



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

**ORMANGÜLÜ BALININ FARE KALP KASINDA MEYDANA
GETİRDİĞİ MOLEKÜLER DEĞİŞİKLİKLERİN BİYOFİZİKSEL
TEKNİKLERLE İNCELENMESİ**

SELİN EMİR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

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

DÜZCE, 2018

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ORMANGÜLÜ BALININ FARE KALP KASINDA MEYDANA
GETİRDİĞİ MOLEKÜLER DEĞİŞİKLİKLERİN BİYOFİZİKSEL
TEKNİKLERLE İNCELENMESİ**

Selin EMİR 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

Doç. Dr. Aslı ÖZKÖK
Hacettepe Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Meral KEKEÇOĞLU
Düzce Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 28/08/2018

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.

28 Ağustos 2018

Selin EMİR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimimde ve bu tezin hazırlanmasında bana yol gösteren, her türlü desteği ve yardımı sağlayan, değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Gülgün ÇAKMAK ARSLAN'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bu tezin ortaya çıkmasında çok değerli katkıları veren Dr. Öğr. Üyesi Meral KEKEÇOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Pınar GÖÇ RASGELE'ye şükranlarımı sunarım.

Tüm hayatım boyunca benden maddi, manevi desteğini esirgemeyen AİLEME sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Düzce Üniversitesi BAP-2016.05.01.503 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

28 Ağustos 2018

Selin EMİR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ŞEKİL LİSTESİ.....	VII
ÇİZELGE LİSTESİ.....	X
KISALTMALAR.....	XI
SİMGELER.....	XII
ÖZET.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1. GİRİŞ.....	1
1.1. ORMANGÜLÜ (<i>RHODODENDRON</i>) BİTKİSİ.....	1
1.2. ORMANGÜLÜ BALI.....	7
1.3. ORMANGÜLÜ BALININ TARİHÇESİ.....	9
1.4. ORMANGÜLÜ BALI ZEHİRLENMESİ.....	10
1.5. GRAYANOTOKSİN (GTX).....	12
1.6. VOLTAJ BAĞIMLI SODYUM KANALI.....	15
1.7. KALP KASI.....	18
1.8. ELEKTROMANYETİK IŞIMA VE SPEKTROSKOPİ.....	22
1.9. INFRARED (KIZILÖTESİ) SPEKTROSKOPİSİ.....	23
1.10. FOURIER DÖNÜŞÜM KIZILÖTESİ (FTIR) SPEKTROSKOPİSİ.....	25
1.11. AZALTI MIŞ TOPLAM YANSIMA (ATR)-FTIR SPEKTROSKOPİSİ.....	27
1.11.1. ATR-FTIR Spektroskopisinin Avantajları.....	29
1.12. ÇALIŞMANIN AMACI.....	29
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
2.1. SARF MALZEMELER.....	32
2.2. ORMANGÜLÜ BALININ PALİNOLOJİK ANALİZİ VE GTX-III TAYİNİ.....	32
2.3. HAYVAN DENEYLERİ.....	33
2.3.1. Deney Grupları ve Uygulamalar.....	33

2.4. ATR-FTIR SPEKTROSKOPİSİ ÇALIŞMALARI	34
2.4.1. Spektral Verilerin Toplanması.....	34
2.4.2. ATR-FTIR Spektroskopisi Çalışmalarında Kullanılan Spektrum Analiz Yöntemleri	35
2.4.3. ATR-FTIR Spektrumlarından Protein İkincil Yapı Tayini	37
2.5. İSTATİKSEL ANALİZ	38
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	39
3.1. ARAŞTIRMA BULGULARI	39
3.1.1. Ormangülü Bahının Palinolojik Analizi	39
3.1.2. ATR-FTIR Spektroskopisi Bulguları	39
3.2. TARTIŞMA	64
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	76
5. KAYNAKLAR	79
6. EKLER	95
6.1. EK 1: ETİK KURUL ONAY BELGESİ	95
ÖZGEÇMİŞ	96

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Ericaceae familyasının dünyadaki yayılışı.	2
Şekil 1.2. <i>Rhododendron ponticum</i>	3
Şekil 1.3. <i>Rhododendron ponticum</i> 'un ülkemizdeki yayılış alanı	3
Şekil 1.4. <i>Rhododendron luteum</i>	4
Şekil 1.5. <i>Rhododendron luteum</i> 'un ülkemizdeki yayılış alanı	4
Şekil 1.6. <i>Rhododendron ungeronii</i>	5
Şekil 1.7. <i>Rhododendron ungeronii</i> 'in ülkemizdeki yayılış alanı	5
Şekil 1.8. <i>Rhododendron caucasicum</i>	6
Şekil 1.9. <i>Rhododendron caucasicum</i> 'un ülkemizdeki yayılış alanı	6
Şekil 1.10. <i>Rhododendron smirnovii</i>	7
Şekil 1.11. <i>Rhododendron smirnovii</i> 'in ülkemizdeki yayılış alanı.....	7
Şekil 1.12. Grayanotoksin I, II ve III'ün genel kimyasal yapısı.....	13
Şekil 1.13. Voltaj bağımlı sodyum kanalının yapısı.....	16
Şekil 1.14. Voltaj bağımlı sodyum kanalına bazı nörotoksinlerin bağlandığı bölgeler.....	17
Şekil 1.15. Kalbin yapısı.....	18
Şekil 1.16. Kalbin tabakaları.....	19
Şekil 1.17. Miyokard hücresi aksiyon potansiyeli fazları.....	21
Şekil 1.18. Elektromanyetik spektrum.....	22
Şekil 1.19. Enerji düzey diyagramı.....	23
Şekil 1.20. Bir kızılötesi spektrumunda titreşim hareketleri	25
Şekil 1.21. Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektrometresi	26
Şekil 1.22. Çok yansımali ATR sistemi yapısı	28
Şekil 2.1. Atmosferik havanın 4000-450 cm ⁻¹ bölgesindeki FTIR spektrumu.	35
Şekil 2.2. Kalp kası dokusunun 1700-1600 cm ⁻¹ arası örnek a) Soğurma ve b) İkincil türev spektrumları.	38
Şekil 3.1. Ormangülü balı içindeki <i>Rhododendron</i> bitkisine ait polen görüntüsü.....	39
Şekil 3.2. Kontrol grubuna ait bir kalp kası örneğinin 4000-450 cm ⁻¹ bölgesindeki ATR-FTIR spektrumu	41

Şekil 3.3. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarındaki fare kalp kasına ait 3700–3030 cm ⁻¹ dalga sayısı aralığındaki spektrumları	44
Şekil 3.4. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının Amid A bantlarının alan değerlerindeki değişim	45
Şekil 3.5. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarındaki fare kalp kasına ait 3025-2800 cm ⁻¹ dalga sayısı aralığındaki spektrumları	46
Şekil 3.6. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının Olefinik=CH gerilme bandının alan değerindeki değişimler	47
Şekil 3.7. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının doymamış/doymuş lipit alan oranındaki değişimler	47
Şekil 3.8. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının CH ₃ antisimetrik gerilme bandının alan değerlerindeki değişimler	48
Şekil 3.9. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının a) CH ₂ antisimetrik gerilme bandı b) CH ₂ simetrik gerilme bandının alan değerindeki değişimler	49
Şekil 3.10. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının CH ₂ antisimetrik gerilme bandının dalga sayısı değerindeki değişimler	49
Şekil 3.11. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının CH ₂ antisimetrik bandının bant genişliği değerindeki değişimler	50
Şekil 3.12. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarındaki fare kalp kasına ait 1800-900 cm ⁻¹ dalga sayısı aralığındaki spektrumları	51
Şekil 3.13. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının karbonil ester gerilme bandının alan değerindeki değişimler	52
Şekil 3.14. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının Amid I bandının dalga sayısı değerindeki değişimler	53
Şekil 3.15. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının Amid I/Amid II alan oranındaki değişimler	53
Şekil 3.16. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının Amid I bandının bant genişliği değerindeki değişimler	54
Şekil 3.17. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının PO ₂ ⁻ antisimetrik gerilme bandının alan değerindeki değişimler	55
Şekil 3.18. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının PO ₂ ⁻ antisimetrik gerilme bandının dalga sayısı değerindeki değişimler	55
Şekil 3.19. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının C-N ⁺ -C gerilme bandının alan değerindeki değişimler	56
Şekil 3.20. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının CH ₂ /CH ₃ antisimetrik alan oranı değerindeki değişimler	57
Şekil 3.21. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının karbonil ester/lipit alan oranı değerindeki değişimler	57
Şekil 3.22. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının lipit/protein	

alan oranı değerindeki değişimler	58
Şekil 3.23. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının nükleik asit/lipit alan oranı değerindeki değişimler	59
Şekil 3.24. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının RNA/protein alan oranı değerindeki değişimler	59
Şekil 3.25. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının RNA/lipit alan oranı değerindeki değişimler	60
Şekil 3.26. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarındaki fare kalp kasına ait a) 1700-1600 cm ⁻¹ arası örnek soğurma, b) İkincil türev temsili spektrumları.....	61
Şekil 3.27. İkincil türev vektör normalizasyonu metodu ile elde edilen kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının dokularındaki a) Turn b) Alfa heliks c) Tesadüfi kıvrılma d) Beta tabaka proteinlerin ikincil yapı miktarındaki değişimler.....	63
Şekil 6.1. Deney hayvanları etik kurulu onay belgesi.....	95

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 1.1 İnfrared spektral bölgeler.....	24
Çizelge 2.1. Belirli bazı kızılötesi bantlar için kullanılan spektral bölgeler ve baseline noktaları.....	36
Çizelge 2.2. Hesaplanan bant alan oranları ve hesaplamada kullanılan bantlar.	37
Çizelge 3.1. Kalp kasının IR spektrumundaki başlıca soğurmaları.....	42
Çizelge 3.2. Başlıca fonksiyonel grupların alan değerlerindeki değişiklikler	43
Çizelge 3.3. İkincil türev vektör normalizasyonu metodu ile elde edilen kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III uygulanmış fare kalp kasının protein ikincil yapı değişimi.....	62

KISALTMALAR

ATR-FTIR	Azaltılmış toplam yansıma-fourier dönüşüm kızılötesi
A.U	Arbitrary unit (keyfi birim)
AV	Atrioventriküler
CD	Sirküler dikroizm
DNA	Deoksiribonükleik asit
FTIR	Fourier transform infrared (Fourier dönüşüm kızılötesi)
GABA	Gama amino bütirik asit
GTX	Grayanotoxin
HNE	4-hydroxynonenal
IR	Infrared (Kızılötesi)
kDA	Kilodalton
LC-MS	Sıvı kromatografisi- Kütle spektrometresi
LDL	Lipoprotein
LPS	Lipopolisakkarit
MDA	Malondialdehit
NO	Nitrit oksit
OGB	Ormangülü balı
R	<i>Rhododendron</i>
RH	Rhododendron Honey
RNA	Ribonükleik asit
SA	Sinoatrial
TBARS	Tiobarbiturik asit reaktif madde
ZnSe	Çinko-selenit

SİMGELER

Al	Alüminyum
°C	Derece santigrad
g	Gram
F	Flor
Ca	Kalsiyum
Cd	Kadmiyum
Co	Kobalt
K	Potasyum
Kg	Kilogram
Mn	Mangan
mg	Miligram
µg	Mikrogram
Mg	Magnezyum
Na	Sodyum
α	Alfa
β	Beta

ÖZET

ORMANGÜLÜ BALININ FARE KALP KASINDA MEYDANA GETİRDİĞİ MOLEKÜLER DEĞİŞİKLİKLERİN BİYOFİZİKSEL TEKNİKLERLE İNCELENMESİ

Selin EMİR

Düzce Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gülgün ÇAKMAK ARSLAN

Ağustos 2018, 95 sayfa

Halk arasında, deli bal olarak da bilinen ormangülü balı (OGB), Türkiye'nin özellikle Karadeniz bölgesinde yaygın olarak yetişen ormangülü bitkisinden elde edilmektedir. Bu bal içindeki grayanotoksin (GTX) bileşiğinden dolayı insanlarda bazı toksik etkilere sebep olmaktadır. Ancak halk arasında yüksek tansiyon, sindirim sistemi bozuklukları, diş ağrısı, soğuk algınlığı gibi sağlık sorunlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. OGB'nin kalp üzerinde bazı olumsuz etkileri olduğu bilinmesine rağmen, kalp kası üzerinde meydana getirdiği yapısal ve fonksiyonel etkiler henüz moleküler düzeyde bilinmemektedir. Bu nedenle, bu çalışmada farklı konsantrasyonlardaki OGB'nin ve GTX'in en toksik tipi olan GTX-III'ün kalp kası üzerindeki etkilerinin moleküler düzeyde araştırılması amaçlanmıştır. *Mus musculus* erkek fareler; birisi kontrol, diğerleri OGB'nin üç farklı dozu (25, 50 and 75 mg/kg) ve GTX-III (0.01 mg/kg) grupları olmak üzere beş gruba ayrılmıştır. Bu farelerin kalp kasları OGB ve GTX-III uygulamasından 24 saat sonra çıkarılmış ve Azaltılmış Toplam Yansıma-Fourier Dönüşüm Kızılötesi (ATR-FTIR) spektroskopisi ile incelenmiştir. Sonuçlar 25 mg/kg OGB'nin kalp kası üzerinde lipit peroksidasyonu dışında herhangi anlamlı bir değişiklik meydana getirmediğini ortaya çıkarmış, fakat kontrol grupları ile 50, 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulanmış gruplar arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Örneğin, 50 mg/kg OGB uygulanan grupta toplam lipit içeriği önemli derecede artmış ve toplam protein içeriği önemli derecede azalmıştır. Bu sonuçla zıt bir şekilde 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulanmış gruplarda toplam lipit içeriği azalmış ve toplam protein içeriği artmıştır. Sistemdeki lipit peroksidasyonu varlığına işaret eden doymamış/doymuş lipit oranı bütün gruplarda artmıştır. Ayrıca, 50 ve 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulaması nükleik asitlerin içerik ve konformasyonunu, proteinlerin ikincil yapılarını değiştirmiş, lipit düzenini azaltmış ve kalp kası hücrelerinin membran akışkanlığını artırmıştır. Bu bulgular, OGB ve GTX-III'ün kalp kası hücrelerinin yapısı ve fonksiyonlarında önemli değişiklikler meydana getirdiğini ve bu değişikliklerin tüketilen doza bağlı olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Anahtar Kelimeler: ATR-FTIR spektroskopisi, Deli bal, Grayanotoksin, Kalp kası, Ormangülü balı.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE MOLECULAR CHANGES OF RHODODENDRON HONEY ON MICE HEART MUSCLE USING BIOPHYSICAL TECHNIQUES

Selin EMİR

Düzce University

Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Biology

Master's Thesis

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Gülgün ÇAKMAK ARSLAN

August 2018, 95 pages

Rhododendron honey (RH), which is also known as "mad honey" in public, is obtained from *Rhododendron* plants widely grown especially in the Black Sea Region of Turkey. This honey induces toxic effects in people due to grayanotoxin found in it. However, it is commonly used for the treatment of some disorders like high blood pressure, gastrointestinal disorders, dental pain, common colds, etc. in public. Although it has been known that RH has some negative effects on heart, the structural and functional effects of it on heart muscle are unknown yet at molecular level. For this reason, in this study, we aimed to investigate the effects of different concentrations of RH and GTX-III, which is the most toxic type of GTXs, on mouse heart muscle tissue at molecular level. Male *Mus musculus* mice were divided into five groups, one being the control group and the others being the three different doses of RH (25, 50 and 75 mg/kg) and GTX-III (0.01 mg/kg) groups. The heart muscles of these mice were collected 24 h after the administration of RH and GTX-III and investigated using Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy. The results revealed that 25 mg/kg of RH didn't cause any significant alterations in the heart muscle except lipid peroxidation, however, significant differences were observed between 50 and 75 mg/kg RH and GTX-III treated groups and control group. For example, the total lipid content increased and the total protein content decreased significantly in 50 mg/kg RH-treated groups. Oppositely, in 75 mg/kg RH-treated and GTX-III-treated groups the total lipid content decreased and the total protein content increased. Unsaturated/saturated lipid ratio increased in all treated groups suggesting the presence of lipid peroxidation in the system. In addition, the treatment of 50, 75 mg/kg RH and GTX-III changed the content and conformation of nucleic acids, the secondary structure of proteins, decreased lipid order and increased membrane fluidity of heart muscle cells. These results revealed that RH and GTX-III causes significant alterations in the structure and function of heart muscle cells and these alterations depend on the dose consumed.

Keywords: ATR-FTIR spectroscopy, Grayanotoxin, Mad honey, Myocardium Rhododendron honey.

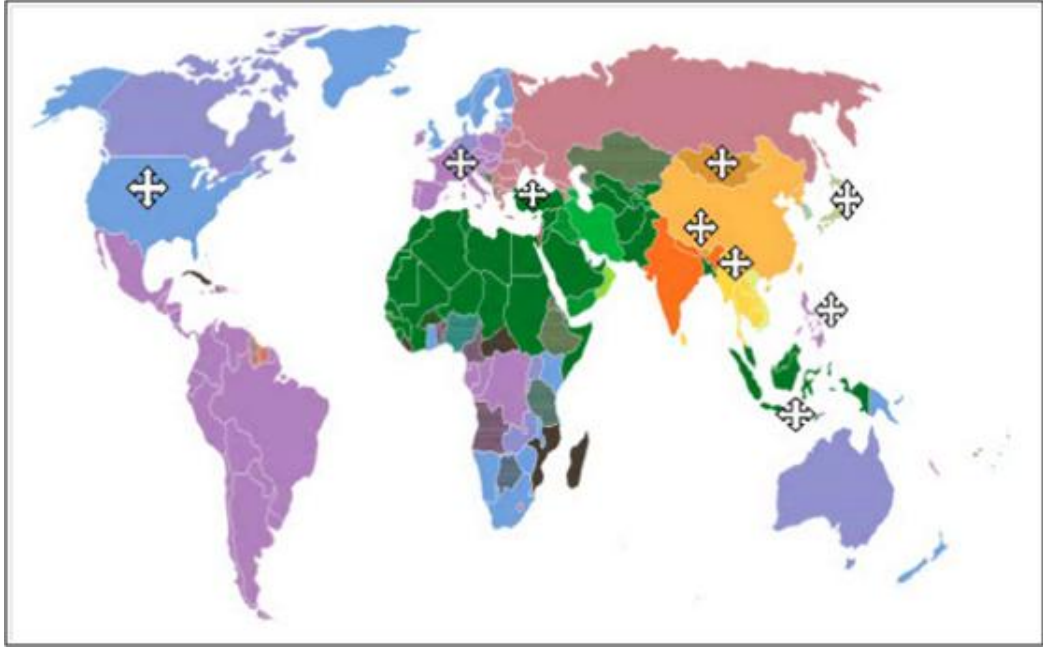
1. GİRİŞ

1.1. ORMANGÜLÜ (*RHODODENDRON*) BİTKİSİ

Karadeniz Bölgesi'nde yoğun olarak bulunan, çeşitli renk ve büyüklükteki çiçekleri, çiçeklerinin yaydığı kokular ve yeşil yaprakları nedeniyle kentsel ve kırsal peyzajda, yaygın kök sistemleri nedeniyle de erozyonun kontrolünde önemli rol oynayan ormangülleri, yayılış alanlarındaki bal arısı kolonileri için önemli bir besin kaynağıdır [1].

Fundagiller (*Ericaceae*) grubuna ait olan ormangüllerinin bilimsel adı olan *Rhododendron*, gül ağacı anlamına gelmektedir (Yunanca rhodon: gül; dendron: ağaç). Ormangüllerinin çoğunluğu daima yeşil yapraklıdır ve bu yapraklar deri gibi sert ve genellikle ovaldir. Ancak nadiren tıpkı çamların iğne yapraklarına benzer şekilde çok dar şerit yapraklara sahip olan ormangülü türleri de bulunmaktadır [2].

Yaşam alanları deniz seviyesinden 4000 m yüksekliğe kadar çıkabilen ormangülleri Türkiye, Çin, Tibet, Burma, Nepal, Yeni Gine, Tropik Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da yayılış gösterir [3]. Şekil 1.1, ormangüllerinin dünyadaki yaygın olarak görüldüğü alanları göstermektedir. Yeryüzünde çok çeşitli ormangülü türleri bulunmaktadır. Sadece kuzey yarı kürede 800'den fazla çeşit ormangülü türü görülür. Çoğunluğu yılın tamamında yeşil kalan ve oldukça büyük çiçekleri olan ormangüllerinin bu çeşitlilikleri, dünyada önemli bir süs bitkisi haline gelmelerine neden olmuştur [4].



Şekil 1.1. Ericaceae familyasının dünyadaki yayılışı [5].

Türkiye'nin kuzey kıyılarını bir kuşak halinde kaplayan nemli orman formasyonu içinde en dikkat çekici ormangülü türlerinden birisi sarı ormangülleri (*Rhododendron luteum*), en yaygın olanı ise mor çiçekli ormangülüdür (*Rhododendron ponticum*). Mor çiçekli ormangülü batıda Istranca dağlarının kuzey yamaçlarından, doğuda Hopa'ya kadar oldukça geniş bir yayılım alanına sahiptir. Nemli orman toplulukları içinde daha çok Doğu Karadeniz bölümünde yoğunlaşan ve birbirinden farklı çiçekleri ile buradaki topluluklara karışan başka ormangülleri de vardır.

Ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren ormangülü türlerinden aşağıda kısaca bahsedilmiştir.

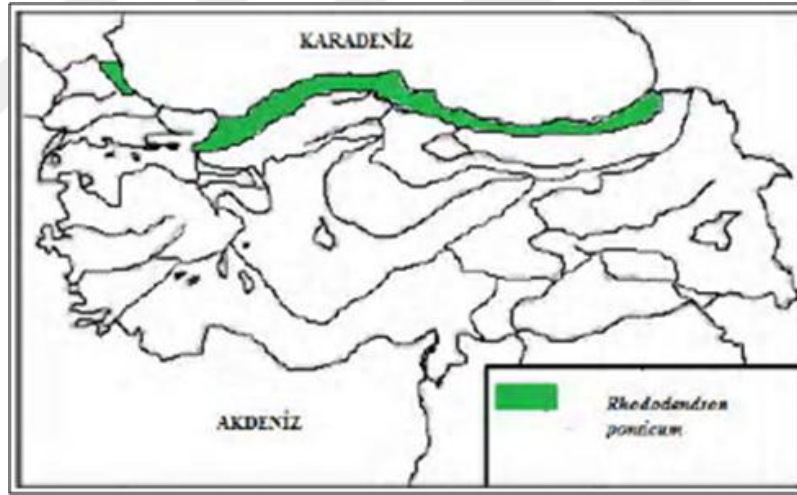
- Mor Çiçekli Ormangülü (*Rhododendron ponticum*)

Baharda çiçek açan ve uzun süre bu çiçekli durumunu koruyan, Karadeniz Bölgesi'ndeki adıyla "kara kumar/komar", "kara ağı" ya da "kumar" olan iyi yetişme ortamlarında 8-10 metreye kadar ulaşabilen bir çalı ya da küçük ağaç türüdür [6]. Genellikle kayın ormanlarında hakim olan ormangülüdür. *R. 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 [7]–[9]. Mart-Mayıs aylarında açan çiçekleri, morumsu pembe, bol nektarlıdır ve nektar, yaprak ve polenler toksin içermektedir. Yapraklar, parlak yeşil,

elips ve ters yumurtamsı, yaprak sapı 1-1,5 cm arasındadır (Şekil 1.2). Ülkemizde, Kırklareli, Kocaeli, Sakarya, Düzce, Kastamonu, Zonguldak, Ordu, Giresun, Rize ve Artvin illerinde (Şekil 1.3) deniz seviyesinden 2100 m'ye kadar olan yüksekliklerde doğal yayılış göstermektedir [10].



Şekil 1.2. *Rhododendron ponticum* [3].



Şekil 1.3. *Rhododendron ponticum*'un ülkemizdeki yayılış alanı [3].

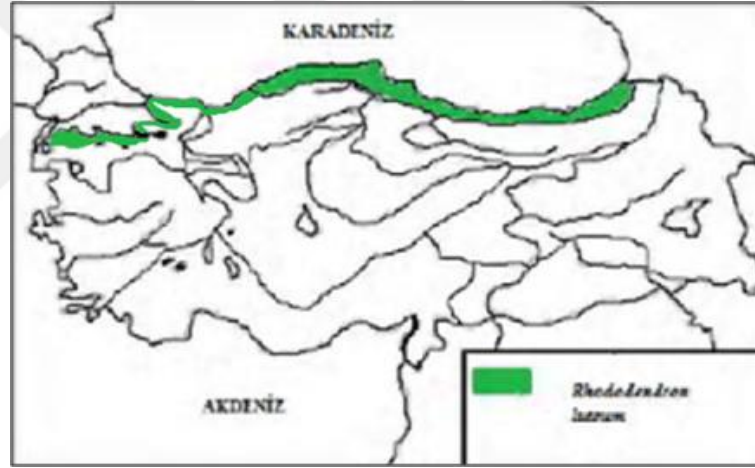
- Sarı Çiçekli Ormangülü (*Rhododendron luteum*)

Halk arasında “eğriçiçeği”, “çifin” [11] ya da “sarı ağu” gibi isimlerle de bilinen, *R. luteum*, Türkiye’de bilinen diğer ormangülü türlerinden farklı olarak, kışın yapraklarını döken bir çalı türüdür. Avrupa’da ve Güneybatı Asya’da yapraklarını döken tek ormangülü türüdür. Yaklaşık 4 metreye kadar boylanabilir ve sarı renkteki çiçeklerinin 5-15 tanesi sürgün ucunda bir arada bulunur (Şekil 1.4). Şekil 1.5' den görüldüğü gibi

Karadeniz bölgesindeki yayılış alanı oldukça geniş olan sarı çiçekli ormangülü, batıya doğru Balıkesir ve Çanakkale çevresine kadar yayılış gösterir [10].



Şekil 1.4. *Rhododendron luteum* [3].



Şekil 1.5. *Rhododendron luteum*'un ülkemizdeki yayılış alanı [3].

- Beyaz Çiçekli Ormangülü (*Rhododendron ungerii*)

Yaprakların ucu küt ve geniş, alt yüzleri soluk kahverengi tüylerle örtülüdür. Kafkaslar ve Kuzeydoğu Anadolu'da doğal yayılış göstermektedir. Türkiye'deki doğal yayılış alanında beyaz kumar/komar olarak da bilinen, daima yeşil ve yaklaşık 6-7 m boylanabilen bir ormangülüdür. Çiçek sapı üzerinde 12-24 çiçekten oluşan çiçek demetleri yer alır (Şekil 1.6). Yaklaşık 800-2000 metreler arasındaki dikey dağılışı, bazı alanlarda 2200 metrelere kadar çıkmaktadır. Şekil 1.7' den görüldüğü gibi Türkiye'de kolşik alanının temsil edildiği Doğu Karadeniz'de, özellikle Batum sınırına yakın olan

yerlerde yayılış göstermektedir [10], [12].



Şekil 1.6. *Rhododendron ungerii* [3].



Şekil 1.7. *Rhododendron ungerii*'in ülkemizdeki yayılış alanı [3].

- Kafkas Ormangülü (*Rhododendron caucasicum*)

Kafkas Ormangülü, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde "dağ kumarı" olarak adlandırılır [11]. Beyaz ya da krem renkli çiçeklere sahip olan (Şekil 1.8) bu ormangülünün çiçekleri yenilmektedir. 1 veya 1,5 metre kadar boy yapabilen bu ormangülü Karadeniz Bölgesi'nin asit karakterli toprakları (pH=3-4) üzerinde, özellikle dağlık alanlarının kuzey yamaçlarında yayılış göstermektedir. Kayın, kayın-köknar ya da kayın-ladin ormanlarının alt katında dağınık topluluklar oluşturmakta ve en iyi yetişme koşullarının subalpin kuşak ile alpin kuşak olduğu belirtilmektedir [12], [13]. Donuk krem rengi çiçekleri olan ve sürgün uçlarında 5-8 çiçek demeti taşıyan bu ormangülünün sürgünleri

de hafif tüylüdür. *R. caucasicum*'un dikey doğrultudaki yayılış alanı genellikle 1800-3000 metre ve en iyi gelişme gösterdiği yükselti aralığı 2000 metrenin üzerindeki yerlerdir. Kafkas ormangülü Şekil 1.9' dan görüldüğü gibi Kaçkar dağlarında ise 3250 metreye kadar çıkabilmektedir [3].



Şekil 1.8. *Rhododendron caucasicum* [3].



Şekil 1.9. *Rhododendron caucasicum*'un ülkemizdeki yayılış alanı [3].

- Pembe Çiçekli Ormangülü (*Rhododendron smirnovii*)

R. smirnowii daima yeşil ve yaklaşık 4 metreye kadar boylanabilmektedir. Koyu yeşil yapraklarının altı ile çiçekleri taşıyan sürgünleri yoğun gri beyaz tüylerle kaplıdır. Parlak pembe çiçeklerininin 7-15 tanesi bir aradadır (Şekil 1.10). Dikey doğrultudaki yayılış alanı, Anadolu'da 850-2300 metreler arasında değişmekle birlikte, daha çok 1600-2200 metreler arasında yoğunlaşmaktadır. Kafkas dağlarında 1000-1600 metrelik seviyelerdeki (Şekil 1.11) kayın ormanlarında, *R. ponticum* ve *R. ungerii* ile karışık

olarak ya da tek başına topluluklar meydana getirmektedir [14].



Şekil 1.10. *Rhododendron smirnovii* [3].



Şekil 1.11. *Rhododendron smirnovii*'in ülkemizdeki yayılış alanı [3].

1.2. ORMANGÜLÜ BALI

Türk Gıda Kodeksine göre bal, bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımlarının, salgılarının veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarının bal arısı tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle birleştirilerek değişikliğe uğratıldığı, su içeriğinin düşürüldüğü ve petekte depolanarak olgunlaştırıldığı doğal bir ürün olarak tanımlanmaktadır [15]. Balın kimyasal bileşimi birçok etkene bağlıdır. Bunlardan en önemlisi nektar ve salgının doğal bileşimidir. Ayrıca iklim koşulları ve arının bal yapma özelliği de balın kimyasal bileşiminde etkili

olmaktadır. İçinde yaklaşık 200 bileşik bulunan bal, ortalama %20 nem, %76 şeker, %0.18 kül, %1 toplam polifenol, protein gibi bileşenlerin yanı sıra koruyucu olarak α - tokoferol, flavonoidler ve diğer fenolikler, glukoz oksidaz, katalaz ve peroksidaz gibi enzimleri de içerir [16]. Balın temel bileşeni karbonhidrattır. Karbonhidratların ise % 85-95'i glukoz ve fruktozdan ibarettir. Ayrıca sakkaroz, maltoz, isomaltoz, melezitoz ve laktoz gibi şekerler bulunur. Balın yapısında karbonhidratlardan başka organik asitler, amino asitler (lisin, histidin, arginin, aspartik asit, serin, glutamik asit, prolin, glisin, alanin, valin, metionin, lösin, izolösin, triosin, fenilalanin, triptofan), mineraller (potasyum, sodyum, kalsiyum, magnezyum, demir, bakır, mangan, klor, fosfor, kükürt, kükürt dioksit, iyot), vitaminler (riboflavin, pantotenik asit, niasin, tiamin, piridoksin, askorbik asit), enzimler (amilaz, sakkaraz, invertaz, fosfotaz, katalaz, glukoz oksidaz), aroma maddeleri, uçucu yağlar, mumlar ve polen taneleri mevcuttur [17], [18].

Ormangülü balı (OGB), çeşitli *Rhododendron* türlerinin nektarlarının bal arıları tarafından toplanması, dehidre edilip, olgunlaştırılması sonucu oluşturulan doğal bir baldır [3], [5]. Bu bal halk arasında “deli bal”, “tutan bal” veya “acı bal” olarak bilinir [19], [20]. OGB, yapısında bulunan grayanotoksin (GTX) bileşiğinden dolayı insanlarda zehirlenmelere neden olmaktadır [21], [22]. OGB'nin rengi diğer ballara göre daha kırmızı-kahverengidir ve keskin özel bir kokusu vardır. Kaynatılırsa ve uzun süre bekletilirse toksisitesinin kaybolacağı düşünüldüğünden, halk arasında bu balın sütle kaynatılıp köpüğü alındığında zehirsiz hale geleceğine inanılır [23]. Tıbbi literatürün yanı sıra tarih kitaplarında da konu hakkında dikkat çekici bilgiler bulunmaktadır.

Yapılan bilimsel çalışmalarda, OGB'nin yüksek fenolik madde içeriğine ve bundan dolayı da yüksek antioksidan, antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir [24]. Dolayısıyla bu bal ne kadar toksik etkiye sahip olsa da insanlar tarafından bazı hastalıklarda tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Gastrointestinal hastalıkların, diyabetin, hipertansiyonun, koroner arter hastalığının ve seksüel performansın artırılmasında alternatif tedavi amacıyla kullanıldığı yönünde bilgiler mevcuttur [25]-[30]. Taşdemir ve arkadaşları [31], deli balın özellikle Kuzey Anadolu'da romatizmal ağrılarda, diş ağrılarının tedavisinde analjezik olarak, soğuk algınlıklarında, ödemde, hem içten hem de dıştan tedavide kullanıldığını, Sütüpınar ve arkadaşları [32] bazı gastrointestinal hastalıkların iyileştirilmesinde 1-2 çay kaşığı deli balın kullanıldığını bildirmişlerdir. Ayrıca *Rhododendron* türlerinden elde edilen ekstraktlar, Japonya'da

alternatif tıpta kullanılmaktadır [33].

Silici ve arkadaşları [24] tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada, 14 farklı OGB’de organik asitler, fenoller, ketonlar, alkoller, 1,2 benzendikarboksilik asit, tributil fosfat, stearik asit, propanoik asit, benzen, etilenfenil asetat ve benzofenon gibi 72 farklı bileşik tespit edilmiştir. Ayrıca OGB; Cu, Cd, Pb, Co, Cr, Ni, Al, Se, Zn, Mn, F, K, Ca ve Mg elementlerini içermekte ve bu balda Cu, Co, Cr, Ni, Se, Zn, Ca ve Mg diğer çiçek ballarına göre daha yüksek Al, Mn, F ve daha az K bulunmaktadır [34].

1.3. ORMANGÜLÜ BALININ TARİHÇESİ

OGB zehirlenmesinden ilk defa MÖ 401’de, Atinalı tarihçi ve ordu komutanı olan Xenophon tarafından bahsedilmiştir [35], [36]. Çeviri ismi “Onbinlerin Dönüşü” olan ve OGB zehirlenmesinin etkisinin ilk olarak anlatıldığı Xsenefon’un “Sirus’un Sevki” günlüğünde bugünkü Trabzon şehri yakınlarında geçtiği anlaşılan şu dikkat çekici hikâye yer almaktadır.

“Colchianların dağına çıkıp yerlilerini bozguna uğrattıktan sonra, Yunanlılar onların köylerinde kamp kurdular. Orada onlara garip gelen bir şey yoktu, ama arı kovanlarının çokluğu alışılmıştın dışındaydı ve bu bal peteklerinden yiyen askerlerin hepsi şuurlarını kaybettiler, kustular ve ishal oldular. Ayrıca hiç birisi ayakta duramıyordu; sadece az yiyenler aşırı sarhoş, fazla yiyenler çıldırma noktasında, bazıları ise ölüm derecesindeydi. Baldan yiyen askerlerin hepsi yere yığılıp kaldılar. Orada sanki büyük bir yenilgi olmuştu ve genel bir hüznün ve çöküntü hali vardı. Ertesi gün onlardan hiçbiri ölü bulunmadı ve şuurlarını geri kazandılar, üçüncü ve dördüncü günde ise sanki bir beden eğitimi yapmışçasına ayağa kalktılar [37].”

MÖ 67’de Kral Mithradates IV tarafından OGB, Kuzeydoğu Anadolu’da Pompey’in ordularına karşı kullanılmıştır. Mithradates başdanışman Yunanlı tabip Kateus’un tavsiyesi üzerine, ilerleyen Romalıların yolu üzerine içi deli bal ile dolu petekler yerleştirmiş ve taktiksel bir geri çekilme yapmıştır. Bu peteklerden yiyen Romalılar bitkin düşerek kolayca etkisiz hale getirilmiştir.

Ondokuzuncu yüzyılda Avrupa ve Kuzey Amerika’da OGB zehirlenme vakaları bildirilmiştir. 1896’da Amerikan eczacılar birliğinin yıllık toplantısında konuşan Kebler, ABD’deki OGB zehirlenmesi vakalarını literatüre kazandırmıştır [38]. Konuşmasında, Kuzey Anadolu’da, Sanni kırsalında delilik meydana getiren bir bal cinsine rastlandığını ve bu balın “Maenomenon” olarak adlandırıldığını belirtmiştir. Bu zehir genel olarak ormanları bol olan yerdeki *Rhododenron* (ormangülü) çiçeklerine atfedilmiştir. Kebler konuşmasında kendi vakalarının yanı sıra daha önce yapılmış diğer çalışmalara da yer

vermiştir. Kebler'e göre Barton, OGB zehirlenmesinin etkilerini rapor eden ilk Amerikalıdır. Barton, bulgularını ilk defa Amerikan Filozoflar Topluluğunda 1794'de okumuş, 1802'de de bir makalesinde bunları yayınlamıştır. 1891 yılında Plugge, Ericaceae familyasından birçok bitki üzerinde çalışma yapmış ve bu bitkilerdeki aktif maddenin andromedotoxin (grayanatoksin) olduğunu keşfetmiştir [39]. British Medical Journal'ın 1999 yılında yeniden basılan 1899 yılı makalesi de, tipik bir OGB zehirlenme vakası üzerinedir. Dioscorides, Diyotaras Siculus ve Aristotle, *Heraklea pontica*'nın (*Rhododendron*'un bir türüdür) yılın belli zamanlarında toplanan balın meydana getirdiği deli edici etkilerden bahsederler. J.P. Tournefort zehirli balın *Azalea pontica*'dan kaynaklandığını tanımlar ve bu balın kim yerse onu aptallaştırdığından bahseder [38].

