

ARAŞTIRMA MAKALESİ

Hümeysra Haksoy¹
Gülgün Çakmak Arslan¹
Pınar Göç Rasgele²
Meral Kekeçoğlu¹

¹Düzce Üniversitesi, Fen-
Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü, Düzce,
Türkiye

²Düzce Üniversitesi,
Ziraat ve Doğa Bilimleri
Fakültesi, Biyosistem
Mühendisliği Bölümü,
Düzce, Türkiye

Yazışma Adresi:

Gülgün Çakmak Arslan
Düzce Üniversitesi, Fen-
Edebiyat Fakültesi, Biyoloji
Bölümü, Düzce, Türkiye
Tel: +90 380 5412404(3991)
E-mail: gulguncakmak@duzce.ed.tr

Geliş Tarihi: 30.07.2019
Kabul Tarihi: 09.12.2019
DOI: 10.18521/ktd.598739

Konuralp Medical Journal
e-ISSN1309-3878
konuralptipdergi@duzce.edu.tr
konuralptipdergisi@gmail.com
www.konuralptipdergi.duzce.edu.tr

Deli Bal ve Grayanotoksin'in Karaciğer Dokusu Üzerindeki Etkilerinin Zamana Bağlı Araştırılması

ÖZET

Amaç: İçindeki grayanotoksin bileşiğinden dolayı insanlarda zehirlenmeye sebep olan deli bal (DB), özellikle Türkiye'nin Karadeniz bölgesinde bazı rahatsızlıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. DB zehirlenmesindeki semptomların 1-2 gün içinde normale döndüğü rapor edilmiş olmasına rağmen, iyileşme süresi hakkında ayrıntılı bir çalışma mevcut değildir. Zehirlenme etkilerinin ne kadar süreli olduğunun bilinmesi, hastalara doğru tedavi metodunun uygulanması ve zamanında taburcu edilebilmeleri açısından önemlidir. Bu çalışmanın amacı, etken doz DB ve içindeki aktif maddenin saf hali olan GTX'in karaciğer dokusu üzerindeki toksik etkilerinin zamana bağlı olarak incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem: *Mus musculus* türü erkek farelere 75 mg/kg (etken doz) DB ve 0,01 mg/kg GTX-III uygulanmış, bu farelerin 24 ve 48 saat sonra karaciğerleri çıkartılmış ve Azaltılmış Toplam Yansıma-Fourier Dönüşüm Kızılötesi (ATR-FTIR) spektroskopisi ile moleküler düzeyde incelenmiştir.

Bulgular: 24 saatlik DB ve GTX uygulaması, karaciğerde lipit peroksidasyonuna, glikojen miktarında azalmaya, doymuş lipit miktarında artışa, membran düzeninde azalmaya, membran akışkanlığında artışa, proteinlerin ve nükleik asitlerin yapı ve konformasyonlarında değişikliklere sebep olmuştur. 48 saatlik süre sonunda glikojen miktarındaki azalış her iki grupta, doymuş lipit miktarındaki artış ise sadece DB grubunda normale dönmüştür. Fakat, lipit peroksidasyonu, protein ve nükleik asitlerin yapı ve konformasyonlarındaki, membran düzen ve akışkanlığındaki değişiklikler için 48 saatlik süre yeterli olmamıştır.

Sonuç: Sonuç olarak, 24 saatlik DB ve GTX uygulaması karaciğer dokusu üzerinde önemli toksik etkiler oluşturmaktadır ve bu toksik etkilerin hepsinin normale dönmesi için 48 saatlik süre yeterli değildir. Çalışmamızın sonuçları, DB'nin etki süresini ve DB zehirlenmesi vakalarında hastaların tedavi ve taburcu sürelerini belirlemek için faydalı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Deli Bal, FTIR Spektroskopisi, Karaciğer, Grayanotoksin

Time-dependent Investigation of Mad Honey and Grayanotoxin on Liver Tissue

ABSTRACT

Objective: Mad Honey (MH), which causes poisoning in people because of grayanotoxin (GTX) in it, is widely used in the treatment of some disorders, especially in the Black Sea Region of Turkey. Although it has been reported that symptoms of MH poisoning return to normal within 1-2 days, there is no detailed study about the recovery time. It is important to know how long the effects of poisoning last in order to apply the correct treatment method and to be discharged from hospital on time. The aim of this study is to investigate the toxic effects of effective dose of MH and GTX, which is the pure form of the active agent of MH, on liver tissue at molecular level depending on the time.

