein ikincil yapı değerlerindeki değişimler (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).

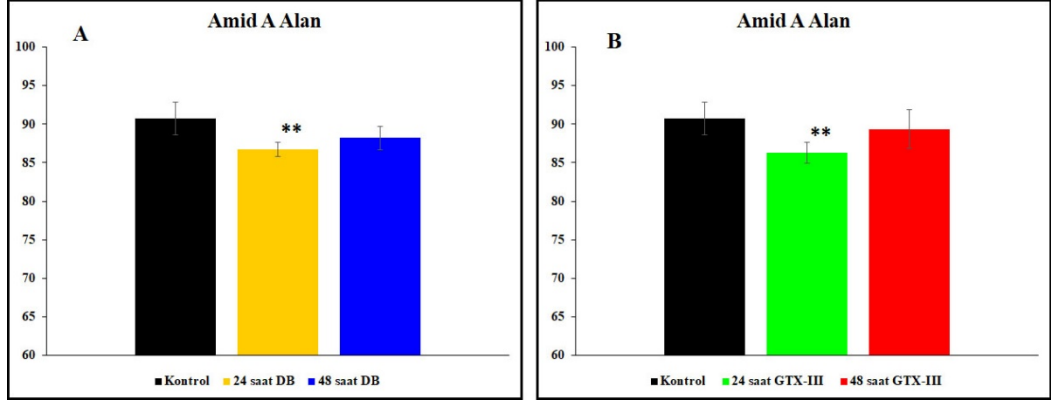
3.1.3. DB ve GTX-III'ün Karaciğer Dokusu Üzerindeki Zamana Bağlı Etkileri

DB'nin farklı konsantrasyonlarının fare karaciğeri üzerindeki doza bağlı etkilerini incelediğimiz birinci bölümdeki sonuçlarımız 25 ve 50 mg/kg DB dozlarının 24 saatlik süre sonunda dokuda glikojen miktarını azaltmak dışında herhangi bir etki yaratmadığını ancak 75 mg/kg DB ve GTX uygulamasının dokudaki biyomoleküllerin yapısı, kompozisyonu ve konformasyonu üzerinde önemli toksik etkiler meydana getirdiğini göstermiştir. Bu nedenle, çalışmamızın bu bölümünde bu toksik etkilerin 48 saat içinde normale dönüp dönmediğinin belirlenmesi amacıyla 75 mg/kg'lık DB dozunun ve saf haldeki GTX'in uygulandığı fare karaciğer dokuları 24 ve 48 saatlik süreler sonunda incelenmiş ve sonuçlar birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

Şekil 3.25.a, kontrol ve DB uygulamasından, Şekil 3.25.b ise kontrol ve GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş fare karaciğeri spektrumunun 3700-3025 cm^{-1} dalga sayısı aralığında bulunan Amid A bantını göstermektedir. Şekil 3.26 ise bu bantın altında kalan alan değerindeki değişiklikleri bar diyagramı olarak göstermektedir. Şekil 3.25 ve Şekil 3.26'dan görüldüğü üzere DB ve GTX'in 24 saatlik uygulama süresi sonunda bu bantın alan değerinde anlamlı bir azalma ($p<0,01$) meydana gelmiş ancak 48 saatlik uygulama süresi sonunda DB ve GTX uygulanan gruplarda herhangi anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir.



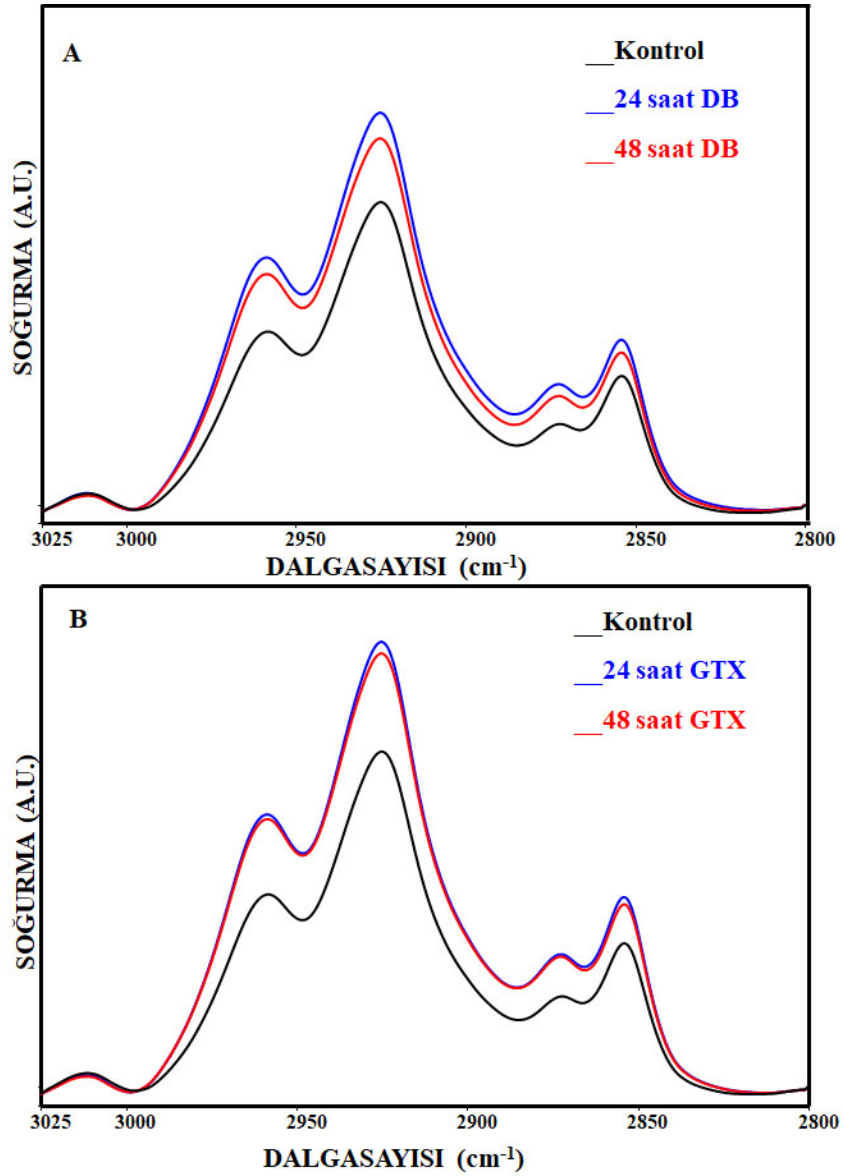
Şekil 3.25. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş fare karaciğer dokularının 3700-3025 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektrumları (Spektrumlar CH_2 antisimetrik gerilme bantına göre normalize edilmiştir).



Şekil 3.26. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Amid A bandı alan değerleri (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

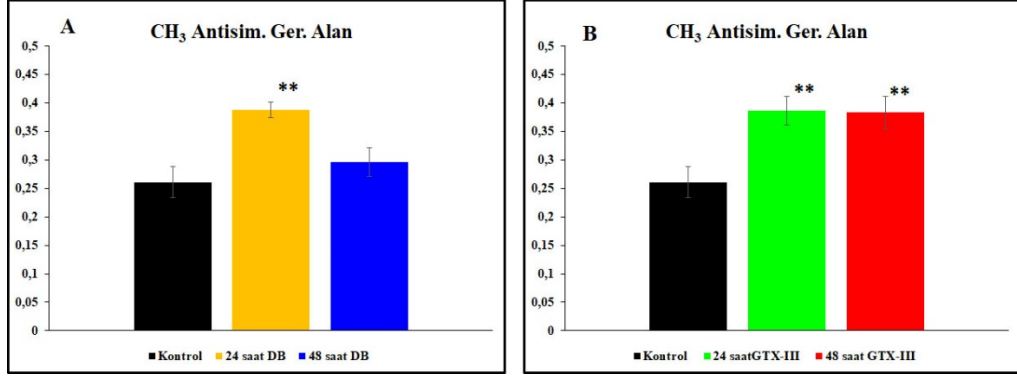
Şekil 3.27.a, kontrol ve DB uygulamasından, Şekil 3.27.b ise kontrol ve GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş grupların $3025-2800 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığındaki C-H gerilme bölgesi spektrumlarını göstermektedir.





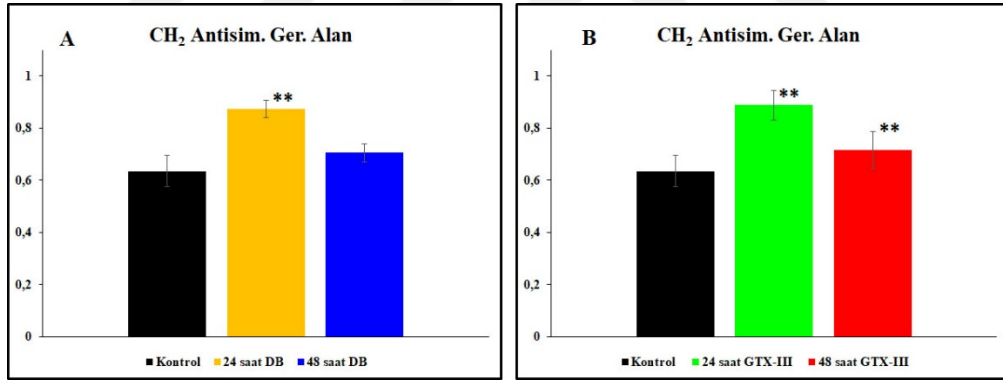
Şekil 3.27. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş fare karaciğer dokularının 3025-2800 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektrumları (Spektrumlar CH_2 antisimetrik gerilme bantına göre normalize edilmiştir).

DB ve GTX'in sistemdeki doymuş lipitler üzerindeki zamana bağlı etkilerini incelemek için CH_3 antisimetrik, CH_2 antisimetrik ve CH_2 simetrik bantlarının alan değerleri incelenmiştir (Şekil 3.28, Şekil 3.29, Şekil 3.30). DB uygulanmış grupların CH_3 antisimetrik bantının altında kalan alan değerlerine bakıldığında, 24 saatlik uygulama sonunda anlamlı bir artış ($p < 0,01$) meydana geldiği ancak 48 saatlik uygulama sonunda herhangi anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür (Şekil 3.28.a). Bu bantın GTX uygulanmış gruplarının alan değerlerine bakıldığında ise hem 24 hem de 48 saatlik uygulama sonunda anlamlı artış ($p < 0,01$) olduğu Şekil 3.28'den görülmektedir.



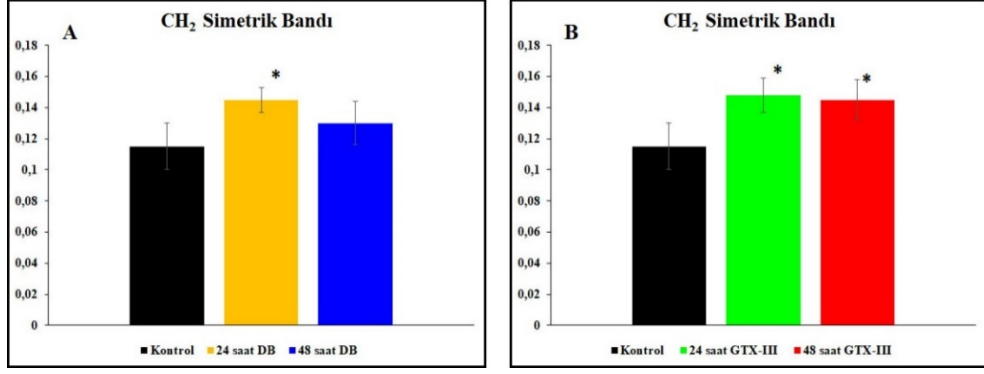
Şekil 3.28. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH₃ antisimetrik gerilme bantı alan değerleri (**p<0,01).

DB uygulanmış grupların CH₂ antisimetrik bantının altında kalan alan değerlerinde (Şekil 3.29.a), CH₃ antisimetrik bantına benzer şekilde 24 saatlik uygulama sonunda anlamlı bir artış (p<0,01) meydana gelirken 48 saatlik uygulama sonunda herhangi anlamlı bir değişiklik olmamıştır. GTX uygulanmış gruplara bakıldığında ise 24 saatlik uygulama sonunda meydana gelen anlamlı artışın 48 saatlik uygulama sonunda da devam ettiği görülmüştür (Şekil 3.29.a).



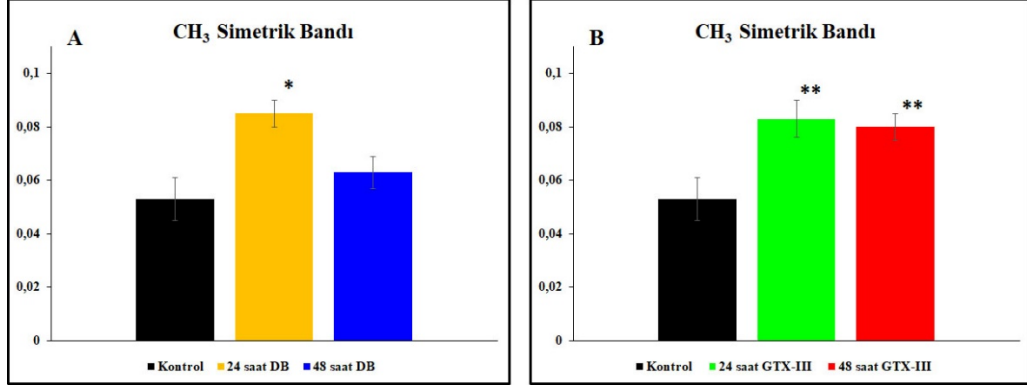
Şekil 3.29. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH₂ antisimetrik gerilme bandı alan değerleri (p<0,01).

CH₂ simetrik bantında da benzer şekilde DB uygulanmış gruplarda bu bantın altında kalan alan değerlerinde 24 saatlik uygulama sonunda anlamlı bir artış (p<0,05) meydana geldiği ancak 48 saatlik uygulama sonunda herhangi anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür (Şekil 3.30.a). GTX uygulanmış grupların bar diyagramlarına bakıldığında ise hem 24 hem de 48 saatlik uygulama sonunda anlamlı artışlar olduğu Şekil 3.30.b'den görülmektedir.



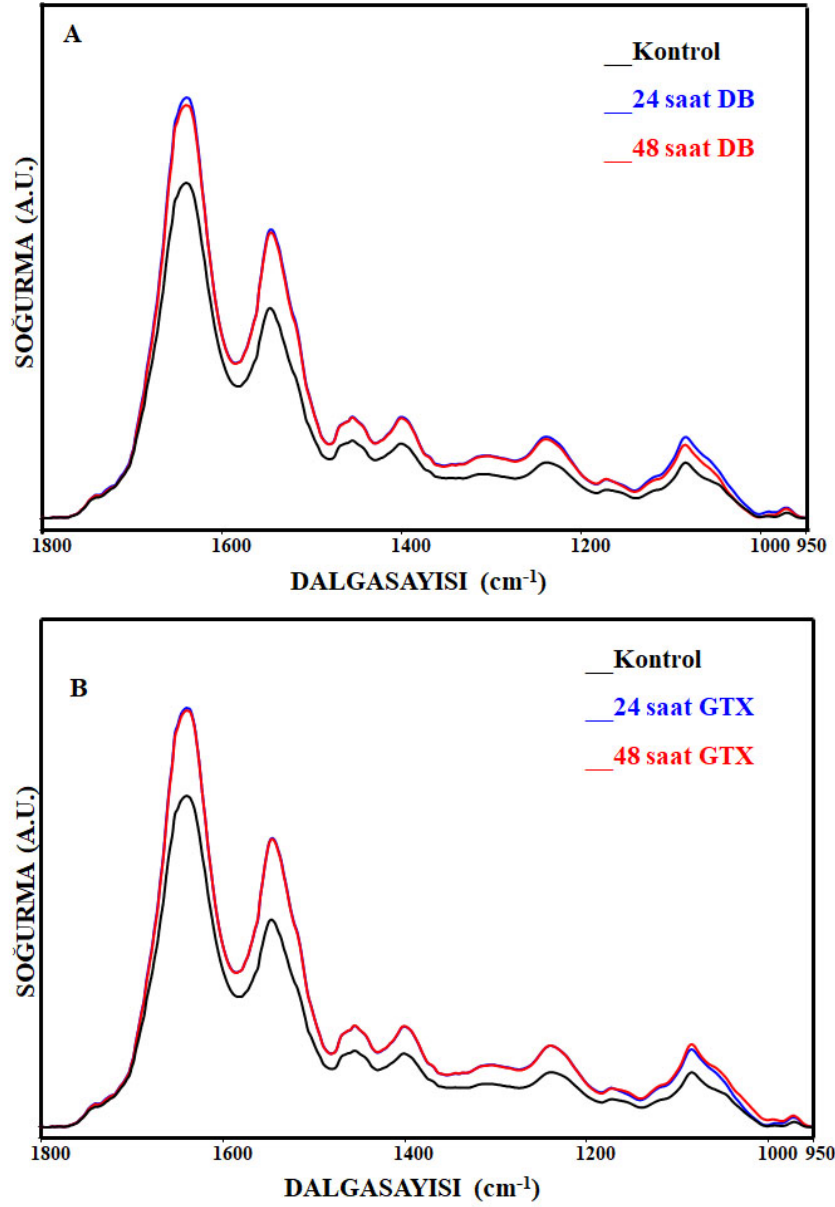
Şekil 3.30. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH₂ simetrik gerilme bandı alan değerleri (*p<0,05).