Türkiye'de OGB ile ilgili ilk araştırma Bucak tarafından 1938 yılında yapılmıştır. Bucak balı mikroskopik olarak incelemiş ve balın içinde *Rhododendron* polenlerini tanımlamıştır [40]. Biberoglu ve arkadaşları [41] 1984 ile 1986 yılları arasında OGB'den zehirlenen 16 hastayı incelemiş, bu ballarda GTX tespit etmiştir. 1991 yılında Onat ve arkadaşları [42] ratların peritonuna OGB enjekte etmişler ve kalp hızlarının azaldığını ayrıca solunumlarının yüzeyselleştiğini tespit etmişlerdir. Özhan ve arkadaşları [43] 2002 yılında acil servislerine başvuran OGB zehirlenmesi olarak düşündükleri 19 vakayı retrospektif olarak incelemişler ve 19 vakanın 15'inde sinüs bradikardisi, 4'ünde ise AV tam blok tespit etmişlerdir. Hastaların 30–180 mg arasında bal yedikleri tespit edilmiş olup, hepsi 2–9 saat arasında 0,5–2 mg atropine cevap vermiş ve 24 saat içerisinde kan basınçları düzelmiştir.

1.4. ORMANGÜLÜ BALI ZEHİRLENMESİ

OGB belli bir dozun üzerinde tüketildiğinde zehirlenmeye sebep olmaktadır. Yapılan araştırmalarda 50 mg/kg'dan (yaklaşık 1 çay kaşığı) fazla tüketmenin ciddi zehirlenmelere sebep olabileceği ve zehirlenme şiddetinin tüketilen bal miktarına bağlı olduğu belirtilmiştir [44]. Zehirlenme belirtileri, bal tüketildikten 20 dakika ile 3 saat arasında ortaya çıkar ve zehirlenme ciddi boyutta değil ise 1-2 gün içinde kişi düzelir [45], [46]. OGB zehirlenmesi, özellikle Türkiye'de Karadeniz Bölgesi'nde sık rastlanan bir durumdur. Bununla birlikte, Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Kore, Almanya ve Avusturya'dan bildirilen vakalar vardır [47].

OGB'nin etken maddesi olan GTX, hipotansiyon, aritmi, solunum depresyonu, bulantı, kusma, baş dönmesi, torsiyon spazmına ve merkezi sinir sistemini etkileyerek spontan harekette azalmanın dahil olduğu çok geniş bir sistemik etkiye sahiptir [32]–[48]. Doza bağlı olmakla beraber, ilk önce tükürük sekresyonunda artış, kusma ve sersemlik hissedilir. Devamında bradikardi, hipotansiyon, nabızdaki belirgin düşüş, santral sinir sistemi etkileri, atrioventriküler (AV) blok, solunum depresyonu gelir. Kontrol altına alınmazsa ölümlü sonuçlanabilir [49]. Ancak literatürde ölümcül bir vaka bildirilmemiştir [22], [23], [35], [50], [51].

OGB ile ilgili yayınlanmış çalışmaların çoğu, bal yedikten sonra bir takım şikayetler ile acil servise giden hasta vakalarıyla ilgili olgu sunumlarıdır [23], [35], [51]–[53]. Çiçek ve arkadaşlarının [50] yayınlamış olduğu bir olgu raporunda OGB tüketen 58 yaşındaki bir erkek hastada baş dönmesi, halsizlik, bulantı ve baygınlık hissiyle acil servise başvurması sonucu hipotansiyon ve bradikardi gözlemlendiği belirtilmiştir. OGB tükettikten sonra baş dönmesi ve bulantısı olan 46 yaşındaki bir erkek hastayı inceleyen İnci ve arkadaşları [51] hastanın sinüs bradikardisi ve hipotansiyonu olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca deli bal zehirlenmesi sonucu bir hastada asistoli tanısı konduğu [54], hastalarda atriyoventriküler blok oluşumu gözlemlendiği [55], miyokart enfarktüsün ortaya çıktığı [56] bildirilmiştir. Gündüz ve arkadaşlarının [35] 2008 yılında yapmış olduğu bir çalışmada 12 farklı olgunun incelendiğini, olguların %75'inde spesifik olmayan bradiaritmi veya sinüs bradikardi rapor edildiğini, zehirlenmenin 5-30 gr OGB tüketilmesiyle ortaya çıktığını ve tedavisinin 1-2 mg intravenöz atropin ile olduğunu bildirmiştir.

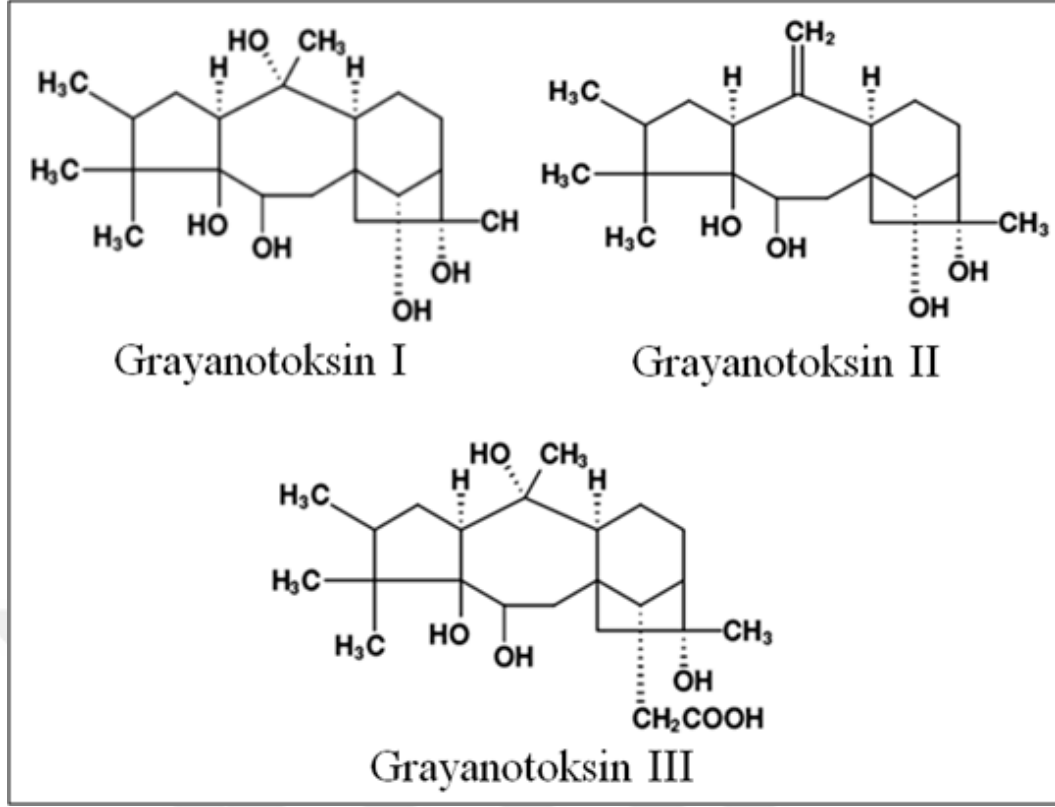
Sınırlı sayıda olmakla birlikte literatürde OGB ile ilgili deneysel çalışmalarda mevcuttur. Örneğin; Aşçıoğlu ve arkadaşlarının [21], OGB ve çiçek balı kullanarak gerçekleştirdikleri bir çalışmanın sonucunda OGB kullanılan kurbağa gastrocnemius kasında daha fazla kasılma olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, Aşçıoğlu ve arkadaşlarının [57] bir diğer araştırmasında kurbağa siyatik sinirinin potansiyel aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlardaki OGB'nin etkisini incelemişler ve OGB'nin siyatik sinirde başlangıç uyarı voltajını yükselttiğini ve yükselmenin kullanılan OGB miktarı ile değiştiğini bildirmişlerdir. Öztaşan ve arkadaşları [26] ratlarda OGB'nin kan glukoz ve lipit seviyeleri üzerine etkilerini araştırmışlar, OGB'nin hem diabetes mellituslu hem de kontrol grubu hayvanlarında kan glukoz ve lipit seviyelerinde anlamlı bir düşmeye

sebepl olduğunu göstermişlerdir. Diğer bir çalışmada, deneysel hipertansiyon oluşturulan sıçanların kan basıncı ve kalp hızı ölçülmüş ve hipertansiyon oluşturulan sıçanlarda OGB'nin kan basıncını ve kalp hızını azalttığı tespit edilmiştir [58]. Ertürk ve arkadaşları [59], OGB'nin antibakteriyel ve antifungal özellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada, Silici ve arkadaşları [60] ratların çeşitli dokularında OGB'nin antioksidant etki gösterdiğini ortaya çıkarmışlardır.

1.5. GRAYANOTOKSİN (GTX)

Ormanğüllerinde dahil olduğu Fundagiller familyasındaki bitkilerin yapraklarında, gövdesinde, çiçeklerinde ve polenlerinde yüksek miktarda bulunan GTX, 2 hegzamerik ve 1 pentamerik halkadan oluşan diterpenoid bir bileşiktir. Görevi, bitkiyi böceklerden ve herbivorlardan korumaktır [61].

GTX'ler daha öncesinde çoklu hidroksilli halkalı hidrokarbon bileşikler olarak andromedotoksin, asetil andremodol ve rodotoksin gibi isimlerle anılmaktaydı. Bunlar kararlı ve 300°C'ye kadar yüksek sıcaklıklara dayanıklı bileşiklerdir. Günümüzde 60 adet bilinen formu tanımlanmıştır [62]. GTX'ler GTX-I'den türevlenirler. GTX-I, GTX-II ve GTX-III'ün kimyasal yapısı Şekil 1.12'de verilmiştir. Bu moleküllerin her biri dört izopren biriminin (C5) bir araya gelmesiyle meydana gelen yirmi karbonlu (C20) polihidroksilli siklik hidrokarbonlardır [63].



Şekil 1.12. Grayanotoksin I, II ve III'ün genel kimyasal yapısı [64].

OGB'de ana toksik izomer GTX-III olmasına rağmen, GTX-I ve GTX-II'de az miktarda bulunmaktadır [61]. GTX-II, daha kararlı moleküler yapıya sahip olduğu için daha geç hidrolize edilmekte ve bundan dolayı da GTX-I ve GTX III'e göre daha az toksik etki göstermektedir. GTX-I ve GTX-III ise daha az kararlı moleküler yapıda olmasından ve daha çabuk hidrolize olmasından dolayı daha toksiktir. Bir çeşit nörotoksin olan GTX'lerin toksik değer sıralaması GTX-III>GTX-I>GTX-II şeklindedir [22], [61]. GTX hücre membranında bulunan sodyum kanallarını bloke ederek aksiyon potansiyeli geçirgenliğine etki eden bir nörotoksindir. GTX-I ve GTX-III bunun için ideal yapıya sahiptir. Fakat GTX-II bu özelliği göstermez [61].

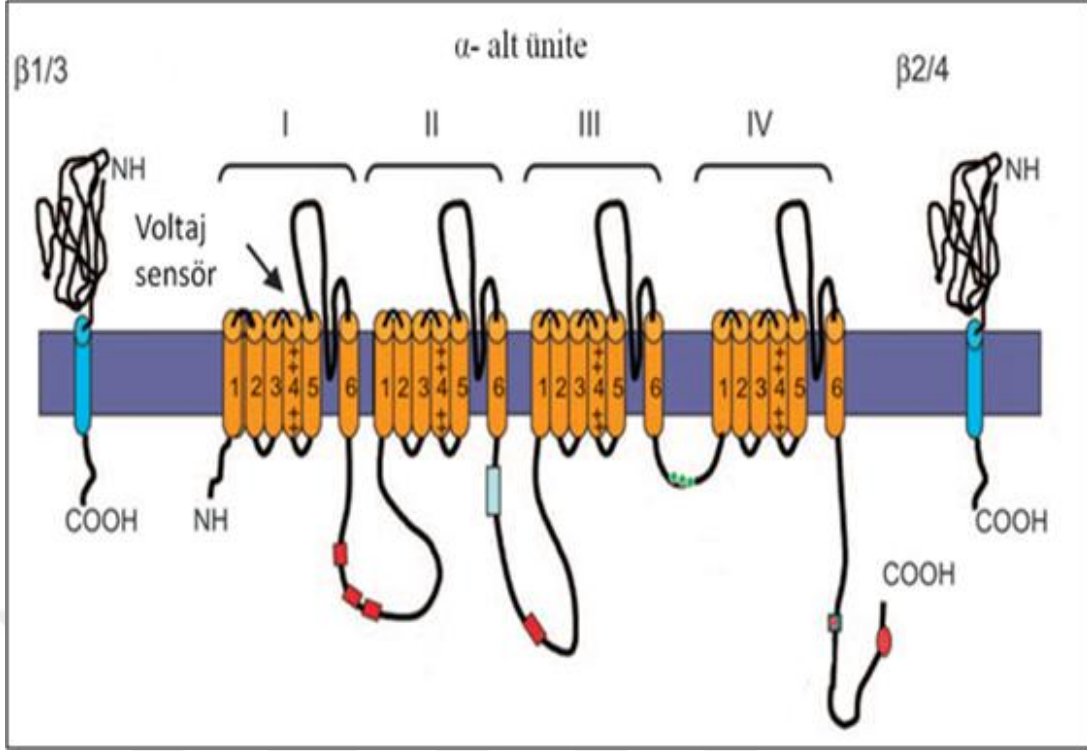
GTX'ler özellikle dolaşım, solunum, sindirim ve santral sinir sistemini etkilemektedir. GTX-III bileşiği ayrıca antikanser, antimikrobiyal, doğal böcek öldürücü etkisi göstermektedir [46], [65]. GTX düşük dozlarda alındığında kalpte kolinerjik etkilerle bradikardi ve hipotansiyon yaparken, yüksek dozlarda alınması durumunda sürrenal medulladan epinefrin salgılatarak taşikardi ve hipertansiyon oluşturur. Solunum sisteminde ise düşük dozlarda soluk almada düzensizlik ve derinlikte azalma, yüksek dozlarda ise solunum hızlanması ve sonrasında solunum depresyonu yapar [66].

Yapılan literatür taramasında GTX ile ilgili farklı çalışmalara rastlanmıştır. Narahashi ve Seyama GTX'in sinir membran depolarizasyon mekanizmasını incelemiş ve GTX-I'in iç ya da dış uygulamayla indüklenen depolarizasyonun dış sodyum konsantrasyonunu düşürerek tersine döndürdüğünü bildirmişlerdir [67]. Zushi ve arkadaşları [68] GTX'in nöromüsküler bağlantı üzerindeki etkisinin muhtemelen sodyumun membran geçirgenliğinde bir artışa sebep olmasına bağlı olduğu ve hem presinaptik hem de postsinaptik membranların depolarizasyonu ile sonuçlandığı sonucuna varmışlardır. Kobayashi ve arkadaşları [48] GTX-I'in fare ve tavuklar üzerindeki gelişimsel toksisitesini inceledikleri bir çalışmada; farelerde 1.5 mg/kg GTX-I'in bazı hayvanların ölmesine neden olduğunu, ancak embriyotoksisite veya teratojenisite (fetüste gelişimsel anomali) tespit edilmediğini, tavuklarda ise yumurta başına 0.1-1.0 µg GTX-I'in embriyotoksik ve teratojenik etki göstermediği halde 10 µg GTX-I'in öldürücü etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Onat ve arkadaşları [69], hayvan deneylerinde GTX'in respiratuar ve kardiyak etkileri ile merkezi sinir sistemi ve periferik etkilerini incelemişlerdir. Sonuçta GTX'in farelerde bradikardi ve respiratuar depresyona neden olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada GTX'in bradikardik etkisinin bilateral vagotomi ile ortadan kalktığı gösterilmiş ve GTX'in bradikardik etkilerinin, nervus vagus ile periferal yoldan oluştuğu sonucuna varılmıştır [69]. Aşçıoğlu ve arkadaşları [57] ratlar üzerinde GTX-I'in karaciğer ve böbrek fonksiyonları üzerine etkisini araştırmışlardır. Analizler sonucunda deneklerin idrarında protein, kan ve keton seviyelerinde azalma görüldüğü bildirilirken, glutamik prüvik transaminaz, laktat dehidrogenaz aktivitelerinde artış olduğu bildirilmiştir. Kim ve arkadaşları [70] ratlar üzerinde GTX-III'ün voltaj bağımlı nöronlarda sinaptik transmisyonunda etkilerinin olduğunu, post-sinaptik voltaj bağımlı sodyum kanallarını bloke ettiğini belirtmişlerdir. Ayrıca GTX'lerin iskelet ve kardiyak kaslar üzerine bradikardi gibi toksik etkilerinin yanı sıra merkezi sinir sistemiyle periferal sinir sistemi üzerine de nörotransmisyon maddeleri etkileyerek toksiteye sebep olduğunu ve 1 µM GTX-III'ün bazı nörokimyasalların (GABA, glutamik asit gibi) frekansını artırdığını bildirmişlerdir [70]. Günümüzde, birçok bilimsel çalışmada rapor edildiği üzere, GTX'in hücre üzerindeki toksik etkilerinin voltaj bağımlı sodyum kanalları üzerinde meydana geldiği bilinmektedir [35], [67], [71].

1.6. VOLTAJ BAĞIMLI SODYUM KANALI

İyon kanalları, Na^+ , K^+ , Cl^- ve Ca^{2+} gibi spesifik iyonların hızlı bir şekilde membran boyunca ilerlemesini sağlayan membranın içi ile dışı arasında uzanan integral proteinlerdir [72]. İyon kanallarının açılması ve kapanması voltaj-bağımlı, ligand-bağımlı ve/veya mekanik-bağımlı olabilir. Bir kanalın herhangi bir şekilde aktive olması, kanalın konformasyonunda değişime neden olarak kanalın açılmasını veya kapanmasını sağlar. [73], [74]. Voltaj bağımlı sodyum kanalları nöron ve kas hücreleri gibi temelde uyarılabilir hücrelerde aksiyon potansiyelinin üretiminden sorumlu proteinlerdir. Bu kanallar hayvan hücrelerinde, aksiyon potansiyelinin depolarizasyon fazının primer sorumlusu olarak, elektriksel uyarılabilirliğin düzenlenmesinde görev alan başlıca iyon kanalıdır [75]. Zar depolarizasyonu sırasında hücre içine hızlıca Na^+ iyonlarının geçişine aracılık ederek, nöronlarda ve kas hücreleri gibi uyarılabilen hücrelerde aksiyon potansiyelinin üretimini ve yayılımını sağlarlar. Bu kanalların Na^+ iyonlarının hücre içine girişini sağlayan temel fonksiyonları, sahip oldukları voltaj bağımlı aktivasyon, seçici iyon iletimi ve hızlı inaktivasyon özelliklerine dayanmaktadır [76], [77].

Na kanalı 220-260 kDa ağırlığında bir α alt ünitesi ve yaklaşık 30-40 kDa ağırlığında bir veya iki yardımcı β alt ünitesinden meydana gelen heteromerik bir komplekstir [78]. α alt ünitesi, her biri 6 hidrofobik zar geçişli segment (S1-S6) içeren 4 homolog kısım (DI-DIV)'den meydana gelmektedir [78]. Sodyum iyon kanalının α alt birimi tek başına işlevseldir ve iyon seçici kanal oluşturma yeteneğine sahiptir [79]. Şekil 1.13'de voltaj bağımlı sodyum kanalının yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.13. Voltaj bağımlı sodyum kanalının yapısı [80].

Sodyum kanallarıyla ilgili yapılan farklı çalışmalarda voltaj bağımlı sodyum kanalları üzerine etki gösteren nörotoksinlerin moleküler mekanizması incelenmiştir. Nörotoksinlerin voltaj duyarlı sodyum kanallarını meydana getiren makromoleküllere özgül olarak bağlandığı ve özelliklerini değiştirdiği bilinmektedir. Çeşitli toksinlerin sodyum kanalları üzerinde hangi bölgelere etki ettikleri araştırılmış ve 5 ayrı grup bağlanma bölgesi tanımlanmıştır.

- Nörotoksin Reseptör Bölgesi 1

Makromolekülün bu reseptör bölgesine tetrodotoksin ve saksitoksin (saxitoksin) toksinleri bağlanır ve Na^+ geçiş yolunda Na^+ iyonu geçişini önler (inhibe eder).

- Nörotoksin Reseptör Bölgesi 2

Makromolekülün bu bölgesine lipitlerde eriyen toksinler bağlanırlar. Grayanotoksin ve alkolaoidlerden veratridin, akonitin ve batrakotoksin (batrachotoxin) bu gruptandır. Bu zehirler membranın istiharat potansiyelinde bile Na^+ geçiş yollarını devamlı aktive eder ve inaktive edilmelerini önlerler. Buna göre, bu tür zehirler Na^+ geçiş yollarının voltaj duyarlı bölgesine bağlanmaktadır.

- Nörotoksin Reseptör Bölgesi 3

Kuzey Afrika akrebi (scorpion α -toksin) zehiri makromolekülün bu bölgesine bağlanır ve Na^+ geçiş yolunun inaktive edilmesini yavaş bir biçimde önler. Reseptör bölgesi 3, makromolekülün voltaj bağımlı kısmının konformasyonel değişikliği ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

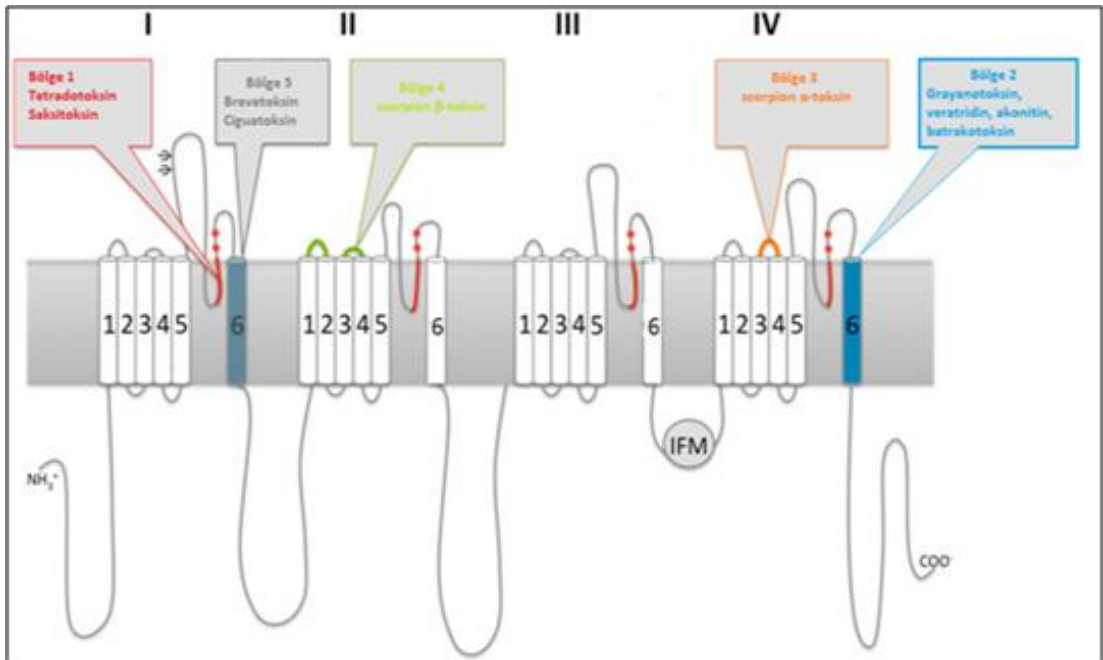
- Nörotoksin Reseptör Bölgesi 4

Amerika akrebi zehiri (scorpion β -toksin) bu bölgeye bağlanır ve Na^+ geçiş yolunun aktive edilmesini kuvvetlendirir [81].

- Nörotoksin Reseptör Bölgesi 5

Batrakotoksin ve reseptör bölgesi II'de etki eden diğer toksinler gibi, sırasıyla *Ptychodiscus brevis* ve *Gambierdicus toxicus* dinoflagellatlarından izole edilen lipitte çözünür brevetoksinler ve ciguatoksinler, sodyum kanalı aktivitesini artırır. Nörotoksin reseptör bölgesi 5'e bağlanırlar ve aktivasyonda daha negatif zar potansiyellerine ve inaktivasyon bloğuna neden olurlar [82]–[84].

Şekil 1.14 sodyum kanalına bağlanan nörotoksinlerin bağlanma bölgelerini göstermektedir.



Şekil 1.14. Voltaj bağımlı sodyum kanalına bazı nörotoksinlerin bağlandığı bölgeler

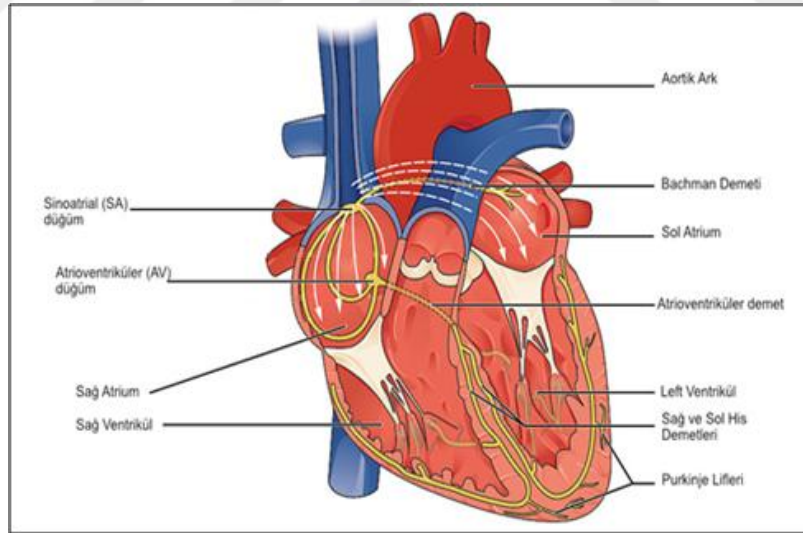
[85].

Grayanotoksinin de içinde bulunduğu reseptör 2 bölgesine bağlanan toksinler kanalların daha kolay açılacağı ve daha uzun süre açık kalacağı şekilde sodyum kanallarını modüle ettiklerinden sodyum kanalı aktivatörü olarak bilinirler. Sodyum kanallarının aşırı duyarlılığı, epileptik nöbet ve kardiyak aritmilerin oluşumu ile yakından ilişkilidir [86].

1.7. KALP KASI

Dolaşımın ana merkezi ve motoru olarak işlev gören kalp, içindeki kanı vücut ve akciğerlere pompalar. Pompalama işlevi, kalp kasının ritmik olarak kasılması ve gevşemesi ile başarılır. Kalp kasının kasılmasındaki moleküler mekanizmalar iskelet kasınıninkine benzer, ancak kalp kası iskelet kasından farklı olarak, sinirsel kontrol olmadan da, eşzamanlı olarak kendiliğinden kasılabilmektedir [87].

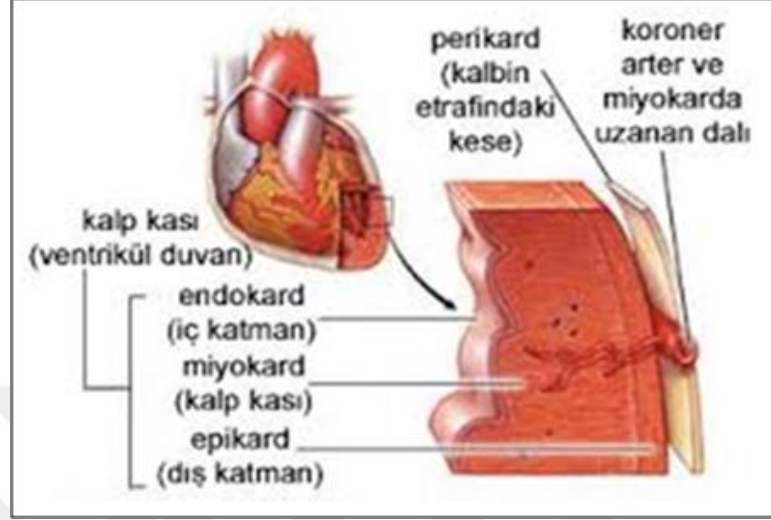
Kalp 4 ana boşluktan oluşur. Üstte yer alan boşluklara atrium (kulakçık) altta yer alan boşluklara ise ventrikülüs (karıncık) denir (Şekil 1.15). Atriyum ventikül için zayıf bir hazırlayıcı pompa işlevi görür ve görevi kanın ventriküllere taşınmasına yardımcı olmaktır. Ventrikül ise kanı pulmoner ya da periferik dolaşıma gönderen ana pompalama kuvvetini sağlar [88].



Şekil 1.15. Kalbin yapısı.

Kalp duvarlarının kalın tabakası olan miyokard kalbin kasılmasında görevlidir. Bu tabaka kendine özgü bir çeşit çizgili kas yapısına sahiptir. Dışarıdan epikard ile içeriden ise endokard ile kaplanmıştır. Şekil 1.16'da kalp tabakaları görülmektedir. Ventrikulus duvarındaki kas tabakası ile atrium duvarındaki kas tabakası birbirlerinden özel bir yapı

ile ayrılmıştır. Böylelikle ventrikuluslar ile atriumlar ayrı ayrı çalışabilmektedir. Ventrikulusların kas tabakası atrium'ların kas tabakasından çok daha kalındır. Bu kalınlık fonksiyonel farklılığından kaynaklanmaktadır [89]. Miyokard tabakasının en kalın olduğu bölüm kalbin apeks (uç) kısmıdır.



Şekil 1.16. Kalbin tabakaları.

Kalp kası hem iskelet kası hem de düz kasların özelliklerini gösterir. Kalp kasında bulunan ince aktin filamentler ile kalın miyozin filamentler çizgili kaslardakine benzer şekilde düzenlenmesinden ötürü kalp kası hücreleri iskelet kası görünümündedir fakat çizgili kas hücrelerinden daha kısadır [88].

Kalp kası her biri özel işlevler üstlenmiş değişik türlerde hücrelerden oluşur. Bir kısmı kalbin otomatik ritmini oluştururken, bir kısmı uyarı iletimini, diğer bir kısmı ise kasılma işlevlerini üstlenmiştir [87]. Kardiyomiyositler kendi aralarında gap-junction denilen özel bağlantı elemanları içerirler. Hücreler arası yüksek geçirgenliğe sahip olan bu bağlantı elemanları, hem komşu hücrelerle mekanik bağlantıyı, hem de iyonik akımların ve küçük moleküllerin iletimini sağlarlar. Bu sayede kalbe gelen uyarı, tüm kalbe kolayca yayılır ve miyositler topluca kasılırlar [88].

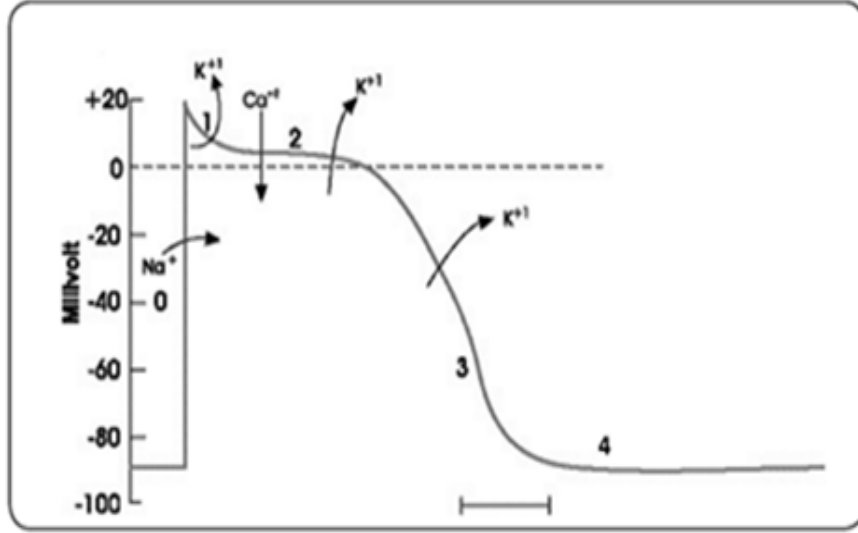
Kalp hücrelerindeki aksiyon potansiyelleri, iskelet kası hücrelerinden farklı olduğu gibi, kalp hücreleri arasında da farklılıklar vardır. Bu farklar iyon kanalları farklılıklarından kaynaklanır. Kalpte dominant olarak Na^+ , K^+ ve Ca^{2+} gibi voltaj duyarlı iyon kanalları mevcuttur. Membran potansiyelinin değişimine bağlı olarak bu kanallar açılır veya kapanır. Kalp kası hücrelerinin zar yapısı; yüksek dirençli lipid çift

tabakası, hücre içinin dışına göre milivoltlar düzeyinde negatif olan dinlenim zar potansiyeli gibi bazı temel elektriksel özelliklere sahiptir. Zarda yer alan voltaj bağımlı iyon kanallarının özellikleri ve çeşitliliği, kalbe kendiliğinden çalışabilme (fonksiyonel sinsityum) özelliğinin yanısıra aksiyon potansiyellerinin biçimini de belirler. Bunlar sadece hücrede kasılmayı tetiklemekle kalmaz aynı zamanda pek çok hücrenin kasılma boyunca varlığını sürdürerek kasılmayı kontrol edip, kalbin bir pompa gibi çalışmasını da sağlar [90].

İskelet kasları sadece uyarıldıkları zaman kasıldıkları halde, kalp dışarıdan bir uyarı olmaksızın ritmik olarak aksiyon potansiyeli oluşturma yeteneği olan ve sinoatrial (SA) ve atriyoventriküler (AV) düğümlerde bulunan hücrelere (pacemaker) sahiptir. Tüm elektriksel uyarıları başlatan SA düğümlerdir.

Kalp hücrelerinde tipik bir aksiyon potansiyeli Şekil 1.17'de görüldüğü gibi 5 evreye ayrılır. Kalbin bu aksiyon potansiyeli fazlarından birinde herhangi bir bozukluk olması kalbin ritminin bozulmasına sebep olur. Bir kalp kası hücresinin aksiyon potansiyeli evreleri kısaca şu şekilde özetlenebilir:

- Hızlı Yükselme Evresi (Faz 0): Voltaj bağımlı Na^+ kanalları açılır ve hücre içine hızlı Na^+ akımı olur.
- Erken Repolarizasyon Evresi (Faz 1): Na^+ kanalları inaktive olur. Voltaj bağımlı K^+ kanalları açılır. Bu arada hücre dışında kısa süreli K^+ artışı olur.
- Plato evresi (Faz 2): Voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları açılır ve hücre içine Ca^{+2} akımı başlar.
- Repolarizasyon Evresi (Faz 3): Ca^{+2} kanalları kapanır, K^+ kanalları açılır. Hücre dışına K^+ çıkışı nedeniyle hücre zarında repolarizasyon olur. Bu fazda hücre içinde K^+ azalır Na^+ artar.
- İleri Akım Evresi (Faz 4): Sodyuma olan geçirgenlik giderek artar. Bu dengesizlik Na/K ATPaz tarafından dengelenir. Hücre bir sonraki aksiyon potansiyelinin eşik voltajına çıkar.



Şekil 1.17. Miyokard hücresi aksiyon potansiyeli fazları.