Methods: *Mus musculus* male mice were treated with 75 mg/kg DB (effective dose) and 0.01 mg/kg GTX-III, liver tissues of these mice were removed after 24 and 48 hours and examined by Attenuated Total Reflection-Fourier Transformation Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy at molecular level.

Results: 24 h MH and GTX administration caused lipid peroxidation, a decrease in glycogen amount, an increase in saturated lipid amount, a decrease in membrane order, an increase in membrane fluidity, changes in the structure and conformations of proteins and nucleic acids. After 48 h the decrease in glycogen amount returned to normal values in both groups, the increase in the saturated lipids returned to normal values only in the MH group. However, the 48 h-period were not sufficient to return to normal values for the lipid peroxidation, changes in the structure and conformation of proteins and nucleic acids and membrane order and fluidity.

Conclusions: In conclusion, 24 hour MH and GTX treatment induces toxic effects on liver tissue and the 48 h-period is not sufficient for normalization of all these toxic effects. The results of this study will be useful to determine the duration of treatment and discharge from hospital for patients with MH poisoning.

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

GİRİŞ

Deli bal (DB), Ormangülü (*Rhododendron*) bitkisinden üretilen ve içindeki grayanotoksin (GTX) bileşiminden dolayı insanlarda zehirlenmelere sebep olan toksik bir baldır (1). Fundagiller (*Ericaceae*) familyasına ait olan Ormangülleri Türkiye'nin Karadeniz bölgesi başta olmak üzere Nepal, Japonya, Çin, Filipinler, Kore, Endonezya, Avusturya, Almanya, Brezilya ve bazı kuzey Amerika ülkelerinde yetişmektedir (2). Zehirlenmeye sebep olan GTX'ler bal arıları tarafından çeşitli Ormangülü türlerinin polen ve nektarlarından ekstrakt edilir (3). Türkiye'de sık görülen Ormangülü türleri, yüksek konsantrasyonlarda GTX içeren *R. luteum* ve *R. ponticum*'dur (4).

DB zehirlenme vakalarının çoğu GTX'in kardiyak bulgularından kaynaklanmaktadır. Bildirilen tüm vakalarda en sık rastlanan fiziksel bulgular bradikardi ve hipotansiyondur ve diğer semptomlar genel olarak bu iki bulgu ile ilgilidir (5). Hastalarda atriyoventriküler blok, nodal ritimler ve daha sıklıkla sinüs bradikardileri de görülmektedir. Bahsedilen kardiyovasküler etkilerin yanı sıra bulantı, kusma, salivasyon, kramp tarzı karın ağrısı gibi gastrointestinal şikayetler ve baş dönmesi, bilinç kaybı, bulanık görme, deliryum gibi nörolojik semptomlarda ortaya çıkabilmektedir (6).

Bütün bu toksik etkilerine rağmen DB, halk arasında özellikle Türkiye'nin Karadeniz bölgesinde hipertansiyon, diyabet, soğuk algınlığı, gastrointestinal bozukluklar, artrit, cinsel performans bozuklukları gibi rahatsızlıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (3,7). DB'nin tarihte biyolojik silah olarak kullanıldığı bilinmektedir (5). DB'nin popüleritesi, gıda olarak tüketilmesi, kolay elde edilebilmesi, alternatif tıpta sıklıkla tercih edilmesinden dolayı günden güne artmakta ve bu baldan kaynaklanan zehirlenmeler dünya çapında bir sorun haline gelmektedir. Özellikle kardiyovasküler etkilerinden dolayı önem kazanan bu gıda zehirlenmesi türü hayatı tehdit edici olabilir (4).