Proteinlerden sinyal alan CH₃ simetrik gerilme bantının altında kalan alan değerlerindeki değişikliklerin bar diyagramı Şekil 3.31'de verilmiştir. Şekil 3.31.a'dan görüldüğü üzere DB uygulanmış gruplarda 24 saatlik uygulama sonunda anlamlı bir artış (p<0,05) meydana gelmiş ancak 48 saatlik uygulama sonunda herhangi anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. Şekil 3.31.b'den ise GTX uygulanmış grupların hem 24 hem de 48 saatlik uygulamalar sonucunda bu bantın altında kalan alan değerinde anlamlı artış (p<0,01) olduğu görülmektedir.



Şekil 3.31. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH₃ simetrik gerilme bandı alan değerleri (*p<0,05).

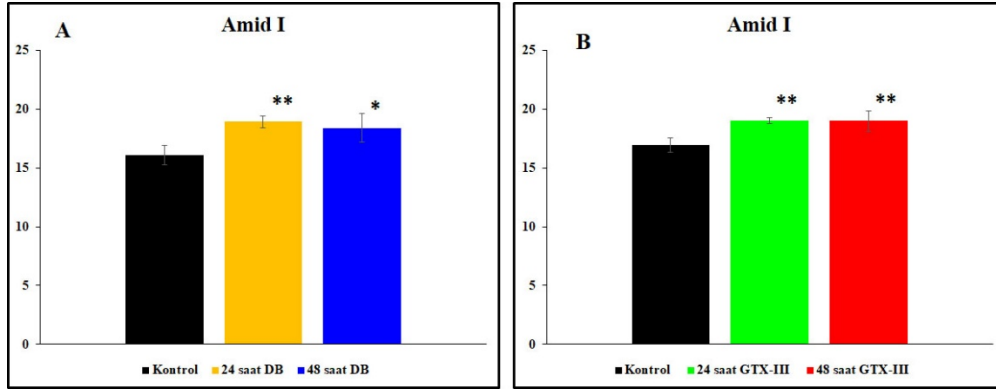
Çalışmamızda analiz edilen diğer bir bölge olan parmak izi bölgesindeki spektral değişimler Şekil 3.32’de gösterilmiştir.



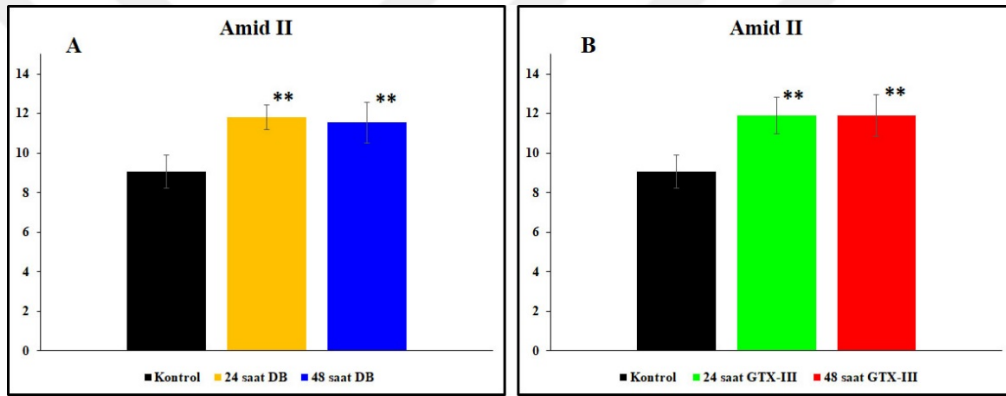
Şekil 3.32. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş fare karaciğer dokularının 1800-950 cm⁻¹ dalga sayısı aralığındaki spektrumları (Spektrumlar CH₂ antisimetrik gerilme bantına göre normalize edilmiştir).

Şekil 3.33.a ve b’den görüldüğü gibi protein miktarındaki değişimi gösteren Amid I bantının altında kalan alan değerlerinde, DB ve GTX uygulanmış grupların 24 ve 48 saatlik tüm uygulama gruplarında anlamlı derecede artış ($p<0,01$) meydana gelmiştir. Benzer şekilde Amid II bantında gözlediğimiz artışta her iki uygulama grubunda 48 saat boyunca devam etmiştir (Şekil 3.34). Bu sonuç bize DB ve GTX uygulamasından 24

saat sonra incelenen fare karaciğerindeki protein miktarındaki artışın 48 saat sonunda da devam ettiğini göstermektedir.

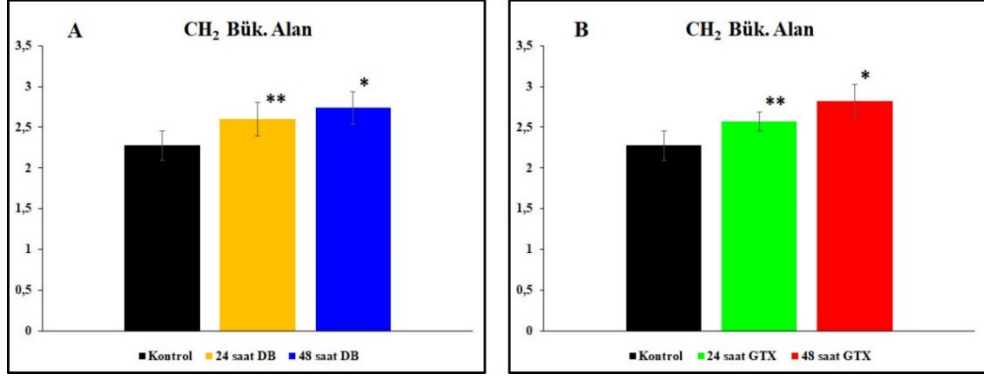


Şekil 3.33. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Amid I bantı alan değerleri (**p<0,01).



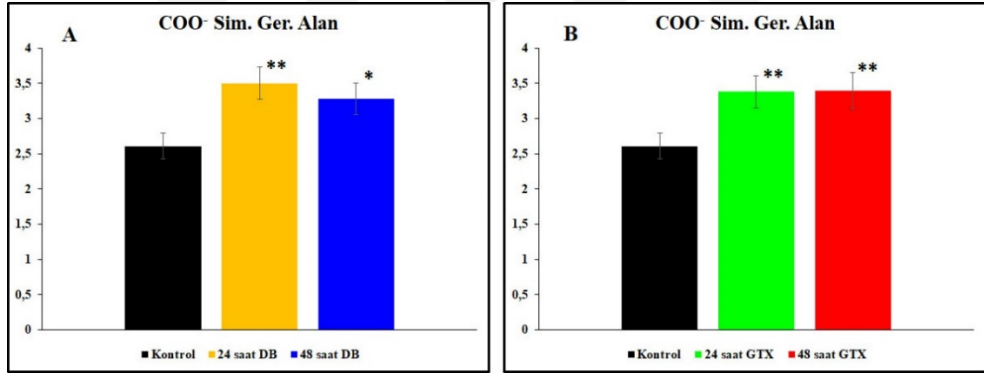
Şekil 3.34. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Amid II bantı alan değerleri (**p<0,01).

Parmak izi bölgesinde 1453 cm^{-1} dalga sayısında meydana gelen CH_2 bükülme bandının DB ve GTX uygulamalarından 24 ve 48 saatlik süre sonunda incelenmiş grupların alan değerlerindeki değişiklikler Şekil 3.35'de verilmiştir. Bu şekillere bakıldığında DB ve GTX uygulamasından hem 24 hem de 48 saatlik süre sonunda alan değerlerinde anlamlı derecede artışlar ($p<0,05$, $p<0,01$) olduğu görülmektedir.



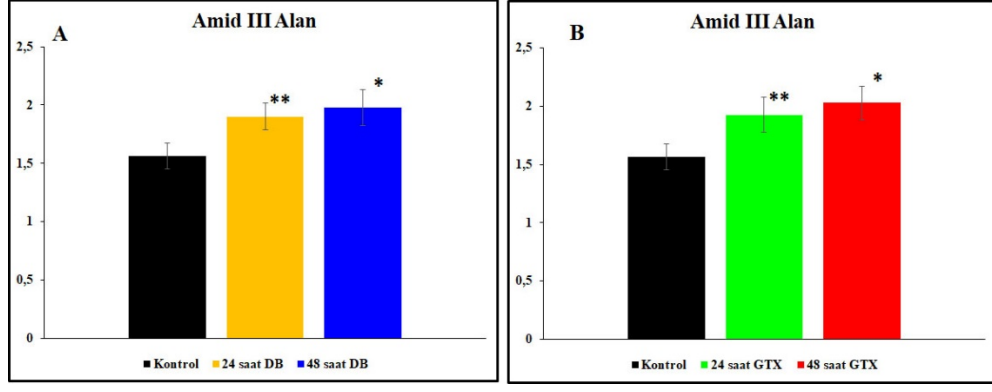
Şekil 3.35. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH₂ bükülme bantı alan değerleri (*p<0,05, **p<0,01).

Aynı bölgede bulunan yağ asitleri ve amino asitlerden sinyaller alan COO⁻ simetrik gerilme bantı alan değerindeki değişikliklere bakıldığında, CH₂ bükülme bandına benzer şekilde DB ve GTX uygulanmış grupların hem 24 hem de 48 saatlik uygulama gruplarının her birinde anlamlı artışlar (p<0,05, p<0,01) meydana geldiği görülmektedir (Şekil 3.36).



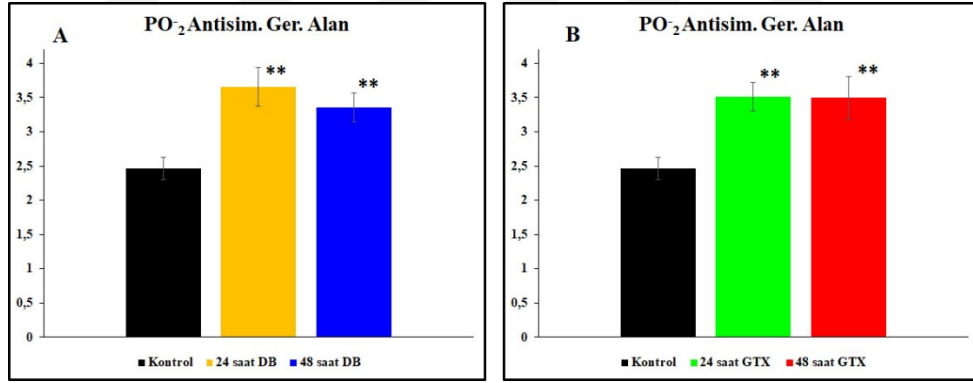
Şekil 3.36. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının COO⁻ simetrik gerilme bantı alan değerleri (*p<0,05, **p<0,01).

1308 cm⁻¹ dalga sayısında ortaya çıkan ve proteinlerden sinyal alan Amid III bantının DB ve GTX uygulamasından 24 ve 48 sonra incelenmiş grupların alan değerindeki değişiklikler bar diyagramı olarak Şekil 3.37'de verilmiştir. Bu şekillerden görüldüğü üzere DB ve GTX uygulamasından 24 ve 48 saatlik süreler sonunda incelenen tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artışlar (p<0,05, p<0,01) meydana gelmiştir.



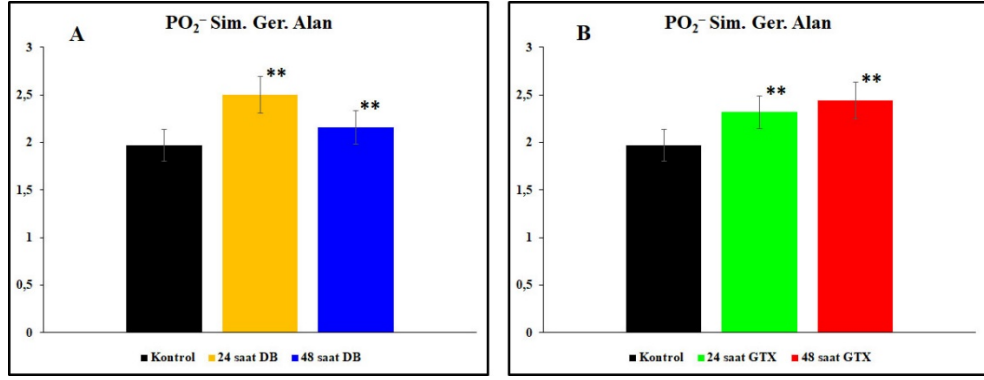
Şekil 3.37. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Amid III bantı alan değerleri (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

PO_2^- antisimetrik ve PO_2^- simetrik gerilme bantlarının DB ve GTX uygulamasından 24 ve 48 saatlik süre sonunda alan değerlerinde meydana gelen değişikliklerin bar diyagramları sırasıyla Şekil 3.38 ile Şekil 3.39'da verilmiştir. Şekil 3.38'den, nükleik asitlerle ilgili bilgi edindiğimiz PO_2^- antisimetrik gerilme bandının altında kalan alan değerlerinde, DB ve GTX uygulamasından hem 24 saatlik hem de 48 saatlik süreler sonunda kontrole göre anlamlı artışlar ($p < 0,01$) meydana geldiği görülmektedir.



Şekil 3.38 Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının PO_2^- antisimetrik germe bantı alan değerleri (** $p < 0,01$).

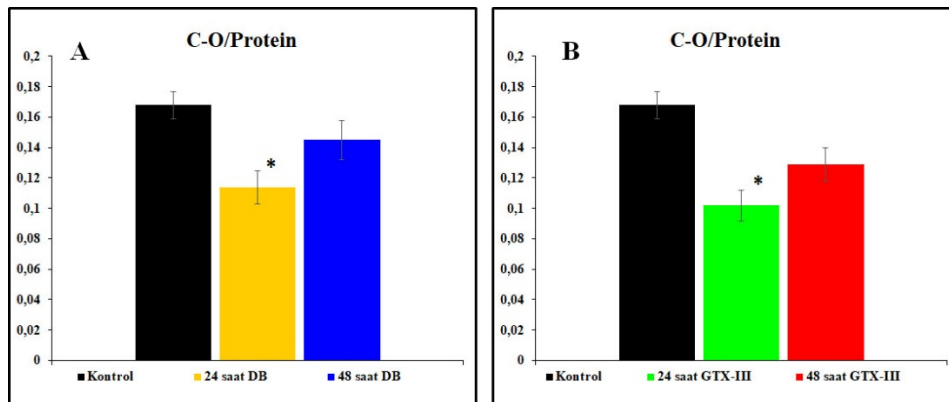
PO_2^- simetrik gerilme bantının altında kalan alan değerlerine bakıldığında da PO_2^- antisimetrik bandına benzer şekilde DB ve GTX uygulamasından hem 24 saatlik hem de 48 saatlik süreler sonunda tüm uygulama gruplarının kontrole göre anlamlı şekilde arttığı ($p < 0,01$) görülmüştür (Şekil 3.39).



Şekil 3.39. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının PO₂⁻ simetrik germe bantı alan değerleri (**p<0,01).

Çalışmamızın ilk kısmında bazı özel bantların altında kalan alan değerleri birbirine oranlanarak 24 saat sonra meydana gelen yapısal ve kompozisyonel değişiklikler hakkında önemli bilgiler edinilmiştir. Çalışmamızın bu kısmında da aynı parametreler kullanılarak bu değişikliklerin 24 ve 48 saatlik süreler sonundaki değişimleri analiz edilmiştir.

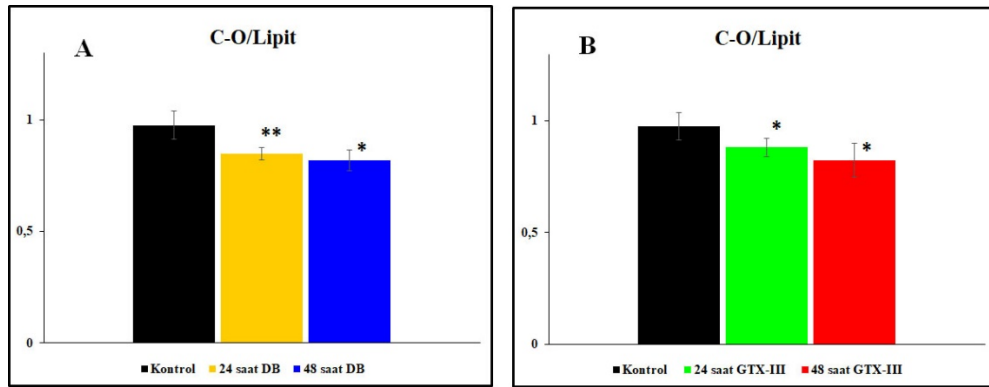
Sistemdeki glikojen miktarıyla ilgili bilgi edindiğimiz C-O/protein ve C-O/lipit oran değerlerindeki değişikliklerin bar diyagramı sırasıyla Şekil 3.40 ve Şekil 3.41'de verilmiştir. C-O/protein değerlerinde DB ve GTX uygulamasından 24 saatlik süre sonunda incelenmiş gruplarda anlamlı bir azalış (p<0,05) meydana geldiği ancak 48 saatlik süre sonunda incelenmiş gruplarda herhangi anlamlı bir değişiklik meydana gelmediği gözlenmiştir (Şekil 3.40).



Şekil 3.40. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının C-O/Protein bant alan oranındaki değişiklikler (*p<0,05).

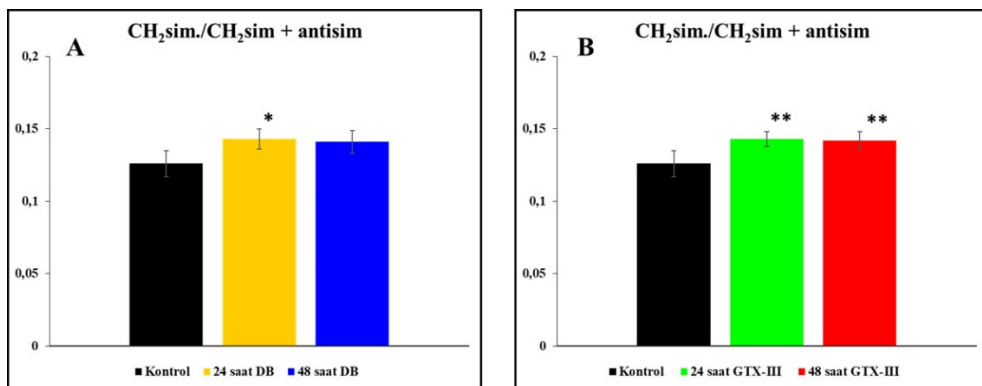
C-O/lipit oranına baktığımızda ise DB ve GTX uygulamasından 24 ve 48 saatlik süreler sonunda incelenmiş grupların her birinde anlamlı bir azalma (p<0,05, p<0,01) meydana

geldiği görülmüştür (Şekil 3.41).