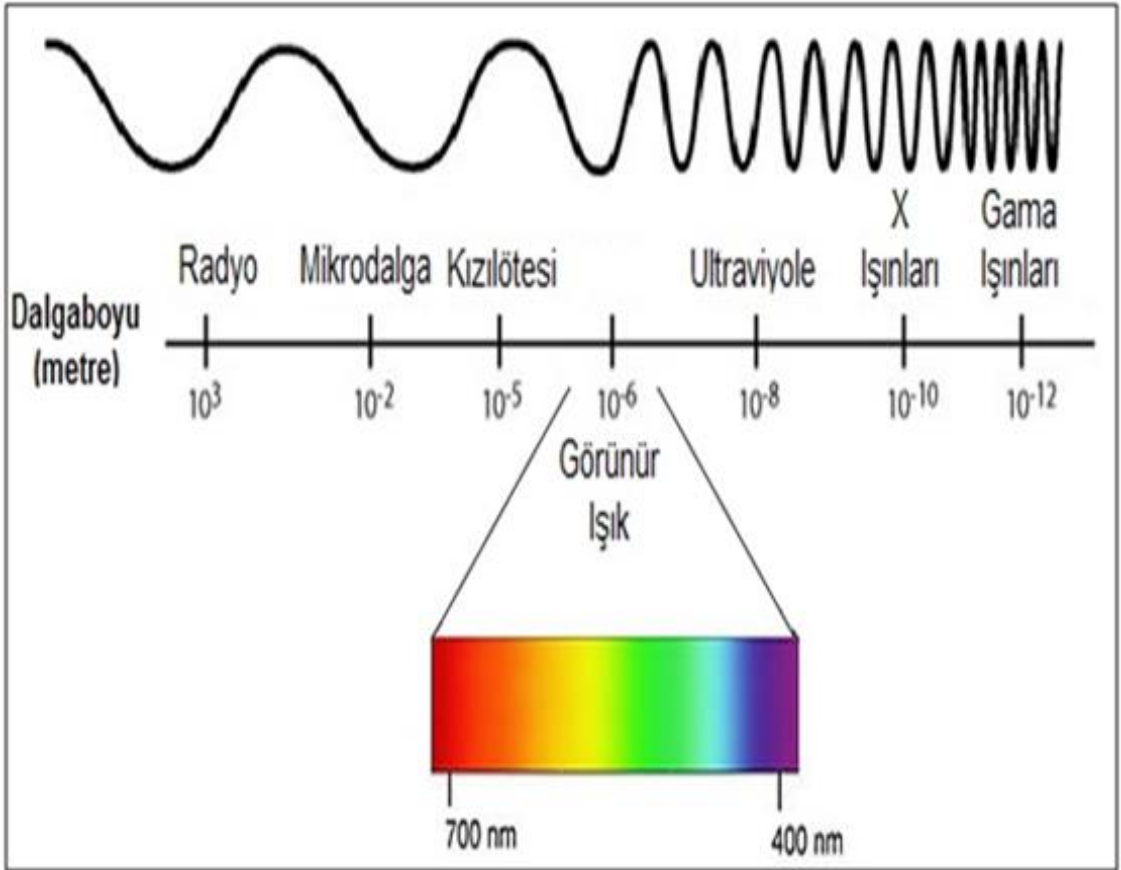
Daha öncede bahsedildiği gibi GTX'ler etkilerini hücre membranındaki Na kanallarının grup II reseptör bölgesine bağlanarak, kanalı aktive etmek yoluyla gösterirler. GTX'ler, sodyum kanallarının aktivasyon kapılarına depolarizasyon sırasında bağlanarak gerilimi artırır. Bu artan gerilimin, sodyum kanallarının farklı alt ünitelerinin etkinliklerini değiştirdiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Kardiyak tutulumda kardiyak sodyum kanalları alt ünitelerinin ve iskelet kasında M_2 (muskarinik reseptör) alt ünitelerinin etkinliği vurgulanmıştır [23], [70].

GTX'in voltaj bağımlı Na kanalları üzerindeki etkisi üç aşamalıdır.

- 1- GTX, voltaj bağımlı Na kanallarına açılma fazında bağlanır.
- 2- Kanallar modifiye olur ve inaktivasyonu engellenir.
- 3- Son olarak, modifiye Na kanallarının aktivasyon potansiyeli, sodyum kanalının hiperpolarizasyonuna neden olur. Bu durum hücre membranının voltaj bağımlı aktivasyonuna [71] ve hücrenin depolarize durumda kalmasına neden olur [91] yani repolarizasyon engellenir. Bu da sinoatriyal nodda aksiyon potansiyelinin zayıflamasına, yani sinüs nod disfonksiyonuna neden olur [91]. Bu durum doza bağlı olarak hipotansiyona, bradikardiye ve solunum hızı depresyonuna neden olur.

1.8. ELEKTROMANYETİK IŞIMA VE SPEKTROSKOPİ

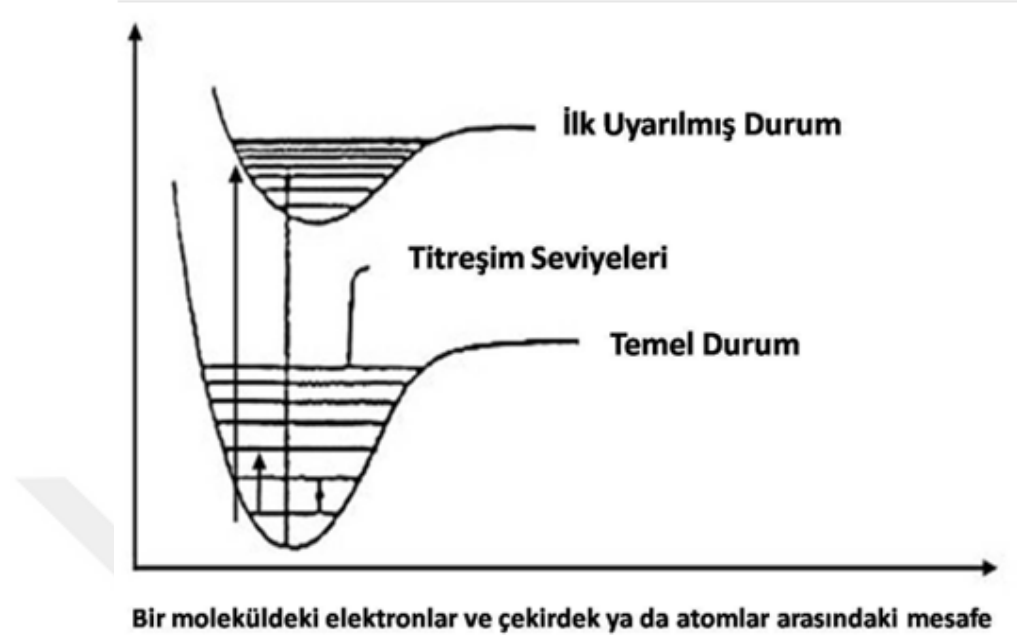
Elektromanyetik ışımaya, uzayda yüksek hızla hareket eden bir enerji türüdür. Elektromanyetik ışımının en çok karşılaşılan türleri, gözle algıladığımız görünür ışık ve ısı şeklinde algıladığımız infrared (kızılötesi) ışınlarıdır. Elektromanyetik ışımaya, dalga frekanslarına göre; radyo dalgaları, mikrodalgalar, kızılötesi, görünür ışık, ultraviyole, x ışınları ve gama ışınları olmak üzere yedi grupta sınıflandırılır [92]. Şekil 1.18'de elektromanyetik spektrum gösterilmiştir.



Şekil 1.18. Elektromanyetik spektrum [92].

Elektromanyetik ışımaya madde ile etkileşime geçtiğinde, frekans değişiklikleriyle beraber niteliksel olarak davranış değişiklikleri de meydana gelir. Elektromanyetik ışımaya ve madde arasındaki etkileşim; elektronlar veya atomların enerji düzeyleri arasında geçişe neden olabilir. Elektronlar, bir enerji düzeyinden diğer bir enerji düzeyine geçişleri sırasında enerjiye ihtiyaç duyarlar. İlk uyarılmış durum ile temel

durum arasında, olası elektron geçişleri meydana gelebilir [93]. Şekil 1.19’da tipik bir enerji düzey diyagramı gösterilmiştir.



Şekil 1.19. Enerji düzey diyagramı [93].

Spektroskopi, bir maddedeki atom, molekül veya iyonların, bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında soğurulan, saçılan veya yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesi ve yorumlanması olarak tanımlanabilir [94]. Spektroskopinin araştırma konusu elektromanyetik ışımaya ile madde arasındaki etkileşimdir.

1.9. INFRARED (KIZILÖTESİ) SPEKTROSKOPİSİ

Infrared (IR) spektroskopisi, kızılötesi ışınlar ile molekül arasındaki etkileşimi esas alan spektroskopik yöntemlerden birisidir. Bir moleküldeki elektron veya atomların temel durumu ile ilk uyarılmış durumu arasındaki geçiş kızılötesi bölgesindeki ışınların emilimiyle gerçekleşir. Kızılötesi spektrumu, moleküldeki özel fonksiyonel grupların kimyasal bağlarındaki karakteristik titreşimler tarafından üretilir. Bir bileşiğin titreşim spektrumu o bileşiğe özgüdür ve optik izomerler dışında hiçbir bileşiğin titreşim spektrumu birbirleri ile aynı değildir. Her bir fonksiyon grubunun teşhisi o grup için belirgin olan titreşim dalga sayısı ile sağlanır. Değişik fonksiyonel gruplara ait titreşim dalga sayıları, daha önce literatürde yer verilen bilgilerden veya atlaslardan faydalanılarak tanımlanmaya çalışılır [95].

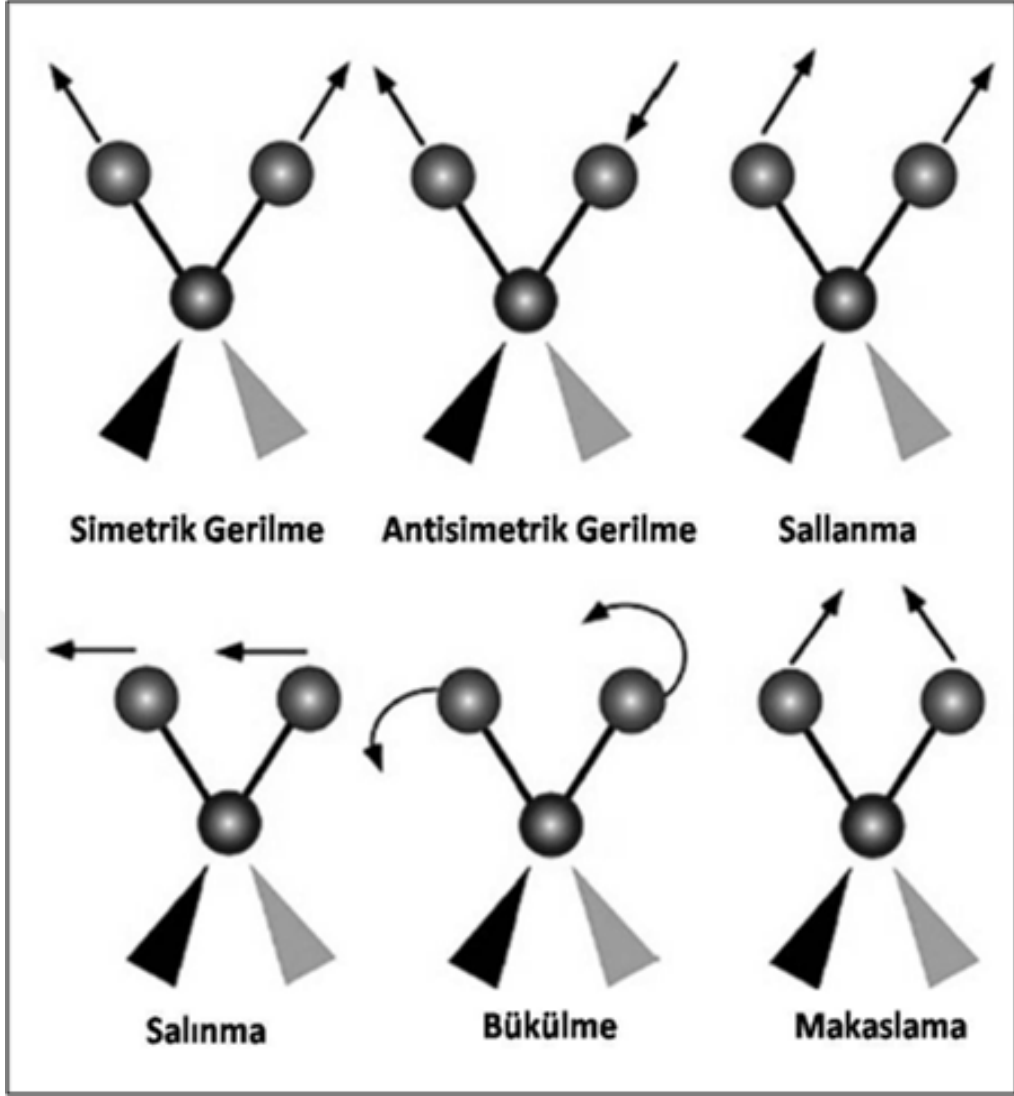
Kızılötesi (Infrared=IR) bölge, elektromanyetik spektrumun 400 cm^{-1} ile 4 cm^{-1} aralığındaki uzak infrared bölge, 4000 cm^{-1} ile 400 cm^{-1} aralığındaki orta infrared bölge ve 14000 cm^{-1} ile 4000 cm^{-1} aralığındaki yakın infrared bölge olarak tanımlanan 3 bölgesinden oluşmaktadır (Çizelge 1.1). Elektromanyetik spektrumun 4000 cm^{-1} ile 400 cm^{-1} arasını kapsayan orta infrared bölgede titreşimsel geçişler meydana gelmektedir. Bu bölgede gerçekleşen infrared absorpsiyonu sonucu oluşan titreşim bantları birçok molekülün nicel ya da nitel analizinde kullanıldığı gibi belirli kimyasal grupların tanınmasına da yardımcı olmaktadır [96], [97].

Çizelge 1.1 İnfrared spektral bölgeler [98].

Bölge	Dalga sayısı aralığı (cm^{-1})	Dalga boyu (μm)
Yakın-IR	14000-4000	0.8-2,5
Orta-IR	4000-400	2.5-25
Uzak-IR	400-4	25-1000

Kızılötesi ışın soğurulması, molekülün titreşim ve dönme hareketlerinde değişimler meydana getirir [99]. Moleküler titreşimler iki grupta toplanabilir:

1. Gerilme titreşimi: Bağ eksenine doğrultusunda uzama ve kılma hareketidir. Yer değiştirme vektörleri bağ uzunluğundaki değişimi verir. Gerilme titreşimi simetrik ve antisimetrik olmak üzere iki şekilde meydana gelir.
Simetrik gerilme: Molekülün bütün bağlarının uzaması veya kılması hareketine denir.
Antisimetrik gerilme: Bağların bir veya birkaçının uzarken diğerlerinin kılması hareketine denir.
2. Eğilme titreşimleri: Düzlem boyunca olan titreşim yani iki bağ arasındaki açının değişmesidir. Dört tipi vardır: Sallanma, salınma, bükülme ve makaslama (Şekil 1.20).

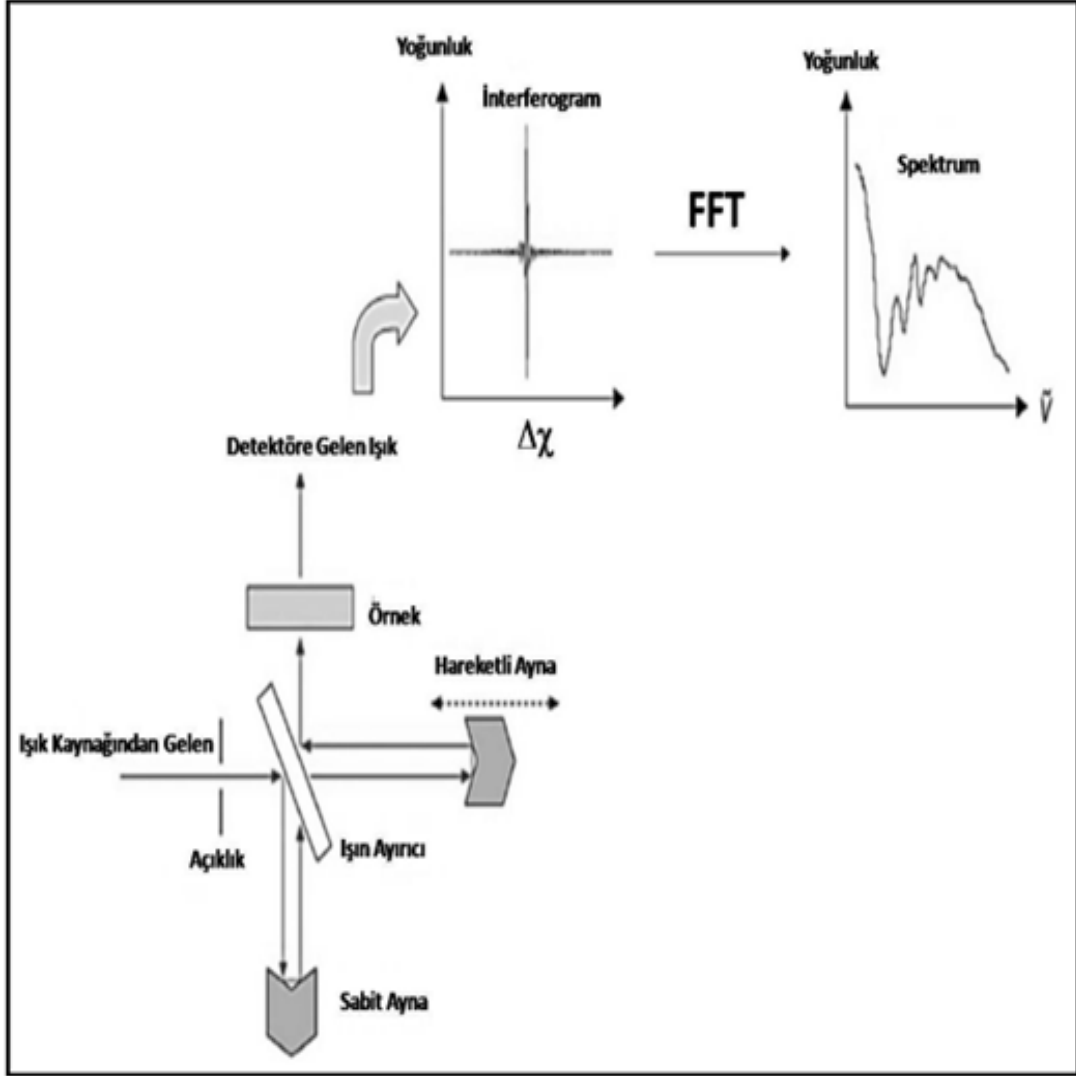


Şekil 1.20. Bir kızılötesi spektrumunda titreşim hareketleri [100].

1.10. FOURIER DÖNÜŞÜM KIZILÖTESİ (FTIR) SPEKTROSKOPİSİ

Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, kızılötesi dalga boyunda elektromanyetik ışınım uygulamasıyla moleküllerin titreşimlerini ölçerek değişik titreşim gruplarını görüntüleyen ve böylece moleküllerin mikro çevresi hakkında önemli bilgiler veren hassas bir tekniktir. FTIR spektroskopisi, matematiksel bir metod olan Fourier transformasyonu uygulayarak veriyi zaman alanından frekans alanına aktaran özel bir kızılötesi spektroskopisi tekniğidir. FTIR spektrometresi, ilk olarak bir Michelson interferometresi kullanarak örnekten gelen sinyallerin bir interferogramını toplar. Daha sonra bu interferograma Fourier dönüşümü uygulayarak bir spektrum elde eder.

İnterferometre, gelen kızılötesi ışınları bir ışın ayırıcı kullanarak iki optik ışına ayırır. Bir ışın sabit alandaki düz bir aynaya gider. Diğer ışın, ışın ayırıcıdan ayrılıp çok kısa bir mesafeye hareket eden düz bir aynaya gider. İki ışın kendi aynalarından geri gelirler ve ışın ayırıcısında tekrar karşılaştıklarında birleşirler. İnterferometredeki sinyal, birbirleriyle birleşen bu iki ışının sonucudur. Elde edilen bu sinyal interferogram olarak adlandırılır [101]. Şekil 1.21’de FTIR spektroskopisinin çalışma prensibi verilmiştir.



Şekil 1.21. Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektrometresi [101].

Bir interferogramda, kaynaktan gelen sinyaller her kızılötesi frekans hakkında bilgi verir ve aynı zamanda bütün frekanslarda ölçülmüş olur. Spektranın veri analizi için frekanslar kullanılır. Fourier dönüşümü spektrometre bilgisayarı tarafından gerçekleştirilir ve interferogramı absorbands-frekans spektrumuna dönüştürür. Bu

dönüşüm ya da dalga boyuna karşı absorpsiyon grafiği olarak gösterilir ya da genellikle daha ileri analizler için frekans (cm^{-1}) olarak sunulur.

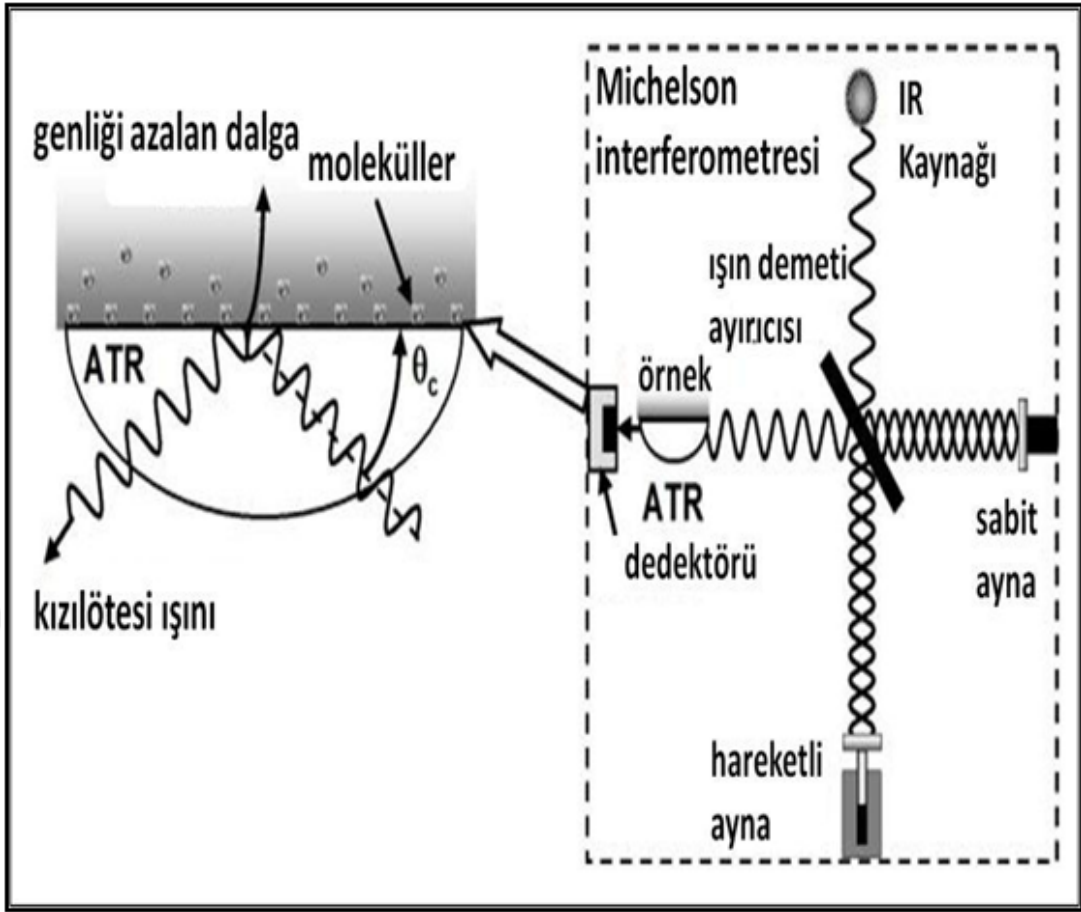
FTIR spektroskopisinden elde edilen bir spektrum, bir bileşiğin yapısındaki bağ türleri, fonksiyonel gruplar ve dolayısıyla sistemdeki moleküllerin belirlenmesini sağlar ve bunların konsantrasyonu, yapı ve fonksiyonu hakkında önemli bilgiler verir.

FTIR spektroskopisi ile kullanılan örneğe zarar vermeden biyolojik sistemler hakkında değerli bilgiler elde edilebilir [102], [103]. Bu teknik kullanılarak çok düşük konsantrasyondaki örnekler hem *in vivo* hem *in vitro* koşullarda incelenebilmekte; protein, lipid, DNA, kolesterol, karbonhidrat gibi hücrelerin yapıtaşları moleküllerinin fonksiyonel gruplarındaki değişimler ve dolayısıyla bu fonksiyonel grupların ait oldukları moleküllerdeki değişiklikler hassaslıkla belirlenebilmektedir [102], [104]–[113].

Genel olarak FTIR spektroskopisinde kullanılan değişkenler bant şiddeti/bantın altında kalan alan, bant konumu (frekans değeri) ve bant genişliğidir. Bant şiddeti ve alanı maddenin konsantrasyonu hakkında bilgi verirken, bant konumu düzen/düzensizlik hakkında, bant genişliği ise dinamik hakkında bilgi verir [114]–[116]. Özellikle biyolojik çalışmalarda, biyolojik sistemleri onlara zarar vermeden moleküler düzeyde inceleyebilmesi nedeniyle FTIR spektroskopisi tekniği daha da önem kazanmaktadır [104], [107], [111]–[113], [117]–[119].

1.11. AZALTILMIŞ TOPLAM YANSIMA (ATR)-FTIR SPEKTROSKOPİSİ

ATR-FTIR spektroskopisi en çok kullanılan FTIR tekniğidir. Bu spektroskopik teknik, hiç numune hazırlamaya gerek duymadan, örneklerin kalitatif ve kantitatif analizi için kullanılmaktadır. FTIR spektroskopisi tekniğinde örneklerin hazırlanması için gereken süre, azaltılmış toplam yansıma (Attenuated Total reflectance=ATR) ataçmanı takılarak minimal süreye indirilebilir. Kısa sürede sonuç elde edilebilen ATR-FTIR spektroskopisi yöntemi ile bir örnek için elde edilen spektral çekimlerin sayısı kolaylıkla artırılabilir. Kızılötesi kaynağından gelen ışının örnek ile temasıyla oluşan, ışığın örnek içerisinde toplam iç yansımasında meydana gelen değişimleri belirlemek bu ataçmanın temel prensibini oluşturmaktadır (Şekil 1.22).



Şekil 1.22. Çok yansımali ATR sistemi yapısı [120].

Bu teknikte bir kızılötesi ışın belli bir açı doğrultusunda yüksek refraktif indeksi ile ATR kristaline yönlendirilir. Eğer kristalle örnek arasındaki ara yüzeyde geliş açısı, iki yüzey arasında kırılma endeksi fonksiyonu olarak tanımlanan kritik bir açıdan daha fazla ise, toplam iç yansıma meydana gelir. Bu ataçman kullanımı ile kızılötesi ışınlardan kaynaklı sinyalin elde edilebilmesi için örnek ile gelen ışının çok yakın bir temasta olması gerekmektedir. Bu nedenle, belirli bir basınç uygulanarak kristal ve örnek arasında yakın temas olması sağlanmaktadır. Örnek infrared spektrumunun bir bölgesinde enerji soğurduğu zaman, geriye kalan radyasyon zayıflatılmış olacaktır. Bu zayıflatılmış radyasyon spektrometre ile tespit edilir ve böylelikle örneğe ait kızılötesi spektrumu elde edilmiş olur.

ATR için birçok uygun kristal materyalleri bulunmaktadır. Bu kristaller, Germanyum (Ge), Silika (Si), elmas (Di), ve çinko-selenit (ZnSe) ham maddelerinden oluşabilmektedir. Kullanılan örneğin özelliğine ve incelenmek istenen kızılötesi bölgesine göre kullanılacak kristalin materyali seçilmektedir. Bu çalışmada, orta-IR

bölgesinde kullanıma uygun olan, suya dayanıklı, düşük maliyetli Di/ZnSe (elmas/çinko-selenit) kristali kullanılmıştır. Bu kristal, orta-IR bölgesinde kuru, ıslak veya sulu örnekleri analiz etmek için uygundur.

1.11.1. ATR-FTIR Spektroskopisinin Avantajları

- Numuneye kimyasal olarak bir ön işlem yapmaya gerek yoktur. Bu teknik ile doku direkt kristalin üzerine konularak incelenebilir.
- Katı, sıvı ve gaz formdaki bütün örnekler kolaylıkla incelenebilir.
- IR ışığı numunede değişiklik meydana getirmez, fonksiyonel ve yapısal deneyler için zararlı değildir. Analiz için az miktarda örnek yeterlidir. Tek bir spektrumdan, fonksiyonel gruplardaki tüm değişiklikler anında tespit edilebilir ve veriler hızlı bir şekilde elde edilebilir.
- Nitel ve nicel yorumların yapılmasına olanak sağlar [110], [115], [118], [121]–[123].

1.12. ÇALIŞMANIN AMACI

Literatürde OGB ile ilgili birçok klinik çalışmaya rastlamak mümkündür. OGB'nin ve GTX'in kalp üzerinde önemli etkileri olduğu bilinmesine rağmen, bu maddelerin kalp kası üzerinde meydana getirdiği yapısal ve buna bağlı fonksiyonel etkileri henüz moleküler düzeyde bilinmemektedir. OGB'nin etken maddesi olan GTX'in hücre üzerindeki toksik etkileri hücre zarındaki protein yapısındaki sodyum kanalları üzerinden meydana gelmektedir [71]. Kalbin kasılmasında görevli olan iyonların konsantrasyonlarının değişmesi birçok kalp hastalığına yol açabilir. Örneğin sodyum yokluğunda kalbin uyarılabilirliği kaybolur ve kalp durur, çünkü aksiyon potansiyeli ekstraselüler sodyum iyonuna bağlıdır [124]. Potasyum iyonunun hücre dışı sıvıda aşırı olması, kalbin gevşemesine ve kalp hızının yavaşlamasına neden olur. Potasyum yoğunluğunun normal değerinin 2 veya 3 katına yükselmesi, kalbi zayıflatabilir ve ritmini bozabilir ki, bu durum ölüme bile neden olabilir. Artan kalsiyum iyonu ise potasyum iyonlarının tam tersi etki yaparak kalbi spastik kasılmaya doğru götürür [88].

Kalbin kasılma aktivitesinin sürekli olarak devam etmesi için gerekli olan enerji çoğunlukla lipitlerden sağlanır [125]. Yağ asitleri kalbin ana enerji kaynağıdır ve kalp yağ asitlerinin en fazla oksidasyona uğratıldığı organdır [126]. Bu nedenle, kalp kası

hücresindeki lipit homeostazisinin uygun seviyede tutulması kalbin normal bir şekilde fonksiyon gösterebilmesi için çok önemlidir ve kalp hücrelerinde lipit homeostazisinin bozulması önemli sorunlara yol açmaktadır [127]. Örneğin, yağ asidi oksidasyonunda ortaya çıkan anormal durumların kardiyak aritmilere ve iletim defektlerine, mitokondriyal yağ asidi metabolizmasındaki herhangi bir sorunun kalp krizine sebep olabilen kardiyomyopati ve aritmilere sebep olduğu bilinmektedir [128]. Son zamanlarda gerçekleştirilen çalışmalar, hücre içi miyokardial ve perikardial lipit depolarının önemine işaret etmekte ve bu yağ depolarında meydana gelen en küçük değişikliklerin bile kardiyak performansta önemli değişikliklere sebep olduğunu belirtmektedir [125]. OGB'nin bradikardi ve hipotansiyon gibi kardiyak yan etkilere ve fonksiyonel bozukluklara sebep olduğu bilinmektedir ancak kalp kasındaki lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi moleküllerin yapısı ve fonksiyonu üzerinde ne gibi etkilere sebep olduğu ile ilgili bir çalışma mevcut değildir.

Biyolojik bir dokunun fonksiyonunu düzgün bir şekilde yerine getirmesi yapısıyla doğrudan ilişkilidir ve dokudaki yapısal değişiklikler, çalışılan örneklerin FTIR spektrumları analiz edilerek direkt olarak görüntülenebilir. Dokuda meydana gelen anormal bir durum önemli yapısal ve bunu izleyen fonksiyonel değişikliklere sebep olur. Hücre düzeyindeki bazı işlev bozuklukları birçok metabolik hastalığın kaynağıdır [129], [130]. Bu işlev bozuklukları, hücre fonksiyonlarını yürüten hücre zarı, iyon kanalları, reseptörler, organeller ve moleküllerin yapısal ve regülatör bozuklukları ve birbirleri ile etkileşimlerindeki değişimler sonucunda ortaya çıkmaktadır [131]–[133]. Dolayısıyla yapısal ve moleküler içeriklerdeki değişimleri belirlemeye yönelik çalışmaların önemi büyüktür. Bu nedenle, bu çalışmada OGB'nin üç farklı dozunun ve GTX-III'ün kalp kasını oluşturan moleküllerin yapısı, kompozisyonu ve fonksiyonu üzerinde meydana getirdiği moleküler değişiklikler ATR-FTIR spektroskopisi kullanılarak ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma OGB'nin ve GTX-III'ün kalp kası üzerindeki toksik etkilerini moleküler düzeyde araştıran ilk çalışmadır.

ATR-FTIR spektroskopisi tekniğini kullanarak gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada;

- OGB ve GTX-III'ün kalp kas dokusundaki doymuş ve doymamış lipitler, proteinler ve nükleik asitlerin miktarları, yapıları ve fonksiyonları üzerinde meydana getirdiği etkilerin moleküler düzeyde ortaya çıkarılması,

- kalp kas dokusunu oluşturan hücrelerin membran akışkanlığı ve düzenindeki değişimlerin incelenmesi,
- hücrede önemli hasara yol açtığı bilinen lipit peroksidasyon düzeyinin ortaya çıkarılması,
- OGB ve GTX-III'ün değişik makromoleküllerin birbirlerine göre konsantrasyon oranları (lipit/protein, doymamış/doymuş lipit oranı gibi) ile bu parametrelerde meydana gelen değişimlerin gösterilmesi,
- protein ikincil yapısındaki değişimlerin incelenmesi amaçlanmıştır.



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. SARF MALZEMELER

OGB Düzceli bal üreticilerinden, saf olarak uygulanacak olan GTX-III ise Enzo Life Sciences firmasından temin edilmiştir.

2.2. ORMANGÜLÜ BALININ PALİNOLOJİK ANALİZİ VE GTX-III TAYİNİ

Çalışmamızda kullandığımız balın OGB olduğunu teyit etmek için balda polen analizi yapılmıştır. OGB'nin palinolojik analizi, Düzce Üniversitesi, Arıcılık Araştırma Geliştirme ve Uygulama Merkezi (DAGEM)'de, uluslararası arıcılık otoriteleri tarafından geliştirilip kabul edilen bir yöntem [134], [135] modifiye edilerek yapılmıştır. Bu yöntemde göre iyice karıştırılarak homojen hale getirilmiş olan bal örneğinden 5'er g tartılarak 15 ml'lik falkon tüplerine aktarılmıştır. Tüp üzerine 10 ml distile su (dH₂O) ilave edilmiştir. Balın çözünmesini sağlamak için falkon tüpleri su banyosunda 45°C sıcaklıkta 15 dakika bekletilmiştir. Su banyosundan alınan örnekler 4000 rpm'de 45 dakika santrifüj edilmiştir. Çözeltinin üst kısımlarında kalan polenlerin de kaybını önlemek için üstteki süpernatant kısım ependorf tüplerine eşit miktarlarda paylaştırılarak daha yüksek devirde (13000 rpm de 15 dk) santrifüj edilmiştir. Oluşan pelletler birleştirildikten sonra mikropipet aracılığı ile lam üzerine alınmıştır. Steril iğne ucuna alınan 1-2 mm³ safraninli gliserin-jelatin lam üzerindeki çözeltiye bulaştırılmış ve her bir lam ısıtıcı tablaya alınarak 40°C'de gliserin jelatinin erimesi ve polenler ile homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. Sonrasında her bir lamın üzerine 18x18 mm²'lik lamel kapatılmıştır. İnceleme esnasında net bir görüntü elde etmek ve bal içeriğinin lam yüzeyine yaklaşmasını sağlamak amacıyla preparatlar ters çevrilerek kuruması için bir süre bekletilmiştir. Böylece preparatlar mikroskopta incelenecek duruma getirilmiştir. Polen preparatları Olympus CX21 markalı ışık mikroskobunda incelenmiştir. Polenleri tanımlamada immersiyon objektif (100X), saymada ise 40X objektif kullanılmıştır. Polenlerin fotoğraf çekimi ise Düzce Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Genetik Araştırma Laboratuvarında bulunan

Olympus DP26 markalı mikroskoba bağlı görüntüleme sistemi ile yapılmıştır. İncelemelerde hazırlanan her bir preparattaki 18x18 mm²'lik tüm alan taranmıştır. Bitki taksonlarının tanımlanması işlemi bittikten sonra tekrar başa dönülmüş ve her bir preparatta sol baştan başlanarak ortalama 400'ü bulana kadar polen sayımı yapılmıştır. Her bir preparatın sayım sonuçlarının yüzdesi alınarak ormangülü balında bulunan polenlerin dominant (\geq %45), sekonder (%16-44), minör (%3-15) ve eser (<%3) miktardaki oranları saptanmıştır [136], [137].

Kullandığımız OGB'nin içerdiği GTX-III miktarı ise, Kaplan ve arkadaşları [138] tarafından gerçekleştirilen araştırma kapsamında LC-MS/MS (Sıvı kromatografisi-Kütle/Kütle Spektrometresi) yöntemi ile analiz edilmiş ve 8 µg/g olarak tespit edilmiştir.

2.3. HAYVAN DENEYLERİ

Çalışma kapsamındaki hayvan deneyleri Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkez'inde gerçekleştirilmiş ve bütün deneysel prosedürler Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (2015/42). Her bir konsantrasyon ve her bir uygulama süresi için, 20-25 g ağırlığında, 8-12 haftalık, her biri 6 erkek fare içeren 5 grup hazırlanmıştır (4 deney grubu, 1 kontrol grubu). Farklı konsantrasyonlardaki OGB'nin suda eritilmesiyle hazırlanan solüsyonlar, kendi grubundaki erkek farelere gram başına 0,01 ml gelecek şekilde alınarak gavaj yoluyla uygulanmıştır. Ayrıca bir grup deney hayvanına da, ticari olarak üretilmiş GTX-III, intraperitoneal yolla uygulanmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra hayvanlar dekapite edilerek kalp dokuları çıkarılmıştır.