Rhodotoksin ya da andromedotoksin olarak da bilinen GTX'ler azotsuz polihidroksil siklik hidrokarbonlardan oluşan diterpenlerdir. Ormangülü bitkisinden 60'tan fazla GTX formu izole edilmiştir (5). Balın içeriğindeki GTX tipi ve miktarı türden türe değişiklik gösterir (3). GTX-I, GTX-II ve GTX-III başlıca toksik GTX tipleri olarak değerlendirilir ve GTX-III'ün en toksik tip olduğu bilinmektedir (8). GTX'ler hücrede açık durumdaki sodyum kanallarına bağlanarak, onların inaktivasyonunu engeller, membran geçirgenliğini artırır, repolarizasyonu inhibe eder ve membran potansiyelini hiperpolarizasyon yönünde hareket ettirir. Sonuçta kas ve sinir hücreleri gibi uyarılabilir hücreler depolarize durumda kalır (9,10). Yani GTX kolinerjik bir ajan gibi hareket ederek bradikardi, hipotansiyon ve solunum hızı depresyonuna sebep olur (3).

Karaciğer birçok fonksiyona sahip kompleks bir organ olup; proteinler, karbonhidratlar, yağlar ve vitaminlerin işlenmesi ve depolanması, hormon ve ilaç metabolizması, toksinlerin detoksifikasyonu gibi fonksiyonlarıyla vücudun metabolik homeostazisinin sürdürülmesinde önemlidir (11). Literatürde DB'nin ve GTX'in karaciğer üzerinde olumsuz etkileri olduğunu rapor eden klinik ve deneysel çalışmalar mevcuttur. Örneğin klinik çalışmalarda DB tüketimine bağlı bir hepatoksisite olgusu (4) ve akut hepatitis olgusu (12) rapor edilmiştir. Deneysel çalışmalarda ise karaciğerde; akut GTX-I uygulamasının bazı enzim seviyelerinde artışa ve fokal nekroz, hepatik santral venin dilatasyonu gibi toksik etkilere (13), GTX-III ve yüksek doz DB'nin lipit peroksidasyonuna (14), farklı dozlardaki DB uygulamasının karaciğer enzim seviyelerinde artışa (8), tıkanıklık, steatoz ve inflamasyona (15) sebep olduğu gösterilmiştir. Ancak bu deneysel çalışmalarda sadece biyokimyasal ve histolojik incelemeler yapılmıştır. Bu nedenle DB'nin ve GTX'in karaciğer dokusu üzerindeki toksik etkilerini moleküler düzeyde ortaya koyan çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bir dokunun işlevini düzgün bir şekilde yerine getirebilmesi yapısı ile ilişkili olduğundan, karaciğer dokusunda meydana gelen yapısal değişiklikler önemli fonksiyonel bozukluklara neden olabilir. Fourier Transform Infrared (FTIR) spektroskopisi hücrelerdeki yapısal değişiklikleri dokuların zarar görmeden incelenmesine olanak sağlayan biyolojik sistemler için uygun bir tekniktir. Bu teknik, moleküllerin değişik dalga boylarındaki titreşimlerini ölçen ve bu nedenle değişik titreşim gruplarını görüntüleyip onların karakterize edilmesini sağlayan, biyolojik doku ve membranlar hakkında değerli bilgiler veren yüksek bir teknoloji ürünüdür (16,17). FTIR spektroskopisi kullanılarak, fonksiyonel grup seviyesinde lipitler, proteinler karbonhidratlar ve nükleik asitler gibi hücrenel bileşenlerdeki moleküler değişimler belirlenebilir (18). Son yıllarda kullanımı oldukça yaygınlaşan ATR-FTIR spektroskopisi, FTIR spektroskopisine ATR (Attenuated Total Reflection- Zayıflatılmış Toplam Yansıma) aksesuarı eklenmesiyle oluşturulan bir tekniktir. ATR-FTIR spektroskopisi, kısa sürede hassas ölçümler yapar ve böylece zamandan tasarruf sağlar. Ayrıca biyolojik dokulardaki farklı fonksiyonel grupları aynı anda izleme olanağı sunması, incelemelerde çok az miktarda numunenin yeterli olması, numune hazırlamanın kolay olması gibi birçok avantaja sahip olması nedeniyle biyolojik sistem çalışmaları için sıklıkla tercih edilen bir tekniktir. Bu teknikte, numuneler ATR kristalinin üzerine doğrudan yerleştirilerek incelenebilir (19).