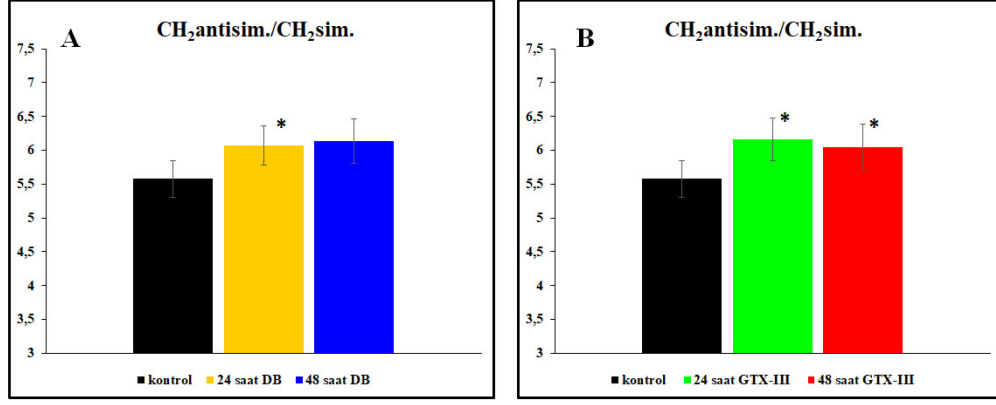


Şekil 3.41. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının C-O/Lipit bant alan oranındaki değişiklikler (*p<0,05, **p<0,01).

CH₂ sim./CH₂ sim.+antisim. oran değerlerindeki değişikliklerin DB ve GTX uygulamasından 24 ve 48 sonra incelenmiş grupların alan değerindeki değişikliklerin bar diyagramı Şekil 42'de verilmiştir. CH₂ antisim./CH₂ sim. oran hesaplamalarında DB ve GTX uygulamasından sonra meydana gelen değişikliklerin bar diyagramları ise sırasıyla Şekil 3.43'de verilmiştir. Doymuş lipitlerle ilgili bu oranların hesaplanması sonucu elde ettiğimiz sonuçlar, DB ve GTX uygulamasından 24 saatlik süre sonunda incelenmiş gruplarda anlamlı derecede artma (p<0,05, p<0,01) meydana geldiğini göstermiştir. 48 saatlik uygulama gruplarına bakıldığında DB uygulamasından sonra herhangi bir anlamlı değişiklik olmadığı ancak GTX uygulamasından sonra artış olduğu görülmektedir.

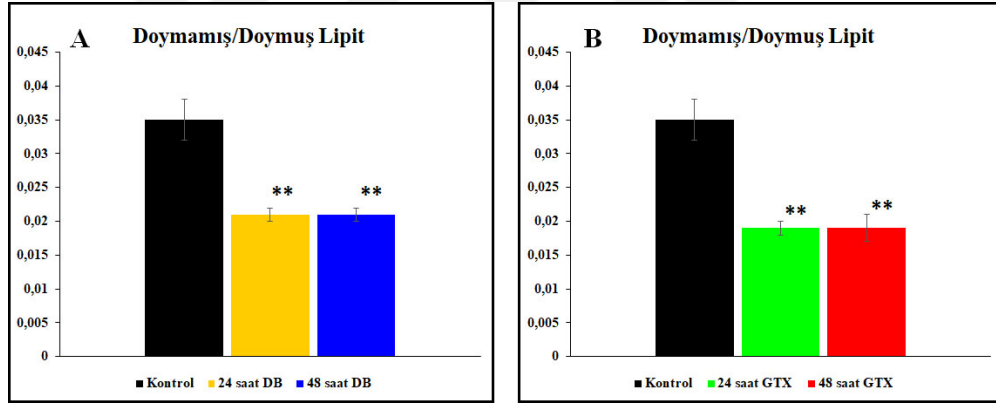


Şekil 3.42. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH₂ sim./CH₂ sim.+antisim. bant alan oranındaki değişiklikler (*p<0,05, **p<0,01).



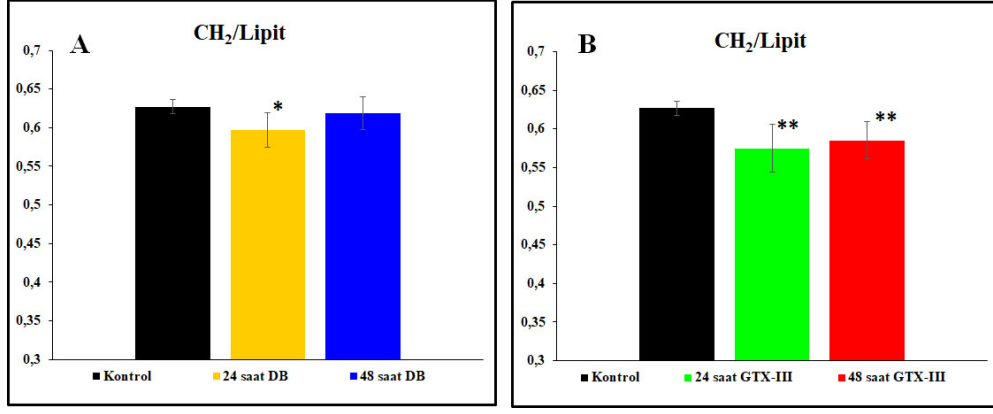
Şekil 3.43. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH₂ antisim./CH₂ sim. bant alan oranındaki değişiklikler (*p<0,05).

Sistemin lipit peroksidasyon indeksi olarak kullanılan doymamış/doymuş lipit oranına bakıldığında ise DB ve GTX uygulamasından hem 24 hem de 48 saatlik süreler sonunda incelenmiş bütün uygulama gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derece azalma (p<0,01) meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 3.44).



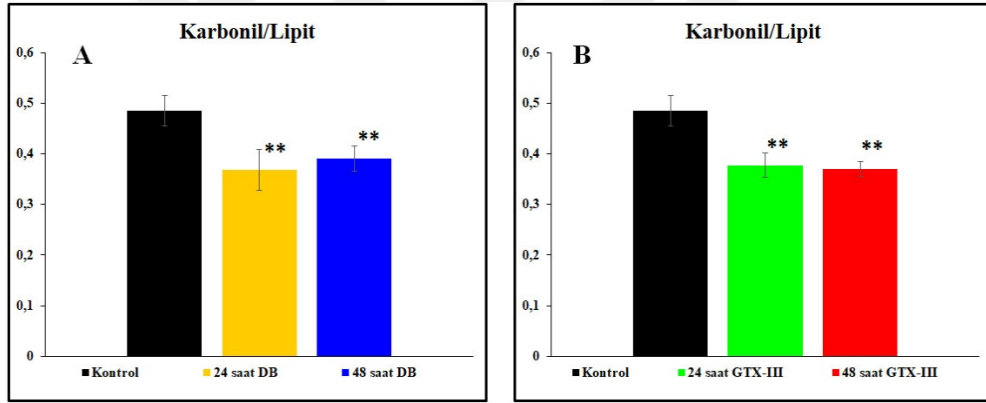
Şekil 3.44. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Doymamış/Doymuş lipit bant alan oranındaki değişiklikler (**p<0,01).

Fosfolipitlerin zincir uzunluğundaki değişiklikleri değerlendirmemizi sağlayan CH₂/lipit oranı değişikliklerinin bar diyagramı Şekil 3.45'te verilmiştir. Şekil 3.45.a'dan görüldüğü üzere DB uygulamasından 24 saat sonra incelenmiş grupta anlamlı bir azalma (p<0,05) gözlenmiş olup 48 saatlik süre sonunda incelenmiş grupta anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Şekil 3.45.b'de ise aynı oran değeri için GTX uygulamasından 24 ve 48 saatlik süreler sonunda incelenmiş grupların her ikisinde de anlamlı derecede azalma (p<0,01) meydana geldiği görülmüştür.



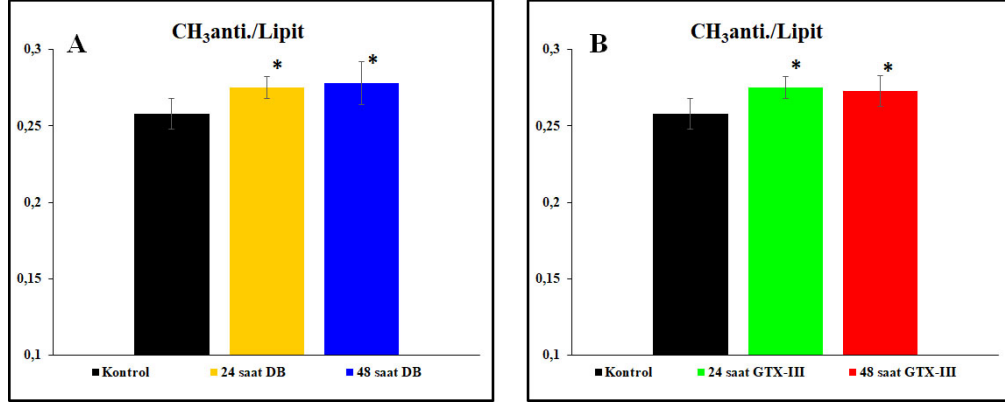
Şekil 3.45. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH₂/Lipit bant alan oranındaki değişiklikler (*p<0,05, **p<0,01).

Sistemin karbonil durumunu belirlemek için kullanılan karbonil/lipit oranındaki değişiklikleri gösteren bar diyagramlarından (Şekil 3.46) DB ve GTX uygulamasından 24 ve 48 saatlik süreler sonunda incelenmiş tüm uygulama gruplarında anlamlı derecede azalma (p<0,01) meydana geldiği görülmektedir (Şekil 3.46).



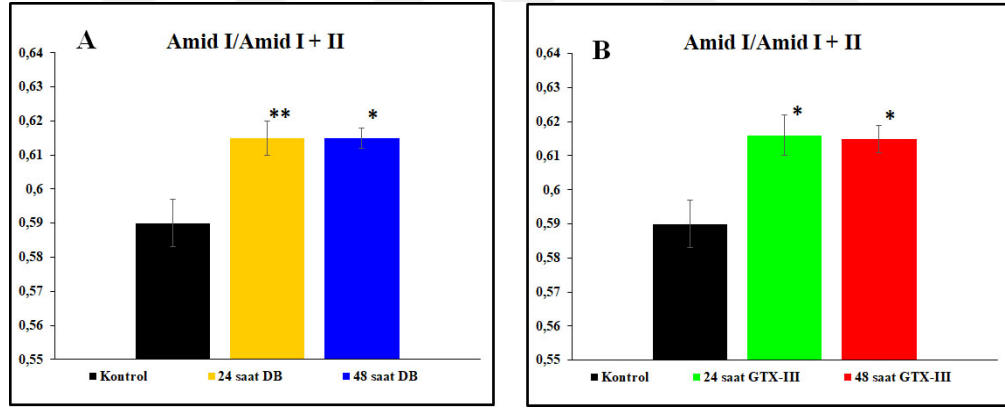
Şekil 3.46. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Karbonil/Lipit bant alan oranındaki değişiklikler (**p<0,01).

Şekil 3.47’de sistemin metil konsantrasyonundaki değişiklikleri değerlendirmek için kullanılan CH₃/lipit oranındaki değişiklikler bar diyagramı olarak verilmiştir. CH₃/lipit oran hesaplamalarında elde ettiğimiz sonuçlar, DB ve GTX uygulamasından 24 ve 48 saatlik süreler sonunda incelenmiş tüm uygulama gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artma (p<0,05) olduğunu ortaya koymaktadır.



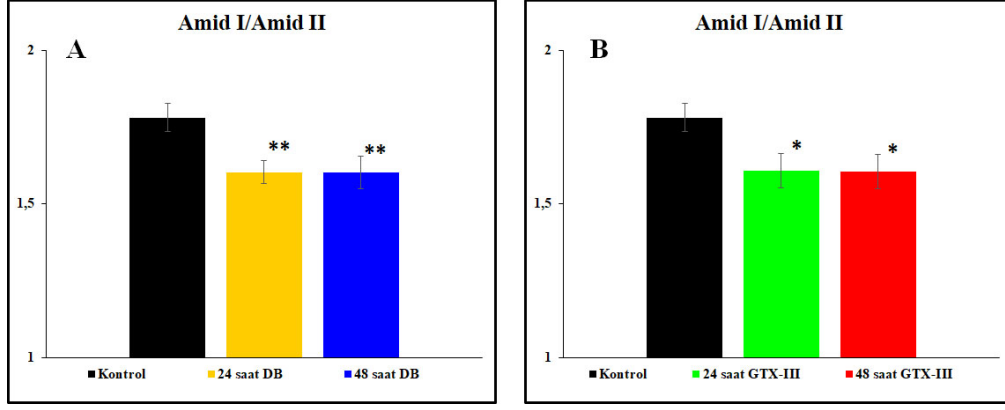
Şekil 3.47. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH₃ anti./Lipit bant alan oranındaki değişiklikler (*p<0,05).

Sistemin protein miktarındaki değişiklikleri belirlemek için kullanılan Amid I/Amid I+II oranı, proteinlerdeki yapısal değişiklikler hakkında bilgi edinmek için kullanılan Amid I/Amid II oranlarındaki değişikliklerin bar diyagramı sırasıyla Şekil 3.48 ve Şekil 3.49'da verilmiştir. Şekil 3.48'de Amid I/Amid I+II oran değerinde DB ve GTX uygulamasından 24 ve 48 saatlik süreler sonunda incelenmiş tüm uygulama gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış (p<0,05, p<0,01) meydana geldiği görülmektedir.



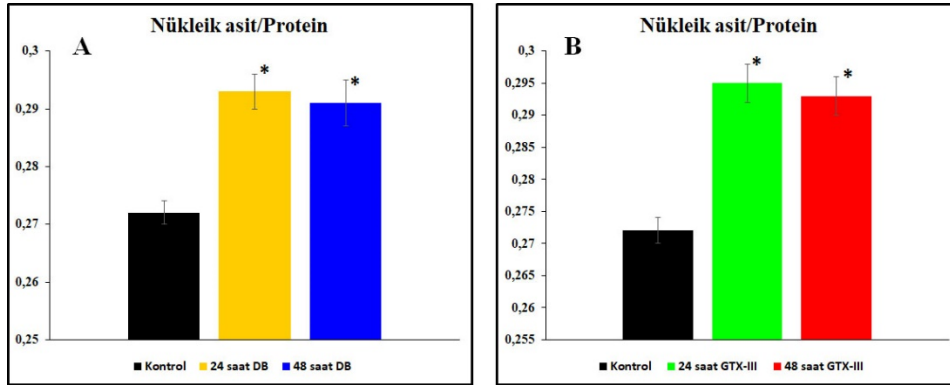
Şekil 3.48. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Amid I/Amid I+II bant alan oranındaki değişiklikler (*p<0,05, **p<0,01).

Şekil 3.49'dan görüldüğü üzere Amid I/Amid II oran değerinde DB ve GTX uygulamasından 24 ve 48 saatlik süreler sonunda incelenmiş tüm uygulama gruplarında istatistiksel olarak anlamlı azalma (p<0,05, p<0,01) meydana gelmiştir.

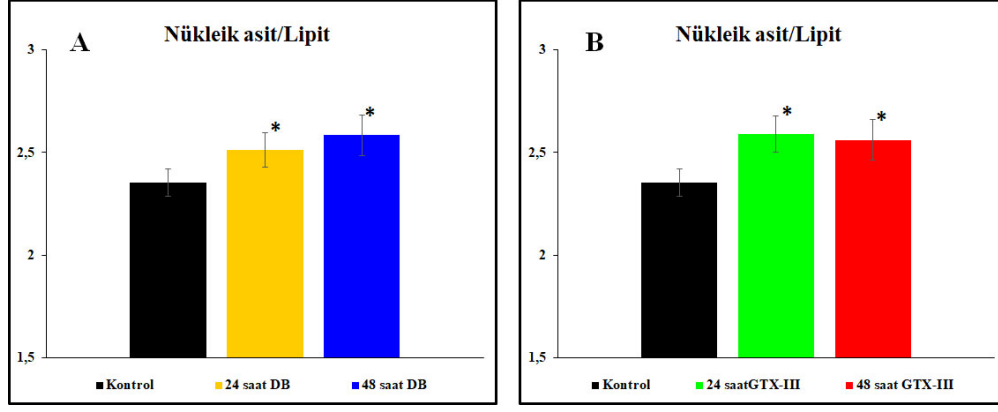


Şekil 3.49. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Amid I/Amid II bant alan oranındaki değişiklikler (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).

Nükleik asit/protein oranının DB uygulamasından 24 ve 48 sonra incelenmiş gruplar için bar diyagramı Şekil 3.50.a'da, GTX uygulamasından 24 ve 48 sonra incelenmiş gruplar için Şekil 3.50.b'de verilmiştir. Nükleik asit/lipit oranının DB uygulamasından 24 ve 48 sonra incelenmiş grupların alan değerindeki değişikliklerin bar diyagramı Şekil 3.51.a'da, GTX uygulamasından 24 ve 48 sonra incelenmiş grupların alan değerindeki değişikliklerin bar diyagramı Şekil 3.51.b'de verilmiştir. Bu oranlarda meydana gelen değişikliklere bakıldığında, DB ve GTX uygulamasından 24 ve 48 saatlik süre sonunda incelenmiş grupların her birinde anlamlı derecede artışlar ($p<0,05$) olduğu görülmektedir.