2.3.1. Deney Grupları ve Uygulamalar

Çalışmamızda kullanılan OGB'nin konsantrasyonları, toksik doz olarak belirtilen dozun (50 mg/kg), ½'si kadar azaltılmış ve arttırılmış konsantrasyonları olan 25 mg/kg ile 75 mg/kg olarak seçilmiştir [139]. Hayvanlara verilen GTX-III konsantrasyon hesaplamaları, baldaki GTX miktarı göz önüne alınarak, Silici ve arkadaşlarının [60] çalışması ışığında yapılmıştır. Buna göre, uygulanacak GTX-III dozu, LD₅₀ dozu olan 0,908 mg/kg'ın yaklaşık olarak onda biri oranındaki konsantrasyonu olan 0,01 mg/kg olarak belirlenmiştir.

Buna göre oluşturduğumuz 5 deney grubumuz aşağıdaki gibidir:

Deney Grupları:

1. Kontrol grubu (n=6); farelere distile su verildi.
2. 25 mg/kg OGB (n=6); farelere gram başına 0,01 ml gelecek şekilde OGB tek doz gavaj yoluyla verildi.
3. 50 mg/kg OGB (n=6); farelere gram başına 0,01 ml gelecek şekilde OGB tek doz gavaj yoluyla verildi.
4. 75 mg/kg OGB (n=6); farelere gram başına 0,01 ml gelecek şekilde OGB tek doz gavaj yoluyla verildi.
5. GTX-III (n=6); farelere 0,01 mg/kg GTX-III tek doz intraperitoneal olarak verildi.

Çalışmamızda OGB ve GTX-III'ün fare kalp kasında ne gibi değişiklikler meydana getirdiğini göstermek için 24 saatin sonunda hayvanlar dekapite edilmiş ve kalp dokuları çıkarılarak ATR-FTIR spektroskopisi deneyleri için -80°C derin dondurucuda saklanmıştır. Örnek taşınması sırasında ve deneylerden önce örneklerin tekrar tekrar dondurulup çözünmesinden kaçınılmıştır.

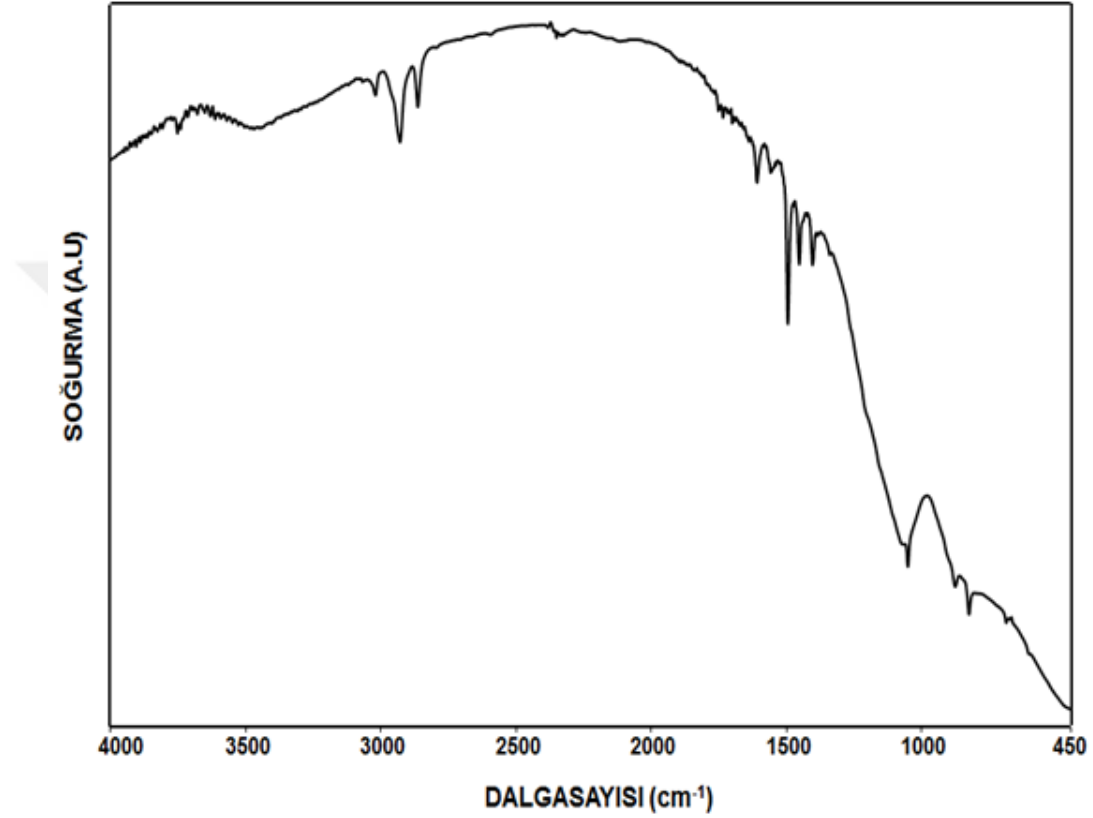
2.4. ATR-FTIR SPEKTROSKOPİSİ ÇALIŞMALARI

2.4.1. Spektral Verilerin Toplanması

ATR-FTIR çalışmaları için kalbin apeks kısmının miyokard tabakasından küçük parçalar alınmıştır. Doku örnekleri ATR ünitesinin elmas/çinko-selenit (Diamant/ZnSe) kristalinin üzerine konulmuş, serbest suyu ortamdaki uzaklaştırmak için 1 dakikalık süre boyunca azot gazı uygulanarak kurutulmuştur. Her bir örnek için 4 cm^{-1} çözünürlükte 100 force gauge basınç uygulanarak 64 çekim sayısı ile $4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında ve oda sıcaklığında spektrumlar elde edilmiştir. Sonuçların güvenilirliğini artırmak için her örnekten 3 kez çekim yapılmış ve bu 3 çekimden elde edilen spektrumların ortalamaları alınarak detaylı analizler ve istatistiksel testler bu spektrumlar üzerinde gerçekleştirilmiştir [140], [141].

Arka plan "Background" spektrumu olarak ortamdaki havanın spektrumu aynı şartlarda elde edilmiştir. Atmosferdeki CO_2 ve H_2O 'dan kaynaklanan soğurma bantları,

araştırılan doku örneğinin soğurma bantlarını kamufle edebilir. Dolayısıyla, bu atmosferik su buharının etkisini azaltmak amacıyla FTIR spektrometresinden sürekli kuru hava geçirilmektedir. Buna ek olarak, örnek çekimi öncesinde havanın çekimi yapılmakta ve elde edilen spektrum bilgisayar programı aracılığıyla örnek spektrumundan matematiksel olarak çıkarılmaktadır. Sözü edilen hava spektrumu Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Atmosferik havanın 4000-450 cm^{-1} bölgesindeki FTIR spektrumu (Y-eksenindeki “A.U” arbitrary unit’in (keyfi birim) kısaltılmışıdır).

2.4.2. ATR-FTIR Spektroskopisi Çalışmalarında Kullanılan Spektrum Analiz Yöntemleri

ATR-FTIR spektroskopisi, örneklere ait spektrumlardaki bantların şiddeti veya bandın altında kalan alan, genişlikleri ve konumlarındaki kayma gibi parametrelerdeki değişimlerin analiz edilmesine olanak sağlamaktadır. Söz konusu analizler, çalışılan gruplarda, kalp kas dokusundan elde edilen, normalize edilmemiş ham ortalama spektrumlar kullanılarak gerçekleştirildi.

Kalp kasında OGB uygulamasına bağlı olarak moleküler konsantrasyonlarda meydana gelen değişimleri saptamak amacıyla her bir molekülü karakterize eden spektral bantların bant alanları hesaplandı. Çizelge 2.1’de bant alanları hesaplanırken kullanılan spektral bölgeleri ve baseline noktalarını göstermektedir.

Çizelge 2.1. Belirli bazı kızılötesi bantlar için kullanılan spektral bölgeler ve baseline noktaları.

Kızılötesi Soğurma Bandı	Kullanılan Spektral Bölge	Baseline Noktaları
Amid A (3283 cm^{-1})	$3790-3024 \text{ cm}^{-1}$	$3790-2800 \text{ cm}^{-1}$
Olefinik (HC=CH) (3011 cm^{-1})	$3024-2998 \text{ cm}^{-1}$	$3024-2840 \text{ cm}^{-1}$
CH ₃ antisimetrik gerilim (2959 cm^{-1})	$2997-2846 \text{ cm}^{-1}$	$2997-2940 \text{ cm}^{-1}$
CH ₂ antisimetrik gerilim (2924 cm^{-1})	$2946-2883 \text{ cm}^{-1}$	$2997-2840 \text{ cm}^{-1}$
CH ₂ simetrik gerilim (2855 cm^{-1})	$2863-2840 \text{ cm}^{-1}$	$2997-2840 \text{ cm}^{-1}$
Karbonil (C=O) gerilim (1738 cm^{-1})	$1791-1714 \text{ cm}^{-1}$	$1800-900 \text{ cm}^{-1}$
Amid I (1641 cm^{-1})	$1714-1586 \text{ cm}^{-1}$	$1800-900 \text{ cm}^{-1}$
Amid II (1545 cm^{-1})	$1586-1480 \text{ cm}^{-1}$	$1800-900 \text{ cm}^{-1}$
PO ₂ antisimetrik gerilme (1238 cm^{-1})	$1271-1182 \text{ cm}^{-1}$	$1800-900 \text{ cm}^{-1}$
C-N ⁺ -C gerilme (972 cm^{-1})	$1000-946 \text{ cm}^{-1}$	$1800-900 \text{ cm}^{-1}$

Çalışılan tüm örneklerde, membran lipitlerinin akışkanlığında meydana gelen değişimleri belirlemek amacıyla lipit kaynaklı CH₂ antisimetrik ve simetrik bantlarının genişlikleri hesaplandı. Ayrıca, yapısal parametreler olan lipit açıl zincir esnekliği hakkında bilgi veren lipit düzeni (order) ve düzensizliği (disorder) hakkında bilgi edinmek için aynı bantların dalga sayısı değerleri de analiz edildi [114], [142]. Moleküllerin konsantrasyonlarındaki birbirlerine göre olan rölatif değişimlerini tespit etmek için spektral bant alan oranları da hesaplandı (Çizelge 2.2). Gruplar arasındaki spektral değişimleri görsel olarak göstermek amacıyla, her gruba ait örneklerin ortalaması alınarak, baseline düzeltilmesi yapıp normalize edildi. Söz konusu spektral

analizler Perkin Elmer Spektrum 10 analiz programı ile yapıldı.

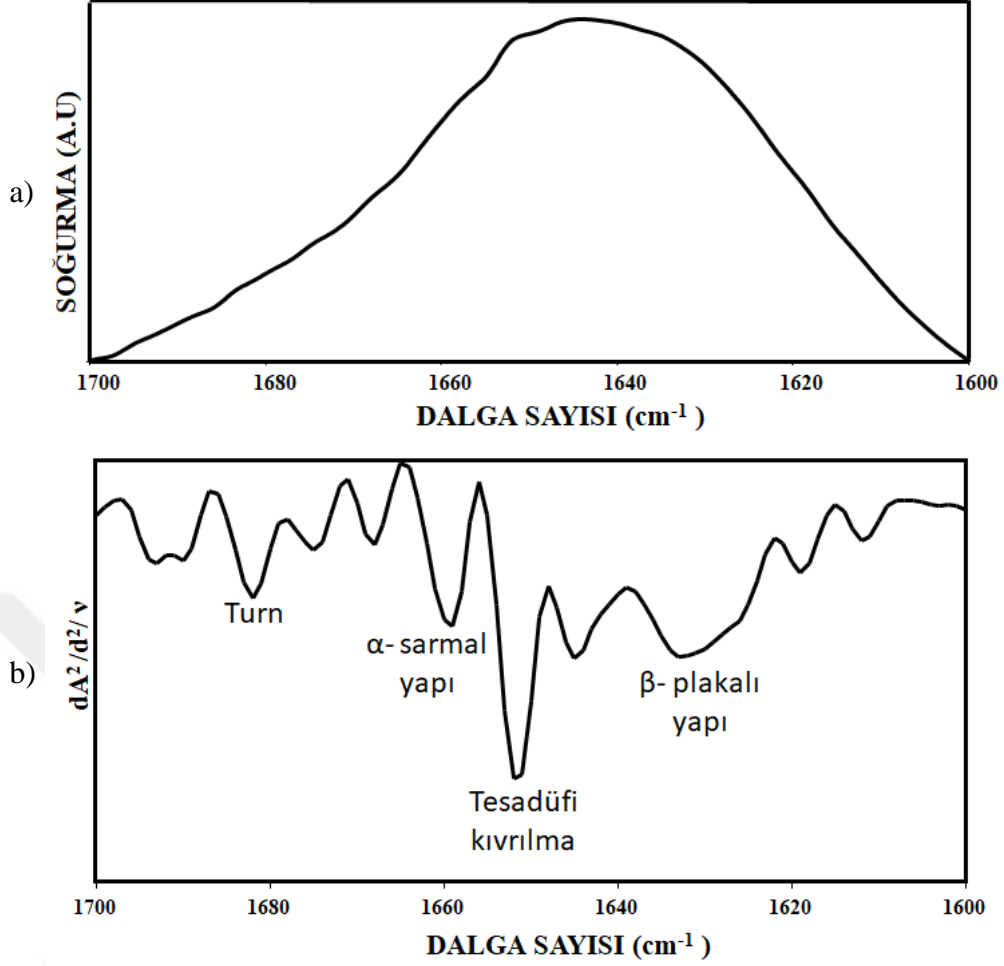
Çizelge 2.2. Hesaplanan bant alan oranları ve hesaplamada kullanılan bantlar.

Hesaplanan Bant Alan Oranı	Açıklama
Lipit/Protein	CH ₃ anti., CH ₂ anti. ve CH ₂ sim. alanların toplamı/Amid II bant alanı
Doymamış lipit/doymuş lipit oranı	Olefinik (HC=CH) bant alanı/CH ₃ anti., CH ₂ anti. ve CH ₂ sim. alanların toplamı
CH ₂ /CH ₃	CH ₂ antisim. ger. bant alanı/CH ₃ antisim. ger. bant alanı
Karbonil/lipit	Karbonil (C=O) ger. bant alanı/CH ₃ anti., CH ₂ anti. ve CH ₂ sim. alanların toplamı
Amid I/Amid II	Amid I/Amid II
Nükleik asit/lipit	PO ₂ ⁻ sim. ger. bant alanı/CH ₃ anti., CH ₂ anti. ve CH ₂ sim. alanların toplamı
RNA/lipit	C-N ⁺ -C ger. bant alanı/CH ₃ anti., CH ₂ anti. ve CH ₂ sim. alanların toplamı
RNA/protein	C-N ⁺ -C gerilme/Amid II

2.4.3. ATR-FTIR Spektrumlarından Protein İkincil Yapı Tayini

FTIR spektrumlarının 1700-1600 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında yer alan Amid I bantı ayrışmamış bantlar içeren geniş bir banttır. Çalışmamızda bu banta ikincil türev-vektör normalizasyon metodu uygulanarak kalp kasındaki, protein ikincil yapı değişimleri belirlendi.

Şekil 2.2'de bir kalp kası doku örneğinde Amid I protein bandı ve ikincil türev spektrumu görülmektedir. Bu parametreler kullanılarak kontrol ve diğer grupların detaylı analizleri gerçekleştirildi ve sonuçlar birbirleri ile karşılaştırıldı.



Şekil 2.2. Kalp kası dokusunun 1700-1600 cm^{-1} arası örnek a) Soğurma ve b) İkincil türev spektrumları.

2.5. İSTATİKSEL ANALİZ

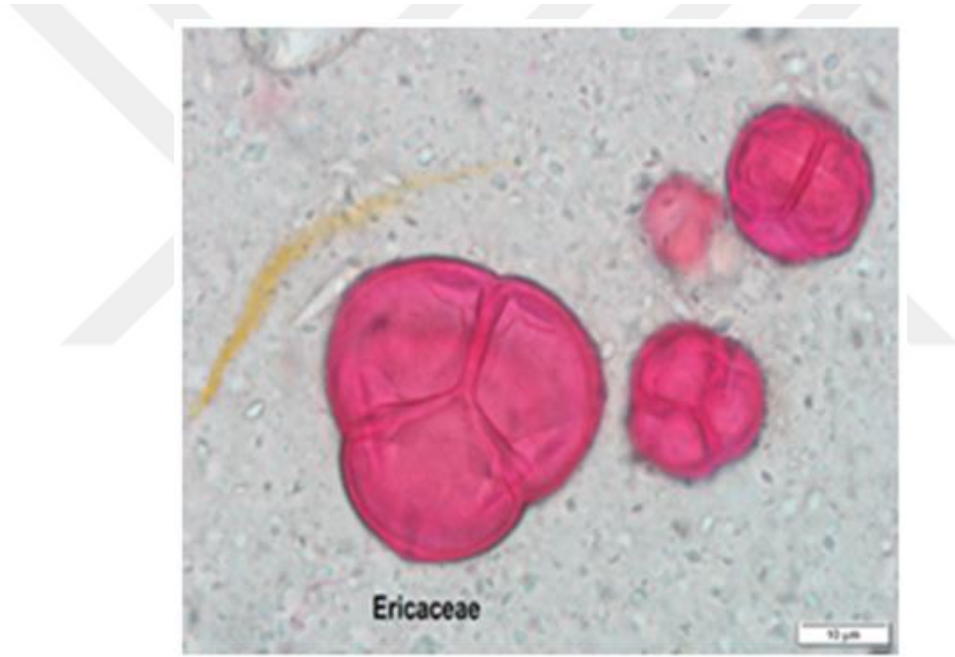
Kontrol ve farklı konsantrasyonlardaki OGB ve GTX-III uygulanan gruplar arasındaki değişimler ve bu değişimlerin istatistiksel anlamlılığının hesaplanması için Mann Whitney-U testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ şeklinde belirlenmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1.1. Ormangülü Balının Palinolojik Analizi

Çalışmamızda kullandığımız balın palinolojik analizi sonucunda, dominant $\geq\%45$ oranında Ericaceae familyasına ait olan *Rhododendron ponticum* poleni içermesi nedeniyle OGB olduğu teyit edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan baldaki *Rhododendron* bitkisine ait polen görüntüsü, Şekil 3.1’de verilmiştir.



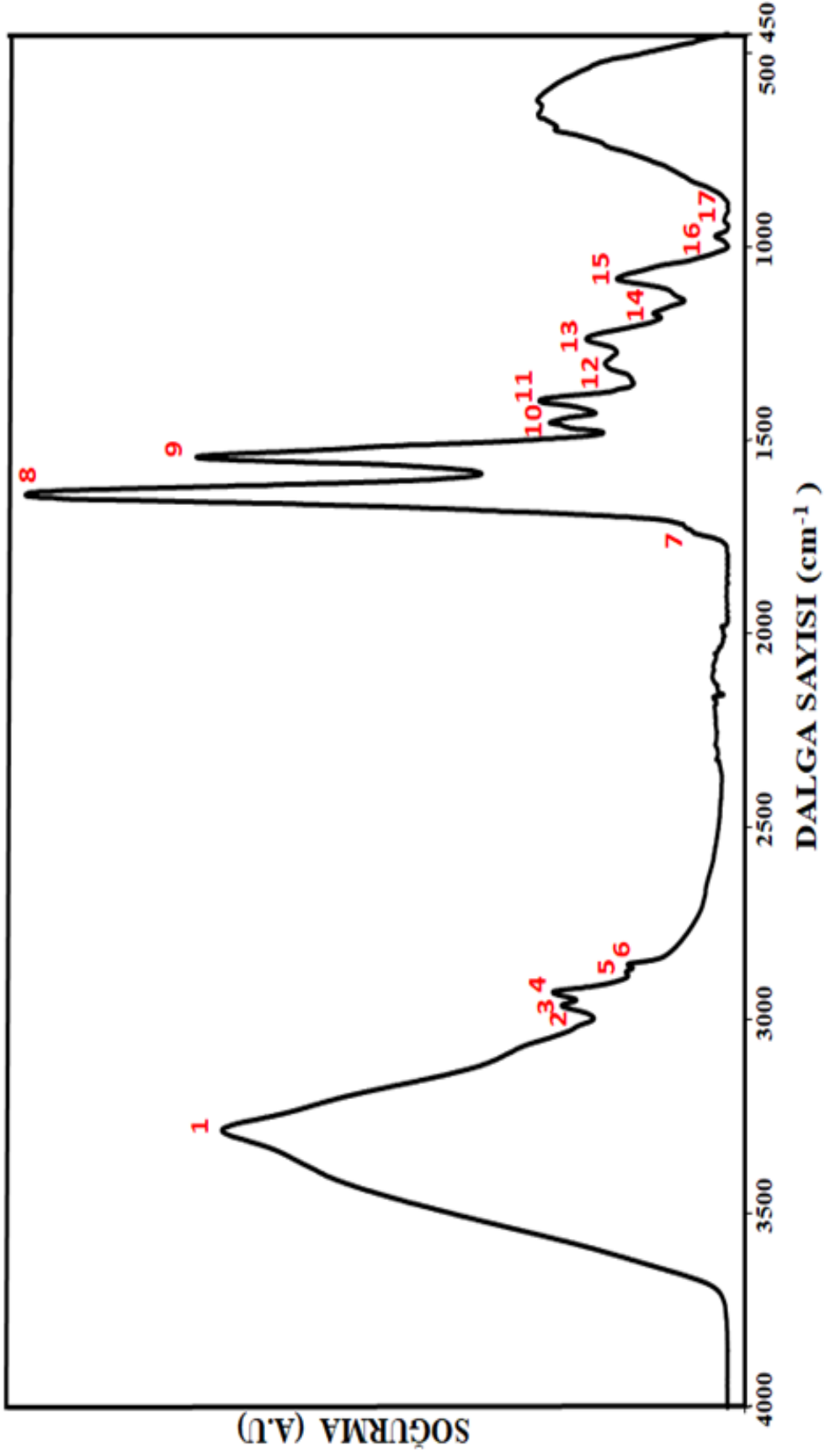
Şekil 3.1. Ormangülü balı içindeki *Rhododendron* bitkisine ait polen görüntüsü.

3.1.2. ATR-FTIR Spektroskopisi Bulguları

ATR-FTIR spektroskopisi moleküllerin değişik dalga boylarındaki titreşim gruplarını görüntüleyerek bu moleküllerin yapısal, fonksiyonel ve dinamik özelliklerinin karakterize edilmesini sağlayan bir tekniktir. Çalışmamızda, farklı konsantrasyonlardaki OGB ve GTX-III uygulanan farelerin kalp kaslarındaki makromoleküllerin relatif miktarları, dinamiği ve yapısal özelliklerindeki değişimlerin araştırılması amacıyla ATR-FTIR spektroskopisi kullanılmıştır.

Bir moleküldeki herhangi bir bağ veya bağ grubu FTIR spektrumlarında karakteristik soğurma bantlarını oluşturur. Dolayısıyla, her bir bant belirli bir bağ ya da bağ grubuna atfedilebilir [143]. Şekil 3.2’de bir kontrol spektrumunun 4000-450 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki soğurma bantları numaralandırılarak gösterilmiştir. Bantların literatüre göre tanımları Çizelge 3.1’de belirtilmiştir.





Şekil 3.2. Kontrol grubuna ait bir kalp kası örneğinin 4000-450 cm^{-1} bölgesindeki ATR-FTIR spektrumu (Y eksenindeki "A.U" arbitrary unit'in (keyfi birim) kısaltılmışıdır).

Çizelge 3.1. Kalp kasının IR spektrumundaki başlıca soğurmaları [104], [109], [111], [112], [115], [122], [123], [141], [144]–[151].

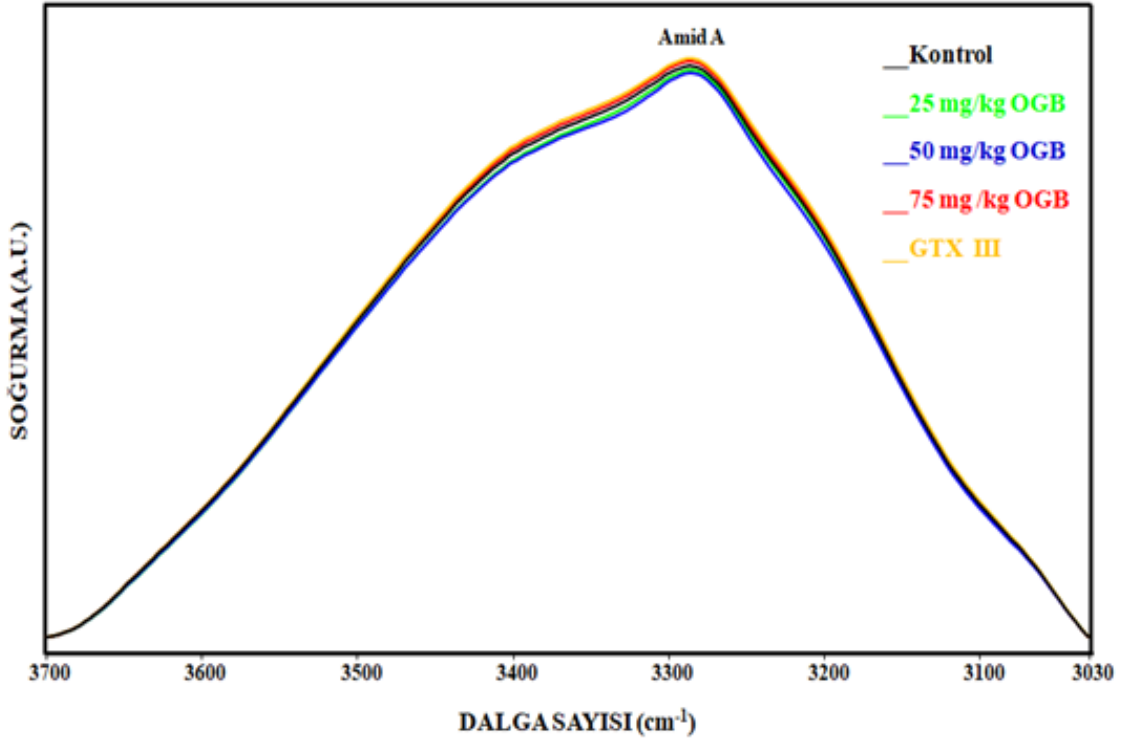
Bant No	Dalga Sayısı (cm ⁻¹)	Açıklaması
1	3283	N-H gerilme ve O-H gerilme (Amid A): Çoğunlukla proteinler
2	3011	Olefinik HC=CH titreşim gerilme: Doymamış lipitler
3	2959	CH ₃ antisimetrik gerilme: Çoğunlukla lipitler
4	2924	CH ₂ antisimetrik gerilme: Çoğunlukla lipitler
5	2874	CH ₃ simetrik gerilme: Çoğunlukla proteinler
6	2855	CH ₂ simetrik gerilme: Çoğunlukla lipitler
7	1738	Karbonil (C=O) ester gerilme: Lipit (Çoğunlukla kolesterol ester ve trigliseritler)
8	1641	Amid I: Protein (%80 C=O gerilme, %10 N-H bükülme, %10 C-N gerilme)
9	1545	Amid II: Protein (%60 N-H bükülme, %40 C-N gerilme)
10	1454	CH ₂ bükülme: Çoğunlukla lipitler
11	1396	COO ⁻ simetrik gerilme: Yağ asitleri ve aminoasitlerin yan grupları
12	1302	Amid III: Protein (%40 C-N gerilme, %30 N-H bükülme, %20 C-C gerilme)
13	1238	PO ₂ ⁻ antisimetrik gerilme:Çoğunlukla nükleik asitler, az bir kısmı Lipitler
14	1172	CO-O-C antisimetrik gerilme: Lipitler, nükleik asitler
15	1080	PO ₂ ⁻ simetrik gerilme: Nükleik asitler ve fosfolipitler
16	972	C-N ⁺ -C gerilme: Nükleik asitler, RNA riboz-fosfat ana zincir titreşimleri
17	931	z-form DNA

Spektrumlarda görülen bantların pik konumları (dalga sayısı değeri), bant alanları, bant alan oranları ve bant genişliği hesaplanarak detaylı spektrum analizleri yapılmıştır. Infrared bantlarının sinyal şiddetleri ve bu bantların altında kalan alanlar, ait olduğu fonksiyonel grubun konsantrasyonu hakkında bilgi vermektedir [93], [102], [107], [111], [112], [147], [152]. Yapılan analizler sonucu elde edilen başlıca fonksiyonel grupların bant alan değerlerindeki değişimler Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

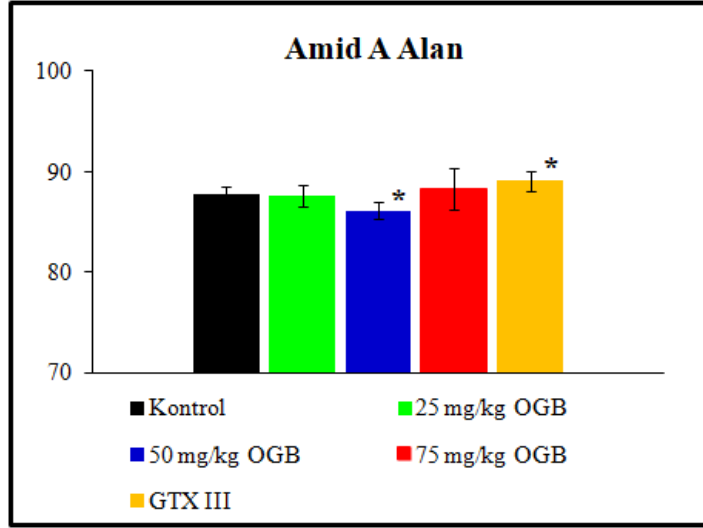
Çizelge 3.2. Başlıca fonksiyonel grupların alan değerlerindeki değişiklikler (Değerler, ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ şeklinde gösterilmiştir. \uparrow : kontrole göre artış olduğunu, \downarrow : kontrole göre azalış olduğunu gösterir).

Bant No	Dalga Sayısı (cm ⁻¹)	Kontrol	25 mg/kg (OGB)	50 mg/kg (OGB)	75 mg/kg (OGB)	GTX (0,01 mg/kg)
1	3283	87,68 \pm 0,887	87,58 \pm 1,024	86,1 \pm 0,882* \downarrow	88,29 \pm 1,237	89,0 \pm 0,947* \uparrow
2	3011	0,021 \pm 0,004	0,030 \pm 0,006	0,037 \pm 0,005* \uparrow	0,026 \pm 0,005	0,026 \pm 0,008
3	2959	0,43 \pm 0,018	0,45 \pm 0,028	0,46 \pm 0,018* \uparrow	0,42 \pm 0,030	0,41 \pm 0,014* \downarrow
4	2924	0,82 \pm 0,025	0,86 \pm 0,072	0,90 \pm 0,063* \uparrow	0,78 \pm 0,018* \downarrow	0,80 \pm 0,032
5	2874	0,10 \pm 0,008	0,10 \pm 0,023	0,11 \pm 0,020	0,01 \pm 0,021	0,10 \pm 0,018
6	2855	0,13 \pm 0,008	0,14 \pm 0,015	0,14 \pm 0,010* \uparrow	0,11 \pm 0,010	0,13 \pm 0,015
7	1738	0,62 \pm 0,012	0,66 \pm 0,037	0,67 \pm 0,036** \uparrow	0,59 \pm 0,015* \downarrow	0,62 \pm 0,029
8	1641	19,54 \pm 0,272	19,72 \pm 0,428	19,58 \pm 0,494	19,56 \pm 0,334	19,40 \pm 0,364
9	1545	12,97 \pm 0,158	13,2 \pm 0,587	13,20 \pm 0,281	12,99 \pm 0,325	12,6 \pm 1,314* \downarrow
10	1454	2,91 \pm 0,054	2,97 \pm 0,067	2,93 \pm 0,108	2,92 \pm 0,142	2,87 \pm 0,084
11	1396	3,99 \pm 0,087	4,07 \pm 0,090	4,02 \pm 0,113	4,00 \pm 0,108	3,92 \pm 0,113
12	1302	2,48 \pm 0,099	2,53 \pm 0,120	2,53 \pm 0,118	2,48 \pm 0,130	2,44 \pm 0,237
13	1238	3,65 \pm 0,071	3,78 \pm 0,127	3,67 \pm 0,148	3,57 \pm 0,115	3,51 \pm 0,087* \downarrow
14	1172	0,93 \pm 0,032	0,99 \pm 0,129	1,01 \pm 0,094	0,91 \pm 0,064	0,91 \pm 0,061
15	1080	3,03 \pm 0,153	3,16 \pm 0,193	3,08 \pm 0,178	2,93 \pm 0,168	2,96 \pm 0,132
16	972	0,09 \pm 0,008	0,09 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,08 \pm 0,005* \downarrow	0,08 \pm 0,009
17	931	0,01 \pm 0,008	0,01 \pm 0,009	0,02 \pm 0,005	0,01 \pm 0,007	0,01 \pm 0,007

Her gruptaki bireylerden elde edilen spektrumların ortalamaları alınmış ve değişimleri görsel olarak daha açık bir şekilde izleyebilmek amacıyla spektrumlar üç spektral bölgeye ($3700\text{--}3030\text{ cm}^{-1}$, $3025\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ ve $1800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$) ayrılmıştır. Şekil 3.3’de kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III uygulanmış gruplardaki fare kalp kasının $3700\text{--}3030\text{ cm}^{-1}$ bölgesindeki ortalama ATR-FTIR spektrumları görülmektedir. Bu bölgede yer alan N-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanan amid A (1 no’lu bant) bantı ağırlıklı olarak sistemdeki protein miktarı hakkında bilgi vermektedir [141], [145]. Şekil 3.4’te, belirtilen bandın alan değerlerindeki değişimler bar diyagramı olarak gösterilmiştir. Şekil 3.3 ve Şekil 3.4’te görüldüğü gibi Amid A bandının altında kalan alan 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta istatistiksel açıdan anlamlı derecede azalmış ($p<0,05$), GTX-III uygulanan grupta ise anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$). Bu bulgu, 50 mg/kg OGB uygulanan grupta protein miktarında bir azalış meydana geldiğini, GTX-III uygulanan grupta ise bir artış meydana geldiğini göstermektedir [107]. Şekil 3.4’te görüldüğü gibi 25 mg/kg ve 75 mg/kg OGB uygulanmış gruplarda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

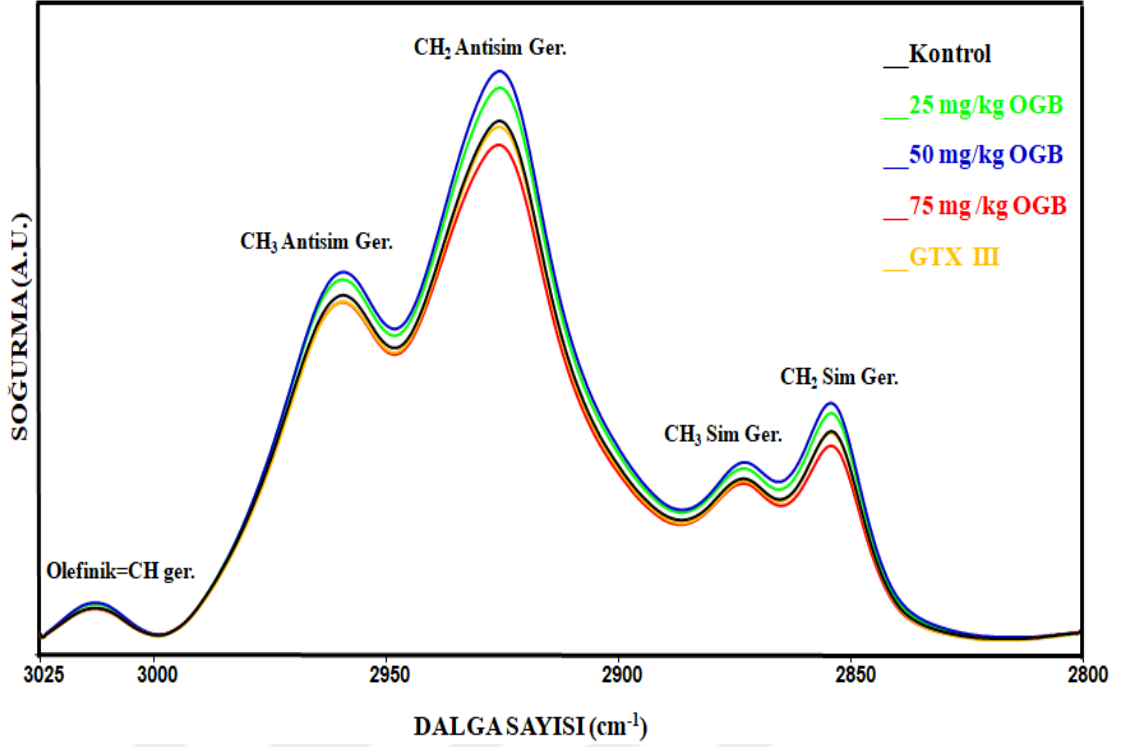


Şekil 3.3. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarındaki fare kalp kasına ait $3700\text{--}3030\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığındaki spektrumları (Y eksenindeki “A.U” arbitrary unit’in (keyfi birim) kısaltılmışıdır).