Zehirlenmeye sebep olan DB miktarı tam olarak bilinmemekle birlikte, zehirlenme belirtilerinin genel olarak bir çay kaşığı bal

tüketiminden sonra ortaya çıktığı farklı çalışmalarda rapor edilmiştir (20,21). Semptomlar bal tüketiminden sonraki ilk 3 saat içinde ortaya çıkmakta, en kötü belirti ve bulgular en az 24 saat sürmektedir. Henüz semptomların tam olarak ne kadar sürdüğü bilinmemekle birlikte, tam iyileşmenin birkaç gün içinde gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Literatürde DB zehirlenmesindeki semptomların süresi hakkında ayrıntılı bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle, DB zehirlenme etkileri ve DB tanısı alan hastaların hastanede ne kadar süre gözlem altında tutulması gerektiğine dair tam bir fikir birliği sağlanamamıştır. Jansen ve ark. DB zehirlenme etkilerinin 1-2 gün sürdüğünü rapor etmiştir (22). Gündüz ve ark. (2008) DB zehirlenmesi teşhisi konan hastaların 2-6 saat kontrol altında tutulduktan sonra taburcu edilebileceğini bildirirken (5), Yaylacı ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada hastaların yaklaşık 27.7 ± 7.2 saat kontrol altında tutulması gerektiğini bildirmiştir (23). Binnetoğlu ve ark. (2008) ise DB'nin etkisinin 72 saat sürdüğünü rapor etmiştir (24). DB zehirlenmesi mortalitesi düşük bir klinik durum olsa da doğru tedavi edilemeyen hastalarda mortalite riski artabilir. Bu nedenle, zehirlenme etkilerinin ne kadar sürdüğünün bilinmesi hastaların hızlı ve doğru tedavi edilebilmeleri ve ne kadar süre gözlem altında tutulmaları gerektiğine karar verilmesi açısından önemlidir.

Daha önceki çalışmalarımızdan birinde, ATR-FTIR spektroskopisi kullanılarak DB'nin fare kalp kas dokusu lipitleri üzerindeki toksik etkileri belirlenmiştir (25). Grubumuz tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, DB'nin farklı konsantrasyonlarının fare karaciğeri üzerindeki etkileri incelenmiş, 25 ve 50 mg/kg'lık DB dozlarının 24 saatlik süre sonunda, bu dokuda glikojen miktarını azaltmak dışında herhangi bir etki göstermediği ancak 75 mg/kg DB ve saf haldeki GTX-III (0,01 mg/kg) uygulamasının dokudaki lipitler, proteinler ve nükleik asitler üzerinde önemli toksik etkiler meydana getirdiği tespit edilmiştir (26). Bu çalışmada ise, önceki çalışmamızda karaciğer için etken doz olduğunu belirlediğimiz 75 mg/kg'lık DB konsantrasyonunun ve GTX-III'ün uygulandığı fare karaciğer dokuları 24 saat ve 48 saatlik süreler sonunda ATR-FTIR spektroskopisi ile analiz edilmiş, DB ve GTX-III uygulamasının karaciğer dokusundaki biyomoleküller üzerinde bu süreler sonunda oluşturduğu etkiler karşılaştırılarak toksik etkilerin 48 saat içinde normale dönüp dönmediğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOD