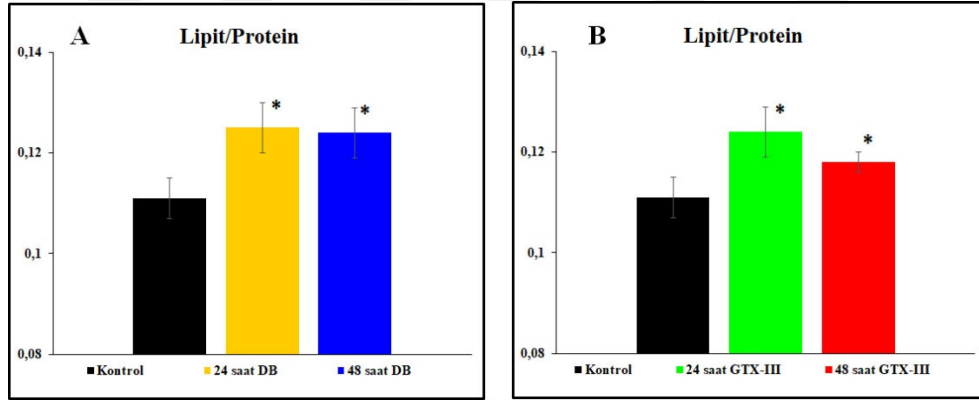


Şekil 3.50. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Nükleik asit/Protein bant alan oranındaki değişiklikler (* $p<0,05$).



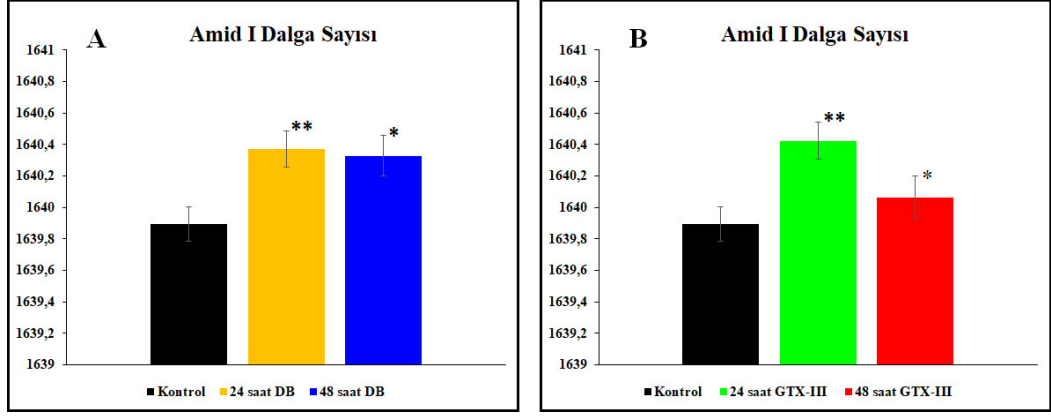
Şekil 3.51. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Nükleik asit/Lipit bant alan oranındaki değişiklikler (* $p < 0,05$).

Şekil 3.52.a'da DB uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş grupların lipit/protein oranı değerindeki değişikliklerin bar diyagramı, Şekil 3.52.b'de ise aynı oran için GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş grupların bar diyagramı verilmiştir. Bu şekillerden görüldüğü gibi DB ve GTX uygulamasından hem 24 hem de 48 saat sonra incelenmiş grupların lipit/protein oran değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı derece artışlar ($p < 0,05$) meydana gelmiştir (Şekil 3.52A).



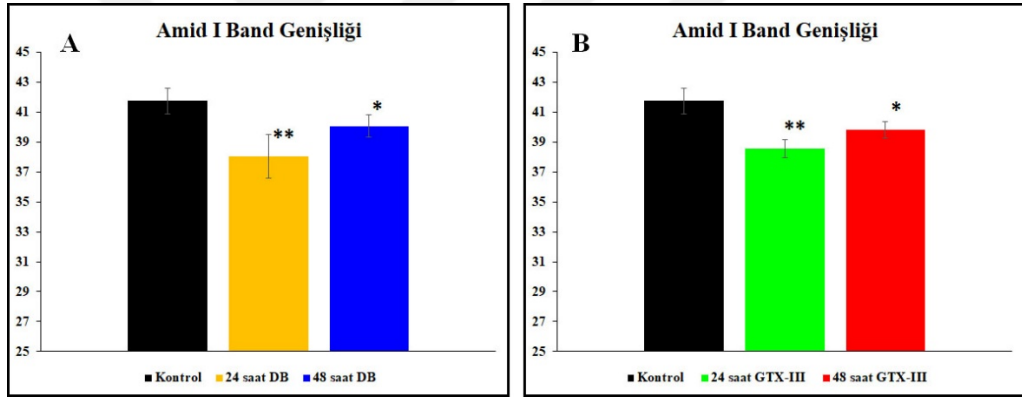
Şekil 3.52. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Lipit/Protein bant alan oranındaki değişiklikler (* $p < 0,05$).

Protein konformasyonundaki değişiklikler hakkında bilgi edinmek için hesaplanan Amid I bantının dalga sayısı ve bant genişliklerindeki değişikliklerin bar diyagramı Şekil 3.53 ve Şekil 3.54'te verilmiştir. Şekil 3.53.a'dan DB uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş grupların Amid I bandı dalga sayısında anlamlı bir artış olduğu görülmektedir. Şekil 3.53.b'de bu bantın dalga sayısında GTX uygulamasından 24 saat sonra anlamlı derece artma ($p < 0,05$, $p < 0,01$) meydana geldiği ancak 48 saatlik süre sonunda herhangi bir anlamlı değişiklik meydana gelmediği görülmüştür.



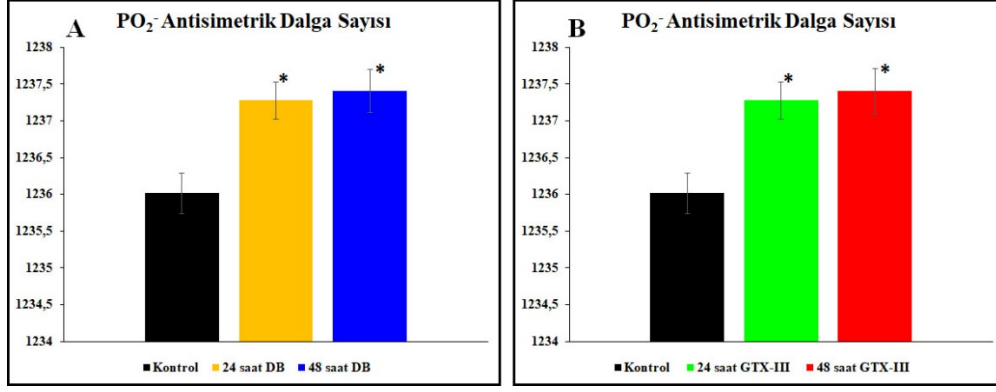
Şekil 3.53. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Amid I dalga sayısı değerleri (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Şekil 3.54'ten görüldüğü üzere Amid I bandının bant genişliğinde DB ve GTX uygulamasından 24 ve 48 saatlik süre sonunda incelenmiş grupların her birinde anlamlı derecede azalma ($p < 0,05$, $p < 0,01$) olmuştur.



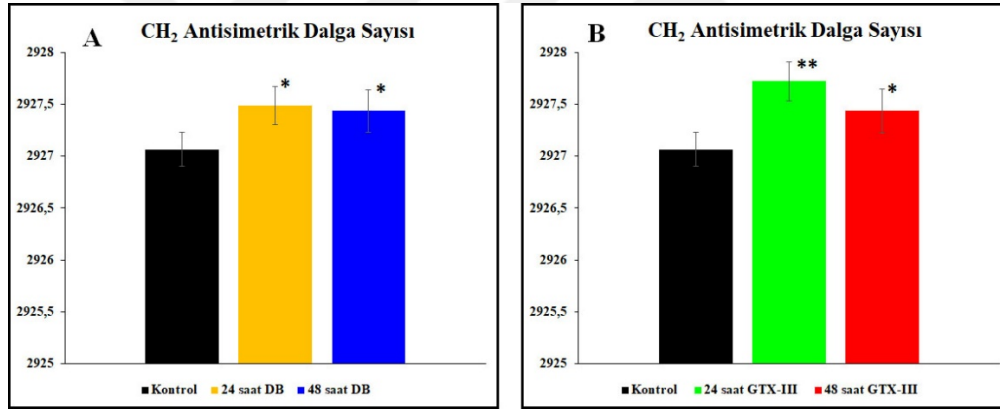
Şekil 3.54. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının Amid I bant genişliği değerleri (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Şekil 3.55'te PO_2^- antisimetrik bantının dalga sayısında meydana gelen değişikliklerin bar diyagramı verilmiştir. Şekilden de görüldüğü üzere DB ve GTX uygulamasından 24 ve 48 saatlik süre sonunda incelenmiş grupların her birinde anlamlı derecede artma ($p < 0,05$) meydana gelmiştir.

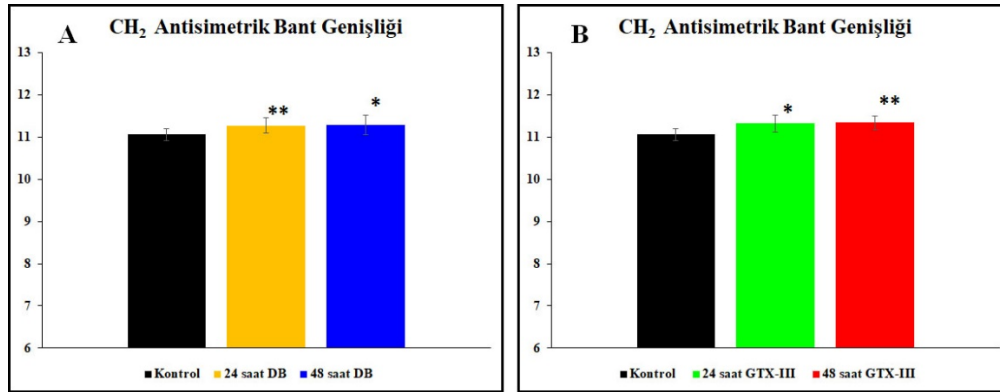


Şekil 3.55. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının PO₂⁻ antisimetrik dalga sayısı değerleri (*p<0,05).

CH₂ antisimetrik bantlarının dalga sayısı ve bant genişliğinde meydana gelen değişikliklerin bar diyagramı Şekil 3.56 ve Şekil 3.57’te verilmiştir. Şekillerden görüldüğü üzere DB ve GTX uygulamasından 24 ve 48 saatlik süre sonunda incelenmiş tüm uygulama gruplarında anlamlı artışlar (p<0,05, p<0,01) meydana gelmiştir.



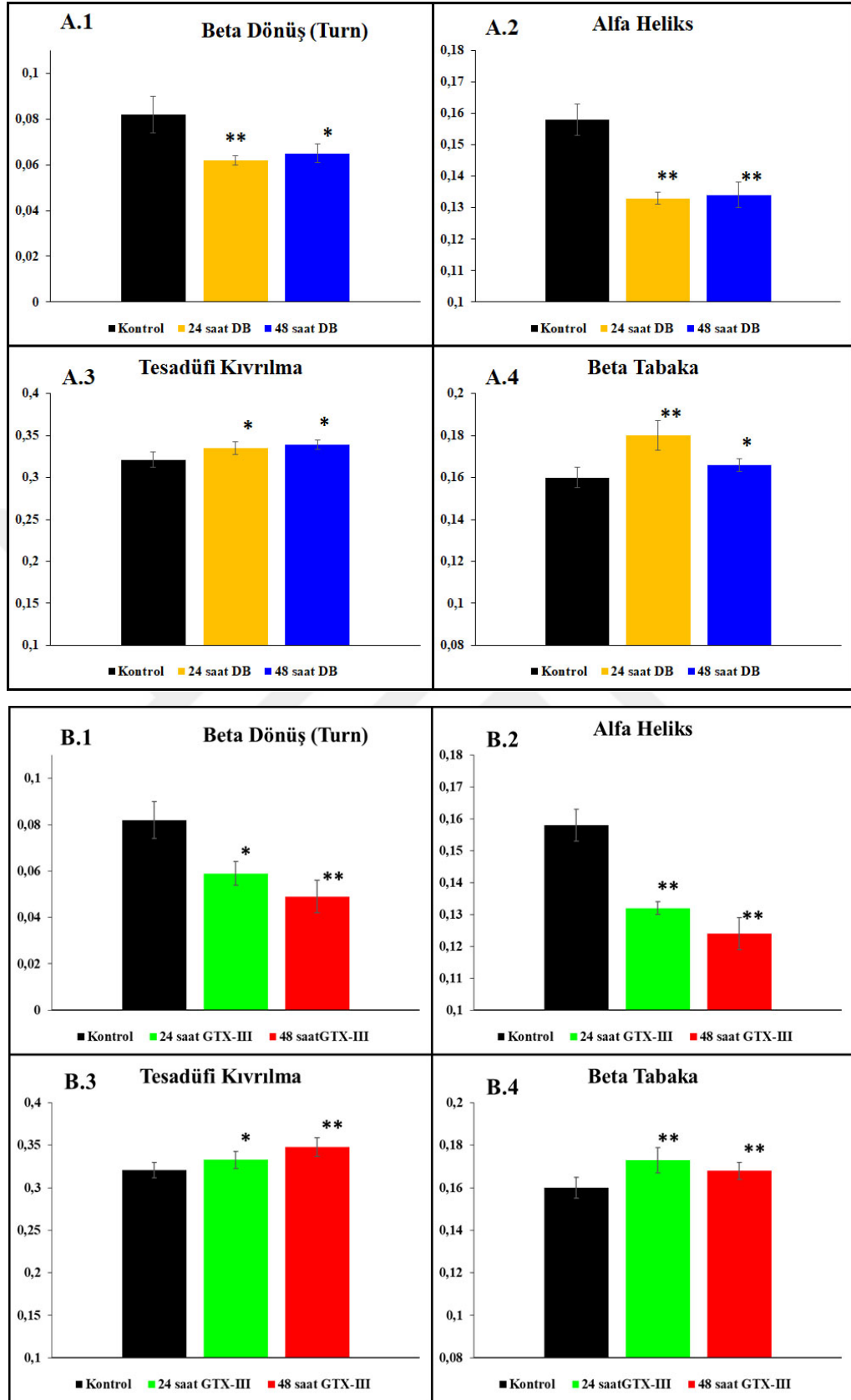
Şekil 3.56. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH₂ antisimetrik dalga sayısı değerleri (*p<0,05, **p<0,01).



Şekil 3.57. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının CH₂ antisimetrik bant genişliği değerleri (*p<0,05, **p<0,01).

İkincil türev spektrumundaki protein ikincil yapı bantlarındaki değişimler Şekil 3.58.a ve b'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere; DB ve GTX uygulanmasından hem 24 hem de 48 saat sonra incelenmiş grupların beta dönüş (turn) ve alfa-heliks yapılarında anlamlı azalmalar, tesadüfi kıvrılma ve beta tabaka yapılarında ise anlamlı artışlar meydana gelmiştir.





Şekil 3.58. Kontrol, a) DB, b) GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş gruplarının protein ikincil yapı değerleri (*p<0,05, **p<0,01).

3.2. TARTIŞMA

3.2.1. DB ve GTX-III'ün Karaciğer Dokusu Üzerindeki Doza Bağlı Etkileri

Biyolojik dokulardaki moleküllerin fonksiyonları yapılarına bağlıdır. ATR-FTIR spektroskopisi tekniği kullanılarak moleküllerdeki yapısal değişimler son derece detaylı bir şekilde ortaya konabilmektedir [111]. Çalışmamızın birinci bölümünde bu teknik, DB ve GTX-III'ün karaciğer dokusundaki proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler ve lipidlerin yapılarındaki, bileşimlerindeki ve fonksiyonlarındaki doza bağlı değişimler hakkında bilgi sahibi olmak için kullanılmıştır. Bu bölümün sonuçları, DB ve GTX-III'ün fare karaciğerini oluşturan biyomoleküllerin konsantrasyonlarında, içeriklerinde, yapılarında ve tüm bunlarla ilişkili olarak fonksiyonlarında doza bağlı anlamlı değişimler meydana getirdiğini göstermiştir.

3283 cm^{-1} 'deki Amid A bantı ağırlıklı olarak proteinlerdeki N-H gerilme titreşimlerinden ve polisakkaritler ve sudaki O-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır [117]. 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra bu bantın altında kalan alan anlamlı derecede azalmıştır (Şekil 3.3). Çalışmamızda örnekler hazırlanırken su ortamdan tamamen uzaklaştırıldığı için suyun bu banta etkisi ihmal edilebilir ve bu bantın sadece polisakkaritler ve proteinlerden kaynaklandığı kabul edilebilir [117]. Sonuçta bu bantın alan değerinde gözlenen bu anlamlı azalma, glikojen konsantrasyonundaki bir azalmayı gösteren glikojen O-H soğurmasından gelen katkının azalmasından kaynaklanmış olabilir. Bu sonuç, 1800-950 cm^{-1} bölgesinde gözlenen bantlardan elde ettiğimiz sonuçlarla desteklenmektedir. Örneğin 1041 cm^{-1} 'de gözlenen ve ana glikojen bantı olarak adlandırılan C-O gerilme bantının alanı bütün gruplarda anlamlı derecede azalmıştır (Şekil 3.12). Ayrıca 1081 cm^{-1} 'de ortaya çıkan ve glikojenden çok güçlü sinyaller alan PO_2^- simetrik gerilme bantının alanında 25 ve 50 mg/kg DB uygulanmış gruplarda anlamlı derecede azalmıştır (Şekil 3.11). Glikojen miktarındaki değişiklikleri daha net bir şekilde ortaya koyabilmek için, ayrıca C-O/protein ve C-O/lipit oran analizleri yapılmış ve bu iki oranın tüm gruplarda anlamlı derecede azaldığı görülmüştür (Şekil 3.13) [125]. Bu sonuç, karaciğer dokusunda DB'nin bütün dozları ve GTX-III uygulamasından sonra glikojen miktarının azaldığı sonucunu doğrulamaktadır. Kükner ve ark. (2016) benzer dozlarla ışık mikroskobu düzeyinde yapmış oldukları önceki bir çalışmada 75 mg/kg DB uygulanmasından sonra farelerde karaciğer yağlanması (steatoz) meydana geldiğini tespit etmişlerdir [70].