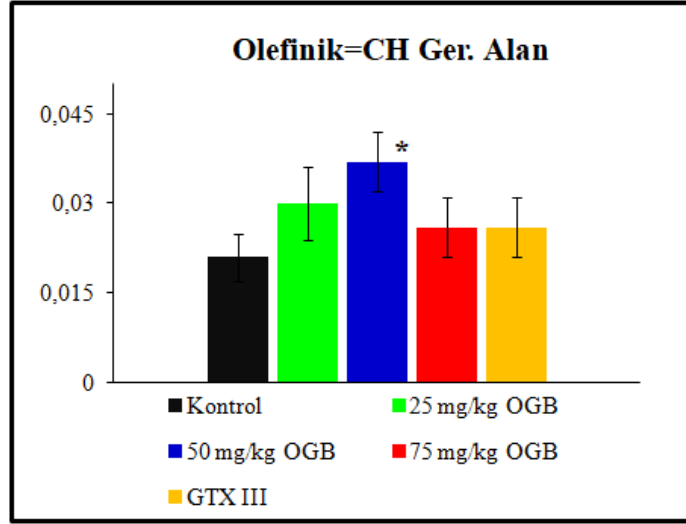
Şekil 3.4. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının Amid A bantlarının alan değerlerindeki değişim (*p<0,05).

Şekil 3.5, kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III uygulanmış fare kalp kasının 3025-2800 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektrumlarını göstermektedir. C-H gerilme bölgesi olarak adlandırılan bu bölgedeki bantlar, olefinik HC=CH gerilme titreşimlerinden (2 no'lu bant), CH_3 antisimetrik gerilme titreşimlerinden (3 no'lu bant), CH_2 antisimetrik gerilme titreşimlerinden (4 no'lu bant), CH_3 simetrik gerilme titreşimlerinden (5 no'lu bant) ve CH_2 simetrik gerilme titreşimlerinden (6 no'lu bant) kaynaklanmaktadır [102], [104], [107], [111], [112], [146]. Bu bölgede bulunan CH_3 antisimetrik, CH_2 antisimetrik ve CH_2 simetrik gerilme titreşimlerinin sinyal şiddetleri veya bant alanları sistemdeki lipit miktarı ve CH_3 simetrik gerilme titreşimlerinin sinyal şiddeti ve alanı ise sistemdeki protein miktarı hakkında bilgi vermektedir [104], [113], [148].

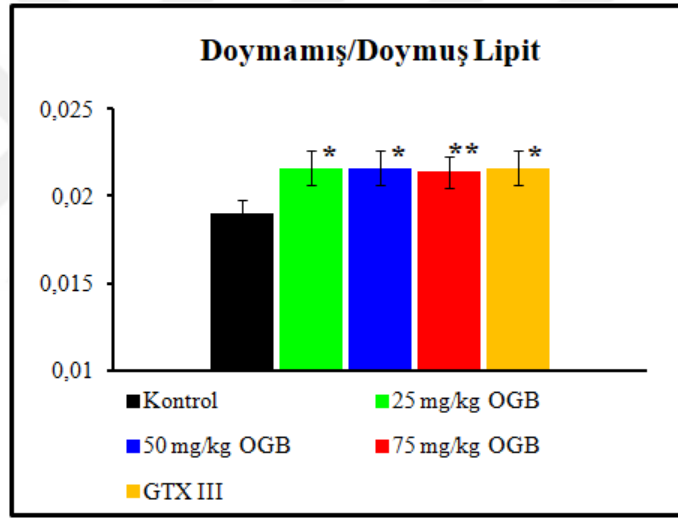


Şekil 3.5. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarındaki fare kalp kasına ait 3025-2800 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektrumları (Y eksenindeki “A.U” arbitrary unit’in (keyfi birim) kısaltılmışıdır).

Doymamış yağ asitlerinde bulunan $\text{HC}=\text{CH}$ gruplarının C-H bağlarındaki gerilme titreşimlerinden kaynaklanan ve 3011 cm^{-1} civarında gözlenen olefinik=CH gerilme bandının sinyal şiddeti ve altında kalan alan hidrokarbon zincirlerinin doymuşluğu hakkında bilgi vermektedir [102], [115], [118], [147]. Şekil 3.6’da görüldüğü gibi bu bandın altında kalan alan 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). Doymamış lipidlerin doymuş lipitlere olan oranları olefinik bant alanının CH_3 antisimetrik, CH_2 antisimetrik ve CH_2 simetrik gerilme bant alanları toplamına bölünmesi ile hesaplanmış ve elde edilen değerler, Şekil 3.7’de bar diyagramı ile gösterilmiştir. Bu oran doymamış lipid indeksi olarak kullanılabilir [153]. Şekilden de görülebileceği gibi, bütün gruplar kontrol grubuna göre daha yüksek doymamış lipid indeksine sahiptir. Doymamışlık indeksi dokulardaki lipid peroksidasyonu oranını tespit etmek amacıyla kullanılabilir [154], [155].



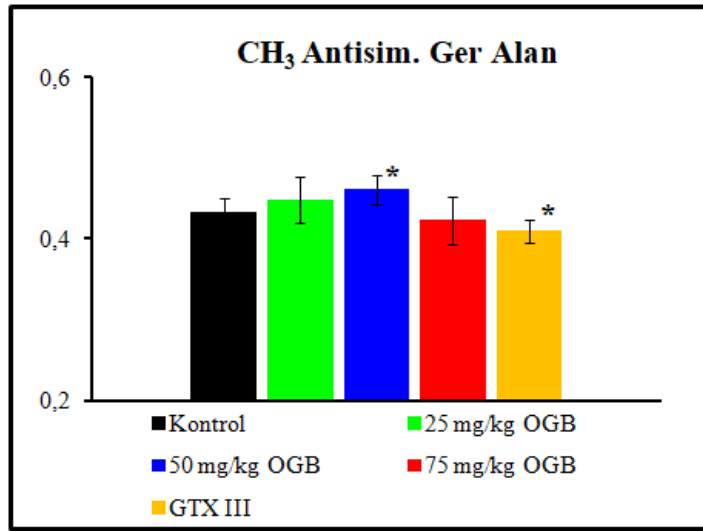
Şekil 3.6. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının Olefinik=CH gerilme bandının alan değerindeki değişimler (*p<0,05).



Şekil 3.7. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının doymamış/doymuş lipit alan oranındaki değişimler (*p<0,05 **p<0,01).

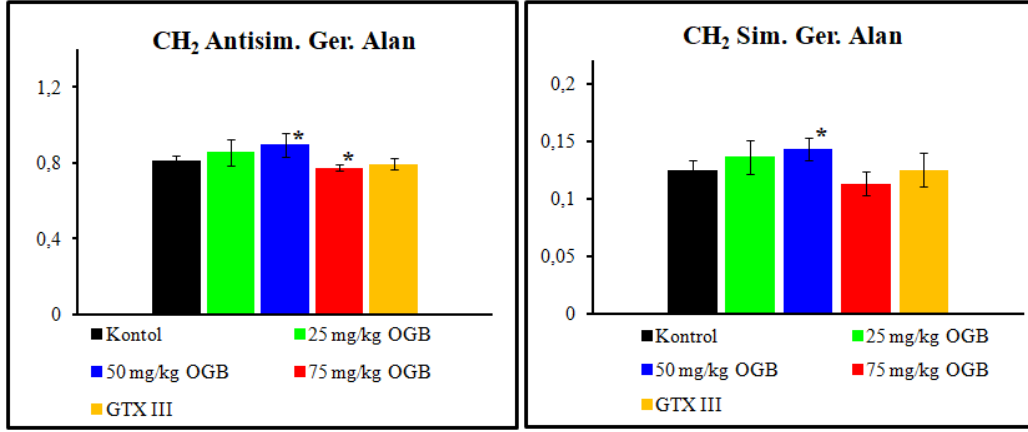
CH₃ antisimetrik gerilme bandı, lipidlerin açıl zincirlerindeki metil gruplarının sayısı hakkında bilgi vermektedir [147]. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının spektrumları karşılaştırıldığında Şekil 3.5 ve Şekil 3.8'den de görülebileceği gibi 50 mg/kg OGB grubunda CH₃ antisimetrik gerilme bandının alan değerinde anlamlı bir artış, GTX-III uygulanan grupta anlamlı bir azalış tespit edilmiştir (p<0,05). Bu sonuç bize, 50 mg/kg OGB'nin fare kalp kasındaki lipidlerin açıl zincirlerinde bulunan metil gruplarının sayısında bir artışa, GTX-III'ün ise azalışa sebep olduğunu

göstermektedir [147].



Şekil 3.8. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının CH₃ antisimetrik gerilme bandının alan değerlerindeki değişimler (*p<0,05).

C-H titreşim bölgesinde yer alan doymuş lipitlere ait ana bantların (4 ve 6 no'lu CH₂ antisimetrik ve simetrik bantları) alan değerleri Şekil 3.9'da verilmiştir. Şekil 3.9 a'dan görüldüğü gibi CH₂ antisimetrik bandının alan değerinde kontrole göre 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta anlamlı bir artış, 75 mg/kg OGB uygulanmış grupta anlamlı bir azalış görülmüştür (p<0,05). Şekil 3.9 b'den de görüldüğü gibi CH₂ simetrik bandının alan değerinde 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta kontrole göre anlamlı bir artış gözlenmiştir (p<0,05). 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta her iki bantta gözlenen artış dokuda doymuş lipit miktarının arttığını göstermektedir [111], [112], [149]. Ayrıca Şekil 3.8'de gösterilen CH₃ antisimetrik gerilme bandının alan değerinin analizinden elde edilen artışta bu sonucu desteklemektedir.

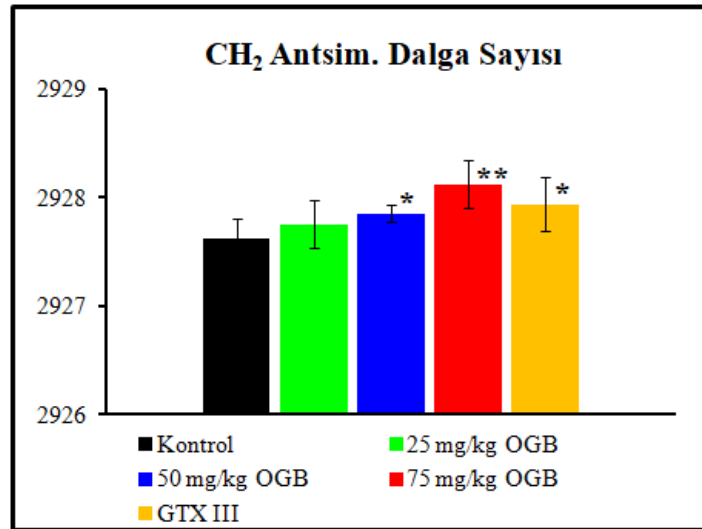


a)

b)

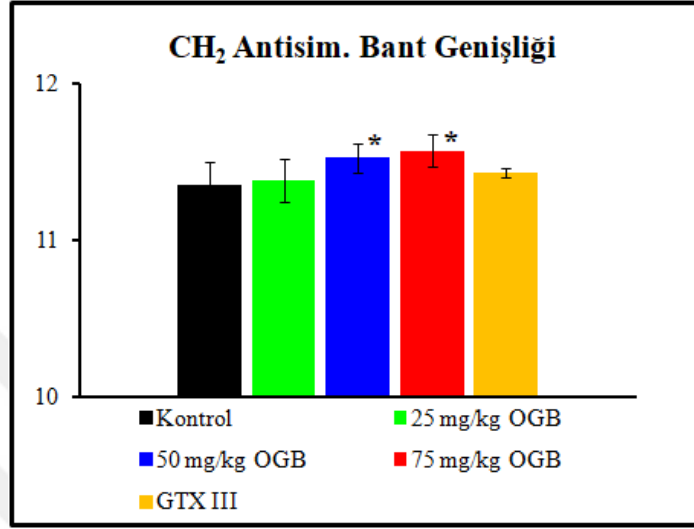
Şekil 3.9. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının a) CH₂ antisimetrik gerilme bandı b) CH₂ simetrik gerilme bandının alan değerindeki değişimler (*p<0,05).

CH₂ antisimetrik ve simetrik bantlarının pozisyonları, lipit açıl zincirlerinin esnekliği yani lipitlerin konformasyonel düzensizlikleri hakkında bilgi vermektedir [117], [142], [156]. Şekil 3.10'dan da görüldüğü gibi 50 mg/kg OGB, 75 mg/kg OGB ve GTX III uygulanmış gruplarda CH₂ antisimetrik bandının dalga sayısında yüksek değerlere doğru bir kayma gözlenmiştir. Bu artış, OGB'nin ve GTX-III'ün açıl zincirlerini daha düzensiz hale getirdiği anlamına gelmektedir. Şekilden aynı zamanda kontrole göre en yüksek artış değerinin 75 mg/kg OGB uygulanmış grupta olduğu görülmektedir.



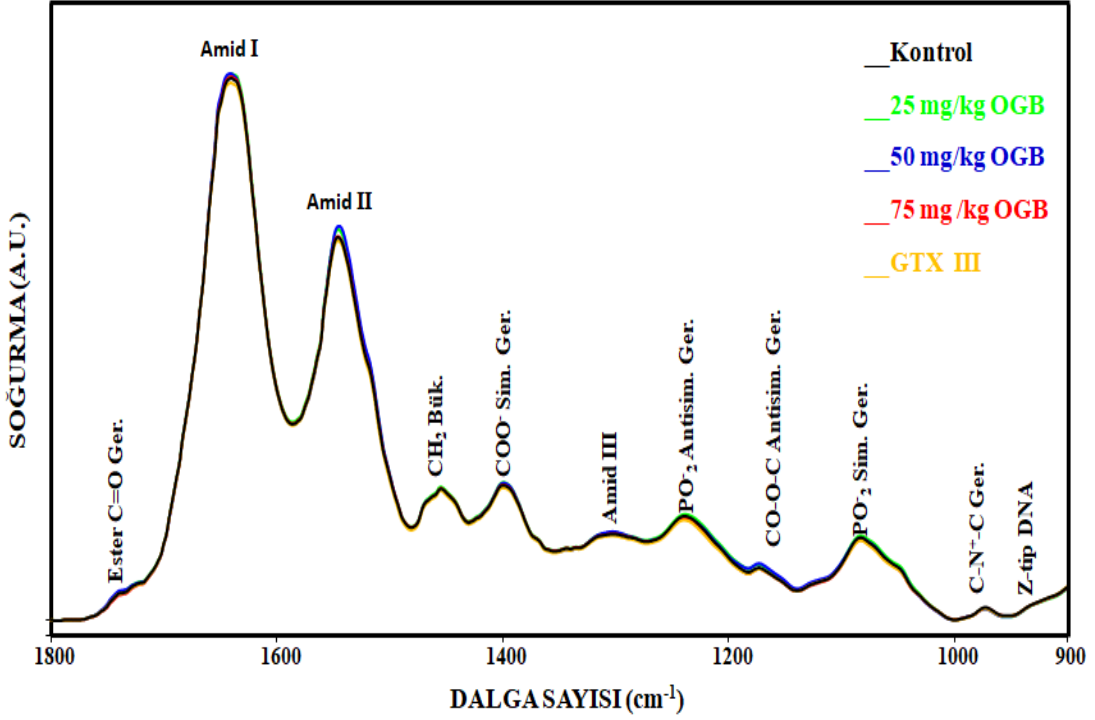
Şekil 3.10. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının CH₂ antisimetrik gerilme bandının dalga sayısı değerindeki değişimler (*p<0,05, **p<0,01).

Ayrıca, CH₂ antisimetrik gerilim bandının bant genişliğinde meydana gelen değişiklikler sistemin dinamiğiyle ilgili bilgi vermektedir [117], [157]. Şekil 3.11'den de görüldüğü gibi, yapılan spektral analizlerin sonucunda 50 ve 75 mg/kg OGB uygulanmış gruplarda CH₂ antisimetrik bandının genişliğinin arttığı tespit edilmiştir (p<0,05). Bu artış fare kalp kasının membran dinamiğini arttırdığını göstermektedir.



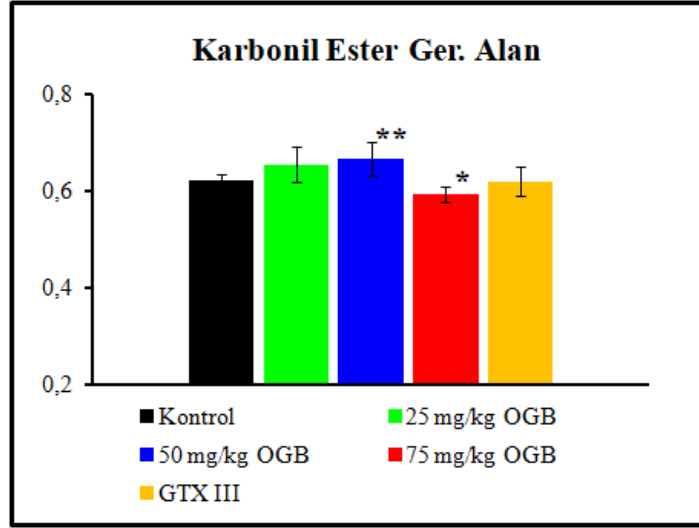
Şekil 3.11. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının CH₂ antisimetrik bandının bant genişliği değerindeki değişimler (*p<0,05).

Çalışma kapsamında incelenen 1800-900 cm⁻¹ bölgesi, çalışılan sisteme özgü fonksiyonel grup titreşimleri içerdiğinden parmak izi bölgesi olarak adlandırılmaktadır ve kolesterol ester, trigliserit, protein, nükleik asit, karbonhidrat, RNA ve DNA gibi moleküllerden kaynaklanan spektral bantlar içermektedir. Şekil 3.12'de kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarındaki fare kalp kası spektrumlarının 1800–900 cm⁻¹ bölgesi gösterilmiştir.



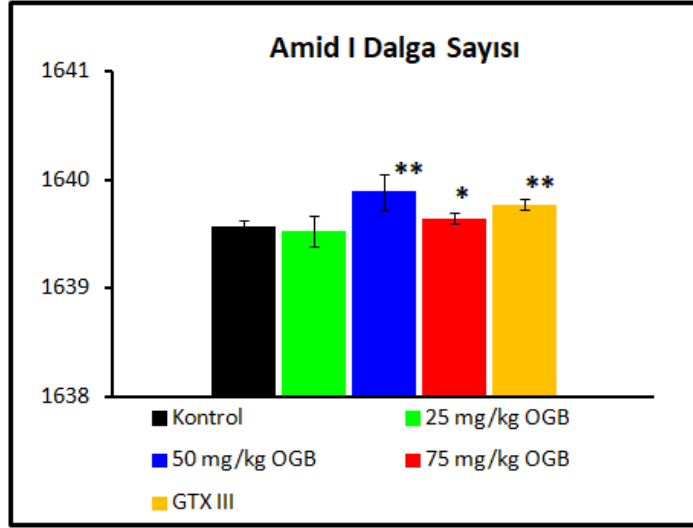
Şekil 3.12. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarındaki fare kalp kasına ait 1800-900 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektrumları (Y eksenindeki “A.U” arbitrary unit’in (keyfi birim) kısaltılmışıdır).

1738 cm^{-1} 'de yer alan C=O ester (karbonil ester) gerilme bandı (7 no'lu bant) ağırlıklı olarak trigliserit ve kolesterol esterlerinden kaynaklanmaktadır [111], [112] ve ayrıca membran lipidlerinin polar ve apolar kısımlarının etkileştikleri bölgeler hakkında önemli bilgiler vermektedir [123], [147]. Dolayısıyla, bu bandın sinyal şiddeti ve/veya alan değerindeki bir değişikliğin lipid miktarı ile doğru orantılı olduğu düşünülmektedir [122], [147]. Kontrol ile karşılaştırıldığında Şekil 3.13'den de görüldüğü gibi 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta karbonil ester bantının alan değeri artmıştır. Bu artış fare kalp kasında trigliserit ve kolesterol miktarında bir artış olduğunu göstermektedir. 75 mg/kg OGB uygulanmış grupta kontrole göre bu bandın alan değeri azalmıştır. Bu azalma fare kalp kasında trigliserit ve kolesterol miktarında azalma olduğunu göstermektedir. Bu gözlem 3025-2800 cm^{-1} bölgesi sonuçlarında da gözlenen 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta lipid miktarının arttığı, 75 mg/kg OGB uygulanmış grupta lipid miktarının azaldığı yorumunu desteklemektedir.

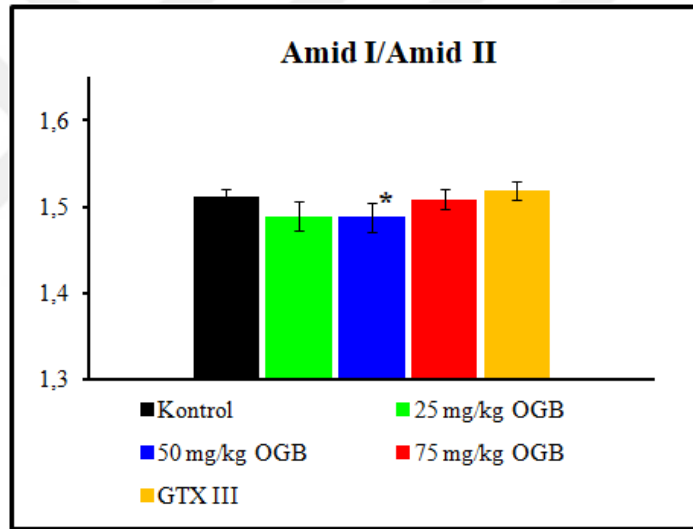


Şekil 3.13. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının karbonil ester gerilme bandının alan değerindeki değişimler (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

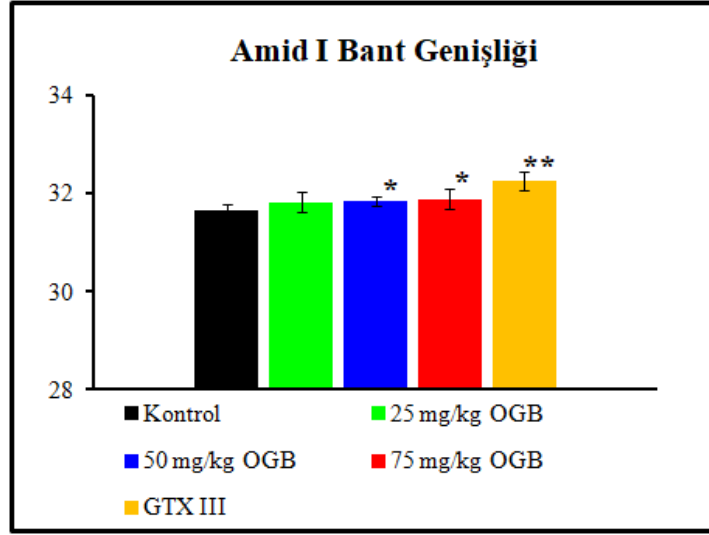
Parmak izi bölgesinde yer alan 1641 ve 1545 cm^{-1} dalga sayısında gözlemlenen Amid I ve Amid II bantları protein kaynaklı bantlardır [111], [112]. Amid I bandı %80 oranında C=O gerilme, %10 oranında C-N gerilme %10 oranında N-H bükülme titreşimlerinden, Amid II bandı ise %60 oranında N-H bükülme ve %40 oranında C-N gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır [95], [107], [109], [111], [112], [122], [147]. Amid I ve Amid II bandının bant dalga sayısı değerlerindeki kaymalar protein yapılarında konformasyonel değişimlerin meydana geldiğini göstermektedir. Bu parametrelere ilave olarak Amid I/Amid II oranı değişimi de proteinlerde yapısal değişimlerin olduğunu gösterir, [111]–[113]. Şekil 3.14'ten de görüldüğü gibi Amid I bandının dalga sayısı 50 mg/kg OGB, 75 mg/kg OGB ve GTX-III gruplarında yüksek değerlere doğru kayarken 25 mg/kg OGB grubunda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu kayma proteinlerin konformasyonunda bir değişiklik meydana geldiğini gösterir [158]. Şekil 3.15'te Amid I/Amid II oranı verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta bu oran anlamlı derecede azalmıştır. Şekil 3.16'da Amid I bant genişliğindeki değişimler gösterilmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında 50 mg/kg OGB, 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulanan gruplarda amid I bant genişliğinde artış gözlenmiş, 25 mg/kg OGB uygulanan grupta herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu parametrelerdeki değişiklik proteinlerin yapı, kompozisyon ve konformasyonunda bir takım değişiklikler meydana getirdiğini göstermektedir [158].



Şekil 3.14. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının Amid I bandının dalga sayısı değerindeki değişimler (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

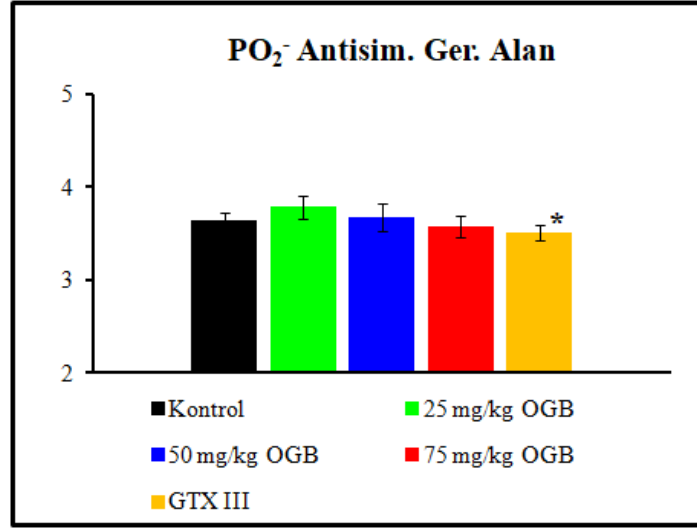


Şekil 3.15. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının Amid I/Amid II alan oranındaki değişimler (* $p < 0,05$).



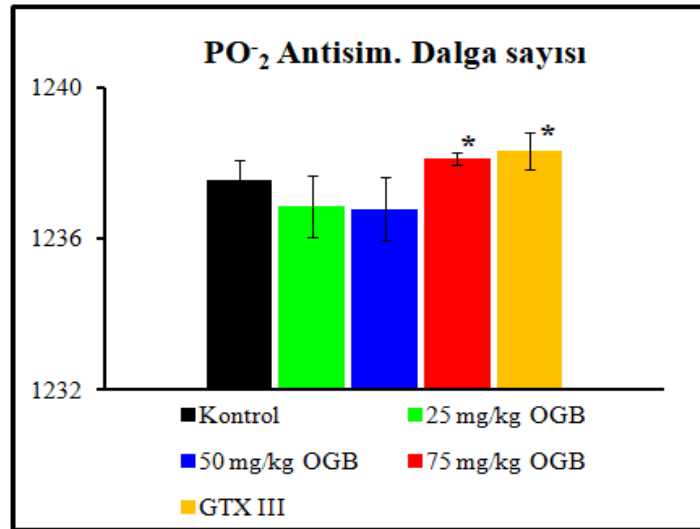
Şekil 3.16. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının Amid I bandının bant genişliği değerindeki değişimler (*p<0,05,**p<0,01).

Kızılötesi spektrumunun 1300-900 cm^{-1} dalga sayısı aralığında gözlemlenen bantlar daha çok nükleik asit, fosfolipit ve karbonhidratlar gibi moleküllerin farklı fonksiyonel gruplarının çeşitli titreşimlerinden kaynaklanmaktadır [107], [111]–[113]. Bu bölgede yer alan 1238 cm^{-1} ve 1080 cm^{-1} de yer alan PO_2^- antisimetrik ve simetrik gerilme bantları nükleik asit ve fosfolipit gibi fosfat (PO_2^-) grupları içeren moleküllerin içindeki P=O bağının soğurma bantlarından oluşmaktadır [107], [111], [113], [159], [160]. Şekil 3.17’den de görüldüğü gibi PO_2^- antisimetrik gerilme bandının alanında kontrol grubuna göre GTX-III uygulanmış grupta anlamlı azalış gözlemlendi ($p<0,05$). Bu sonuç, fare kalp kasında nükleik asit ve membranlarda bulunan fosfolipitlerin miktarının GTX-III uygulanan grupta azaldığını göstermektedir.



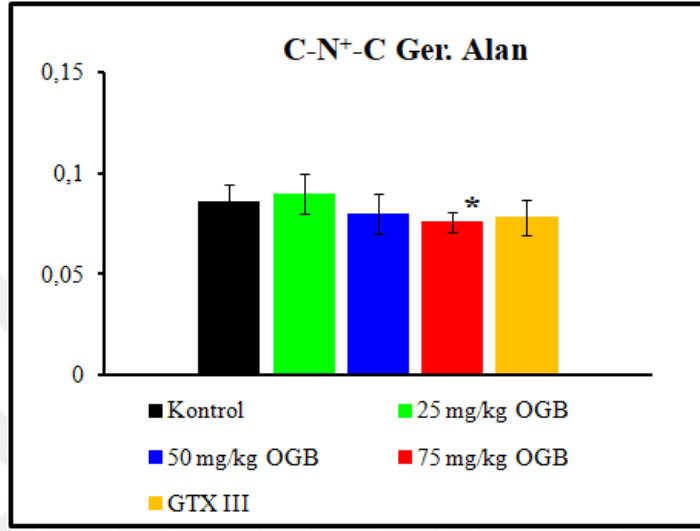
Şekil 3.17. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının PO₂⁻ antisimetrik gerilme bandının alan değerindeki değişimler (*p<0,05).

PO₂⁻ antisimetrik ve simetrik gerilme bantlarının dalga sayısı değerindeki kaymalar nükleik asitlerde ve fosfolipitlerde konformasyonel değişimlerin olduğunu göstermektedir [112], [161]. Şekil 3.18'de PO₂⁻ antisimetrik gerilme bandına ait dalga sayısı değişimleri gösterilmektedir. 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulanmış gruplarda söz konusu bandın dalga sayısı değerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi. Bu sonuç fare kalp kasında nükleik asit ve fosfolipit yapılarında değişimlerin olduğunu ifade etmektedir.



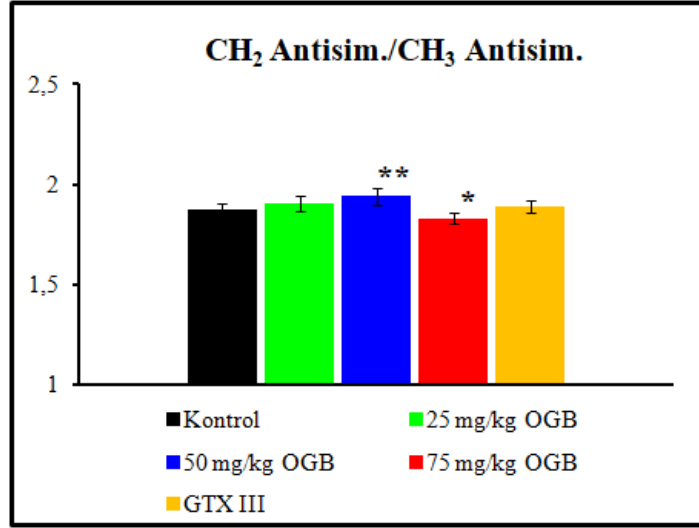
Şekil 3.18. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının PO₂⁻ antisimetrik gerilme bandının dalga sayısı değerindeki değişimler (*p<0,05).

972 cm^{-1} dalga sayısında gözlenen C-N⁺-C gerilme titreşim bandı nükleik asitlerden, özellikle de RNA riboz-fosfat ana zincir titreşimlerinden kaynaklanmaktadır [161], [162]. Şekil 3.19'dan görüldüğü üzere, 972 cm^{-1} bandının alan değerinde, 75 mg/kg OGB uygulanmış grupta kontrole göre anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Bu sonuç, 75 mg/kg OGB uygulanmış grupta RNA miktarında bir azalma olduğu şeklinde yorumlanabilir.



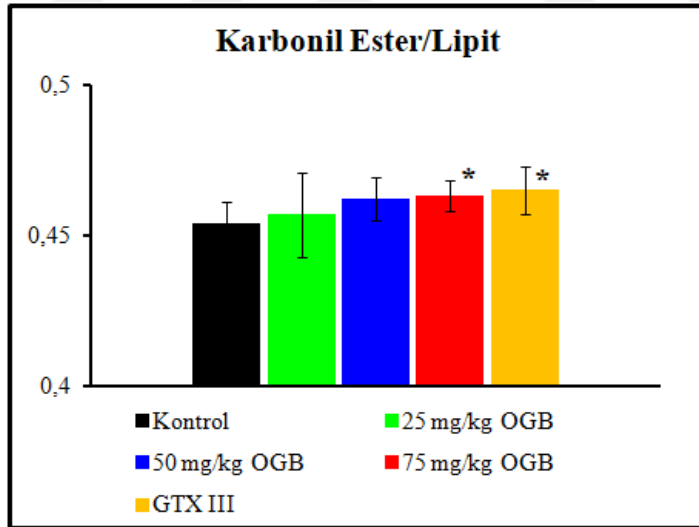
Şekil 3.19. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının C-N⁺-C gerilme bandının alan değerindeki değişimler (*p<0,05).

Spektral analizlerde bant alanı, dalga sayısı ve bant genişliği analizlerinin yanında moleküllerin birbirlerine göre bağıl değişimlerini kıyaslamak amacıyla son yıllarda spektral alan oranları kullanılmaktadır [144], [158]. Örneğin CH₂ antisimetrik bandının CH₃ antisimetrik bant alan oranı lipid zincir uzunluğu hakkında bilgi edinmek için kullanılmaktadır. Söz konusu orandaki artış zincir uzunluğundaki artışı göstermektedir [143], [144]. Şekil 3.20'de söz konusu bantlara ait alan oranındaki değişim gösterilmektedir. Şekilden de görüldüğü üzere 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta anlamlı bir artış, 75 mg/kg OGB uygulanmış grupta anlamlı bir azalış meydana gelmiştir. Bu değişiklikler, 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta lipid zincir uzunluğundaki artışı, 75 mg/kg OGB uygulanmış grupta lipid zincir uzunluğundaki azalışı göstermektedir.



Şekil 3.20. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının CH₂/CH₃ antisimetrik alan oranı değerindeki değişimler (*p<0,05, **p<0,01).

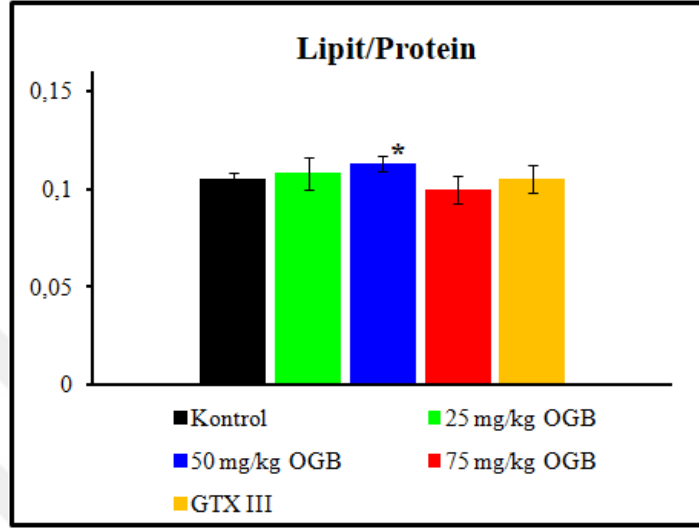
Sistemin karbonil (C=O) durumu hakkında bilgi sahibi olmak için karbonil ester/lipit oranı hesaplanmıştır [144]. Şekil 3.21'den görüldüğü gibi bu oran 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulanmış gruplarda anlamlı olarak artmıştır. Bu sonuç sistemdeki karbonil miktarının arttığını göstermektedir.



Şekil 3.21. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının karbonil ester/lipit alan oranı değerindeki değişimler (*p<0,05).

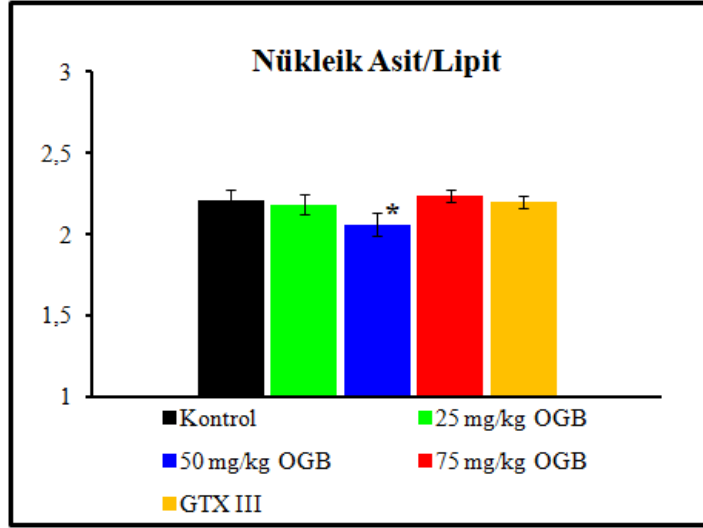
Çalışılan örneklerde lipit ve protein konsantrasyonlarının birbirine göre değişimlerini kıyaslamak amacıyla lipit ve proteinlerden kaynaklı spektral bantların bant alan oranları kullanılmaktadır [112], [113]. Bu oranlar hesaplanırken CH₃ antisimetrik, CH₂

antisimetrik ve CH₂ simetrik gerilme bantları alanlarının toplamı, Amid II bandının altında kalan alana bölünmüştür. Şekil 3.22’de lipit/protein oranı değerindeki değişimler gösterilmektedir. Bu oran 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta anlamlı derecede artmıştır. Şekil 3.22’den de görüldüğü gibi 25 mg/kg OGB, 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulanmış gruplarda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.



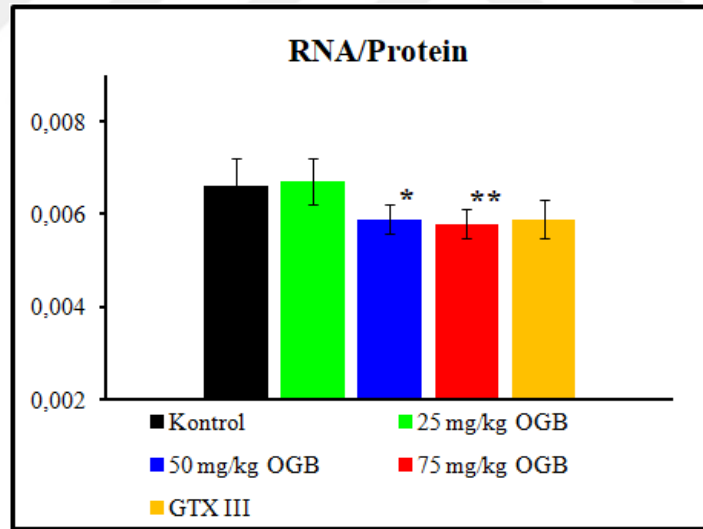
Şekil 3.22. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının lipit/protein alan oranı değerindeki değişimler (*p<0,05).

PO₂ simetrik gerilim bant alanının CH₃ antisimetrik, CH₂ antisimetrik ve CH₂ simetrik gerilme bantları alanlarının toplamına bölünmesi ile elde edilen nükleik asit/lipit oranında elde edilen değişimler Şekil 3.23’de gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü üzere 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta bu oran anlamlı derecede azalmıştır.



Şekil 3.23. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının nükleik asit/lipit alan oranı değerindeki değişimler (*p<0,05).

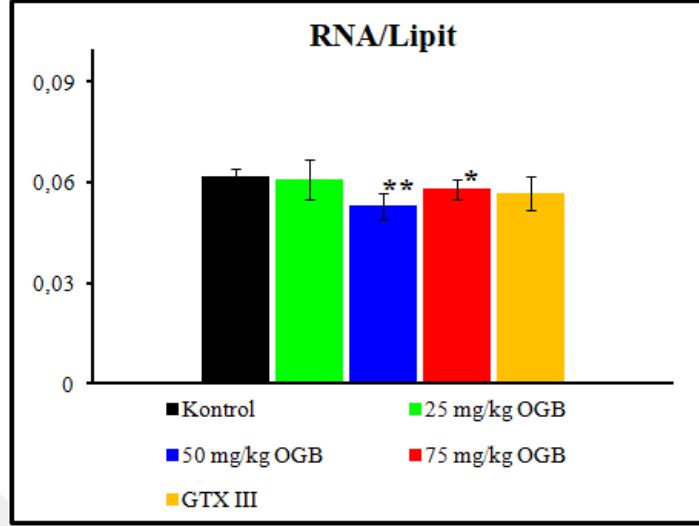
Şekil 3.24'te 972 cm^{-1} bant alanının Amid II bant alanına oranlanması ile elde edilen RNA/protein oranındaki değişimler gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü üzere 50 ve 75 mg/kg OGB uygulanmış gruplarda anlamlı derecede azalma gözlenmiştir.



Şekil 3.24. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının RNA/protein alan oranı değerindeki değişimler (*p<0,05, **p<0,01).

972 cm^{-1} bant alanının CH_3 antisimetrik, CH_2 antisimetrik ve CH_2 simetrik bant alanlarının toplamına bölünmesi ile elde edilen RNA/lipit oranındaki değişimler Şekil 3.25'te gösterilmiştir. Şekilden de görülebileceği üzere 50 ve 75 mg/kg OGB uygulanmış grupta bu oran anlamlı derecede azalmıştır. Şekil 3.24 ve Şekil 3.25'ten

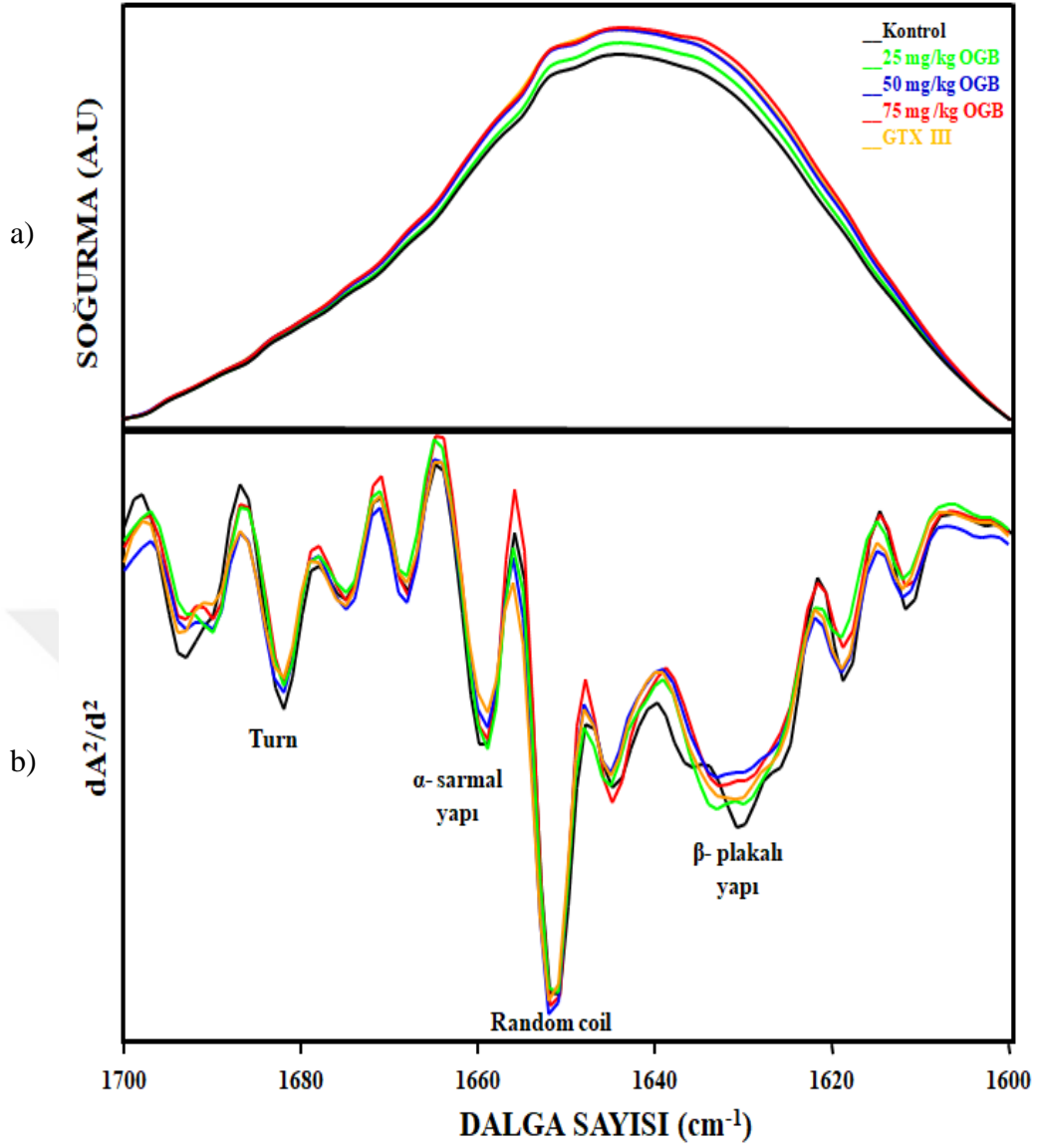
görüreceği üzere 25 mg/kg OGB ve GTX-III uygulanmış gruplarda RNA/protein ve RNA/lipit anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.



Şekil 3.25. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının RNA/lipit alan oranı değerindeki değişimler (*p<0,05, **p<0,01).

Çalışmamızda OGB'nin ve GTX-III'ün fare kalp kasındaki protein ikincil yapılarında meydana getirdiği değişimleri saptamak amacıyla ATR-FTIR spektrumunda sadece proteinlerden kaynaklanan ve 1700-1600 cm⁻¹ aralığında yer alan Amid I bandına, ikincil türev-vektör normalizasyon metodu uygulanmıştır.

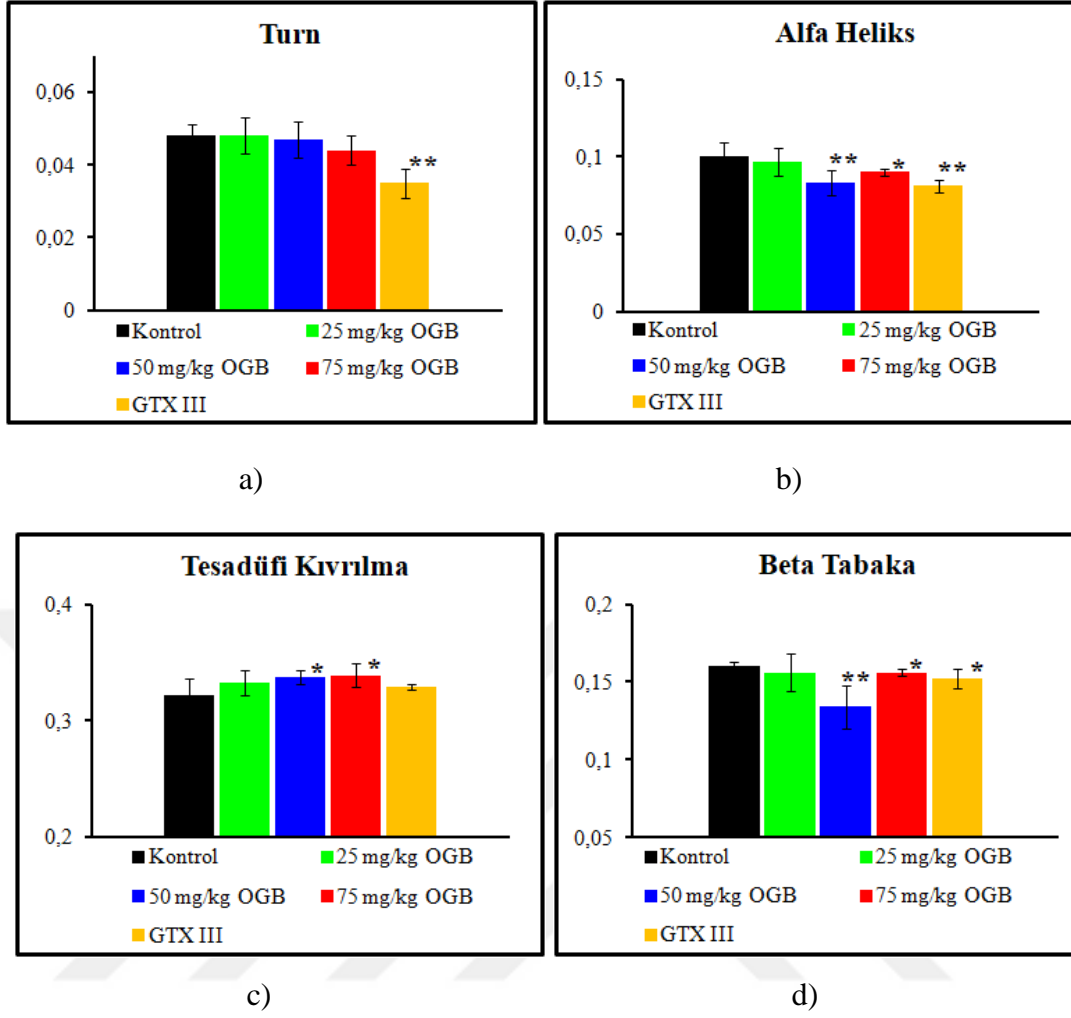
İkincil türev vektör normalizasyonu metodu ile elde edilen kalp kasının protein ikincil yapılarındaki değişimler Çizelge 3.3, Şekil 3.26 ve Şekil 3.27'de gösterilmektedir. İkincil türev spektrumunda proteinlerin ikincil yapısından kaynaklanan turn yapıları 1684 cm⁻¹, alfa heliks 1659 cm⁻¹, tesadüfi kıvrılma (random coil) 1652 cm⁻¹ ve beta tabaka 1637 cm⁻¹ de ortaya çıkmaktadır. Şekil 3.27'de görüldüğü gibi turn miktarı GTX-III uygulanmış grupta anlamlı derecede azalmıştır. Alfa heliks ve beta tabaka miktarlarında 50 mg/kg ve 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulanmış gruplarda anlamlı bir azalma görülmektedir. Tesadüfi kıvrılma miktarında 50 ve 75 mg/kg OGB uygulanmış gruplarda anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu değişiklikler OGB (50 mg/kg ve 75 mg/kg) ve GTX-III'ün protein denatürasyonuna sebep olabileceğini göstermektedir. Şekilden ve çizelgeden görüldüğü gibi 25 mg/kg OGB uygulanmış grupta ikincil yapı analizinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.



Şekil 3.26. Kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarındaki fare kalp kasına ait a) 1700-1600 cm^{-1} arası örnek soğurma, b) İkincil türev temsili spektrumları (Y eksenindeki “A.U” arbitrary unit’in (keyfi birim) kısaltılmışıdır).

Çizelge 3.3. İkincil türev vektör normalizasyonu metodu ile elde edilen kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III uygulanmış fare kalp kasının protein ikincil yapı değişimi (İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi *p<0,05; **p<0,01 şeklinde gösterilmiştir. ↑: kontrole göre artış olduğunu, ↓: kontrole göre azalış olduğunu gösterir).

GRUP	Kontrol	25 mg/kg OGB	50 mg/kg OGB	75 mg/kg OGB	GTX-III
Turn	-0,048±0,003	-0,048±0,005	-0,047±0,005	-0,044±0,004	-0,035±0,004 ** ↓
Alfa Heliks	-0,100±0,009	-0,097±0,009	-0,083±0,008 ** ↓	-0,090±0,002 * ↓	-0,081±0,004 ** ↓
Tesadüfi kıvrılma	-0,322±0,014	-0,333±0,011	-0,338±0,006 * ↑	-0,339±0,010 * ↑	-0,329±0,002
Beta Tabaka	-0,160±0,003	-0,156 ± 0,008	-0,134±0,009 ** ↓	-0,156±0,002 * ↓	-0,152±0,006 * ↓



Şekil 3.27. İkincil türev vektör normalizasyonu metodu ile elde edilen kontrol, OGB (25, 50 ve 75 mg/kg) ve GTX-III gruplarının dokularındaki a) Turn b) Alfa heliks c) Tesadüfi kıvrılma d) Beta tabaka proteinlerin ikincil yapı miktarındaki değişimler.

3.2. TARTIŞMA

Bu çalışmada farelere 25, 50 ve 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulanmış ve 24 saat sonunda OGB'nin kalp kasındaki lipidler, proteinler ve nükleik asitler üzerindeki etkileri, moleküllerin yapıları, kompozisyonları ve fonksiyonları hakkında önemli bilgiler elde etmemizi sağlayan bir teknik olan ATR-FTIR spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir. OGB'yi 50 mg/kg'dan (yaklaşık 1 çay kaşığı) fazla tüketmenin ciddi zehirlenmelere sebep olabileceği [44], zehirlenme belirtilerinin 20 dakika ile 3 saat arasında ortaya çıktığı ve etkilerinin 1-2 gün sürdüğü rapor edilmiştir [45], [46]. Bu nedenle, bu çalışmada hayvanlara uygulanmak üzere, toksik doz sınırı olarak kabul edilen 50 mg/kg ve bu dozun ½'si kadar azaltılmış konsantrasyonu olan 25 mg/kg ve ½'si kadar artırılmış konsantrasyonu olan 75 mg/kg dozları seçilmiştir. Bizim bu çalışmada kullandığımız dozlara benzer dozlar daha önceki çalışmalarda da kullanılmıştır [26], [58].

Çalışmamızda kullandığımız OGB'nin içerdiği primer toksik maddeler olan GTX-I ve GTX-III'ün miktarlarının sırasıyla 32 ve 8 µg/g olduğu tespit edilmiştir. Kaplan ve arkadaşları [138], GTX analiz metodu geliştirmek amacıyla farklı bölgelerden toplayıp kullandıkları OGB'nin içindeki ortalama GTX-I ve GTX-III değerlerini sırasıyla 13,36 ve 5,95 µg/g olarak belirlemişlerdir. Ayrıca, daha önce gerçekleştirilmiş olan benzer çalışmalarda deney hayvanlarına uygulanmış olan OGB'nin içerdiği GTX-I miktarları Eraslan ve arkadaşları [163] tarafından 34,05 µg/g ve Kurtoğlu ve arkadaşları [164] tarafından 20,4 µg/g olarak, GTX-III miktarları ise Eraslan ve arkadaşları [163] tarafından 6,5 µg/g, Kurtoğlu ve arkadaşları [164] tarafından 8,20 µg/g, Silici ve arkadaşları [60], [165] tarafından 6,22 µg/g olarak rapor edilmiştir. Dolayısıyla bizim kullandığımız balda tespit ettiğimiz toksik madde değerleri hem Kaplan ve arkadaşları tarafından rapor edilen ortalama değerlerin üzerindedir hem de diğer çalışmalarda kullanılan OGB'nin içerdiği toksik madde miktarları ile paralellik göstermektedir.

Hücre düzeyindeki bazı işlev bozuklukları birçok metabolik hastalığın kaynağıdır [129], [130]. Bu işlev bozuklukları, hücre fonksiyonlarını yürüten hücre zarı, iyon kanalları, reseptörler, organeller ve moleküllerin yapısal ve regülatör bozuklukları ve birbirleri ile etkileşimlerindeki değişimler sonucunda ortaya çıkmaktadır [131]–[133]. Biyolojik

moleküllerin fonksiyonları yapılarına bağlıdır. Günümüzde, moleküler kompozisyondaki değişimlerin hücre zarında normal işleyiş için gerekli olan lipid ve protein gibi moleküllerin antisimetrik dağılımını değiştirdiği, bunun da hücrede çeşitli fonksiyon bozukluklarına neden olduğu bilinmektedir. Örneğin doymamış/doymuş lipid, lipid/protein oranlarındaki değişimin membran kalınlığını ve lipid düzenini diğer bir deyimle membran yapısını değiştirdiği ve bunun da membran akışkanlığı ile ilgili olduğu ve iyon akımları kinetiği ve fonksiyonunu altüst ettiği bilinmektedir [113], [133], [166]. Bu nedenle yapısal ve moleküler içeriklerdeki değişimleri belirlemeye yönelik çalışmaların önemi büyüktür. Moleküllerin yapısal, fonksiyonel ve dinamik özelliklerinin karakterize edilmesini sağlayan FTIR spektroskopisi, biyolojik çalışmalar açısından lipidlerin diğer biyomoleküllerle etkileşimleri, proteinlerin ikincil yapılarının belirlenmesi, kanser, diyabet gibi patolojik durumların, Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların doku ve membran düzeyinde tanımlama ve teşhisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır [104], [108], [109], [112], [113], [143], [144], [148], [150], [167].

Çalışmamızın sonuçları, OGB ve GTX-III'ün fare kalp kasındaki hücre bileşenlerini oluşturan makromoleküllerin yani doymuş ve doymamış lipidler, proteinler ve nükleik asitlerin miktarlarında, yapılarında ve bunlara bağlı olarak fonksiyonlarında önemli değişiklikler meydana getirdiğini ortaya çıkarmıştır.

3011 cm^{-1} civarında gözlenen olefinik=CH gerilme bantının sinyal şiddeti ve altında kalan alan hidrokarbon zincirlerinin doymamışlığı hakkında bilgi vermektedir [102], [111]–[113], [115], [118], [147]. Söz konusu bantta yapılan analiz sonuçlarına göre, 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta doymamış yağ asidi miktarında anlamlı bir artış meydana gelmiştir (Şekil 3.6). Doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonuna karşı hassas oldukları bilinmektedir ve bu bantın altında kalan alan, lipid peroksidasyonu tayini için bir index olarak kullanılabilir [102]. Ayrıca doymamışlık indeksi olarak bilinen, bu bantın alanının doymuş lipidlerden kaynaklanan bantların alanına bölünmesiyle elde edilen doymamış/doymuş lipid oranının bütün gruplarda anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir (Şekil 3.7). 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta hem olefinik=CH bant alanındaki hem de doymamış/doymuş lipid oranındaki artış, 50 mg/kg'lık OGB dozunun kalp kasında doymamış yağ asidi konsantrasyonunda artış meydana getirdiğini göstermektedir. Olefinik=CH bant alanında görülen bu artışın

nedeni, artan lipit peroksidasyonu sonucu dokudaki lipit peroksidasyon son ürünlerinin artışına bağlı olabilir [111], [113], [154], [155], [168].

Lipit peroksidasyonunun çoklu doymamış yağ asitlerinin açıl zincirlerindeki çift bağlarda meydana geldiği [169], [170] ve olefinik bağlarının kaybıyla sonuçlandığı [171], [172] bilinmektedir. Ancak deney sonuçlarımıza göre olefinik gruplarında bir azalma yerine bir artış gözlenmiştir. Bu sonuç lipit peroksidasyonu reaksiyonları sırasında kaybolan doymamış yağ asidi miktarının lipit peroksidasyon son ürünlerinde bulunan çift bağlar tarafından kompanse edildiğini göstermektedir [102], [113], [152]. Yin ve arkadaşlarının [173] hazırladığı bir derlemede detaylı bir şekilde açıklandığı gibi biyolojik doku ve membranlardaki lipitler serbest radikal kaynaklarıyla muamele edildiklerinde bir dizi oksidasyon reaksiyon zinciri meydana gelir. Çoklu doymamış yağ asitleri bu oksidasyon reaksiyonlarına karşı son derece duyarlıdır. Lipit peroksidasyonu, doymamış bir lipit ünitesinin moleküler oksijenle birleşmesiyle başlayan ve lipit peroksidasyon son ürünleri olarak bilinen lipit hidroperoksit ve dialkilperoksit gibi bileşiklerin oluşmasıyla sonlanan kompleks bir süreçtir. Eğer bir lipit açıl zinciri birden fazla çift bağ içeriyorsa, lipit peroksidasyonu konjuge dienleri oluşturmak için bu çift bağların yeniden düzenlenmesiyle sonuçlanır. Bunu hidroperoksitlerin parçalanması ve kompleks çoğalma reaksiyonları takip eder ve sonuçta ikincil lipit peroksidasyon ürünleri oluşur [173], [174]. Lipitlerde meydana gelen bu dejeneratif çoğalma reaksiyonlarına alkenler, malondialdehit (MDA) gibi karbonil bileşikleri, lipit aldehitleri ve alkil radikallerini içeren çeşitli son ürünlerin oluşması eşlik eder. Sonuç olarak OGB ve GTX-III uygulanmış grupların kalp kası dokusundaki olefinik gruplarının miktarında meydana gelen artış dokuda bu lipit peroksidasyon son ürünlerinin birikmesinden kaynaklanmış olabilir [170], [173]. Hipokampüs dokusunda etanol intoksikasyonunun etkilerini FTIR spektroskopisi ile araştıran önceki bir çalışmada, bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak lipit peroksidasyon son ürünlerinin artışına bağlı olefinik=CH bant alanı ve doymamış/doymuş lipit oranında artış rapor edilmiştir [141]. Severcan ve arkadaşları [102] tarafından gerçekleştirilen bir başka FTIR çalışmasında diyabetin sıçanlarda lipit peroksidasyonunu artırdığı olefinik bandındaki artış ile tespit edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca lipit peroksidasyonu son ürünlerinin varlığı, lipit peroksidasyon testi olarak bilinen TBARS (tiobarbiturik asit reaktif madde) testiyle saptanmış olan MDA varlığı ile doğrulanmıştır.

Lipit peroksidasyonu ile ilgili daha önce rapor edilen sonuçlarda lipit peroksidasyon son ürünlerinde karbonil ester gruplarında da bir artış olduğu tespit edilmiştir [174]–[176]. 1738 cm^{-1} 'de gözlenen karbonil ester gerilme bandı lipitlerdeki kolesterol esterleri ve trigliseritlerdeki karbonil gruplarından sinyal almaktadır. Bu bantın altında kalan alanın doymuş lipit bantlarının altında kalan alana bölünmesiyle hesaplanan karbonil ester/lipit oranının 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulanmış gruplarda arttığı (Şekil 3.21) tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, OGB ve GTX-III uygulamasından sonra kalp kası dokusunda lipit peroksidasyon son ürünlerinin biriktiği ve bu birikim sonucunda olefinik ve karbonil gruplarının arttığı sonucunu desteklemektedir.

Normal koşullarda kalp kası enerji gereksiniminin büyük bir bölümünü serbest yağ asitlerinin oksidasyonundan sağlar ve yağ asitlerinin serbest radikallerin zararlı etkilerine son derece duyarlı olduğu bilinmektedir [125], [173]. Oksidatif stres sonucu oluşan serbest radikaller tüm vücut hücrelerinde normal şartlarda az sayıda üretilirler. Fakat bu radikaller süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidant enzimleri tarafından etkisiz hale getirilirler ve hücredeki diğer moleküllere saldırmaktan alıkonurlar [177]. Herhangi bir sebeple serbest radikallerin üretimi hızla artarsa etkisizleştirme mekanizması çalışmaz ve bu radikaller hücredeki diğer moleküllerle reaksiyona girerek onların yapısını bozar. Örneğin, oksidatif stres sonucu oluşan serbest radikallerden birisi olan hidroksil radikali uzun zincirli yağ asitleri ile tepkimeye girip lipit peroksidasyonuna sebep olur [177]. OGB'nin etken maddesi olan GTX'in etkisi ağırlıklı olarak voltaj bağımlı sodyum kanalları üzerinedir. GTX açık konumdaki sodyum kanalına bağlanır ve böylece sodyum kanalı kapanamaz hale gelir. Sonuçta, aksiyon potansiyeli uzamış bir hiperpolarizasyon sürecine girer [35], [67]. Hücre içi sodyum konsantrasyonundaki artış, hücre içi ve hücre dışı sodyum/kalsiyum değişim mekanizması üzerinde etkili olabilir [178], [179]. Bu şekilde, hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artarken, diğer tarafta sodyum seviyesi azalır. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artışın, serbest radikallerin oluşumunu tetikleyen ana mekanizmalardan birisi olduğu bilinmektedir [180]. Ayrıca, GTX'e maruz kalmanın, karaciğer ve böbrek gibi organlarda işlev bozukluğuna yol açabildiği ve organlardaki fonksiyonel bozuklukların ve biyolojik sistemdeki dengenin bozulmasının da serbest radikal oluşumuna yol açabileceği bilinmektedir [165], [181]. Bu durum OGB ile yapılmış önceki çalışmalarda gösterilmiştir [165], [181]. Diğer yandan, GTX'in

muskarinik M2 reseptörlerine bağlanarak kardiyotoksistide önemli bir rol oynadığı bilinmektedir [69]. GTX'in artmış vagal tonu, kolinerjik etkinin yoğunlaşması nedeniyle, özellikle kardiyovasküler sistemde ve diğer sistemlerde fizyolojik dengenin bozulmasına yol açar [69]. Bu durum, dolaylı olarak, hücresel düzeyde oksidan/antioksidan dengesinin bozulmasına, hücresel antioksidan savunma sisteminin zayıflamasına ve serbest radikallerin oluşumuna yol açabilir. Sonuç olarak, olefinik=CH ve karbonil ester bantlarının alanındaki ve doymamış/doymuş lipit oranındaki artış, sistemde oluşan serbest radikallerin kalp kasındaki yağ asitlerine saldırmasının bir sonucu olan lipit peroksidasyonuna bağlanabilir. Sonuçlarımız OGB'nin etken maddesi olan GTX'in etki mekanizmasının, oksidatif stres oluşturma potansiyeli ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak, Eraslan ve arkadaşları [163] tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, OGB'nin farklı dozlarının kalpte meydana getirdiği oksidatif stres MDA, NO (nitrik oksit) ve HNE (4-hidroksinonenal) gibi oksidatif stres markerlarında gözlenen artış ve antioksidant enzim seviyelerindeki değişimler ile gösterilmiştir. Benzer şekilde, Silici ve arkadaşları [60] tarafından GTX'in çeşitli hücre ve dokularda meydana getirdiği lipit peroksidasyonu, MDA seviyesindeki artış belirlenerek rapor edilmiştir. Aynı çalışmada farklı dokularda ve plazmada antioksidant enzim seviyelerinde artış olduğu gözlenmiştir [60]. Antioksidant enzimler zararlı serbest radikalleri daha az zararlı ya da zararsız bileşiklere dönüştürmede aktif rol oynadığından bu artışta oksidatif stresin dolayısıyla lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilebilir.

Lipit kaynaklı CH₃ antisimetrik ile CH₂ antisimetrik ve simetrik gerilme bantlarının yer aldığı C-H gerilme bölgesi analiz edildiğinde 25 mg/kg OGB uygulanmış grupta herhangi anlamlı bir değişiklik gözlenmemiş, ancak 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta bu bantların alanlarında kontrol grubuna göre artış tespit edilmiştir (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9). Bu artış, lipit miktarındaki artışı dolayısı ile lipit biyosentezindeki artışı göstermektedir. Bu sonuç, 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta CH₂/CH₃ bant alan oranlarındaki artış ile desteklenmektedir (Şekil 3.20). Çünkü söz konusu orandaki artış lipit zincir uzunluğundaki artışı göstermektedir [143], [144]. Lipit bantlarının alanlarında ve CH₂/CH₃ oranında gözlenen artışlar 50 mg/kg OGB uygulanmış fare kalp kasında lipit içeriğinde artış olduğunu göstermektedir. C-H gerilme bölgesine ilaveten parmak izi bölgesindeki lipit bantlarının analizleri de yapılmıştır. Söz konusu bölgede

1738 cm⁻¹'de yer alan karbonil ester gerilme bandının alan değerinde gözlenen artış (Şekil 3.13), 50 mg/kg'lık OGB dozunun lipit miktarını artırdığı sonucunu desteklemektedir. 75 mg/kg OGB uygulanmış grubun sonuçlarına bakıldığında CH₂ antisimetrik (Şekil 3.9 a) ve karbonil ester gerilme (Şekil 3.13) bantlarının alanları ve CH₂/CH₃ (Şekil 3.20) oranının azaldığı gözlenmiştir. GTX uygulanmış grupta bu bantlardan sadece CH₃ antisimetrik bandının alanında anlamlı bir değişiklik gözlenmiştir ve bu değişiklik karşımıza 75 mg/kg OGB grubununkine benzer şekilde bir azalma olarak çıkmıştır. Sonuç olarak, 50 mg/kg OGB lipit miktarını artırırken, 75 mg/kg OGB ve GTX tam tersi bir şekilde azaltmıştır. 50 mg/kg OGB ile 75 mg/kg OGB'nın fare kalp kasındaki lipitlerin miktarı üzerinde yarattığı zıt etki kullanılan dozların içindeki farklı miktarda bulunan GTX miktarı ile açıklanabilir. Daha önce yapılan bir çalışmada OGB'nin farklı dozlarının zıt etkiler yarattığı Gündüz ve arkadaşları [66] tarafından rapor edilmiştir. Araştırmacılar, GTX'in düşük dozlarda alındığında kalpte kolinerjik etkilerle bradikardi ve hipotansiyon yaptığını, yüksek dozlarda alınması durumunda sürrenal medulladan epinefrin salgılatarak taşikardi ve hipertansiyon oluşturduğunu bildirmişlerdir [66]. Bir başka çalışmada, solunum sisteminde GTX'in düşük dozlarda düzensizlik ve derinlikte azalma, yüksek dozlarda ise solunum hızlanması ve solunum depresyonu yaptığı rapor edilmiştir [23].

Lipitlerle ilgili bantların analiz sonuçları bir bütün olarak değerlendirildiğinde, 50 ve 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulamasının kalp kasındaki lipit metabolizmasında değişiklik meydana getirdiği ve bu değişiklik sonucunda 50 mg/kg OGB dozunun kalp kasında lipitlerin birikimine sebep olduğu sonucuna varılabilir. Lipitler kardiyak metabolizmaya yüksek enerjili ATP'leri üretmek için ciddi anlamda katkı sağladığından lipit metabolizması çeşitli kalp hastalıklarında ve kalp yetmezliği süreçlerinde çok önemli bir rol oynar [182]. Lipit alımı ve oksidasyonu arasındaki fizyolojik denge fazla lipitlerin birikmesini önler. Eğer bu denge herhangi bir sebeple bozulacak olursa miyokardiyal lipit birikimi gözlenir ve bu durum çeşitli patolojik cevaplara sebep olur [126], [183]. Yağ asitleri membran akışkanlığı ve membran yapısının stabilitesi üzerindeki etkileri, membrandan iyon ve madde transportu, kardiyak fonksiyon ve eksitabilite için çok önemli olan kardiyak elektrofizyoloji gibi membran fonksiyonlarını önemli derecede etkiler. Yağ asitleri ve onlarla ilişkili diğer lipitler hücre zarındaki yapısal ve fonksiyonel rollerine ek olarak, hücre sinyalleşmesinde ve transdüksiyonda

ikincil mesajcı olarak, apoptoziste efektör olarak, oksidatif ve iskemik zararın oluşumunda regülatör molekül olarak rol oynarlar [184]. Bu nedenle, yağ asidi metabolizmasındaki anormal durumlar kardiyak sistem yapısını ve fonksiyonunu olumsuz yönde etkiler. OGB'nin lipit metabolizmasında değişiklik yaptığı Öztasan ve arkadaşlarının 2005 yılında [26] yaptığı bir çalışmada gösterilmiştir. Bahsedilen çalışmada, diyabetli sıçanlarda OGB uygulamasından sonra kandaki lipit seviyelerinde azalma olduğu tespit edilmiş ve bunun OGB içerisinde bulunan GTX'in parasempatik sinir sistemini veya M₂-muskarinik reseptörleri uyararak pankreas Langerhans adacık hücrelerinden insülin salgılatmasına bağlı olabileceği öne sürülmüştür [26]. OGB bu etkisi nedeniyle kandaki lipit miktarının azalmasına sebep olurken, kalp kası gibi dokularda lipit miktarının artışına sebep olmuş olabilir. Kalp kas dokusunda biriken bu lipitlerin çoğu kalp fonksiyonlarını kötü yönde etkilemekte ve kardiyak fibröz, miyosit apoptozu ve sıklıkla mitokondriyal bozukluklardan kaynaklandığı düşünülen azalmış kasılma gibi yapısal miyokardiyal zararlara sebep olmaktadır [183]. OGB'nin aşırı dozda tüketiminin atriyoventriküler blok, ritm bozuklukları, bradikardi ve ciddi hipotansiyon gibi kardiyak yan etkiler ve fonksiyonel bozukluklara sebep olduğu bilinmektedir [66], [185]. Bütün bu fonksiyonel bozuklukların ortaya çıkmasında dokuda biriken lipitler katkı sağlıyor olabilir.

Lipit/protein oranı membran fonksiyonu ile yakından ilişkili olan lipit ve/veya protein antisimetrisindeki değişiklikler hakkında bilgi vermektedir [111], [112]. 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta bu oran anlamlı derecede artmıştır (Şekil 3.22). Çalışmamızda, 50 mg/kg OGB uygulanmış grubun kalp kasındaki lipit miktarında anlamlı derecede bir artış, protein miktarında anlamlı derecede bir azalma tespit edildiğinden lipit/protein oranında gözlenmiş olan bu artış, fare kalp kasındaki lipit miktarındaki artıştan, protein miktarındaki azalıştan ya da her ikisinde etkisiyle meydana gelmiş olabilir. Ayrıca bu artış 50 mg/kg OGB uygulanmış kalp kası hücre zarlarında lipit antisimetrisinde değişiklik olduğunu göstermektedir. Lipit antisimetrisinde meydana gelen değişikliklerin hücre içi ve hücreler arası iyon konsantrasyonunda ve sonuçta membran fonksiyonunda önemli değişikliklere neden olduğu bilinmektedir [186].