Karaciğer yağlanması, hepatositlerde yağ vezikülleri oluşumuna neden olan hücre içi lipit birikmesidir [70]. Karaciğer dokusundaki lipit birikiminin aynı zamanda dokuda glikojen miktarında azalmaya sebep olduğu bilinmektedir [126]. Daha önceki bir FTIR spektroskopisi çalışmasında, karaciğer yağlanması sonucu ortaya çıkan lipit konsantrasyonundaki bir artış ile birlikte glikojen konsantrasyonunda bir azalma meydana geldiği gösterilmiştir [103]. Sonuç olarak çalışmamızda gözlediğimiz glikojen konsantrasyonundaki azalma, dokuda meydana gelmiş olan lipit birikiminden kaynaklanmış olabilir.

DB ve GTX-III'ün lipit içeriğinde meydana getirdiği değişiklikleri incelemek amacıyla C-H gerilme bölgesinde yer alan bantların alan ve oran analizleri yapılmıştır. Doymuş lipitlerle ilgili bilgi veren bantların (CH₃ antisimetrik, CH₂ antisimetrik ve CH₂ simetrik) alan analiz sonuçları, 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış gruplarda anlamlı artışlar olduğunu göstermiştir (Şekil 3.4). Lipit içeriği hakkında bilgi edinmek için kullandığımız CH₂ sim./CH₂ sim.+antisim. ve CH₂ antisim./CH₂ sim. oranlarında meydana gelen artışlar 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış karaciğer dokularında doymuş lipit miktarında artış meydana geldiği sonucunu desteklemektedir (Şekil 3.14). Benzer şekilde, doymuş lipitlerden kaynaklanan bir diğer bant olan CH₂ bükülme bantının altında kalan alanda 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra anlamlı derecede artmıştır (Şekil 3.7). Yukarıda da bahsedildiği gibi Kükner ve ark. (2016) 75 mg/kg DB uygulamasından sonra, dokudaki lipit miktarındaki artışın bir sonucu olarak karaciğerde yağlanma gözlemlemiştirler [70]. Daha önce yapılmış olan bu çalışma ile uyumlu bir şekilde sonuçlarımız, 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasının doymuş lipitlerin miktarında bir artışa ve aynı zamanda karaciğer dokusundaki glikojen miktarında bir azalmaya neden olduğunu göstermektedir. Lipitler ve glikojen karaciğerin iki ana enerji depolama maddesidir. Bu organ fazla miktardaki karbonhidrat ve proteinleri lipitlere dönüştürdüğü için, sonuçlarımız 75 mg/kg DB ve GTX-III dozlarının karaciğerin enerji metabolizmasını önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir.

Sistemin doymamışlık seviyesi hakkında bilgi sahibi olabilmek için doymamış/doymuş lipit (olefinik=CH/lipit) oranı hesaplanmıştır. Doymamış yağ asitleri lipit peroksidasyonuna son derece duyarlı olduğundan bu oran ATR-FTIR spektroskopisi çalışmalarında lipit peroksidasyon indeksi olarak kullanılmaktadır [120]. Lipit peroksidasyonu sonucu doymamış yağ asitlerinde yani olefinik bağlarında bir azalma meydana geldiği bilinmektedir [124]. Sonuçlarımız 75 mg/kg DB ve GTX-III

uygulamasından sonra doymamış/doymuş lipit oranında bir azalma olduğunu göstermiştir (Şekil 3.15). Meydana gelen bu azalma sistemdeki doymamış lipit miktarında bir azalma meydana geldiğini göstermektedir. Bu azalma dokuda 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra meydana gelmiş olan lipit peroksidasyonunun bir sonucu olabilir. DB ve GTX ile yapılan çalışmalar uygulama sonrasında GTX'in oksidatif stresi indüklediği ve bu nedenle sistemde serbest radikaller meydana getirdiğini göstermiştir [108], [127]. Doymamış yağ asidi zincirindeki çift bağlar lipit peroksidasyonu oluşturan maddelere karşı oldukça duyarlıdır. DB içerisinde bulunan GTX-III'ün sodyum kanallarını etkilediği bilinmektedir [128]. GTX-III sodyum kanallarına açık pozisyondayken bağlanır ve kapanmalarını engeller. Böylece aksiyon potansiyeli uzun bir hiperpolarizasyon periyoduna girer. Dolayısıyla, hücre içi sodyum konsantrasyonu artarak sodyum/kalsiyum değişim mekanizmalarını etkiler [53]. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artış serbest radikallerin oluşumuna sebep olan temel mekanizmalardan biridir. Ayrıca literatürde, GTX'in karaciğer ve böbrek gibi organlarda bazı işlev bozukluklarına neden olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur [63], [108], [127], [129]. Organlarda meydana gelen fonksiyonel bozukluklar ve biyolojik sistemlerde meydana gelen hasarlar serbest radikal oluşumuna neden olabilir [108]. Oluşan serbest radikaller dokuda lipitler, proteinler ve nükleik asitlerle tepkimeye girerler. Lipitlerle tepkimeye girdiğinde sistemdeki lipit peroksidasyon zincir reaksiyonu tetiklenir ve bu reaksiyonlar sonucu lipitler parçalanır [120]. Lipit peroksidasyonu sonrası doymamış lipitlerin konsantrasyonu ve olefinik bağlarında azalma meydana gelir [130]. Dolayısıyla doymamış/doymuş lipit oranında gözlediğimiz azalma, dokudaki serbest radikallerin indüklediği lipit peroksidasyonuna bağlanabilir.

Lipitlerin yapısı ve bileşimindeki değişiklikleri değerlendirmek için incelenen oran analiz sonuçları 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra CH_2 /lipit ve karbonil/lipit oranında azalma, CH_3 /lipit oranında ise artma olduğunu göstermiştir (Şekil 3.16). CH_2 /lipit oranında meydana gelen azalma fosfolipitlerin zincir uzunluğunda azalma olduğunu, karbonil/lipit oranındaki azalma ise sistemdeki karbonil miktarında azalma olduğunu göstermektedir [120]. CH_3 /lipit oranında meydana gelen anlamlı artış ise 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasının sistemdeki metil konsantrasyonunu artırdığını göstermektedir [120]. Elde ettiğimiz bulgular, 75 mg/kg DB ve GTX-III'ün serbest radikal oluşturarak karaciğer dokusundaki lipit yapısında bozulmalara neden olduğunu ve GTX'in etki mekanizmalarından birinin oksidatif stres

oluşum potansiyeli ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Bu bulgular, farklı dokularda DB ve GTX-III uygulamasından sonra lipit peroksidasyonunun gözleendiği önceki çalışmalarla uyum içindedir. Örneğin, Eraslan ve ark. (2018) yaptıkları bir çalışmada farklı DB dozlarının oksidatif stresi indüklediği ve antioksidan enzim seviyesinde değişikliklere neden olduğunu, ayrıca malondialdehit (MDA), nitrik oksit ve 4-hidroksinonenal gibi oksidatif stres markörlerinin oluşumunu uyardığını bildirmiştir. Bu çalışmada gözlenen MDA ve antioksidan enzim seviyelerindeki artış lipit peroksidasyonunun bir sonucudur [109]. Ayrıca Kükner ve ark. (2016) 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra karaciğerde enflamasyon gözlemlemiştir [70]. Serbest radikaller enflamasyon oluşumunda rol aldığından karaciğerdeki enflamasyon ortamı serbest radikal oluşumuna sebep olabilir ve oluşan bu serbest radikaller lipit peroksidasyonuna katkı sağlamış olabilir.

DB ve GTX-III'ün protein içeriğinde meydana getirdiği değişiklikleri incelemek amacıyla Amid I, II ve III bantlarının alan analizleri yapılmıştır. Protein konsantrasyonu ile ilgili bilgi veren bu bantların alan değerleri 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış gruplarda anlamlı derecede artmıştır (Şekil 3.6, Şekil 3.9). Ayrıca, 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra AmidI/AmidI+II oranında gözlediğimiz artış bu dozlarda karaciğer dokularında protein miktarında artış meydana geldiği sonucunu desteklemektedir (Şekil 3.17). Literatürde DB zehirlenmesinden sonra aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz gibi karaciğer enzimlerinde artış gözleendiğini rapor eden çalışmalar vardır [62], [63], [108]. Dolayısıyla karaciğerdeki protein miktarında gözlediğimiz bu artış DB ve GTX'e bağlı zehirlenme sonrası ortaya çıkan enzimlerin sentezindeki artıştan kaynaklanmış olabilir. Bu bantlara ek olarak proteinlerden güçlü sinyaller alan bir bant olan CH₃ simetrik gerilme bantının alanında 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra meydana gelen artış, proteinlerde bir artış olduğu sonucunu desteklemektedir (Şekil 3.5). Ayrıca sistemdeki yağ asitleri ve aminoasitlerden kaynaklanan bir bant olan COO⁻ simetrik gerilme bantının alanında 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra artış gözlenmiştir (Şekil 3.8). Meydana gelen bu artış proteinlerle ve lipitlerle ilgili analizlerimizden elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir.

Amid I ve Amid II bantlarının pozisyon ve şekillerinde meydana gelen değişiklikler proteinlerdeki konformasyonel değişiklikler hakkında bilgi vermektedir [120]. Çalışmamızda, proteinlerde meydana gelen yapısal değişikliklerle ilgili bilgi edinebilmek

için Amid I bantına ait spektrumların bant genişliği, dalga sayısı ve bunlara ek olarak Amid I/Amid II oranı incelenmiştir. Amid I bantının dalga sayısının 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra arttığı, bant genişliğinin ise azaldığı görülmüştür (Şekil 3.21). Dalga sayısında meydana gelen bu azalma ve bant genişliğinde gözlenen bu artış protein konformasyonunda bir değişiklik olduğunu göstermektedir [122]. Bu sonuç, 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra Amid I/Amid II oranında meydana gelen azalma ile de desteklenmiştir (Şekil 3.18). Proteinlerdeki yapısal değişimleri belirlemek bazı patolojik durumlarda proteinlerin fonksiyonlarını anlamak açısından son derece önemlidir. Dokuda meydana gelen herhangi bir patolojik durumun, Amid I/Amid II oranında azalmaya ve dolayısıyla protein yapısında değişikliğe sebep olduğu önceki FTIR çalışmalarında gösterilmiştir [118], [122].

Proteinlerin ikincil yapısında meydana gelen değişiklikler hakkında daha detaylı bilgi sahibi olabilmek için gerçekleştirdiğimiz ikincil türev analiz sonuçlarına göre 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra beta dönüş ve alfa heliks yapılarında azalma, tesadüfi kıvrılma ve beta tabaka yapılarında artma meydana gelmiştir (Şekil 3.24). Tesadüfi kıvrılma yapısında meydana gelen bu artış 75 mg/kg DB ve GTX-III'ün protein denaturasyonuna sebep olduğunu göstermektedir [101]. Karaciğerde gözlenen protein denaturasyonu sistemdeki serbest radikallerin miktarındaki artıştan kaynaklanmış olabilir [47]. Proteinlerin işlevlerini düzgün bir şekilde yerine getirebilmeleri üç boyutlu yapılarına bağlıdır. Protein katlanması sırasında oluşabilecek hatalar protein ikincil yapısında farklılıklara dolayısıyla fonksiyonel hasarlara yol açabilir. DB'de bulunan GTX'lerin indüklediği serbest radikal oluşumundaki artış hücrenin redoks potansiyelini değiştirerek protein ikincil yapısında değişikliklere sebep olabilir [131]. Serbest radikallerin proteinlerde dejenerasyona ve agregasyona sebep olarak protein hasarına yol açtığı bilinmektedir [47]. Daha önce yapılan bir çalışmada sıçan karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonu ile protein sentezinde meydana gelen hasar arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir [132]. Sonuçlarımız, 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra protein ikincil yapısında önemli bozulmalar olduğunu açıkça ortaya koymuştur. 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış gruplarda gözlenmiş olan protein yapısında ve fonksiyonundaki değişiklikler, gen ekspresyon seviyesi ya da protein sentezindeki değişikliklerin sonucu ortaya çıkmış olabilir.

75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra PO_2^- antisimetrik gerilme bantının alanında gözlemlediğimiz artış sistemdeki nükleik asitlerin miktarında artış olduğunu

göstermektedir (Şekil 3.10) [117]. Ayrıca, 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış gruplarda bu bantın dalga sayısında yüksek değere doğru bir kayma meydana gelmiştir (Şekil 3.22). Bu kayma, nükleik asitlerin hidrojen bağlama kapasitesinde meydana gelmiş olan bir azalmanın ve bu gruplardaki nükleik asitlerin konformasyonlarında meydana gelmiş olan bir değişimin sonucu ortaya çıkmış olabilir [115]. Ayrıca, karaciğer dokularındaki nükleik asit yapı ve konformasyonundaki değişiklikleri gözlemek için nükleik asit/lipit ve nükleik asit/protein oran analizleri yapılmış ve bu oranların 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış gruplarda arttığı tespit edilmiştir (Şekil 3.19). Bu sonuçlar, 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasına bağlı olarak nükleik asit yapı ve konformasyonunda değişiklikler meydana geldiği sonucunu doğrulamıştır. Ayrıca, proteinlerle ilgili bulgularımızı desteklemektedir. Sonuç olarak protein konsantrasyon ve yapısında gözlenen değişikliklerin sebeplerinden birisi 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra gen ekspresyon seviyesinde ortaya çıkan farklılıklar olabilir [115].

Lipit/protein oranı, sistemdeki lipit ve protein metabolizmasında meydana gelen değişimler ve hücre fonksiyonlarda çok önemli olan lipit ve/veya protein asimetrisi hakkında bilgi vermektedir [120]. Ayrıca bu orandaki herhangi bir değişim membran yapısını, düzenini ve akışkanlığını etkilemektedir [133]. 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra lipit/protein oranında bir artış gözlenmiştir (Şekil 3.20). 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra hem lipit hem de protein içeriğinde bir artış gözlediğimizden bu oranda meydana gelen artış lipit miktarında daha büyük bir artış olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu artış 75 mg/kg DB ve GTX-III'ün karaciğer hücre zarlarında lipit ve protein asimetrisinde değişiklikler olduğunu göstermekte ve lipit ve protein metabolizmasında değişiklikler olduğu sonucunu desteklemektedir [120]. Lipit ve/veya protein asimetrisindeki değişikliklerin hücre içi ve hücreler arası iyon konsantrasyonlarında ve bunun sonucunda membran fonksiyonunda önemli değişikliklere sebep olduğu bilinmektedir [111].

Hücre zarının ana bileşenleri olan lipitlerin düzeni ile ilgili parametreler ve akışkanlıkları hücre zarının fonksiyonunu normal bir şekilde sürdürebilmesi için çok önemlidir. Sistemdeki membranların düzeni ve akışkanlığı hakkında bilgi edinmek için CH₂ antisimetrik bantının dalga sayısı ve bant genişliği hesaplanmıştır [123]. 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra bu bantın dalga sayısında bir artış gözlenmiştir (Şekil 3.23). Bu artış membran düzeninin azaldığını ve zardaki lipitlerin açıl zincir

esnekliğin arttığını göstermektedir. Benzer şekilde, 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra bu bantın genişlik değerinde belirgin bir artış gözlenmiştir (Şekil 3.23). Bu artış, 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra membran lipit akışkanlığında bir artış meydana geldiğini göstermektedir. Sonuç olarak, 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulaması karaciğer dokusunda membran düzenini azaltmış, membran akışkanlığını artırmıştır. Bu değişiklikler 75 mg/kg DB ve GTX-III tarafından indüklenen oksidatif strese ve onu takip eden lipit kompozisyon ve konsantrasyonundaki farklı lipit çeşitlerinin birbirine göre oranlarındaki ve lipit/protein oranındaki değişikliklerden kaynaklanmış olabilir. Önceki bir çalışmada oksidatif strese bağlı olarak membran düzeninde bir azalma meydana geldiği elektron paramanyetik spektroskopisi ile tespit edilmiştir [134]. Biyolojik membranlar madde transferi, sinyal iletimi ve membrana bağlı enzimlerin aktivitesi gibi bir takım önemli fonksiyonları kontrol etmektedir. Ayrıca membran düzeni ve dinamiğinde, membranlarda bulunan proteinlerin ikincil yapılarında ve moleküler içerikte meydana gelen değişikliklerin iyon kanallarının bütünlüğüne ve işlevine zarar vererek birçok hastalığa yol açtığı bilinmektedir [120]. Tüm bu nedenlerden dolayı, membran düzeninin ve akışkanlığının optimum seviyede tutulması gerekir. GTX'in yağda çözünen bir toksin olduğu ve GTX'lerin hücre üzerindeki etkilerinin hücre membranlarındaki değişikliklerden kaynaklandığı bilinmektedir [52]. Sonuçta, membranının düzeni ve akışkanlığı, GTX'lere olan geçirgenlik derecesi için çok önemlidir. Literatürle uyumlu olarak sonuçlarımız 75 mg/kg DB ve GTX-III'ün membran düzen ve akışkanlığında değişikliklere sebep olarak hücre membranının normal fonksiyonunu bozduğunu göstermiştir. Hücre membranında gözlediğimiz bu zararlı etkiler DB içindeki GTX'lerin toksik mekanizmalarından birisi olabilir.