Biyolojik membranlar lipit dinamikleri, sinyal iletimi, madde transferi ve membrana bağlı enzimlerin aktivitesi gibi birçok hücre fonksiyonunu kontrol ettiğinden, membran akışkanlığının optimum seviyede korunması çok önemlidir [187], [188]. Ayrıca

günümüzde lipit düzenindeki farklılıklar, lipit dinamiği, membranlardaki proteinlerin sekonder yapılarındaki değişikliklerin makromolekül içeriklerindeki değişikliklerle birlikte iyon kanallarının kinetiğini ve fonksiyonlarını bozduğu ve dolayısıyla birçok hastalığa neden olduğu bilinmektedir [133]. FTIR spektrumunda CH_2 antisimetrik bantının dalga sayısı, membrandaki lipitlerin düzen ve düzensizlik durumları (açıl zincirlerinin esnekliği) hakkında bilgi vermektedir. Örneğin, bu bantın dalga sayısı değerindeki bir artış daha esnek açıl zincirlerini yani daha düzensiz bir membran yapısını, bir azalma ise daha düzenli bir membran yapısını göstermektedir [117], [143], [158]. 25 mg/kg OGB uygulanmış grubun CH_2 antisimetrik bantının dalga sayısında anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, 50 ve 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulanmış gruplarda bu bantın dalga sayısı yüksek değerlere doğru anlamlı derecede artış göstermiştir (Şekil 3.10). Bu sonuç bize 50 mg/kg, 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulamasının membran düzeninde bir azalma meydana getirdiğini yani membranın daha düzensiz yaptığını göstermektedir. Membran düzenindeki azalma, 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta daha net gözlenmiş olan OGB ve GTX-III tarafından indüklenen oksidatif strese bağlı lipit peroksidasyonu ile ilişkili olabilir. Oksidatif stresin lipit düzenine etkisini gösteren bir çalışmada, fosfolipitlerde lipit düzenindeki oksidatif strese bağlı azalma elektron paramanyetik spektroskopisi ile de tespit edilmiştir [189]. CH_2 antisimetrik bantının bant genişliğindeki değişimler ise membran lipitlerinin akışkanlığında meydana gelen değişimleri belirlemek amacıyla kullanılır [143]. Deney sonuçlarımıza göre CH_2 antisimetrik bantının genişliği 50 ve 75 mg/kg OGB uygulanmış gruplarda anlamlı derecede artmıştır (Şekil 3.11). Bant genişliğindeki bu artış lipit akışkanlığında bir artış meydana geldiğini göstermektedir [117], [157]. Lipit akışkanlığındaki söz konusu değişim örneklerine ait lipit kompozisyonundaki, diğer bir ifade ile doymuş yağlar, fosfolipitler ve kolesterol v.b. lipit miktarları ile bunların birbirlerine göre olan bağıl değişimlerinden ve lipit/protein oranındaki değişimden kaynaklanmış olabilir [190]. OGB'nin etken maddesi olan GTX'in iskelet ve kalp kası üzerindeki etkilerinin tümünün hücre membranında yaptığı değişikliklere bağlı olduğu bilinmektedir [191], [192]. GTX yağda çözünen bir toksindir, dolayısıyla hücre zarının düzeni ve akışkanlığı GTX'e karşı geçirgenlikte çok önemlidir. Daha önce bahsedildiği gibi GTX hücre zarındaki voltaj bağımlı sodyum kanallarına bağlanarak membranın sodyum geçirgenliğini artırır ve ayrıca kalsiyumun hücre içine girişini kolaylaştırır [70], [71]. Kas kasılmasında, hücre bölünmesinde, apoptozide, nörotransmitter salınımı gibi

olaylarda sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonundaki değişimler önemli rol oynamaktadır [193]. Çalışmamızda gözlediğimiz membran düzenindeki azalma ve membran akışkanlığındaki artış membran geçirgenliğini artıran bir etkidir. Dolayısıyla sonuçlarımız OGB ve GTX'in hücre zarını etkilediği ve bunun sonucunda hücre içi iyon konsantrasyonunda değişiklikler meydana getirdiği ile ilgili bulgularla uyum içindedir. Bu sonuç, 50 ve 75 mg/kg OGB dozunun ve GTX-III'ün membran düzeni ve akışkanlığında önemli değişikliklere sebep olarak hücre zarının normal işleyişini bozduğunu göstermektedir. Hücre zarının düzeni ve akışkanlığında meydana getirdiği bu olumsuz etkiler, OGB'nin kalp kasındaki toksik etki mekanizmalarından birisi olabilir.

FTIR spektroskopisi biyolojik sistemlerdeki proteinlerin lipitlerle birlikte çalışılmasına imkan sağlayan bir tekniktir [113], [166]. 3283 cm^{-1} 'de gözlenen Amid A bandı, 1641 cm^{-1} ve 1545 cm^{-1} yer alan Amid I ve Amid II bantları ve 2874 cm^{-1} de gözlenen CH_3 simetrik bantları proteinlerdeki yapı ve konsantrasyon değişimleri hakkında bilgiler vermektedir. Söz konusu bantların alan değerleri incelendiğinde 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta Amid A bandının altında kalan alanının anlamlı derecede azaldığı, GTX-III uygulanmış grupta ise arttığı görülmüştür (Şekil 3.4). Bu sonuç, 50 mg/kg'lık OGB uygulamasının kalp kasındaki toplam protein içeriğini azalttığını ve 0,01 mg/kg GTX-III uygulamasının ise artırdığını göstermektedir. Amid I bandının dalga sayısı ve bant genişliği değerindeki değişimler protein yapı ve konformasyonları hakkında bilgi verir [143], [194]. Bu bandın dalga sayısı ve bant genişliğindeki değişimler incelendiğinde, 25 mg/kg OGB uygulanmış grupta anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak, 50 ve 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulanmış gruplarda Amid I bandının hem dalga sayısında hemde bant genişliğinde anlamlı derecede artma saptanmıştır (Şekil 3.14 ve Şekil 3.16). Bu artış 50 ve 75 mg/kg'lık OGB'nin ve GTX-III'ün kalp kasındaki proteinlerin yapısında ve konformasyonunda önemli değişiklikler meydana getirdiğini göstermektedir. Bu sonuç, 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta Amid I/Amid II alan oranında gözlenen anlamlı düşüş ile de desteklenmektedir [143], [194] (Şekil 3.15). Amid I bandının dalga sayısında ve bant genişliğinde gözlenen değişiklikler ile Amid I/Amid II oranında gözlenen değişiklik OGB'nin ve GTX-III'ün kalp kası dokusundaki proteinlerin konformasyonunu etkilediğini göstermektedir. Bulgularımız FTIR spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirilmiş olan önceki çalışmalarda protein

oksidasyonundan sonra gözlenen Amid I bandının genişliğinde gözlenen artış ile desteklenmektedir [113], [195]. Proteinlerin oksidasyonu aminoasitler üzerinde bazı ek karbonil gruplarının oluşumuna sebep olabileceğinden, bu karbonil grupları amin gruplarına bağlanmakta ve oluşturduğu spektroskopik absorpsiyondan dolayı Amid I bantında genişlemeye sebep olmaktadır [113], [174], [195]. Sonuç olarak, OGB'nin toksik etkisiyle oluşan serbest radikallerin proteinleri oksidasyona uğratması, proteinlerde meydana gelen yapısal ve konformasyonel değişikliklerin sebebi olabilir. Literatürde, oksidasyonun proteinlerin yapısı ve stabilitesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir takım çalışmalar mevcuttur [112], [149], [196]. Jayaraman ve arkadaşları [197] oksidasyonun düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) partiküllerinin ikincil yapıları üzerindeki etkilerini LC/MS/MS ve sirküler dikroizm (CD) tekniklerini kullanarak araştırmışlar ve protein oksidasyonunun alfa-heliks yapısının kaybolmasına ve tesadüfi kıvrılma yapısında artışa sebep olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları bizim spektral sonuçlarımız ile uyum içindedir.

Yapılan protein ikincil yapı analizi çalışmalarında elde edilen sonuçlar kalp kasında 25 mg/kg OGB'nin herhangi bir anlamlı değişiklik yaratmadığını göstermiştir. Alfa heliks miktarı 25 mg/kg OGB uygulanmış grup dışındaki bütün gruplarda, beta tabaka miktarı 50 mg/kg OGB ve GTX-III uygulanmış grupta, turn miktarı GTX-III uygulanmış grupta azalırken, tesadüfi kıvrılma miktarı 50 ve 75 mg/kg OGB uygulanmış grupta anlamlı derecede artmıştır (Şekil 3.27). Bu sonuç, 50 ve 75 mg/kg OGB uygulanmış grubun kalp kasındaki proteinlerde denatürasyon meydana geldiğini göstermektedir. Protein denatürasyonu OGB tarafından indüklenen serbest radikal üretimi ve oksidatif streten kaynaklanmış olabilir. OGB uygulamasından sonra kalp kasındaki bazı aminoasitler yapısal olarak bozulmuş olabilir ve proteinlerde gözlenen bu değişikliklere sebep olmuş olabilir. Serbest radikallerin protein bağlarına ulaşılabilirliği ve agregasyonu artırarak protein degradasyonuna sebep olduğu bilinmektedir [198]. Önceki bir çalışmada lipit peroksidasyonu ile protein sentezine verilen zarar arasındaki ilişki sıçan karaciğer dokusu için rapor edilmiştir [199]. Sonuçlarımız, kalp kasındaki proteinlerin ikincil yapılarının 50 ve 75 mg/kg OGB dozlarından önemli ölçüde etkilendiğini göstermektedir. Çalışmamızda kalp kasındaki protein ikincil yapılarında meydana gelebilecek değişimlerin tespit edilmesi, makromoleküler yapı ve fonksiyonlardaki değişimlerin belirlenmesi için gereklidir. Şimdiye kadar metabolik rahatsızlıklarla ilgili

yapılan çalışmalarda, değişik proteinlerin miktarları ve gen ekspresyonları incelenmiştir [200]–[205]. Protein yapılarındaki ve buna bağlı olarak da fonksiyonlarındaki değişimler, yalnızca gen ekspresyonundaki veya protein sentezindeki farklılaşmalara bağlı değildir. Proteinlerin görevlerini tam olarak yapabilmeleri doğal hallerindeki üç boyutlu yapılarına bağlıdır [206]. Katlanma aşamasında meydana gelebilecek her türlü hata, proteinlerin farklı ikincil, üçüncül ya da dördüncül yapılara ulaşmalarına, böylece işlevlerini yitirmelerine veya farklı işlevlere sahip olmalarına neden olmaktadır [207]. Bu nedenle, ekspresyon değişikliği olmadan, yalnızca varolan proteinlerin birincil ya da ikincil yapılarının değişmesinin de proteinlerde fonksiyon bozulmalarına yol açabildikleri bilinmektedir. Serbest radikal üretimindeki artış hücrenin redoks potansiyelini değiştirerek, proteinler ve nükleik asitler gibi makromoleküllerin ikincil yapısını değiştirebilir [208]. Daha önce de bahsedildiği gibi GTX'ler, sodyum kanal proteinine bağlanarak bu proteinin yapısını değiştirir. Önceki bir çalışmada lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden birisi olan MDA'nın kas miyozin proteininin alfa-heliks yapısında bir düşüşe ve tesadüfi kıvrılma yapısında bir artışa sebep olduğu rapor edilmiştir [209]. Sonuç olarak protein ikincil yapısında gözlenen değişiklikler OGB ve GTX-III uygulamasından sonra artan lipit peroksidasyonundan da kaynaklanmış olabilir. Ayrıca, lipit içeriğinde meydana gelmiş olan değişikliklerden kaynaklanan membran kalınlığında gözlenen değişiklikler protein konformasyonunda direkt bir etki yaratmış olabilir [210].

1300-900 cm^{-1} bölgesi karbonhidratlar ve nükleik asit ve fosfolipit gibi fosfat grubu taşıyan makromoleküllerden kaynaklanan bantları içermektedir. Nükleik asitlerin ana bantlarından birisi olarak bilinen 972 cm^{-1} 'de gözlenen C-N⁺-C gerilme bandının alan analizi yapıldığında bu bandın alanının 75 mg/kg OGB uygulanmış grupta azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 3.19). Bu azalma sistemdeki nükleik asit miktarında bir azalma olduğunu göstermektedir. Fosfolipitler ve nükleik asitlerden sinyaller alan PO_2^- antisimetrik bandının alanında GTX-III uygulanmış grupta azalma gözlenmiştir (Şekil 3.17). Ayrıca bu bandın dalga sayısında 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulanmış gruplarda yüksek değerlere doğru bir kayma gözlenmiştir (Şekil 3.18). Bu kayma nükleik asitlerin hidrojen bağı yapma kapasitelerinde bir düşüş meydana gelmesinden kaynaklanmış olabilir ve nükleik asitlerde OGB uygulamasından sonra ortaya çıkmış olan konformasyonel bir değişikliğe işaret etmektedir. Ayrıca bu sonuç nükleik asitlerde

gözlenen yapısal değişikliklerin DNA ve RNA omurgalarının hidrojen bağı yapma kapasitelerindeki değişikliklerle ilişkili olabileceğini göstermektedir [211]. Nükleik asitlerin miktarı ve konformasyonu ile ilgili değişikliklerin çoğunlukla 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulanmış grupta ortaya çıkmasına rağmen, nükleik asit/lipit oranı (Şekil 3.23) 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta, RNA/protein (Şekil 3.24) ve RNA/lipit (Şekil 3.25) oranları 50 ve 75 mg/kg OGB uygulanmış grupta anlamlı derecede azalmıştır. Nükleik asitler ile ilgili sonuçlar bir bütün olarak değerlendirildiğinde özellikle 50, 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulanmış gruplarda nükleik asitlerin içeriğinde ve konformasyonunda önemli değişikliklerin olduğundan bahsedilebilir. Bu değişikliklerin nedeni 50, 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulanmış grupların hücre çekirdeklerinin morfolojisi, organizasyonu ve mimarisinde meydana gelen değişiklikler olabilir. Örneğin OGB uygulamasından sonra çekirdek/sitoplazma oranı değişmiş olabilir ya da hücre bölünme hızı değişmiş olabilir [162]. 50 ve 75 mg/kg OGB uygulanmış grupta, RNA/lipit ve RNA/protein oranlarında gözlenen azalma RNA miktarında bir azalma olduğunu ve dolayısıyla protein sentezinde azalma meydana geldiği sonucunu desteklemektedir. Sonuçlarımızla uyumlu olarak, Aşçıoğlu ve arkadaşları [212] tarafından yapılan bir çalışmada GTX-III'ün fare kemik iliği hücrelerinde mitotik aktiviteyi düşürdüğü ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtilmiştir. Nükleik asitlerin yapısı ve içeriğinde gözlenen değişiklikler GTX'in direkt olarak nükleik asitlere bağlanma kapasitesi ile de ilgili olabilir. GTX'ler, 2 hegzamerik ve 1 pentamerik halkadan oluşan diterpenoid bileşiklerdir. H atomu içermemelerine rağmen, temel yapılarından dolayı bir hegzamerik ve bir pentamerik halkadan oluşan pürin bazları gibi görünürler [213], [214]. Başka bir deyişle GTX'lerin halka yapılı CH₂ ve CH₃ grupları vardır. Bu gruplar bu bileşiklere tıpkı alkilleyici ajanlar gibi mutajenik olma özelliği verir. Bu yüzden GTX'ler DNA replikasyonu sırasında pürin bazlarının yerine DNA ipliklerinin arasına ekleme yapabilir, iki DNA ipliği arasında çapraz bağlantı oluşturabilir ve metilasyona ve kırıklara neden olabilirler [215], [216]. Ayrıca, OGB'nin içindeki GTX tarafından oluşturulan serbest radikallerde nükleik asitlerde yapısal ve konformasyonel değişikliklere sebep olmuş olabilir.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

OGB'nin kalp üzerinde önemli etkileri olduğu bilinmesine rağmen bu konu ile ilgili var olan çalışmalar genellikle klinik düzeydedir. Literatürdeki deneysel çalışmalar da sınırlı derecede bilgi sunmakta, dokuda patolojiye yol açmış olabilecek moleküler, yapısal ve kompozisyonel değişimlere değinmemekte, bununla ilgili yeterli bilgi vermemektedir. Bu nedenle, bu çalışmada, ATR-FTIR spektroskopisi tekniği ile OGB'nin etkilerinden dolayı kalp kasındaki hücre bileşenlerini oluşturan makromoleküllerin yani doymuş ve doymamış lipitler, proteinler ve nükleik asitlerin miktarlarındaki değişimler, bunların birbirleri ile oranlarındaki değişimler, yapılarındaki değişimlerin neler olduğu açığa çıkarılmaya çalışılmıştır. Ayrıca çalışmamızda, protein sekonder yapısındaki değişimler, lipit peroksidasyon oranı, reseptör yapı, fonksiyon ve dağılımında çok önemli rolü olduğu bilinen membran düzeni ve membran akışkanlığı parametrelerindeki değişimler analiz edilmiştir.

Sonuçlarımız, 25 mg/kg'lık OGB uygulamasının fare kalp kasında lipit peroksidasyonu dışında herhangi anlamlı bir değişiklik meydana getirmediğini, fakat 50 ve 75 mg/kg OGB ve GTX-III'ün lipit peroksidasyonu ile birlikte lipit, protein ve nükleik asitlerin içerik, yapı ve fonksiyonlarında önemli değişiklikler meydana getirdiğini ortaya çıkarmıştır. 50 mg/kg OGB uygulaması toplam lipit içeriğinde önemli derecede bir artışa, toplam protein içeriğinde ise önemli derecede bir azalmaya sebep olmuştur. Bu sonuçla zıt bir şekilde 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulanmış gruplarda toplam lipit içeriği azalmış ve protein içeriği artmıştır. 50 ve 75 mg/kg OGB uygulamasından sonra nükleik asit/lipit, RNA/protein ve RNA/lipit oranlarında gözlenen azalma RNA miktarındaki ve dolayısıyla protein sentezindeki azalmayı göstermektedir. 50 mg/kg OGB uygulanmış grupta lipit/protein oranında gözlenen azalma protein sentezinde bir azalma meydana geldiği sonucunu desteklemektedir. OGB'nin uygulanan bütün dozları ve GTX-III, dokuda lipit peroksidasyonu varlığını gösteren bir parametre olan doymamış/doymuş yağ asidi oranında artış meydana getirmiştir. Doymamış yağ asidi konsantrasyonunda gözlenen bu artışın lipit peroksidasyonu sonucu oluşan son

ürünlerin dokuda birikmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca 50 ve 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulanmış grupların kalp kas dokularında gözlenen karbonil ester/lipit oranındaki artışta OGB ve GTX-III uygulamasının sistemde lipit peroksidasyonu meydana getirdiğinin bir kanıtıdır. 50 mg/kg OGB grubunun kalp kası hücrelerindeki lipitlerin zincir uzunluğunda bir artış tespit edilmiştir. 50, 75 mg/kg OGB ve GTX-III uygulamasının kalp kası hücre membranlarının düzenini önemli miktarda azalttığı ve membran dinamiğini önemli miktarda artırdığı gözlenmiştir. OGB'nin kalp kası üzerindeki etkilerinin hücre membranında yaptığı değişiklikler sonucunda oluştuğu bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamızdan elde ettiğimiz bu sonuç OGB'nin kalp kasının fonksiyonlarını ne derecede etkilediğini ortaya çıkarmak açısından son derece önemlidir. Yapılan protein ikincil yapı analizi çalışmalarından elde ettiğimiz sonuçlar, 50 ve 75 mg/kg OGB uygulamasından sonra kalp kas dokusunda tesadüfi kıvrılma miktarında artış olduğunu göstermiştir ki bu da proteinlerde denatürasyon olduğunu göstermektedir. Bütün bu değişikliklere protein ve nükleik asitlerde gözlenen konformasyonel değişiklikler de eşlik etmiştir.

Sonuçlarımız, düşük dozdaki (25 mg/kg) OGB uygulamasının kalp kas dokusunda lipit peroksidasyonu dışında önemli bir değişiklik meydana getirmediğini ama diğer iki dozun (özellikle 50 mg/kg) ve GTX-III'ün önemli moleküler değişiklikler meydana getirdiğini göstermiştir. Anormallikler en çok 50 mg/kg'lık muamelede görüldüğünden, OGB bu ve daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılmamalıdır.

Çalışmamızda, kalp kas dokusundaki moleküler değişiklikler incelenerek OGB zehirlenmesine eşlik eden hücresel değişiklikler değerlendirilebilmiştir. Moleküler kompozisyondaki değişimler, membrandaki normal işleyiş için gerekli olan lipit ve protein gibi moleküllerin antisimetrik dağılımını değiştirdiğinden ve lipit birikimi, protein yapı ve konformasyon değişimi gibi patolojik durumları indüklediğinden çeşitli fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır. Bu nedenle çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar, OGB'nin kalp kasının fonksiyonlarını ne derecede etkilediğini ortaya çıkarmak açısından son derece önemlidir.

ATR-FTIR spektroskopisi yöntemini kullanarak gerçekleştirdiğimiz bu çalışma, OGB'nin kalp kası üzerinde meydana getirdiği yapısal, kompozisyonel ve fonksiyonel değişimleri moleküler düzeyde ortaya çıkaran ilk çalışma olduğundan özgün bir çalışmadır. Bu anlamda literatüre ve evrensel bilime katkı sağlayacaktır. Ayrıca bu

bulgular, ATR-FTIR spektroskopi tekniği kullanılarak değişik patolojik sistemler hakkında moleküler düzeyde çok değerli bilgiler elde edilebileceğini açıkça göstermiştir.

Türkiye'nin özellikle Karadeniz Bölgesi'nde geniş bir dağılıma sahip olan ve resmi olarak satışı olmamasına rağmen ülkemizin bu bölgesinde önemli bir gelir kaynağı haline gelen OGB'nin halk arasında yaygın bir kullanıma sahip olduğu bir gerçektir. Bu nedenle halk arasındaki bilinçsiz ve aşırı tüketimini önlemek amacıyla, yüksek dozlarda olumsuz etkilere sahip olduğunu kanıtladığımız OGB'nin, çalışmamızda kullanılan konsantrasyonlarının altındaki konsantrasyonları kullanılarak yapılacak bilimsel çalışmalar ışığında bazı formülasyonlar şekline getirilerek tüketime sunulabileceği ve düşük dozlarda kullanılarak önemli bir ekonomik gelir kaynağı haline getirilmesiyle ülke ekonomisine kazandırılması yönünde çalışılabileceği düşünölmektedir. OGB'nin tıbbı özellikle de farmakoloji alanına kazandırılabilmesi aşamasında bu çalışma sonuçlarından da yararlanılabilecektir.

Bundan sonraki süreçte, bu çalışmada kullanılan dozlardan farklı dozlarda OGB ve GTX-III kullanılarak kalp dokusunda ve diğer dokulardaki etkilerinin incelenmesi üzerine yeni çalışmalar gerçekleştirilmesi planlanmaktadır.

5. KAYNAKLAR

- [1] H. C. Gültekin, "Orman gülleri," *Orman ve Av*, c. 2, ss. 36-40, 2010.
- [2] R. Anşın ve S. Terzioğlu, "Mor çiçekli ormangülü'nün yeni bir varyetesi (*Rhododendron ponticum* L. subsp. *ponticum* var. *heterophyllum* Anşın, var. *nova*)," *Türk Tarım ve Ormanlık Dergisi*, c. 18, ss. 137-140, 1994.
- [3] T. Çeter ve K. Güney, "Orman gülü ve deli bal," *Uludağ Arıcılık Dergisi*, c. 11, s. 4, ss. 124-129, 2011.
- [4] K. Dehnen-Schmutz, C. Perrings and M. Williamson, "Controlling *Rhododendron ponticum* in the British Isles: an economic analysis," *Journal of Environmental Management*, vol. 70, no. 4, pp. 323-332, 2004.
- [5] D. N. Bölükbaşı. (2017, 26 Eylül) *Deli bal* [Online]. Erişim: https://dagem.duzce.edu.tr/Dokumanlar/dagem/7c53aefa-9f80-48c5-bdf8-fa2d6cc4e442_Calistay_Sunum_10_DN_BOLUKBASI.pdf
- [6] O. Taşkın, "Ormangülü (*Rhododendron ponticum* L.) odununun bazı kimyasal ve morfolojik özellikleri ile bu odundan yaş metoduyla lif levha yapılması üzerine araştırmalar," *Ormanlık Araştırma Enstitüsü Yayınları Teknik Bülten Serisi*, c. 181, 1987.
- [7] R. I. Milne and R. J. Abbott, "Origin and evolution of invasive naturalized material of *Rhododendron ponticum* L. in the British Isles," *Molecular Ecology*, vol. 9, no. 5, pp. 541-556, 2000.
- [8] G. Peterken, "Ecological effects of introduced tree species in Britain," *Forest Ecology and Management*, vol. 141, no. 1-2, pp. 31-42, 2001.
- [9] A. Thomson, G. Radford, D. Norris and J. Good, "Factors affecting the distribution and spread of *Rhododendron* in North Wales," *Journal of Environmental Management*, vol. 39, no. 3, pp. 199-212, 1993.
- [10] P. H. Davis, "*Rhododendron* L.," in *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*, vol. 6, P. F. Stevens, Ed. Edinburgh, Scotland: Edinburgh University Press, 1978, pp. 90-94.
- [11] A. Guner and H. Duman, "A floristic excursion to Artvin and Camili," *The Karaca Arboretum Magazine IV*, vol. 4, no. 2, pp. 55-84, 1997.
- [12] K. Browicz, *Chorology of Trees and Shrubs in South-West Asia and Adjacent Regions*, Warsawa-Poznan, Poland: Polish Scientific Publishers, 1982, pp. 172.
- [13] P. F. Stevens, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburg, Scotland: Edinburgh University Press, 1978, pp. 91-94.
- [14] M. Avcı, "Ormangülleri (*Rhododendron* L.) ve Türkiye'deki doğal yayılışları," *İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Bölümü Coğrafya Dergisi*, c. 12, ss. 13-29, 2004.

- [15] Anonim, *Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (2012/58)*, Ankara, Türkiye: Başbakanlık Basımevi, 2012.
- [16] J. W. White, "Composition of honey," in *Honey: A Comprehensive Survey*, Heinemann, Germany, 1979, pp. 157-158.
- [17] M. Doğan, "Marketlerde ve aktarlar da satılan balların antioksidan ve oksidan kapasitelerinin araştırılması," Y. L. Tezi, Biyokimya Anabilim dalı, Harran Üniversitesi, Şanlıurfa, Türkiye, 2007.
- [18] E. Sunay, A. Ö. Altıparmak, M. Doğaroğlu ve J. Gökçen, "Türkiye ve Dünya'da bal üretimi, ticareti ve karşılaşılan sorunlar," 2. *Marmara Arıcılık Kongresi*, Yalova, Türkiye, 2003, ss. 154-184.
- [19] F. Pamir, *Klinik Toksikoloji*. Ankara, Türkiye: Ankara Yarı Açık Cezaevi Matbaası, 1969, ss. 457-458.
- [20] S. Kurtoğlu, "Zehirlenmeler, teşhis ve tedavi" *Erciyes Üniversitesi Yayınları*, c. 30, ss. 569-570
- [21] M. Ascioğlu and C. Ozesmi, "Grayanotoxin content of honey samples from Black Sea Region of Turkey," *Hamdard Medicus*, vol. 38, pp. 42-47, 1995.
- [22] I. Koca and A. F. Koca, "Poisoning by mad honey: a brief review," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 45, pp. 1315-1318, 2007.
- [23] A. Başgül, "Deli bal zehirlenmesi," *Yoğun Bakım Dergisi*, c. 3, s. 1, ss. 33-36, 2003.
- [24] S. Silici, O. Sagdic and L. Ekici, "Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys," *Food Chemistry*, vol. 121, no. 1, pp. 238-243, 2010.
- [25] A. Demircan, A. Keles, F. Bildik, G. Aygencel, N. O. Dogan and H. F. Gómez, "Mad honey sex: therapeutic misadventures from an ancient biological weapon," *Annals of Emergency Medicine*, vol. 54, no. 6, pp. 824-829, 2009.
- [26] N. Oztasan, K. Altinkaynak, F. Akcay, F. Gocer and S. Dane, "Effects of mad honey on blood glucose and lipid levels in rats with streptozocin-induced diabetes," *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, vol. 29, no. 5, pp. 1093-1096, 2005.
- [27] H. Uzun, H. Narci, I. Tayfur, K. Karabulut and O. Karcioğlu, "Mad honey intoxication: what is wrong with the blood glucose? a study on 46 patients," *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, vol. 17, no. 20, pp. 2728-2731, 2013.
- [28] M. Yarlioglu, M. Akpek, I. Ardic, D. Elcik, O. Sahin and M. G. Kaya, "Mad-honey sexual activity and acute inferior myocardial infarctions in a married couple," *Texas Heart Institute Journal*, vol. 38, no. 5, pp. 577, 2011.
- [29] S. Yaylaci, O. Ayyıldız, E. Aydın, A. Osken, F. Karahalil, C. Varım, M. V. Demir, A. B. Genc, S. Sahinkus, Y. Can, İ. Kocayigit and C. Bilir "Is there a difference in mad honey poisoning between geriatric and non-geriatric patient groups," *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, vol. 19, no. 23, pp. 4647-4653, 2015.

- [30] S. Yaylaci I. Kocayigit, E. Aydın, A. Osken, A. B. Genc, M. A. Cakar and A. Tamer, "Clinical and laboratory findings in mad honey poisoning: a single center experience," *Nigerian Journal of Clinical Practice*, vol. 17, no. 5, pp. 589-593, 2014.
- [31] D. Tasdemir, A. Donmez, I. Calis and P. Ruedi, "Evaluation of biological activity of Turkish plants. Rapid screening for the antimicrobial, antioxidant, and acetylcholinesterase inhibitory potential by TLC bioautographic methods," *Pharmaceutical Biology*, vol. 42, no. 4-5, pp. 374-383, 2004.
- [32] N. Sutlupinar, A. Mat, and Y. Satganoglu, "Poisoning by toxic honey in Turkey," *Archives of Toxicology*, vol. 67, no. 2, pp. 148-150, 1993.
- [33] H. Hikino, Y. Ohizumi, C. Konno, K. Hashimoto and H. Wakasa, "Subchronic toxicity of ericaceous toxins and Rhododendron leaves," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 27, no. 4, pp. 874-879, 1979.
- [34] S. Silici, O. D. Uluozlu, M. Tuzen and M. Soylak, "Assessment of trace element levels in Rhododendron honeys of Black Sea Region, Turkey," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 156, no. 1-3, pp. 612-618, 2008.
- [35] A. Gunduz, S. Turedi, R. M. Russell and F. A. Ayaz, "Clinical review of grayanotoxin/mad honey poisoning past and present," *Clinical Toxicology*, vol. 46, no. 5, pp. 437-442, 2008.
- [36] H. Thiermann, L. Szinicz, F. Eyer, F. Worek, P. Eyer, N. Felgenhaur and T. Zilker, "Modern strategies in therapy of organophosphate poisoning," *Toxicology Letters*, vol. 107, no. 1-3, pp. 233-239, 1999.
- [37] T. Gökçöl, "Xenophon: Anabasis, Onbinlerin Dönüşü," 2. baskı, İstanbul, Türkiye: Sosyal Yayınlar, 1984, ss. 143-144.
- [38] L. F. Kebler, "Poisonous honey," *Journal of the American Pharmaceutical Association*, vol. 44, pp. 167-174, 1896.
- [39] P. C. Plugge, "Andromedotoxinhaltige Ericaceen," *Archiv der Pharmazie Banner*, vol. 229, no. 5-7, pp. 552-554, 1891.
- [40] A. Bucak, "Zehirli bal," *Farmakologia*, c. 8, ss. 33-40, 1938.
- [41] S. Biberoglu, K. Biberoglu and B. Komsuoglu, "Mad honey," *Jama*, vol. 259, no. 13, pp. 1943, 1988.
- [42] F. Y. Onat, B. C. Yegen, R. Lawrence, A. Oktay and S. Oktay, "Mad honey poisoning in man and rat," *Reviews on Environmental Health*, vol. 9, no. 1, pp. 3-9, 1991.
- [43] H. Ozhan, R. Akdemir, M. Yazici, H. Gunduz, S. Duran and C. Uyan, "Cardiac emergencies caused by honey ingestion: a single centre experience," *Emergency Medicine Journal*, vol. 21, no. 6, pp. 742-744, 2004.
- [44] P. Viccellio, "Systemic poisonous plant intoxication," in *Handbook of Medical Toxicology*, Washington, USA: Library of Congress Cataloging, 1993, pp. 718.
- [45] S. A. Jansen, I. Kleerekooper, Z. L. Hofman, I. F. Kappen, A. Stary-Weinzinger and M. A. van der Heyden, "Grayanotoxin poisoning: mad honey disease and beyond," *Cardiovascular Toxicology*, vol. 12, no. 3, pp. 208-215, 2012.

- [46] R. Popescu and B. Kopp, "The genus *Rhododendron*: an ethnopharmacological and toxicological review," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 147, no. 1, pp. 42-62, 2013.
- [47] P. Eller and K. Hochegger, "Honey intoxication and the Bezold–Jarisch reflex," *International Journal of Cardiology*, vol. 144, no. 2, p. 251, 2010.
- [48] T. Kobayashi, M. Yasuda and I. Seyama, "Developmental toxicity potential of grayanotoxin I in mice and chicks," *The Journal of Toxicological Sciences*, vol. 15, no. 4, pp. 227-234, 1990.
- [49] E. Vural, "Deli bal intoksikasyonu," *Cerrahpaşa Öğrenci Bilimsel Dergisi*, c. 2, s. 3, ss. 1-3, 2009.
- [50] D. Çiçek, K. Gemici, U. Eryılmaz ve J. Cordan, "Karadeniz deli balı ve andromedotoksin zehirlenmesi: Nodal ritimli bir hasta," *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, c. 30, s. 1, ss. 61-62, 2004.
- [51] S. İnci, F. Gündoğdu, H. Değirmenci, H. Duman and H. Tas, "A Case of Sinusal Bradycardia Caused by Mad Honey Toxicity," *The Eurasian Journal of Medicine*, vol. 39, pp. 72-74, 2007.
- [52] U. Y. Çavuş, B. Işık ve O. Tekin, "Deli bal zehirlenmesi," *Yeni Tıp Dergisi*, c. 27, ss. 187-189, 2010.
- [53] Z. Köseoğlu ve O. Kösenli, "Güney bölgesinde kuzeyli bir toksin: deli bal zehirlenmesi." *Akademik Acil Tıp Dergisi*, c. 8, s. 1, ss. 57-59, 2009.
- [54] A. Gunduz, H. Bostan, S. Turedi, I. Nuhoglu and T. Patan, "Wild flowers and mad honey," *Wilderness and Environmental Medicine*, vol. 18, no. 1, pp. 69-71, 2007.
- [55] D. Dursunoglu, S. Gur and E. Semiz, "A case with complete atrioventricular block related to mad honey intoxication," *Annals of Emergency Medicine*, vol. 50, no. 4, pp. 484-485, 2007.
- [56] N. Yildirim, M. Aydin, F. Cam and O. Celik, "Clinical presentation of non–ST-segment elevation myocardial infarction in the course of intoxication with mad honey," *The American Journal of Emergency Medicine*, vol. 26, no. 1, pp. 101-108, 2008.
- [57] M. Asçioglu, Ç. Özesmi, P. Dogan and F. Öztürk, "Effects of Chronic Grayanotoxin-I Administration on Hepatic and Renal Functions in Rats," *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, vol. 179, no. 1, pp. 47-53, 1996.
- [58] N. Oztasan and A. Songur, "The use of " Mad Honey" as an antihypertensive agent in rats-a preliminary study," *Kocatepe Medical Journal*, vol. 8, no. 1, pp. 55-58, 2007.
- [59] O. Erturk, F. P. Karakas, D. Pehlivan and N. Nas, "The antibacterial and antifungal effects of *Rhododendron* derived mad honey and extracts of four *Rhododendron* species," *Turkish Journal of Biology*, vol. 33, no. 2, pp. 151-158, 2009.
- [60] S. Sibel, Y. M. Enis, S. Hüseyin, A. A. Timucin and O. Duran, "Analysis of grayanotoxin in *Rhododendron* honey and effect on antioxidant parameters in rats," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 156, pp. 155-161, 2014.