3.2.2. DB ve GTX-III'ün Karaciğer Dokusu Üzerindeki Zamana Bağlı Etkileri

Çalışmamızın birinci bölümünün sonuçları, 25 ve 50 mg/kg'lık DB dozlarının 24 saatlik süre sonunda karaciğer dokusunda glikojen miktarını azaltmak dışında herhangi bir etki göstermediğini ancak 75 mg/kg DB ve içindeki toksik maddenin saf hali olan GTX-III'ün bu dokuda önemli zararlı etkiler meydana getirdiğini göstermiştir. Bu nedenle, ikinci bölümde 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış gruplarda meydana gelen zararlı etkilerin 48 saatlik süre sonunda normale dönüp dönmediğini araştırmak amacıyla sadece bu iki doz üzerinde zamana bağlı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda 75 mg/kg DB ve GTX-III verilmiş fare karaciğerleri uygulamadan 24 ve

48 saat sonra incelenmiş sonuçlar birbiriyle karşılaştırılmıştır.

DB ve GTX'in 24 ve 48 saatlik uygulama gruplarının spektrumlarının karşılaştırıldığı üç spektral bölgedeki şekillere (Şekil 3.25, Şekil 3.27, Şekil 3.32) bakıldığında, DB ve GTX uygulamasından 24 saat sonra elde edilen bütün spektrumlar kontrol spektrumundan oldukça farklı olmasına rağmen, 48 saat sonra elde edilen spektrumların bazılarının kontrol grubuna çok yakın ve benzer olduğu, bazılarının ise kontrol grubundan uzak ve farklı olduğu görülmektedir. Örneğin $3700-3025\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığındaki Amid A bantı incelendiğinde DB ve GTX uygulamasından 24 saat sonra analiz edilen karaciğer spektrumlarının kontrol spektrumundan son derece farklı ve uzak olduğu, ancak 48 saat sonra analiz edilen karaciğer spektrumlarının kontrol spektrumuna daha yakın olduğu görülmektedir (Şekil 3.25). C-H gerilme bölgesinde 24 saatlik DB uygulaması spektrumunun kontrol spektrumundan oldukça farklı ve uzak olduğu ancak 48 saatlik DB uygulaması spektrumunun kontrol grubuna biraz daha yaklaştığı görülmektedir (Şekil 3.27.a). Aynı bölgedeki GTX uygulanmış fare karaciğer spektrumlarına bakıldığında ise 24 ve 48 saatlik uygulama spektrumlarının birbirine çok yakın olduğu, her ikisinin neredeyse üst üste çakıştığı ve kontrol spektrumundan oldukça uzakta ve farklı oldukları görülmektedir (Şekil 3.27.b). Parmak izi bölgesinde ($1800-950\text{ cm}^{-1}$) hem DB'nin hem de GTX'in 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinin sonunda elde edilen spektrumların birbirine çok benzediği ve ikisinin de kontrol spektrumundan oldukça uzak olduğu görülmektedir (Şekil 3.32). Bu şekillerden anlaşıldığı ve çalışmamızın birinci bölümünün sonuçlarının detaylı bir şekilde ortaya koyduğu gibi DB ve GTX'in 24 saatlik uygulaması karaciğer dokusu üzerinde önemli değişiklikler meydana getirirken, 48 saat sonra bu etkilerin bazıları normale dönmekte bazılarının etkisi ise aynen devam etmektedir. Bu sonuç, aşağıda açıklanacağı gibi spektrumların bant alanı, bant alan oranı, bant dalga sayısı ve genişliği analizlerinden elde ettiğimiz sayısal analiz sonuçları ile daha detaylı olarak ortaya konmuştur.

Birinci bölümde de açıklandığı gibi DB'nin 24 saatlik uygulama süresi sonunda sistemdeki doymuş lipidlerin miktarında artış gözlenmiştir. DB'nin 48 saatlik uygulama gruplarına bakıldığında ise doymuş lipidlerin miktarında kontrol grubuna göre herhangi anlamlı bir değişikliğin olmadığı görülmüştür (Şekil 3.28, Şekil 3.29, Şekil 3.30, Şekil 3.42, Şekil 3.43). Bu sonuç, DB'nin lipid metabolizmasında 24 saat içinde meydana getirdiği değişikliğin 48 saatlik süre sonunda normale döndüğünü göstermektedir. GTX uygulamasından sonra ise hem 24 hem 48 saatlik uygulama süreleri sonunda doymuş

lipitlerin miktarında önemli derecede artışlar meydana gelmiştir (Şekil 3.28, Şekil 3.29, Şekil 3.30, Şekil 3.42, Şekil 3.43). Bu sonuç, GTX'in dokudaki toksik etkisinin 48 saat boyunca devam ettiğini ortaya çıkarmıştır. Yani 48 saatlik süre DB'nin doymuş lipitler üzerinde meydana getirdiği zararlı etkiyi normale döndürmek için yeterli olmuş ancak GTX'in yarattığı etkiyi normale döndürmek için yeterli olmamıştır. Birinci bölümdeki sonuçlarımız lipit miktarındaki artışla birlikte sistemdeki glikojen miktarında bir azalma meydana geldiğini göstermiştir. Daha önce de belirtildiği gibi 3283 cm⁻¹'deki Amid A bantı proteinlerden ve polisakkaritlerden sinyaller almaktadır. Bu bantın alan değeri DB ve GTX'in 24 saatlik uygulama gruplarında anlamlı derecede azalmıştır (Şekil 3.25, Şekil 3.26). Biz çalışmamızda ana protein bantları olan Amid I ve II bantlarının alan değerlerinde anlamlı artışlar gözlediğimiz için bu banttaki azalma glikojendeki azalmaya atfedilebilir [99], [110], [117], [135]. Dolayısıyla, DB ve GTX'in 24 saatlik uygulama sonrasında bu bantın alan değerinde gözlenen azalma sistemdeki glikojen konsantrasyonundaki azalmadan kaynaklanmış olabilir. Amid A bantı DB ve GTX uygulamasından 48 saat sonra incelendiğinde ise bantın alan değerinin kontrole yaklaştığı ve kontrole arasında anlamlı bir fark olmadığı ortaya çıkmıştır (Şekil 3.25, Şekil 3.26). Bu sonuç DB ve GTX'in glikojen metabolizması üzerinde meydana getirdiği zararlı etkinin 48 saatlik süre içinde normale döndüğünü göstermektedir.

DB ve GTX'in hem 24 hem de 48 saatlik uygulama süresi sonunda, lipit peroksidasyonu indeksi olarak kullanılan doymamış/doymuş lipit oranı anlamlı derecede azalmıştır (Şekil 3.44). Lipit yapısı ve bileşimindeki değişiklikleri belirlemek için kullandığımız diğer oran analiz sonuçları incelendiğinde DB ve GTX uygulamasından 24 saat sonra CH₂/lipit ve karbonil/lipit oranlarında anlamlı azalma, CH₃/lipit oranında anlamlı artma meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 3.45, Şekil 3.46, Şekil 3.47). DB ve GTX'in 48 saatlik uygulama sonuçlarına bakıldığında genel olarak 24 saatlik uygulama sonuçları ile paralel ve istatistiksel olarak anlamlı olarak değiştiği görülmüştür. Bu sonuçlar karaciğer dokusunda 24 saat sonunda DB ve GTX etkisiyle ortaya çıkmış olan lipit peroksidasyonu ve lipitlerdeki yapısal değişimlerin 48 saatlik süre sonunda normale dönmediğini göstermektedir.

Sonuçlarımız, proteinlerden kaynaklanan bantların (Amid I, II ve III) bant alan değerlerinin DB ve GTX uygulamasından 24 saat sonra incelenen karaciğer dokusunda anlamlı derecede arttığını ortaya çıkarmış ve bu artışın etkilerinin uygulamadan 48 saat sonra da devam ettiğini göstermiştir (Şekil 3.33, Şekil 3.34, Şekil 3.37). Protein

bantlarına ilave olarak, hem aminoasitlerden hem de yağ asitlerinden sinyaller alan bir bant olan COO⁻ simetrik gerilme bantının alanında da DB ve GTX uygulamasından hem 24 hem de 48 saat sonra anlamlı derecede artışlar gözlenmiştir (Şekil 3.36). Proteinlerden sinyal alan CH₃ simetrik gerilme bantının alanı incelendiğinde, DB uygulamasından 24 saat sonra anlamlı derecede artış gözlenmiş ancak bu artış 48 saat sonra normale dönmüştür (Şekil 3.31.a). Aynı bant GTX uygulamasından sonra incelendiğinde ise 24 saat sonra meydana gelen anlamlı artışın 48 saat sonra da devam ettiği gözlenmiştir (Şekil 3.31.b). Bu durum CH₃ simetrik bantının lipitlerden de sinyal almasından kaynaklanmış olabilir. Bunlara ilave olarak protein miktarı hakkında bilgi edinmek için hesapladığımız AmidI/Amid I+II oran değerinde DB ve GTX uygulamasından 24 saat sonra meydana gelen artışın 48 saat sonra normale dönmediği görülmektedir (Şekil 3.48). Tüm bu sonuçlar DB ve GTX uygulamasından 24 saat sonra fare karaciğeri protein miktarında meydana gelen artışın 48 saat sonra da devam ettiğini göstermektedir. Bundan başka DB ve GTX'in hem 24 hem de 48 saatlik uygulamasından sonra Amid I bantının dalga sayısında meydana gelen artış (Şekil 3.53), bant genişliğinde ise bir azalma gözlenmiştir (Şekil 3.54). Birinci bölümde de açıklandığı gibi bu artış ve azalma proteinlerin yapısında bir değişiklik olduğunu göstermektedir. Ayrıca Amid I/II oranında hem 24 hem 48 saat sonra anlamlı azalmalar gözlenmiştir (Şekil 3.49). DB ve GTX uygulamasının proteinlerin ikincil yapılarında meydana getirdiği değişiklikler zamana bağlı olarak incelendiğinde hem 24 hem de 48 saatlik uygulama sürelerinin sonunda beta dönüş (turn) ve alfa-heliks yapılarında anlamlı bir azalma, tesadüfi kıvrılma ve beta tabaka yapılarında ise anlamlı bir artış olduğu görülmüştür (Şekil 3.58). Tüm bu sonuçlar DB ve GTX uygulamasının proteinlerde meydana getirdiği konformasyonel ve yapısal değişimlerin etkisinin 48 saat boyunca devam ettiğini göstermektedir.

Sistemdeki nükleik asit miktarındaki değişikliği analiz etmek için PO₂⁻ antisimetrik bant alanı analiz edilmiş ve DB ve GTX'in sistemdeki nükleik asit miktarında bir artışa sebep olduğu ve bu artışın 48 saatlik uygulama süresi boyunca devam ettiği görülmüştür (Şekil 3.38). Ayrıca DB ve GTX uygulanmasından 24 saat sonra incelenen gruplarda bu bantın dalga sayısında artma meydana geldiği ve bu artışın 48 saat sonunda incelenmiş dokularda da meydana geldiği görülmüştür (Şekil 3.55). Karaciğer dokusundaki nükleik asit yapı ve konformasyonundaki değişiklikleri belirlemek için yapılan nükleik asit/protein ve nükleik asit/lipit oran analizleri DB ve GTX uygulandıktan 24 saat sonra meydana

gelen değişimlerin 48 saat sonunda da devam ettiğini ortaya çıkarmıştır (Şekil 3.50, Şekil 3.51). Bu sonuçlar, DB ve GTX uygulamasından sonra nükleik asit yapı ve konformasyonunda oluşan değişikliklerin 48 saat boyunca devam ettiğini göstermektedir. Ayrıca bu sonuçlar protein konsantrasyonu ve yapısında tespit ettiğimiz bulgular ile uyum içindedir.

Sistemdeki lipit ve protein metabolizması ile ilgili bilgiler veren lipit/protein oranı DB ve GTX uygulamasından hem 24 hem 48 saat sonra artmıştır (Şekil 3.52). Sistemdeki membran yapısı, düzeni ve akışkanlığı hakkında bilgi veren CH₂ antisimetrik gerilme bantının dalga sayısı ve bant genişliğindeki değişimler incelendiğinde DB ve GTX uygulamasından 24 saat sonra meydana gelen değişikliklerin 48 saat sonra da devam ettiği görülmüştür (Şekil 3.56, Şekil 3.57). Bu sonuç DB ve GTX uygulamasından sonra karaciğer dokusundaki membran düzeninde ve membran akışkanlığında meydana gelen değişikliğin 48 saat boyunca devam ettiğini göstermektedir. Elde ettiğimiz bu bulgulara göre DB ve GTX uygulamasının lipit ve protein metabolizmasında meydana getirdiği zararlı etkiler 48 boyunca devam etmektedir.



4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

DB zehirlenmesi ile ilgili daha önce gerçekleştirilmiş olan çalışmaların çoğu klinik düzeydedir. Literatürde, az sayıda olmakla birlikte deneysel çalışmalarda vardır. Ancak bunlar hücrede toksik etkilerin ortaya çıkmasında etkili olabilecek moleküler değişimler hakkında bilgi vermemektedir. Bu nedenle, çalışmamızın birinci bölümünde DB'nin toksik etkilerinden dolayı karaciğer hücrelerindeki biyomoleküllerin yani lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitlerin yapısı, kompozisyonu ve fonksiyonlarındaki değişimler doza bağlı olarak ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır.

Birinci bölümün sonuçları, 25 ve 50 mg/kg'lık DB dozlarının karaciğer dokusunda glikojen miktarındaki azalma dışında herhangi anlamlı bir değişikliğe sebep olmadığını göstermiştir. Ancak 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulaması glikojen miktarında azalmayla birlikte dokudaki lipitlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin yapı, kompozisyon ve fonksiyonlarında önemli değişikliklere sebep olmuştur. Örneğin, 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulaması karaciğerdeki doymuş lipit, protein ve nükleik asit miktarlarında önemli derece artışlara sebep olmuştur. 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra gözlenen doymamış/doymuş lipit, CH₂/lipit ve karbonil/lipit oranlarındaki azalmalar ve CH₃/lipit oranındaki artış sistemde lipit peroksidasyonu meydana geldiğini göstermektedir. Ayrıca 75 mg/kg DB ve GTX-III membran düzeninde azalmaya ve membran akışkanlığında artışa sebep olmuştur. DB'nin hücreler üzerinde meydana getirdiği etkilerin hücre zarında oluşturduğu değişiklikler sonucunda ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu yüzden hücre zarı ile ilgili elde ettiğimiz bu bulgu DB'nin hücrelerin fonksiyonlarını ne derecede ve nasıl etkilediğini ortaya çıkarabilmek için çok önemlidir. Protein ikincil yapı analizinden elde edilen sonuçlar, 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulamasından sonra karaciğer dokusunda tesadüfi kıvrılma yapılarında bir artış olduğunu dolayısıyla dokuda protein denaturasyonu meydana geldiğini göstermiştir. 75 mg/kg DB ve GTX-III uygulanmış gruplarda gözlenen tüm bu değişimlere protein ve nükleik asitlerin konformasyonlarında ortaya çıkan değişiklikler eşlik etmiştir. Özetle birinci bölümün sonuçları karaciğer dokusu için toksik dozun 75 mg/kg'lık doz olduğunu ortaya çıkarmıştır. DB 75 mg/kg ve onun üzerindeki dozlarda tüketilmemelidir.

Çalışmamızın ikinci bölümünde, bu toksik dozun (75 mg/kg) ve GTX-III'ün

uygulandığı fare karaciğer dokuları 24 ve 48 saatlik süreler sonunda ATR-FTIR spektroskopisi ile analiz edilmiş ve sonuçlar birbiriyle karşılaştırılmıştır. Bu bölümden elde ettiğimiz sonuçlar, DB'nin karaciğer dokusunda meydana getirdiği lipit peroksidasyonu, protein ve nükleik asitlerin miktar, yapı ve konformasyonundaki, lipit düzen ve akışkanlığındaki değişikliklerin normale dönmesi için 48 saatlik sürenin yeterli olmadığını ancak doymuş lipitler ve glikojen metabolizmasının normale dönmesi için bu sürenin yeterli olduğunu göstermiştir. GTX saf halde verildiğinde ise sonuçların tümü toksik doz DB uygulamaları ile paralel çıkmış ancak 48 saatlik süre de normale dönme oranı DB verilmiş gruba göre daha az gözlenmiştir. Bu durum, DB'nin içindeki GTX miktarının saf olarak verilen konsantrasyona tam denk gelmemiş olmasından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca, DB'nin içinde GTX'ten başka antioksidan, antiradikal ve antimikrobiyal özellik gösteren birçok fenolik madde olduğu bilinmektedir [8]. Bu fenolik maddeler, DB'nin içindeki GTX'in dokuda yarattığı toksik etkinin iyileşmesine katkı sağlamış olabilir. Dolayısıyla, tüm bu faktörler GTX'in saf halinin etki süresinin daha uzun olmasına sebep olmuş olabilir.

Sonuç olarak çalışmamız, DB'nin tüketilen miktarının önemli olduğunu, bu balın rastgele tüketiminin biyolojik sistemlerde çok önemli zararlı etkilere sebep olabileceğini ve bu etkilerin hepsinin normale dönmesi için 48 saatlik sürenin yeterli olmadığını ortaya çıkarmıştır. DB halk tarafından bazı hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanıldığından, 25 ve 50 mg/kg'lık DB dozlarının karaciğer dokusunda glikojen miktarını azaltma dışında herhangi bir değişikliğe sebep olmaması ile ilgili bulgularımız DB'nin alternatif tıptaki kullanımı için çok önemlidir. Çalışmamızın sonuçları, DB'nin yanlış kullanımının önlenmesi için yararlı olabilir ve bu balın tıpa özellikle farmakolojiye entegre edilmesi aşamasında kullanılabilir. Ayrıca çalışmamızın sonuçları, DB'nin etki süresini öğrenmek ve DB zehirlenmesi vakalarında hastaların tedavi ve taburcu sürelerini belirlemek için faydalı olabilir.

Bu çalışma, Düzceli üreticilerden elde edilen DB'nin karaciğer dokusu üzerindeki yapısal, kompozisyonel ve fonksiyonel etkileri doza ve zamana bağlı olarak ortaya çıkaran ilk çalışmadır. Bunlara ilave olarak çalışmamız ATR-FTIR spektroskopisinin biyolojik dokularda toksik bir madde tarafından oluşturulan değişikliklerin hızlı ve hassas bir şekilde görüntülenebileceğini göstermiştir.

Bundan sonraki süreçte, çalışmamızda kullandığımız DB ve GTX-III dozlarından farklı dozlar kullanılarak ve yeni zaman dilimleri (72 saat, 96 saat, vb.) eklenerek karaciğer

dokusunda ve farklı başka dokularda meydana gelen etkilerin doza ve zamana bağlı olarak incelenmesi ile ilgili yeni projeler gerçekleştirilmesi planlanmaktadır.



5. KAYNAKLAR

- [1] R. Gami ve P. Dhakal, "Mad honey poisoning: A Review," *Journal of Clinical Toxicology*, c. 7, sayı 1, ss. 1–5, 2017.
- [2] I. K. Karabagias, A. Badeka, S. Kontakos, S. Karabournioti ve M. Kontominas, "Botanical discrimination of greek unifloral honeys with physicochemical and chemometric analyses," *Food Chemistry*, c. 165, ss. 181–190, 2014.
- [3] F. Karadal ve Y. Yıldırım, "Balın kalite nitelikleri, beslenme ve sağlık açısından önemi," *Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, c. 9, sayı 3, ss. 197–209, 2012.
- [4] C. Mutlu, M. Erbaş ve S. Arslan Tontul, "Bal ve diğer arı ürünlerinin bazı özellikleri ve insan sağlığı üzerine etkileri," *Akademik Gıda*, c. 15, sayı 1, ss. 75–75, 2017.
- [5] A. İslam, İ. Khalil, N. İslam, M. Moniruzzaman, A. Mottalib, S. Sulaiman ve S. Gan, "Physicochemical and antioxidant properties of bangladeshi honeys stored for more than one year," *Bio Med Centra Complementary and Alternative Medicine*, c. 12, sayı 177, ss. 1–10, 2012.
- [6] Ü. Cenk ve Ö. Küplülü, "Chemical quality of strained honey consumed in Ankara," *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, c. 50, sayı 1, ss. 1–1, 2006.
- [7] P. G. Rasgele ve M. Kekeçoğlu, "Physicochemical properties of rhododendron honey produced in Turkey," *Herba Polonica*, c. 59, sayı 3, ss. 88–97, 2014.
- [8] S. Silici, O. Sağdıç ve L. Ekici "Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of rhododendron honeys," *Food Chemistry*, c. 121, sayı 1, ss. 238–243, 2010.
- [9] R. Sıralı ve Ş. Cımbırtoğlu, "Ormangülü (rhododendron) türlerinin bazı özellikleri ve arıcılık açısından önemi," *Arıcılık Araştırma Dergisi*, c. 10, sayı 2, ss. 45–53, 2018.
- [10] S. Silici, O. D. Uluozlu, M. Tüzen ve M. Soylak, "Assessment of trace element levels in rhododendron honeys of black sea region turkey," *Journal of Hazardous Materials*, c. 156, sayı 1–3, ss. 612–618, 2008.
- [11] Z. Can, O. Yıldız, H. Şahin, E. Akyüz, S. Silici ve S. Kolaylı, "An investigation of turkish honeys: their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles," *Food Chemistry*, c. 180, ss. 133–141, 2015.
- [12] I. Koca ve A. F. Koca, "Poisoning by mad honey: A brief review," *Food and Chemical Toxicology*, c. 45, sayı 4, ss. 1315–1318, 2007.
- [13] A. Başgül, "Deli bal zehirlenmesi," *Yeni Tıp Dergisi*, c. 27, sayı 3, ss. 187–189, 2010.
- [14] R. Popescu ve B. Kopp, "The genus rhododendron: An ethnopharmacological and toxicological review," *Journal of Ethnopharmacology*, c. 147, sayı 1, ss. 42–

- 62, 2013.
- [15] A. Demircan, A. Keleş, F. Bildik, G. Aygencel, N. Ö. Doğan ve H. F. Gomez, “Mad honey sex: Therapeutic misadventures from an ancient biological weapon,” *Annals of Emergency Medicine*, c. 54, sayı 6, ss. 824–829, 2009.
- [16] N. Sütlüoğlu, A. Mat ve Y. Satganoğlu, “Poisoning by toxic honey in Turkey”, *Archives Toxicology*, c. 67, sayı 2, ss. 148–150, 1993.
- [17] M. Yarlıoğlu, M. Akpek, I. Ardıç, D. Elcik, O. Şahin ve M. G. Kaya, “Mad-honey sexual activity and acute inferior myocardial infarctions in a married couple,” *Texas Heart Institute Journal*, c. 38, sayı 5, ss. 577–580, 2011.
- [18] S. Ullah, S. Ullah Khan, S. Tawfik ve S. Fahad “Mad honey: uses, intoxicating/poisoning effects, diagnosis, and treatment,” *Royal Society of Chemistry*, c. 8, sayı 33, ss. 18635–18646, 2018.
- [19] S. A. Jansen, I. Kleerekooper, Z. Hofman ve I. Kappen, “Grayanotoxin poisoning: ‘Mad honey disease’ and beyond,” *Cardiovascular Toxicology*, c. 12, sayı 3, ss. 208–215, 2012.
- [20] F. Aliyev, C. Türkoğlu, C. Çeliker, I. Firatlı, G. Alici ve I. Uzunhasan, “Chronic mad honey intoxication syndrome: A new form of an old disease,” *Europace*, c. 11, sayı 7, ss. 954–956, 2009.
- [21] N. Öztaşan, K. Altinkaynak, F. Akçay, F. Göçer ve Ş. Dane, “Effects of mad honey on blood glucose and lipid levels in rats with streptozocin-induced diabetes,” *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, c. 29, sayı 5, ss. 1093–1096, 2005.
- [22] O. Pişkin, D. A. Yurtlu ve B. G. Aydın, “The use of ‘mad honey’ as an antihypertensive agent in rats a preliminary study,” *Kocatepe Tıp Dergisi*, c. 8, sayı 1, ss. 55–58, 2007.
- [23] O. Tatlı, Y. Karaca ve S. Türkmen, “Clinical study immune-mediated cochleovestibular disease,” *Bratislava Medical Journal*, c. 116, sayı 5, ss. 296–301, 2015.
- [24] Ö. Ertürk, F. P. Karakaş, D. Pehlivan ve N. Nas, “The antibacterial and antifungal effects of rhododendron derived mad honey and extracts of four rhododendron species,” *Turkish Journal Biological*, c. 33, sayı 2, ss. 151–158, 2009.
- [25] S. Silici ve A. T. Atayoglu, “Mad honey intoxication: A systematic review on the 1199 cases,” *Food Chemistry Toxicology*, c. 86, sayı 4, ss. 282–290, 2015.
- [26] N. Erdemoğlu, E. K. Akkol, E. Yeşilada ve I. Çalış, “Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive principles from a folk remedy, rhododendron ponticum luteum leaves,” *Journal of Ethnopharmacology*, c. 119, sayı 1, ss. 172–178, 2008.
- [27] A. Sahin, S. Türkmen, N. Güzel ve A. Gündüz “A comparison of the effects of grayanotoxin-containing honey (mad honey), normal honey, and propolis on fracture healing,” *Medical Principles and Practice*, c. 27, sayı 2, ss. 99–106, 2018.
- [28] E. K. Bilir, H. Tütün, S. Sevin, G. Kismali ve E. Yarsan, “Cytotoxic effects of rhododendron ponticum luteum extract on prostate carcinoma and

- adenocarcinoma cell line (DU145, PC3),” *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, c. 24, sayı 3, ss. 451–457, 2018.
- [29] L. F. Kebler, “Poisonous honey,” *Proceeding of American Pharmaceutical Association*, c. 44, sayı 4, ss.167-174, 1986.
- [30] T. Gökçel, *Xenophon: Anabasis, Onbinlerin Dönüşü*, 2. baskı, İstanbul, Türkiye: Sosyal Yayıncılık, 1984, ss.143-144.
- [31] A. Gündüz, Ö. Tatlı ve S. Türedi, “Does mad honey poisoning require hospital admission,” *American Journal of Emergency Medicine*, c. 27, sayı 4, ss. 424–427, 2009.
- [32] P. Eller ve K. Hochegger, “Honey intoxication and the Bezold-Jarisch reflex,” *International Journal of Cardiology*, c. 144, sayı 2, ss. 251, 2010.
- [33] A. Gündüz ve S. Türedi, “Clinical review of grayanotoxin/mad honey poisoning past and present,” *Clinical Toxicology*, c. 46, sayı 5, ss. 437–442, 2008.
- [34] D. N. Bölükbaşı. (2019, 3 Aralık). *Deli bal* [Online]. Erişim: http://www.duzce.edu.tr/dagem/.../Calistay_Sunum_10_DN_BOLUKBASI, 2010.
- [35] A. Bucak, “Zehirli bal,” *Farmakologia*, c. 8, sayı 2, ss. 33-40, 1938.
- [36] S. Biberöglü, K. Biberöglü ve B. Komsuoğlu, “Mad honey,” *Jama*, c. 259, sayı 4, ss. 218-219, 1988.
- [37] H. Özhan, R. Akdemir, M. Yazıcı, H. Gündüz, S. Duran ve C. Uyan, “Cardiac emergencies caused by honey ingestion: A single centre experience,” *Emergency Medicine Journal*, c. 21, sayı 6, ss. 742–744, 2004.
- [38] E. Dilber, M. Kalyoncu, N. Yariş ve A. Ökten, “A case of mad honey poisoning presenting with convulsion: Intoxication instead of alternative therapy,” *Turkish Journal of Medicine Science*, c. 32, sayı 4, ss. 361–362, 2002.
- [39] D. Çiçek, K. Gemici, U. Eryılmaz ve J. Cordan, “Karadeniz delibali ve andromedotoksin zehirlenmesi: Nodal ritimli bir hasta,” *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, c. 30, sayı 1, ss. 61–62, 2004.
- [40] M. Tulmaç, H. Ebinç, M. T. Doğru ve Ö. Şahin, “Deli bal intoksikasyonu sonucu gelişen senkop,” *Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, c. 10, sayı 2, ss. 30–31, 2008.
- [41] S. Yaylaci, A. Ösken, S. Olt, T. Temiz, A. Tamer, ve H. Gündüz, “Mad honey poisoning accompanied by hypotension and bradycardia,” *Sakarya Medical Journal*, c. 1, sayı 2, ss. 73–75, 2011.
- [42] M. Avcı, “Ormangülleri (*Rhododendron L.*) ve Türkiyedeki doğal yayılışları,” *Coğrafya Dergisi*, sayı 12, ss. 13-29, 2004.
- [43] A. Gündüz, S. Türedi, H. Uzun ve M. Topbaş “Mad honey poisoning”, *American Journal Emergency Medicine*, c. 24, sayı 5, ss. 595–598, 2006.
- [44] S. Terzioğlu, N. Merev ve R. Anşin, “A study on turkish rhododendron luteum (*Ericaceae*),” *Turkish Journal Agriculture and Forestry*, c. 25, sayı 5, ss. 311–317, 2001.
- [45] R. I. Milne ve R. J. Abbott, “Origin and evolution of invasive naturalized material of rhododendron ponticum luteum in the british ıslles,” *Molecular*

- Ecology*, c. 9, sayı 5, ss. 541–556, 2000.
- [46] A. G. Thomson, G. L. Radford, D. A. Norris ve J. E. G. Good, “Factors affecting the distribution and spread of rhododendron in north wales,” *Journal of Environmental Management*, c. 39, sayı 3. ss. 199–212, 1993.
- [47] I. General Aspects ve K. J. A. Davies, “Protein damage and degradation by oxygen radicals,” *Journal of Biological Chemistry*, c. 262, sayı 20, ss. 9895–9901, 1987.
- [48] K. Browicz, *Chorology of Trees and Shrubs in South-West Asia and Adjacent Rregions*, 1. baskı, Poznan, Poland: Panstwowe Wydawnictwo Naukowe, 1982, ss. 172.
- [49] P. F. Stevens, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Rhododendron L.)*, 6. baskı, Edinburgh: Edinburgh University Press, 1978, ss. 90-94.
- [50] P. Viccellio, *Handbook of Medical Toxicology Washington*, 1. baskı, New York, United States, Little Brown and Company, 1993, ss. 718.
- [51] T. Terai, K. Osakabe, M. Katai ve K. Sakaguchi “Preparation of 9-hydroxy grayanotoxin derivatives and their acute toxicity in mice,” *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, c. 51, sayı 3, ss. 351–353, 2003.
- [52] H. Maejima, E. Kinoshita, I. Seyama ve K. Yamaoka, “Distinct sites regulating grayanotoxin binding and unbinding to D4S6 of Na V 1.4 sodium channel as revealed by improved estimation of toxin sensitivity,” *Journal of Biological Chemistry*, c. 278, sayı 11, ss. 9464–9471, 2003.
- [53] T. Yuki, K. Yamaoka, M. Yakehiro ve I. Seyama, “State-dependent action of grayanotoxin ion Na⁺ channels in frog ventricular myocytes,” *Journal of Physiology*, c. 534, sayı 3, ss. 777–790, 2001.
- [54] K. Sakata, M. Hattori, A. Sakurai ve T. Hosotsuji, “Isolation and identification of biologically active constituents of leucothoe catesbaei a gray,” *Journal of Pesticide Science*, c. 2, sayı 4, ss. 453–456, 1977.
- [55] H. Özhan, R. Akdemir, M. Yazici ve H. Gündüz “Cardiac emergencies caused by honey ingestion: A single centre experience,” *Emergency Medicine Journal*, c. 21, sayı 6, ss. 742–744, 2004.
- [56] Ö. Yılmaz, M. Eser ve A. Şahiner, “Hypotension, bradycardia and syncope caused by honey poisoning,” *Resuscitation*, c. 68, sayı 6, ss. 405–408, 2006.
- [57] M. T. İnal, D. Memiş, B. Yıldız ve İ. Yıldırım, “Deli bal zehirlenmesi: Olgu sunumu,” *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, c. 3, sayı 2, ss. 58–60, 2012.
- [58] E. Binnetoglu, S. Dindar, E. Şengül ve N. Kahraman Ay, “Mad honey poisoning; How much observe,” *Abant Medicine Journal*, c. 1, sayı 1, ss. 32–34, 2012.
- [59] A. Gündüz, Ö. Tatlı ve S. Türedi, “Geçmişten günümüze deli bal zehirlenmesi,” *Türkiye Acil Tıp Dergisi*, c. 8, sayı 3, ss. 46–49, 2008.
- [60] S. Yaylacı, I. Kocayığit, E. Aydın, A. Ösken, A. Genç, M. A. Çakar ve A. Tamer “Clinical and laboratory findings in mad honey poisoning: A single center experience,” *Nigerian Journal of Clinical Practice*, c. 17, sayı 5, ss. 589–593, 2014.