- [61] J. Wong, E. Youde, B. Dickinson and M. Hale, *Report of the rhododendron feasibility study*, Bangor, Gwynedd, Bangor: School of Agricultural and Forest Sciences University of Wales, 2002, pp. 73.
- [62] M. Asciglu, C. Ozesmi, P. Dogan and F. Ozturk, "Effects of acute grayanotoxin-I administration on hepatic and renal functions in rats," *Turkish Journal Medical Sciences*, vol. 30, no. 1, pp. 23-28, 2000.
- [63] T. Terai, K. Osakabe, M. Katai, K. Sakaguchi, I. Narama, T. Matsuura, J. Katakawa and T. Tetsumi, "Preparation of 9-hydroxy grayanotoxin derivatives and their acute toxicity in mice," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 51, no. 3, pp. 351-353, 2003.
- [64] T. Kan, S. Hosokawa, S. Nara, M. Oikawa, S. Ito, F. Matsuda and H. Shirahama, "Total synthesis of (-)-grayanotoxin III," *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 59, no. 19, pp. 5532-5534, 1994.
- [65] K. Sakata, M. Hattori, A. Sakurai and T. Hosotsuji, "Isolation and identification of biologically active constituents of leucothoe catesbaei A. Gray," *Journal of Pesticide Sciences*, vol. 2, pp. 453-456, 1977.
- [66] A. Gunduz, S. Turedi, H. Uzun and M. Topbas, "Mad honey poisoning," *American Journal of Emergency Medicine*, vol. 24, no. 5, pp. 595-598, 2006.
- [67] T. Narahashi and I. Seyama, "Mechanism of nerve membrane depolarization caused by grayanotoxin I," *The Journal of Physiology*, vol. 242, no. 2, pp. 471-487, 1974.
- [68] S. Zushi, J. Miyagawa, M. Yamamoto, K. Kataoka and I. Seyama, "Effect of grayanotoxin on the frog neuromuscular junction," *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 226, no. 1, pp. 269-275, 1983.
- [69] F. Onat, B. C. Yegen, R. Lawrence, A. Oktay and S. Oktay, "Site of action of grayanotoxins in mad honey in rats," *Journal of Applied Toxicology*, vol. 11, no. 3, pp. 199-201, 1991.
- [70] S. E. Kim, M. C. Shin, N. Akaike and C. J. Kim, "Presynaptic effects of grayanotoxin III on excitatory and inhibitory nerve terminals in rat ventromedial hypothalamic neurons," *Neurotoxicology*, vol. 31, no. 2, pp. 230-238, 2010.
- [71] H. Maejima, E. Kinoshita, I. Seyama and K. Yamaoka, "Distinct sites regulating grayanotoxin binding and unbinding to D4S6 of Nav1. 4 sodium channel as revealed by improved estimation of toxin sensitivity," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 11, pp. 9464-9471, 2003.
- [72] R. Klabunde, *Cardiovascular physiology concepts*, Baltimore, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
- [73] J. M. Nerbonne and R. S. Kass, "Molecular physiology of cardiac repolarization," *Physiological Reviews*, vol. 85, no. 4, pp. 1205-1253, 2005.
- [74] L. Goldman and A. I. Schafer, *Goldman's Cecil Medicine*, Philadelphia, USA: Elsevier Health Sciences, 2011.
- [75] A. L. Goldin, "Mechanisms of sodium channel inactivation," *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 13, no. 3, pp. 284-290, 2003.

- [76] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley, "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve," *The Journal of Physiology*, vol. 117, no. 4, pp. 500-544, 1952.
- [77] W. A. Catterall, "From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels," *Neuron*, vol. 26, no. 1, pp. 13-25, 2000.
- [78] W. A. Catterall, S. Cestèle, V. Yarov-Yarovoy, H. Y. Frank, K. Konoki and T. Scheuer, "Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins," *Toxicon*, vol. 49, no. 2, pp. 124-141, 2007.
- [79] J. J. Clare, S. N. Tate, M. Nobbs and M. A. Romanos, "Voltage gated sodium channels as therapeutic targets," *Drug Discovery Today*, vol. 5, no. 11, pp. 506-520, 2000.
- [80] F. S. Cusdin, J. J. Clare and A. P. Jackson, "Trafficking and cellular distribution of voltage gated sodium channels," *Traffic*, vol. 9, no. 1, pp. 17-26, 2008.
- [81] A. Noyan, *Yaşamda ve hekimlikte fizyoloji*, Ankara, Türkiye: Meteksan, 2011.
- [82] E. Benoit, A. Legrand and J. Dubois, "Effects of ciguatoxin on current and voltage clamped frog myelinated nerve fibre," *Toxicon*, vol. 24, no. 4, pp. 357-364, 1986.
- [83] J. Huang, C. H. Wu and D. G. Baden, "Depolarizing action of a red-tide dinoflagellate brevetoxin on axonal membranes," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 229, no. 2, pp. 615-621, 1984.
- [84] A. Lombet, J. N. Bidard and M. Lazdunski, "Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage dependent Na⁺ channel," *FEBS Letters*, vol. 219, no. 2, pp. 355-359, 1987.
- [85] M. Stevens, S. Peigneur and J. Tytgat, "Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 2, p. 71, 2011.
- [86] H. Ishii, E. Kinoshita, T. Kimura, M. Yakehiro, K. Yamaoka, K. Imoto, Y. Mori and I. Seyama, "Point-mutations related to the loss of batrachotoxin binding abolish the grayanotoxin effect in Na(+) channel isoforms," *The Japanese Journal of Physiology*, vol. 49, no. 5, pp. 457-461, 1999.
- [87] F. Pehlivan, *Biyofizik*, Ankara, Türkiye : Pelikan yayıncılık, 2017, ss. 208-209.
- [88] A. C. Guyton and J. E. Hall (H. Çavuşoğlu, B.Ç. Yegen Çev.), *Tıbbi Fizyoloji*, İstanbul, Türkiye: Nobel Tıp Kitabevleri, 2007, ss. 113-114.
- [89] N. Dursun, *Veteriner Anatomi II*, Ankara: Medisan Yayınevi, 1996, pp. 128-163.
- [90] W. Ganong (Türk Fizyolojik Bilimler Derneği Çev), *Tıbbi Fizyoloji*, 17. baskı, Ankara, Türkiye: Barış Kitabevi, 1996, pp. 345-390.
- [91] I. Seyama, K. Yamaoka, M. Yakehiro, Y. Yoshioka, and K. Morihara, "Is the site of action of grayanotoxin the sodium channel gating of squid axon," *The Japanese Journal of Physiology*, vol. 35, no. 3, pp. 401-410, 1985.
- [92] A. I. Genc, "Molecular characterization of the effects of valdecoxib on colon cancer cell lines (ht29 & sw620) using atr-ftir spectroscopy," M.S thesis,

Department of Biochemistry, Middle East Technical University, Ankara, Turkey, 2014.

- [93] D. M. Freifelder, *Physical Biochemistry: Application to Biochemistry and Molecular Biology*, Newyork, USA: WH Freeman Press, 1982, pp. 145.
- [94] E. Pekin, *Enstrümental Analiz*, Çanakkale, Türkiye: Paradigma Akademi Yayınları, 2013, pp. 68-75.
- [95] B. H. Stuart, *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, 1997.
- [96] S. Da-Wen, *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, U.S.A: Academic Press, 2009.
- [97] G. Gauglitz and T. Vo-Dinh, *Handbook of Spectroscopy*, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003.
- [98] G. C. Smith and S. P. Jackson, "The DNA-dependent protein kinase," *Genes & Development*, vol. 13, no. 8, pp. 916-934, 1999.
- [99] J. M. Hollas, *Modern Spectroscopy*, London, England: John Wiley & Sons, 2004, p. 452.
- [100] A. Marcelli, A. Cricenti, W. M. Kwiatek, and C. Petibois, "Biological applications of synchrotron radiation infrared spectromicroscopy," *Biotechnology Advances*, vol. 30, no. 6, pp. 1390-1404, 2012.
- [101] K. Gerwert and C. Kötting, *Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy*, Hoboken, USA: John Wiley & Sons, 2010.
- [102] F. Severcan, I. Sahin, and N. Kazanci, "Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes--evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1668, no. 2, pp. 215-222, 2005.
- [103] S. Garip, A. C. Gozen, and F. Severcan, "Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of Bacillus and Micrococcus isolates," *Food Chemistry*, vol. 113, no. 4, pp. 1301-1307, 2009.
- [104] F. Severcan, N. Toyran, N. Kaptan, and B. Turan, "Fourier transform infrared study of the effect of diabetes on rat liver and heart tissues in the CH region," *Talanta*, vol. 53, no. 1, pp. 55-59, 2000.
- [105] F. Severcan, N. Kaptan, and B. Turan, "Fourier transform infrared spectroscopic studies of diabetic rat heart crude membranes," *Journal of Spectroscopy*, vol. 17, no. 2-3, pp. 569-577, 2003.
- [106] H. Boyar, F. Zorlu, M. Mut, and F. Severcan, "The effects of chronic hypoperfusion on rat cranial bone mineral and organic matrix," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 379, no. 3, pp. 433-438, 2004.
- [107] G. Cakmak, I. Togan, and F. Severcan, "17 β -Estradiol induced compositional, structural and functional changes in rainbow trout liver, revealed by FT-IR spectroscopy: a comparative study with nonylphenol," *Aquatic toxicology*, vol. 77, no. 1, pp. 53-63, 2006.

- [108] N. Toyran, P. Lasch, D. Naumann, B. Turan and F. Severcan, "Early alterations in myocardia and vessels of the diabetic rat heart: an FTIR microspectroscopic study," *Biochemical Journal*, vol. 397, no. 3, pp. 427-436, 2006.
- [109] A. Dogan, K. Ergen, F. Budak and F. Severcan, "Evaluation of disseminated candidiasis on an experimental animal model: a Fourier transform infrared study," *Applied Spectroscopy*, vol. 61, no. 2, pp. 199-203, 2007.
- [110] O. Bozkurt, M. D. Bilgin and F. Severcan, "The effect of diabetes mellitus on rat skeletal extensor digitorum longus muscle tissue: An FTIR study," *Spectroscopy*, vol. 21, no. 3, pp. 151-160, 2007.
- [111] O. Bozkurt, M. Severcan and F. Severcan, "Diabetes induces compositional, structural and functional alterations on rat skeletal soleus muscle revealed by FTIR spectroscopy: a comparative study with EDL muscle," *The Analyst*, vol. 135, no. 12, pp. 3110-3119, 2010.
- [112] N. S. Ozek, S. Tuna, A. E. Erson-Bensan and F. Severcan, "Characterization of microRNA-125b expression in MCF7 breast cancer cells by ATR-FTIR spectroscopy," *The Analyst*, vol. 135, no. 12, pp. 3094-3102, 2010.
- [113] G. Cakmak, F. Zorlu, M. Severcan and F. Severcan, "Screening of protective effect of amifostine on radiation-induced structural and functional variations in rat liver microsomal membranes by FT-IR spectroscopy," *Analytical Chemistry*, vol. 83, no. 7, pp. 2438-2444, 2011.
- [114] D. G. Cameron and G. M. Charette, "Automation of Fourier Transform Infrared Studies of Temperature-induced Phenomena," *Applied Spectroscopy*, vol. 35, no. 2, pp. 224-225, 1981.
- [115] G. Cakmak, I. Togan, C. Uğuz and F. Severcan, "FT-IR spectroscopic analysis of rainbow trout liver exposed to nonylphenol," *Applied Spectroscopy*, vol. 57, no. 7, pp. 835-841, 2003.
- [116] N. Toyran and F. Severcan, "Competitive effect of vitamin D₂ and Ca²⁺ on phospholipid model membranes: an FTIR study," *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 123, no. 2, pp. 165-176, 2003.
- [117] H. Boyar and F. Severcan, "Oestrogen-phospholipid membrane interactions: an FTIR study," *Journal of Molecular Structure*, vol. 408, pp. 269-272, 1997.
- [118] A. M. Melin, A. Perromat and G. Délérís, "Pharmacologic application of Fourier transform IR spectroscopy: in vivo toxicity of carbon tetrachloride on rat liver," *Biopolymers*, vol. 57, no. 3, pp. 160-168, 2000.
- [119] A. M. Melin, A. Perromat and G. Délérís, "Sensitivity of *Deinococcus radiodurans* to γ -irradiation: A novel approach by Fourier transform infrared spectroscopy," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 394, no. 2, pp. 265-274, 2001.
- [120] T. D. Wang G. Triadafilopoulos, J. M. Crawford, L. R. Dixon, T. Bhandari, P. Sahbaie, S. Friedland, R. Soetikno and C. H. Contag "Detection of endogenous biomolecules in Barrett's esophagus by Fourier transform infrared spectroscopy," *Proceedings of The National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 40, pp. 15864-15869, 2007.

- [121] M. R and H. H. Mantsch, "Progress in Protein-Lipid Interactions," in *Fourier transform infrared studies of lipid-protein interaction*, vol. 2, Netherlands: Elsevier Science Publishers, 1986, pp. 103-147.
- [122] P. I. Haris and F. Severcan, "FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 7, no. 1-4, pp. 207-221, 1999.
- [123] J. Kneipp, P. Lasch, E. Baldauf, M. Beekes and D. Naumann, "Detection of pathological molecular alterations in scrapie-infected hamster brain by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1501, no. 2-3, pp. 189-199, 2000.
- [124] E. Rasim, "Kalp Pompası: Mekanikleri, anatomi ve sitoskeleton yapısı," *Kanıtla Dayalı Kalp Yetersizliği Kitabı*, İstanbul, Türkiye: Nobel Tıp Kitapevi 2010, ss. 8.
- [125] P. Wolf, Y. Winhofer, M. Krssak and M. Krebs, "Heart, lipids and hormones," *Endocrine Connections*, vol. 6, no. 4, pp. 59-69, 2017.
- [126] U. B. Hendgen-Cotta, S. Esfeld, C. Comon, R. Ahrends, L. Klein-Hitpass, U. Flögel, T. Rassaf and M. Totzeck, "A novel physiological role for cardiac myoglobin in lipid metabolism," *Scientific Reports*, vol. 7, pp. 43219, 2017.
- [127] H. Wang, M. Lei, R. C. Hsia and C. Sztalryd, "Analysis of lipid droplets in cardiac muscle," *Methods in Cell Biology*, vol. 116, pp. 129-149, 2013.
- [128] D. Bonnet, D. Martin, P. De Lonlay, E. Villain, P. Jouvet, D. Rabier, M. Brivet and J. M. Saudubray, "Arrhythmias and conduction defects as presenting symptoms of fatty acid oxidation disorders in children," *Circulation*, vol. 100, no. 22, pp. 2248-2253, 1999.
- [129] L. H. Storlien, A. J. Hulbert, and P. L. Else, "Polyunsaturated fatty acids, membrane function and metabolic diseases such as diabetes and obesity," *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, vol. 1, no. 6, pp. 559-563, 1998.
- [130] C. Rask-Madsen and G. L. King, "Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes," *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, vol. 3, no. 1, pp. 46-56, 2007.
- [131] J. Wang and G.J. Zhang, "Influence of membrane physical state on lysosomal potassium ion permeability," *Cell Biology International*, vol. 29, no. 6, pp. 393-401, 2005.
- [132] O. G. Luneva, N. A. Brazhe, N. V. Maksimova, O. V. Rodnenkov, E. Y. Parshina, N. Y. Bryzgalova, G. V. Maksimov, A. B. Rubin, S. N. Orlov and E. I. Chazov, "Ion transport, membrane fluidity and haemoglobin conformation in erythrocyte from patients with cardiovascular diseases: Role of augmented plasma cholesterol," *Pathophysiology*, vol. 14, no. 1, pp. 41-46, 2007.
- [133] M. S. Awayda, W. Shao, F. Guo, M. Zeidel and W. G. Hill, "ENaC-membrane interactions: regulation of channel activity by membrane order," *The Journal of General Physiology*, vol. 123, no. 6, pp. 709-727, 2004.

- [134] A. Maurizio and F. Hodges, "Pollen analysis of honey," *Bee World*, vol. 32, no. 1, pp. 1-5, 1951.
- [135] J. Louveaux, A. Maurizio and G. Vorwohl, "Internationale Kommission für Bienenbotanik der IUBS Methodik der Melissopalynologie," *Apidologie*, vol. 1, no. 2, pp. 193-209, 1970.
- [136] R. Barbattini, M. Greatti, M. Iob, A. Sabatini, G. Marcazzan and R. Colombo, "Osservazioni su *Metcalfa pruinosa* (Say) e indagine sulle caratteristiche del miele derivato dalla sua melata," *Apicoltura*, vol. 7, pp. 113-135, 1991.
- [137] Z. Warakomska and T. Jaroszynska, "Analysis of the honeydew honeys of *Roztocze*," *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, vol. 36, pp. 149-156, 1992.
- [138] M. Kaplan, E. O. Olgun and O. Karaoglu, "Determination of grayanotoxins in honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry using dilute-and-shoot sample preparation approach," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, no. 24, pp. 5485-5491, 2014.
- [139] S. Silici. (2011, 26 Mart). *Rhododendron (ormangülü) bali hakkında bilgilendirme toplantısı*, [Online]. Erişim: http://www.tab.org.tr/downloads/orman_gulu_rhododendronbali.pdf
- [140] S. Akkas, M. Severcan, O. Yilmaz and F. Severcan, "Effects of lipoic acid supplementation on rat brain tissue: An FTIR spectroscopic and neural network study," *Food Chemistry*, vol. 105, no. 3, pp. 1281-1288, 2007.
- [141] B. Elibol-Can, E. Jakubowska-Dogru, M. Severcan and F. 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*, vol. 35, no. 11, pp. 2050-2062, 2011.
- [142] H. L. Casal and H. H. Mantsch, "Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, vol. 779, no. 4, pp. 381-401, 1984.
- [143] G. Cakmak, I. Togan, C. Uguz and F. Severcan, "FT-IR spectroscopic analysis of rainbow trout liver exposed to nonylphenol," *Applied Spectroscopy*, vol. 57, no. 7, pp. 105-109, 2003.
- [144] G. Cakmak, L. M. Miller, F. Zorlu, and F. 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*, vol. 520, no. 2, pp. 67-73, 2012.
- [145] C. Aksoy and F. Severcan, "Role of vibrational spectroscopy in stem cell research," *Journal of Spectroscopy*, vol. 27, no. 3, pp. 167-184, 2012.
- [146] A. Watts and J. J. H. de Pont, *Progress in protein-lipid interactions*, 2nd ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science & Technology, 1986, pp. 103-147.
- [147] H. Takahashi, S. W. French, and P. T. Wong, "Alterations in hepatic lipids and proteins by chronic ethanol intake: A high pressure fourier transform infrared spectroscopic study on alcoholic liver disease in the rat," *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, vol. 15, no. 2, pp. 219-223, 1991.

- [148] H. H. Mantsch, "Biological applications of Fourier transform infrared spectroscopy: a study of phase transitions in biomembranes," *Journal of Molecular Structure*, vol. 113, pp. 201-212, 1984.
- [149] S. Garip and F. Severcan, "Determination of simvastatin-induced changes in bone composition and structure by Fourier transform infrared spectroscopy in rat animal model," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 52, no. 4, pp. 580-588, 2010.
- [150] A. C. Leskovjan, A. Kretlow and L. M. Miller, "Fourier transform infrared imaging showing reduced unsaturated lipid content in the hippocampus of a mouse model of Alzheimer's disease," *Analytical Chemistry*, vol. 82, no. 7, pp. 2711-2716, 2010.
- [151] B. Elibol-Can, N. Simsek-Ozek, F. Severcan, M. Severcan and E. Jakubowska-Dogru, "Vitamin A deficiency induces structural and functional alterations in the molecular constituents of the rat hippocampus," *British Journal of Nutrition*, vol. 113, no. 1, pp. 45-55, 2015.
- [152] K. Z. Liu, R. Bose and H. H. Mantsch, "Infrared spectroscopic study of diabetic platelets," *Vibrational Spectroscopy*, vol. 28, no. 1, pp. 131-136, 2002.
- [153] R. Gasper, J. Dewelle, R. Kiss, T. Mijatovic and E. Goormaghtigh, "IR spectroscopy as a new tool for evidencing antitumor drug signatures," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1788, no. 6, pp. 1263-1270, 2009.
- [154] R. C. Bruch and W. S. Thayer, "Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, vol. 733, no. 2, pp. 216-222, 1983.
- [155] M. T. Curtis, D. Gilfor, and J. L. Farber, "Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 235, no. 2, pp. 644-649, 1984.
- [156] J. Umemura, D. G. Cameron and H. H. Mantsch, "A Fourier transform infrared spectroscopic study of the molecular interaction of cholesterol with 1, 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 602, no. 1, pp. 32-44, 1980.
- [157] F. Severcan, N. Kazanci, U. Baykal, and S. Suzer, "IR and turbidity studies of vitamin E-cholesterol-phospholipid membrane interactions," *Bioscience Reports*, vol. 15, no. 4, pp. 221-229, 1995.
- [158] G. Cakmak, M. Severcan, F. Zorlu and 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*, vol. 92, no. 12, pp. 837-848, 2016.
- [159] J. Liquier and E. Taillandier, "Infrared spectroscopy of nucleic acids," *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, vol. 35, pp. 131-158, 1996.
- [160] M. Diem, S. Boydston-White, and L. Chiriboga, "Infrared spectroscopy of cells and tissues: shining light onto a novel subject," *Applied Spectroscopy*, vol. 53, no. 4, pp. 148-161, 1999.

- [161] M. Banyay, M. Sarkar, and A. Gräslund, "A library of IR bands of nucleic acids in solution," *Biophysical Chemistry*, vol. 104, no. 2, pp. 477-488, 2003.
- [162] L. Chiriboga, H. Yee, and M. Diem, "Infrared spectroscopy of human cells and tissue. Part VII: FT-IR microspectroscopy of DNase- and RNase-treated normal, cirrhotic, and neoplastic liver tissue," *Applied Spectroscopy*, vol. 54, no. 4, pp. 480-485, 2000.
- [163] G. Eraslan, M. Kanbur, M. Karabacak, K. Arslan Y. Siliğ, Z. S. Soyer, M. Y. Tekeli and A. Taş, "Effect on oxidative stress, hepatic chemical metabolizing parameters, and genotoxic damage of mad honey intake in rats," *Human and Experimental Toxicology*, vol. 37, no. 9, pp. 991-1004, 2017.
- [164] A. B. Kurtoglu, R. Yavuz and G. A. Evrendilek, "Characterisation and fate of grayanotoxins in mad honey produced from *Rhododendron ponticum* nectar," *Food chemistry*, vol. 161, pp. 47-52, 2014.
- [165] S. Silici, Z. Dogan, H. Sahin, T. Atayoglu and B. Yakan, "Acute effects of grayanotoxin in rhododendron honey on kidney functions in rats," *Environmental Science and Pollution Research International*, vol. 23, no. 4, pp. 3300-3309, 2016.
- [166] B. Szalontai, Y. Nishiyama, Z. Gombos and N. Murata, "Membrane dynamics as seen by Fourier transform infrared spectroscopy in a cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803: the effects of lipid unsaturation and the protein-to-lipid ratio," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1509, no. 1, pp. 409-419, 2000.
- [167] K.-Z. Liu, M. Jackson, M. G. Sowa, H. Ju, I. M. Dixon and H. H. Mantsch, "Modification of the extracellular matrix following myocardial infarction monitored by FTIR spectroscopy," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, vol. 1315, no. 2, pp. 73-77, 1996.
- [168] F. Severcan, O. Bozkurt, R. Gurbanov and G. Gorgulu, "FT-IR spectroscopy in diagnosis of diabetes in rat animal model," *Journal of Biophotonics*, vol. 3, no. 8-9, pp. 621-631, 2010.
- [169] A. S. Khouw, S. Parthasarathy and J. L. Witztum, "Radioiodination of low density lipoprotein initiates lipid peroxidation: protection by use of antioxidants," *Journal of Lipid Research*, vol. 34, no. 9, pp. 1483-1496, 1993.
- [170] L. L. de Zwart, J. H. Meerman, J. N. Commandeur and N. P. Vermeulen, "Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26, no. 1-2, pp. 202-226, 1999.
- [171] R. H. Sills, D. J. Moore and R. Mendelsohn, "Erythrocyte peroxidation: quantitation by Fourier transform infrared spectroscopy," *Analytical Biochemistry*, vol. 218, no. 1, pp. 118-123, 1994.
- [172] D. J. Moore, R. H. Sills and R. Mendelsohn, "Peroxidation of erythrocytes: FTIR spectroscopy studies of extracted lipids, isolated membranes, and intact cells," *Biospectroscopy*, vol. 1, no. 2, pp. 133-140, 1995.
- [173] H. Yin, L. Xu and N. A. Porter, "Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis," *Chemical Reviews*, vol. 111, no. 10, pp. 5944-5972, 2011.

- [174] O. P. Lamba, S. Lal, M. C. Yappert, M. F. Lou and D. Borchman, "Spectroscopic detection of lipid peroxidation products and structural changes in a sphingomyelin model system," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1081, no. 2, pp. 181-187, 1991.
- [175] O. P. Lamba, D. Borchman and W. H. Garner, "Spectral characterization of lipid peroxidation in rabbit lens membranes induced by hydrogen peroxide in the presence of Fe^{2+}/Fe^{3+} cations: a site-specific catalyzed oxidation," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 16, no. 5, pp. 591-601, 1994.
- [176] K. Manda, M. Ueno, T. Moritake and K. Anzai, "alpha-Lipoic acid attenuates x-irradiation-induced oxidative stress in mice," *Cell Biology and Toxicology*, vol. 23, no. 2, pp. 129-137, 2007.
- [177] S. Barlas, E. Tireli, E. Dayıoğlu and C. Barlas, "Miyokard korunması-II: Miyokard metabolizması ve harabiyeti," *Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi*, c. 2, ss. 313-317, 1994.
- [178] C. Manzl, J. Enrich, H. Ebner, R. Dallinger and G. Krumschnabel, "Copper-induced formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes," *Toxicology*, vol. 196, no. 1-2, pp. 57-64, 2004.
- [179] M. Maczewski and A. Beresewicz, "Role of nitric oxide and free radicals in cardioprotection by blocking Na^+/H^+ and Na^+/Ca^{2+} exchange in rat heart," *European Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 461, no. 2-3, pp. 139-147, 2003.
- [180] V. Adam-Vizi and A. A. Starkov, "Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 2, pp. 413-426, 2010.
- [181] Y. Nishikawa, K. Fukumoto, T. Tetsumi, M. Katai and H. Meguri, "Effects of grayanotoxin III on liver function and renal function in rats," *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, vol. 109, no. 5, pp. 340-343, 1989.
- [182] R. Nohara, "Lipid metabolism in the heart contribution of BMIPP to the diseased heart," *Annals of Nuclear Medicine*, vol. 15, no. 5, pp. 403-409, 2001.
- [183] P. C. Schulze, K. Drosatos and I. J. Goldberg, "Lipid use and misuse by the heart," *Circulation Research*, vol. 118, no. 11, pp. 1736-1751, 2016.
- [184] J. Marin-Garcia and M. J. Goldenthal, "Fatty acid metabolism in cardiac failure: biochemical, genetic and cellular analysis," *Cardiovascular Research*, vol. 54, no. 3, pp. 516-527, 2002.
- [185] K. Ergun, O. Tufekcioglu, D. Aras, S. Korkmaz and S. Pehlivan, "A rare cause of atrioventricular block: Mad Honey intoxication," *International Journal of Cardiology*, vol. 99, no. 2, pp. 347-348, 2005.
- [186] W. Becker, L. Kleinsmith, J. Hardin and B. Wilbur, "Membranes: their structure, function, and chemistry," in *The World of the Cell 7th ed.*, 2003, pp. 158-195.
- [187] W. J. van Blitterswijk, J. Damen, H. Hilkmann, and J. de Widt, "Alterations in biosynthesis and homeostasis of cholesterol and in lipoprotein patterns in mice

- bearing a transplanted lymphoid tumor,” *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 816, no. 1, pp. 46-56, 1985.
- [188] J. J. Garcia, R. J. Reiter, M. Karbownik, J. R. Calvo, G. G. Ortiz, D. X. Tan, E. Martinez-Ballarín and D. Acuna-Castroviejo, “N-acetylserotonin suppresses hepatic microsomal membrane rigidity associated with lipid peroxidation,” *European Journal of Pharmacology*, vol. 428, no. 2, pp. 169-175, 2001.
- [189] F. M. Megli and K. Sabatini, “Mitochondrial phospholipid bilayer structure is ruined after liver oxidative injury in vivo,” *Federation of European Biochemical Societies Letters*, vol. 573, no. 1-3, pp. 68-72, 2004.
- [190] M. Inbar, R. Goldman, L. Inbar, I. Bursuker, B. Goldman, E. Akstein, P. Segal, E. Ipp, I. Ben-Bassat, “Fluidity difference of membrane lipids in human normal and leukemic lymphocytes as controlled by serum components,” *Cancer Research*, vol. 37, no. 9, pp. 3037-3041, 1977.
- [191] C. Ozesmi, S. Aydogan and M. Ascioğlu, “Effects of honey containing grayanotoxin I on frog gastrocnemius muscle,” *Veterinary and Human Toxicology*, vol. 36, no. 2, pp. 117-119, 1994.
- [192] C. Eken, “Grayanotoksin zehirlenmesi,” *Turkish journal of medical sciences* vol. 4, no. 2, pp. 76-77, 2004.
- [193] D. M. Bers, D. A. Eisner and H. H. Valdivia, “Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} and heart failure: roles of diastolic leak and Ca^{2+} transport,” *Circulation Research*, vol. 93, no. 6, pp. 487-490, 2003.
- [194] N. S. Ozek, I. B. Bal, Y. Sara, R. Onur and F. Severcan, “Structural and functional characterization of simvastatin-induced myotoxicity in different skeletal muscles,” *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1840, no. 1, pp. 406-415, 2014.
- [195] C. Signorini, M. Ferrali, L. Ciccoli, L. Sugherini, A. Magnani and M. Comporti, “Iron release, membrane protein oxidation and erythrocyte ageing,” *Federation of European Biochemical Societies Letters*, vol. 362, no. 2, pp. 165-170, 1995.
- [196] R. T. Hamilton, L. Asatryan, J. T. Nilsen, J. M. Isas, T. K. Gallaher, T. Sawamura and T. K. Hsiai, “LDL protein nitration: implication for LDL protein unfolding,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 479, no. 1, pp. 1-14, 2008.
- [197] S. Jayaraman, D. L. Gantz and O. Gursky, “Effects of oxidation on the structure and stability of human low-density lipoprotein,” *Biochemistry*, vol. 46, no. 19, pp. 5790-5797, 2007.
- [198] K. J. Davies, “Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 262, no. 20, pp. 9895-9901, 1987.
- [199] C. G. Fraga, R. Zamora and A. L. Tappel, “Damage to protein synthesis concurrent with lipid peroxidation in rat liver slices: effect of halogenated compounds, peroxides, and vitamin E,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 270, no. 1, pp. 84-91, 1989.

- [200] S. C. Benoit C. J. Kemp, C.F. Elias, W. Abplanalp, J. P. Herman, S. Migrenne, A. L. Lefevre, C. Cruciani-Guqlielmacci, C. Magnan, F. Yu, K. Niswender, B. G. Irani, W. L. Holland and D. J Cleqq “Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 119, no. 9, pp. 2577-2589, 2009.
- [201] A. Charbonneau, C. G. Unson and J. M. Lavoie, “High-fat diet-induced hepatic steatosis reduces glucagon receptor content in rat hepatocytes: potential interaction with acute exercise,” *The Journal of Physiology*, vol. 579, no. 1, pp. 255-267, 2007.
- [202] R. A. DeAngelis, M. M. Markiewski, R. Taub and J. D. Lambris, “A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF-kappaB inhibitor, I kappa B alpha,” *Hepatology*, vol. 42, no. 5, pp. 1148-1157, 2005.
- [203] S. Kim, I. Sohn, J.-I. Ahn, K. H. Lee, Y. S. Lee and Y. S. Lee, “Hepatic gene expression profiles in a long-term high-fat diet-induced obesity mouse model,” *Gene*, vol. 340, no. 1, pp. 99-109, 2004.
- [204] R. A. Koza, L. Nikonova, J. Hogan, J.-S. Rim, T. Mendoza, C. Faulk, J. Skaf and L. P. Kozak “Changes in gene expression foreshadow diet-induced obesity in genetically identical mice,” *PLoS Genetics*, vol. 2, no. 5, p. 81, 2006.
- [205] L. Qiu, E. O. List and J. J. Kopchick, “Differentially expressed proteins in the pancreas of diet-induced diabetic mice,” *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, vol. 4, no. 9, pp. 1311-1318, 2005.
- [206] C. B. Anfinsen, “Principles that govern the folding of protein chains,” *Science*, vol. 181, no. 4096, pp. 223-230, 1973.
- [207] C. Soto, “Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy,” *Federation of European Biochemical Societies Letters*, vol. 498, no. 2-3, pp. 204-207, 2001.
- [208] I. M. Olivares-Corichi, G. Ceballos, R. Medina-Santillan, R. Medina-Navarro, A. M. Guzman-Grenfell and J. J. Hicks, “Oxidation by reactive oxygen species (ROS) alters the structure of human insulin and decreases the insulin-dependent D-glucose-C14 utilization by human adipose tissue,” *Frontiers Bioscience*, vol. 10, pp. 3127-3131, 2005.
- [209] S. J. Li and A. J. King, “Structural changes of rabbit myosin subfragment 1 altered by malonaldehyde, a byproduct of lipid oxidation,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, no. 8, pp. 3124-3129, 1999.
- [210] J. Slater and C. Huang, “The Structure of Biological Membranes, ” *CRC, Boca Raton, FL*, pp. 121-145, 2005.
- [211] G. I. Dovbeshko, N. Y. Gridina, E. B. Kruglova and O. P. Pashchuk, “FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage,” *Talanta*, vol. 53, no. 1, pp. 233-246, 2000.
- [212] M. Ascioğlu, N. Cucer, A. Erenmemisoglu and A. Ekecik, “Effect of Grayanotoxin III on mitotic activity of bone marrow cells of mice,” *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, vol. 10, no. 2, pp. 63-66., 2001.

- [213] P. Scott, B. Coldwell and G. Wiberg, "Grayanotoxins. Occurrence and analysis in honey and a comparison of toxicities in mice," *Food and Cosmetics Toxicology*, vol. 9, no. 2, pp. 179-184, 1971.
- [214] M. Windholz, S. Budavari, L. Y. Stroumtsos and M. N. Fertig, *An Encyclopedia of Chemicals and Drugs*, 9th ed., Rahway, NJ USA: Merck & Co., 1976, pp. 4388.
- [215] C. Cera, M. Egbertson, S. P. Teng, D. M. Crothers and S. J. Danishefsky, "DNA cross-linking by intermediates in the mitomycin activation cascade," *Biochemistry*, vol. 28, no. 13, pp. 5665-5669, 1989.
- [216] L. Dusre, J. M. Covey, C. Collins and B. K. Sinha, "DNA damage, cytotoxicity and free radical formation by mitomycin C in human cells," *Chemico Biological Interactions*, vol. 71, no. 1, pp. 63-78, 1989.



6. EKLER

EK 1: ETİK KURUL ONAY BELGESİ

T.C.

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu

Sayı : 98

8.11.2015

Konu : Kararlar

BAŞVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)	ARAŞTIRMANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Orman güllü balının Fare Kalp kasında meydana getirdiği moleküler değişikliklerin ATIR-Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ile incelenmesi
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPAL INVESTIGATER)	Yrd. Doç. Dr. Gülgün ÇAKMAK
	DiĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATERS)	Yrd.Doç.Dr.Pınar GÖÇ RASGELE, Yrd.Doç.Dr.Meral KEKEÇOĞLU
	ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)	Düzce Ün. Fen Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi

KARAR (DECISION)	Karar no (Decision No): 2015/42	Tarih (Date): 13.11.2015
	Yrd. Doç. Dr. Gülgün ÇAKMAK'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

Üyeler	Uzmanlık alanı	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Aysel KÜKNER (Başkan)	Histoloji ve Embriyoloji AD. Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Erol AYAZ (Üye)	Tıbbi Parazitoloji AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Hamit COŞKUN (Üye)	Psikoloji Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Fen Edebiyat Fakültesi	
Prof. Dr. Neriman ŞENGÜL (Invivo Üye)	Genel Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Serkan ÇAKIR (Üye)	Kanatsız hayvan Yetiştiriciliği Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Doç. Dr. Ali Rıza GEZİCİ (Üye)	Beşin Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Fatih ULAŞ (Üye)	Göz Hastalıkları AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Yeşim YENER (Üye)	İlköğretim Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Eğitim Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Serdar GÖZÜTOK (Üye)	Yaban Hayatı ve Ekolojisi Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Eray KEMAHLI (Üye)	Üroloji AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Mustafa ŞİT (Üye)	Genel Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Orçun TOPTAŞ (Üye)	Cerrahi AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Diş Hek. Fakültesi	
Vet. Hek. Ayhan ÇETINKAYA (Sorumlu Veteriner Hekim)	Veteriner Hekim	AİBÜ Deneysel Hayvanlar Uygulama ve Araştırma Merkezi	
Vet. Hek. Orhan BULUT (TC Üyesi)	Veteriner Hekim	BOLCA Hindi /BOLU	
Av. Cihan KARAGOZ (Sivil Toplum Kuruluşu üyesi)	Avukat	Tabaklar Mahallesi Hürriyet cad.No.47/7Merkez/ BOLU	

Şekil 6.1. Deneysel hayvanlar etik kurulu onay belgesi.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : SELİN EMİR
Doğum Tarihi ve Yeri : 28.06.1991- Düzce
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : sln.emr90@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyoloji	Düzce Üniversitesi	2018
Lisans	Biyoloji	Uludağ Üniversitesi	2014
Lise		Özel Yunus Güner Lisesi	2009

Bildiriler

1. Cakmak Arslan G., Emir S., Rasgele Goc P., Kekecoglu M., "Molecular Effects of Rhododendron Honey on Mouse Heart Muscle Studied by ATR-FTIR Spectroscopy" 3rd International Congress on Applied Biological Sciences, 9-12 July 2017, Afyon, TURKEY.
2. Cakmak Arslan G., Emir S., Rasgele Goc P., Kekecoglu M., "Rhododendron Honey Induces Compositional, Structural and Dynamic Changes in Mouse Heart Muscle Tissue Lipids Revealed by ATR-FTIR Spectroscopy" 15th Euro Fed Lipid Congress, 27-30 August 2017, Uppsala, SWEDEN.

3. Cakmak Arslan G., Emir S., Rasgele Goc P., Kekecoglu M., "Structural and Functional Characterization of Mad Honey and Grayanotoxin Induced alterations on Mouse Myocardium" 3rd International Conference on Environmental Science and Tecnology, 19-23 October, 2017, Budapest, HUNGARY.