- [61] N. Yıldırım, M. Aydın, F. Cam ve O. Çelik, "Clinical presentation of non-ST-segment elevation myocardial infarction in the course of intoxication with mad honey," *American Journal of Emergency Medicine*, c. 26, sayı 1, ss. 108.e1-108.e2, 2008.
- [62] N. Çetin, E. Marçıl, M. Kıldıran ve S. Ögüt, "Deli bal ile hepatotoksisite," *Türkiye Acil Tıp Dergisi*, c. 9, sayı 6, ss. 84–86, 2009.
- [63] F. Sarı Doğan, V. Özaydın, O. İncealtın, O. Güneysel ve M. Demireller, "A case of acute hepatitis following mad honey ingestion," *Turkish Journal Emergency Medicine*, c. 15, sayı 4, ss. 185–186, 2015.
- [64] F. Y. Onat, B. C. Yeğen, R. Lawrence, A. Oktay ve S. Oktay, "Mad honey poisoning in man and rat," *Reviews on Environmental Health*, c. 9, sayı 1, ss. 3–10, 1991.
- [65] F. Y. Onat, B. C. Yeğen, R. Lawrence, A. Oktay ve S. Oktay, "Site of action of grayanotoxins in mad honey in rats," *Journal of Applied Toxicology*, c. 11, sayı 3, ss. 199–201, 1991.
- [66] M. Aşçıoğlu ve Ç. Özesmi, "Grayanotoxin content of honey samples from Black Sea Region of Turkey," *Hamdard Medicus*, c. 38, sayı 11, ss. 42-47, 1995.
- [67] M. Aşçıoğlu, Ç. Özesmi, P. Doğan ve F. Öztürk, "Effects of chronic grayanotoxin-I administration on hepatic and renal functions in rats," *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, c. 179, sayı 3, ss. 47-53, 1996.
- [68] M. Aşçıoğlu, Ç. Özesmi, P. Doğan ve F. Öztürk, "Effects of acute Grayanotoxin-I administration on hepatic and renal functions in rats," *Turkish Journal Medical Science*, c. 30, sayı 1, ss. 23–27, 2000.
- [69] S. Sibel, Y. M. Enis, S. Hüseyin, A. A. Timuçin ve O. Duran, "Analysis of grayanotoxin in Rhododendron honey and effect on antioxidant parameters in rats," *Journal of Ethnopharmacology*, c. 156, sayı 9, ss. 155–161, 2014.
- [70] A. Kükner, G. İlater, G. Söyler, P. G. Rasgele, M. Kekeçoğlu ve M. Kambur, "The effect of rhododendron honey on mice liver tissue," *International Journal of Morphology*, c. 34, sayı 3, ss. 842–847, 2016.
- [71] S. Silici, Y. M. Enis ve S. Hüseyin, "Analysis of grayanotoxin in rhododendron honey and effect on antioxidant parameters in rats," *Journal Ethnopharmacology*, c. 156, sayı 6, ss. 155–161, 2014.
- [72] H. Şahin ve O. Yıldız, "Effects of mad honey on some biochemical parameters in rats," *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, c. 21, sayı 4, ss. 255–259, 2016.
- [73] M. Ross, G. Kaye ve W. Pawlina, *Histology: A Text and Atlas*, 4. baskı, Australia: Liipincott Williams and Wilkins, 2003, ss. 533.
- [74] K. L. Moore, A. F. Dalley ve A. Agur, *Moore Clinically Oriented Anatomy*, 3. baskı, Kanada: Williams & Wilkins, 2014, ss. 133.
- [75] S. Özbilgin, O. Yılmaz, B. Ergür ve V. Hancı, "Effectiveness of sugammadex for cerebral ischemia/reperfusion injury," *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, c. 32, sayı 4, ss. 292–301, 2016.
- [76] R. Snell, *Clinical Anatomy By Regions*, 9. baskı, London, Engl and: Liipincott Williams and Wilkins, 2012, ss. 66-76.

- [77] M. A. Gerber ve S. Thung "Histology of the Liver," *American Journal of Surgical Pathology*, c. 9, sayı 11, ss. 709–722, 1987.
- [78] M. Lafortune, F. Madore, H. Patriquin ve G. Breton, "Segmental anatomy of the liver: A sonographic approach to the Couinaud nomenclature," *Radiology*, c. 181, sayı 2, ss. 443–448, 1991.
- [79] J. Goyri-O'Neill, D. Pais, F. Andrede ve P. Ribeiro "Improvement of the embalming perfusion method: the innovation and the results by light and scanning electron microscopy," *Acta Medica Portuguesa*, c. 26, sayı 3, ss. 188–94, 2013.
- [80] L. Garcia-Moreno, G. Vallejo, J. L. Arias, M. A. Aller, L. Lorente ve J. Arias, "Behaviour of nucleolar organizer regions in the different wistar rat liver lobes," *Laboratory Animals*, c. 28, sayı 1, ss. 50–54, 1994.
- [81] L. C. Jungueira, J. Carneiro ve R. O. Kelley, *Basic Histology*, 8. baskı, New York, United States: McGraw Hill Medical Books, 1998, ss. 175-78.
- [82] E. P. Solomon, *İnsan Anatomisi ve Fizyolojisine Giriş*, 1. baskı, İstanbul, Türkiye: Birol Yayıncılık, 1997, ss. 274.
- [83] J. E. Hall, *Guyton And Hall Textbook Of Medical Physiology*, 13. baskı, Philadelphia, United States: W. B. Saunders Company, 2016, ss. 874.
- [84] J. P. Iredale, "Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ," *Journal of Clinical Investigation*, c. 117, sayı 3, ss. 539–548, 2007.
- [85] B. H. Stuart ve D. J. Ando, *Biological applications of infrared spectroscopy*, 1. baskı, London, England: John Wiley & Sons, 1997, ss. 81.
- [86] I. D. Campbell, *In: Biological Spectroscopy*, 1. baskı, Wokingham, United Kingdom: Benjamin/Cummings Publishing Company, 1984, ss.152-174.
- [87] E. Pekin, *Enstrümental Analiz*, 1. baskı, Çanakkale, Türkiye: Paradigma Akademi Yayınları, 2013, ss. 68-75.
- [88] A. İnan Genç, "Molecular characterization of the effects of valdecoxib on colon cancer cell lines (ht29 & sw620) using atr-ftir spectroscopy," Yüksek lisans tezi, Biyokimya Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 2014.
- [89] G. C. Smith ve S. P. Jackson, "The DNA-dependent protein kinase," *Genes & Development*, c. 13, sayı 8, ss. 916-934, 1999.
- [90] D. Freifelder, *Applications to Biochemistry and Molecular Biology*, 2. baskı, San Francisco, United States: W. H. Freeman, 1982, ss. 469-517.
- [91] S. Nielsen, *Food Analysis*, 5. baskı, Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG, 2017, ss. 352-379.
- [92] A. Yazıcı, "Yakın kızılötesi spektroskopisi ile çileğin (*fragaria*) pestisit kalıntılarının belirlenmesi," Yüksek lisans tezi, Gıda Mühendisliği, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye, 2019.
- [93] A. Rohman, "The employment of Fourier transform infrared spectroscopy coupled with chemometrics techniques for traceability and authentication of meat and meat products," *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, c. 6,

sayı 1, ss. 9–17, 2019.

- [94] R. Mendelsohn, G. Anderle, M. Jaworsky, H. Mantsch ve R. Dluhy, “Fourier transform infrared spectroscopic studies of lipid-protein interaction in native and reconstituted sarcoplasmic reticulum,” *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, c. 775, sayı 2, ss. 215–224, 1984.
- [95] K. Gerwert ve C. Kötting, “Fourier transform infrared spectroscopy,” *Encyclopedia of Soils in the Environment*, c. 4, sayı 9, ss. 80–85, 2004.
- [96] N. Toyran, F. Zorlu ve F. Severcan, “Effect of stereotactic radiosurgery on lipids and proteins of normal and hypoperfused rat brain homogenates: A Fourier transform infrared spectroscopy study,” *International Journal of Radiation Biology*, c. 81, sayı 12, ss. 911–918, 2005.
- [97] J. Kneipp, P. Lasch, E. Baldauf, M. Beekes ve D. Naumann, “Detection of pathological molecular alterations in scrapie-infected hamster brain by fourier transform infrared (ft-ir) spectroscopy,” *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, c. 1501, sayı 2–3, ss. 189–199, 2000.
- [98] F. Severcan, G. Görgülü, S. T. Görgülü ve T. Güray, “Rapid monitoring of diabetes-induced lipid peroxidation by fourier transform infrared spectroscopy: evidence from rat liver microsomal membranes,” *Analytical Biochemistry*, c. 339, sayı 1, ss. 36–40, 2005.
- [99] G. Çakmak, İ. Togan, C. Uğuz ve F. Severcan “FT-IR spectroscopic analysis of rainbow trout liver exposed to nonylphenol,” *Applied Spectroscopy*, c. 57, sayı 7, ss. 835–841, 2003.
- [100] O. Bozkurt, M. Severcan ve F. Severcan, “Diabetes induces compositional, structural and functional alterations on rat skeletal soleus muscle revealed by ftir spectroscopy: a comparative study with edl muscle,” *Analyst*, c. 135, sayı 12, ss. 3110–3119, 2010.
- [101] S. Garip, E. Yapici ve N. S. Özek, “Evaluation and discrimination of simvastatin-induced structural alterations in proteins of different rat tissues by FTIR spectroscopy and neural network analysis,” *Analyst*, c. 135, sayı 12, ss. 3233–3241, 2010.
- [102] P. I. Haris ve F. Severcan, “FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media,” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, c. 7, sayı 1–4, ss. 207–221, 1999.
- [103] C. Peng ve F. Chiappini, “Vibrational signatures to discriminate liver steatosis grades,” *Analyst*, c. 140, sayı 1, ss. 1107–1118, 2015.
- [104] J. Louveaux, A. Maurizio ve G. Vorwohl, “Internationale kommission für bienenbotanik der IUBS methodik der melissopalynologie,” *Apidologie*, c. 1, sayı. 2, ss. 193-209, 1970.
- [105] A. Maurizio ve F. E. D. Hodges, “Pollen analysis of honey,” *Bee World*, c. 32, sayı 1, ss. 1–5, 1951.
- [106] M. Kaplan, E. O. Olgun ve O. Karaoğlu, “Determination of grayanotoxins in honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry using dilute-and-shoot sample preparation approach,” *Journal Agriculture Food Chemistry*, c. 62, sayı 24, ss. 5485–5491, 2014.

- [107] A. B. Kurtoğlu, R. Yavuz ve G. A. Evrendilek, "Characterisation and fate of grayanotoxins in mad honey produced from rhododendron ponticum nectar," *Food Chemistry*, c. 161, sayı 4, ss. 47–52, 2014.
- [108] S. Silici, H. Şahin ve Z. Doğan, "Acute effects of grayanotoxin in rhododendron honey on kidney functions in rats," *Environmental Science and Pollution Research*, c. 23, sayı 4, ss. 3300–3309, 2016.
- [109] G. Eraslan, M. Kanbur ve M. Karabacak, "Effect on oxidative stress, hepatic chemical metabolizing parameters, and genotoxic damage of mad honey intake in rats," *Human and Experimental Toxicology*, c. 37, sayı 9, ss. 991–1004, 2018.
- [110] G. Ç. Arslan, S. Emir, P. G. Rasgele ve M. Kekeçoğlu, "Ormangülü balı'nın fare kalp kas dokusu lipitleri üzerindeki toksik etkilerinin moleküler düzeyde incelenmesi," *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, Basımda.
- [111] D. Yonar, L. Öcek, B. I. Tiftikçioğlu, Y. Zorlu ve F. Severcan, "Relapsing-remitting multiple sclerosis diagnosis from cerebrospinal fluids via fourier transform infrared spectroscopy coupled with multivariate analysis," *Scientific Reports*, c. 8, sayı 5, ss. 1–13, 2018.
- [112] M. Kardaş, A. G. Gozen, ve F. Severcan, "FTIR spectroscopy offers hints towards widespread molecular changes in cobalt-acclimated freshwater bacteria," *Aquatic Toxicology*, c. 155, sayı 6, ss. 15–23, 2014.
- [113] C. Aksoy ve F. Severcan, "Role of vibrational spectroscopy in stem cell research," *Spectroscopy*, c. 27, sayı 3, ss. 167–184, 2012.
- [114] C. Ceylan, T. Tanrikul ve H. Özgener, "Biophysical evaluation of physiological effects of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) farming using FTIR spectroscopy," *Food Chemistry*, c. 145, sayı 10, ss. 1055–1060, 2014.
- [115] B. E. Can, N. Şimşek Özek, F. Severcan, M. Severcan ve E. Jakubowska Doğru, "Vitamin A deficiency induces structural and functional alterations in the molecular constituents of the rat hippocampus," *British Journal of Nutrition*, c. 57, sayı 2, ss. 45–55, 2014.
- [116] B. E. Can, E. J. Doğru ve M. Severcan, "The effects of short-term chronic ethanol intoxication and ethanol withdrawal on the molecular composition of the rat hippocampus by FT-IR spectroscopy," *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, c. 35, sayı 11, ss. 2050–2062, 2011.
- [117] G. Çakmak, İ. Togan ve F. Severcan, "17β-Estradiol induced compositional, structural and functional changes in rainbow trout liver, revealed by FT-IR spectroscopy: A comparative study with nonylphenol," *Aquatic Toxicology*, c. 77, sayı 9, ss.53-63, 2006.
- [118] G. Çakmak, F. Zorlu ve M. Severcan, "Structural and functional variations in rat liver microsomal," *Analytical Chemistry*, c. 83, sayı 3, ss. 2438–2444, 2011.
- [119] G. Çakmak, F. Zorlu ve M. Severcan, "Amifostine, a radioprotectant agent, protects rat brain tissue lipids against ionizing radiation induced damage: An FTIR microspectroscopic imaging study," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, c. 520, sayı 2, ss. 67–73, 2012.
- [120] G. Çakmak, M. Severcan, F. Zorlu ve F. Severcan, "Structural and functional damages of whole body ionizing radiation on rat brain homogenate membranes and protective effect of amifostine," *International Journal of Radiation Biology*,

c. 92, sayı 12, ss. 837–848, 2016.

- [121] P. Demir, S. Akkaş, M. Severcan, F. Zorlu ve F. Severcan, “Ionizing radiation induces structural and functional damage on the molecules of rat brain homogenate membranes: Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study,” *Applied Spectroscopy*, c. 69, sayı 1, ss. 154–164, 2015.
- [122] R. Gurbanov, M. Bilgin ve F. Severcan, “Restoring effect of selenium on the molecular content, structure and fluidity of diabetic rat kidney brush border cell membrane,” *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, c. 1858, sayı 4, ss. 845–854, 2016.
- [123] S. B. Akkaş, M. Severcan, O. Yilmaz ve F. Severcan, “Effects of lipoic acid supplementation on rat brain tissue: An FTIR spectroscopic and neural network study,” *Food Chemistry*, c. 105, sayı 3, ss. 1281–1288, 2007.
- [124] S. Türker, M. Severcan, G. İlbay ve F. Severcan, “Epileptic seizures induce structural and functional alterations on brain tissue membranes,” *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, c. 1838, sayı 12, ss. 3088–3096, 2014.
- [125] O. Bozkurt, S. H. Bayari, M. Severcan, C. Krafft, J. Popp ve F. Severcan, “Structural alterations in rat liver proteins due to streptozotocin-induced diabetes and the recovery effect of selenium: Fourier transform infrared microspectroscopy and neural network study,” *Journal of Biomedical Optics*, c. 17, sayı 7, ss. 231-238, 2012.
- [126] J. Gu, Y. Zhang ve D. Xu, “Ethanol-induced hepatic steatosis is modulated by glycogen level in the liver,” *Journal of Lipid Research*, c. 56, sayı 7, ss. 1329–1339, 2015.
- [127] G. Eraslan, M. Kanbur ve M. Karabacak, “Effect on oxidative stress, hepatic chemical metabolizing parameters, and genotoxic damage of mad honey intake in rats,” *Human and Experimental Toxicology*, c. 37, sayı 9, ss. 991–1004, 2018.
- [128] H. Maejima, E. Kinoshita, I. Seyama ve K. Yamaoka, “Distinct sites regulating grayanotoxin binding and unbinding to D4S6 of NaV1.4 sodium channel as revealed by improved estimation of toxin sensitivity,” *Journal Biological Chemistry*, c. 278, sayı 11, ss. 9464–9471, 2003.
- [129] Y. Nishikawa, K. Fukumato, T. Tetsumi, M. Katai ve H. Maguri, “Effects of Grayanotoksin III on liver function and renal function in rats,” *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, c. 34, sayı 1, ss. 430–433, 1986.
- [130] M. R. J. Moore. ve H. Sills, “Peroxidation of erythrocytes: FTIR spectroscopy studies of extracted lipids, isolated membranes, and intact cells,” *Biospectroscopy*, c. 1, sayı 2, ss. 133–140, 1995.
- [131] I. M. Olivares, G. Ceballos ve R. M. Santillan, “Table of contents,” *The Journal of Arthroscopy and Related Surgery*, c. 21, sayı 10, ss. 3127-3131, 2005.
- [132] C. G. Fraga ve A. L. Tappel, “Damage to DNA concurrent with lipid peroxidation in rat liver slices,” *Biochemistry Journal*, c. 252, sayı 3, ss. 893–896, 1988.
- [133] S. Özek, S. Tuna, E. Benson ve F. Severcan “Characterization of microRNA-125b expression in MCF7 breast cancer cells by ATR-FTIR spectroscopy,” *Analyst*, c. 135, sayı 12, ss. 3094–3102, 2010.

- [134] F. M. Megli ve K. Sabatini, "Mitochondrial phospholipid bilayer structure is ruined after liver oxidative injury in vivo," *FEBS Letters*, c. 573, sayı 1–3, ss. 68–72, 2004.
- [135] A. M. Melin, A. Perromat ve G. Deleris "Pharmacologic application of fourier transform ır spectroscopy: In vivo toxicity of carbon tetrachloride on," *Biospectroscopy*, c. 57, sayı 11, ss. 160–168, 1999.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : HÜMEYRA HAKSOY
Doğum Tarihi ve Yeri : 14.07.1991-Düzce
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : humeyrhaksoy@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyoloji.	Düzce Üniversitesi	2020
Lisans	Biyoloji.	Kocaeli Üniversitesi	2013
Lise		Arsal Anadolu Lisesi	2009

YAYINLAR

1. Cakmak Arslan G., **Haksoy H.**, Goc Rasgele P., Kekecoglu M. “Determination of the dose-dependent toxic effects of mad honey on mouse liver using ATR-FTIR spectroscopy” **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117719>.
2. **Haksoy H.**, Cakmak Arslan G., Goc Rasgele P., Kekecoglu M. “Deli Bal ve Grayanotoksin’in Karaciğer Dokusu Üzerindeki Etkilerinin Zamana Bağlı Araştırılması” **Konuralp Tıp Dergisi, (Basım aşamasında)**.

BİLDİRİLER

1. **Haksoy H.**, Çakmak Arslan G, Göç Rasgele P. ve ark. Deli Balın Karaciğer Dokusu Üzerindeki Etkilerinin Moleküler Düzeyde İncelenmesi. VI Uluslararası Fen, Mühendislik ve Mimarlık Bilimlerinde Akademik Çalışmalar Sempozyumu. 2019; p16.
<https://drive.google.com/file/d/1zR9Y8547GGJrldCaGA2Y1uQiGxJHTvL3/view> (erişim tarihi: 30.07.2019).