Çalışmamızda kullanılan DB; Düzceli arıcılardan temin edilmiş, GTX-III (Lot-H1 293B) Enzo Life Science firmasından satın alınmıştır. Düzce Üniversitesi Arıcılık Araştırma Geliştirme ve Uygulama Merkezi'nde (DAGEM) yapılan palinolojik analiz sonucuna göre; kullandığımız

DB'nin % 96 oranında Ericaceae (Rhododendron ponticum) poleni içerdiği tespit edilmiştir.

Deney protokolü Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (2017/2/4). Çalışmada kullanılan Mus musculus türü erkek fareler (8-12 haftalık, 20-25 g), 12:12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsünde, 22 ± 2 °C'lik bir sıcaklıkta tutulmuş, standart fare diyeti ve suyla beslenmiştir. Hayvanlar, her biri 6 fare içeren 5 gruba ayrılmıştır: Grup I = Kontrol; Grup II = 24 saat DB; Grup III = 48 saat DB; Grup IV = 24 saat GTX; Grup V = 48 saat GTX.

75 mg/kg DB'nin suda çözülmesiyle hazırlanan solüsyon, farelere gram başına 0,01 ml gelecek şekilde alınarak tek doz olarak gavaj yoluyla uygulanmıştır. GTX-III'ün ise LD50 dozunun (0,908 mg/kg) yaklaşık olarak onda biri oranındaki konsantrasyonu olan 0,01 mg/kg'lık dozu intraperitoneal yolla uygulanmıştır (27). DB ve GTX-III uygulamasından 24 ve 48 saat sonra hayvanlar dekapite edilerek karaciğer dokuları çıkarılmış ve spektroskopik ölçümlerde kullanılabilecek kadar -80 °C'de dondurucuda saklanmıştır.

Fare karaciğer örneklerinin ATR-FTIR spektrumları, ATR aksesuarı takılmış Spectrum Two FTIR spektrometresi (Perkin-Elmer Ltd., Beaconsfield, UK) kullanılarak elde edilmiştir. Fare karaciğerinin üç farklı bölgesinden (sol lateral, sağ lateral ve sağ medial lob) 0,5 X 0,5 X 0,1 cm büyüklüğünde örnekler kesilmiş, bu parçalar doğrudan ATR ünitesinin elmas/çinko-selenit (Diamond/ZnSe) kristalinin üzerine yerleştirilmiştir. Suyun ortamdan uzaklaştırılması için, kristalin üzerindeki karaciğer dokusuna 5 dakikalık süre boyunca azot gazı uygulanmış ve düzgün bir yüzey teması sağlanması için doku sıkıştırılmıştır (28,29). Spektrumlar oda sıcaklığında, $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında, 4 cm^{-1} çözünürlükte ve 64 tarama sayısı ile elde edilmiştir. Sonuçların güvenilirliğini artırmak için her karaciğerin seçilen bölgelerindeki birbirine komşu 3 kısımdan çekimler yapılmış, böylece her bir karaciğer için 9 spektrum elde edilmiş ve bu spektrumların ortalamaları alınarak detaylı analizlerde bunlar kullanılmıştır.

Bant sinyal şiddeti, bant dalga sayısı ve bant genişlikleri Spectrum 100 yazılımı (Perkin Elmer) kullanılarak ölçülmüştür. Bant genişliği ve bant dalga sayısı değerleri, bantın %75 yüksekliğinden okunmuştur. Baseline düzeltmeleri ve normalizasyon prosedürleri sadece görsel gösterimler için uygulanmıştır. Protein ikincil yapısındaki değişimleri belirlemek için $1700-1600 \text{ cm}^{-1}$ aralığında bulunan Amid I bantı kullanılmıştır. Analizler OPUSNT yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Bruker Optics, Reinstetten, Germany).

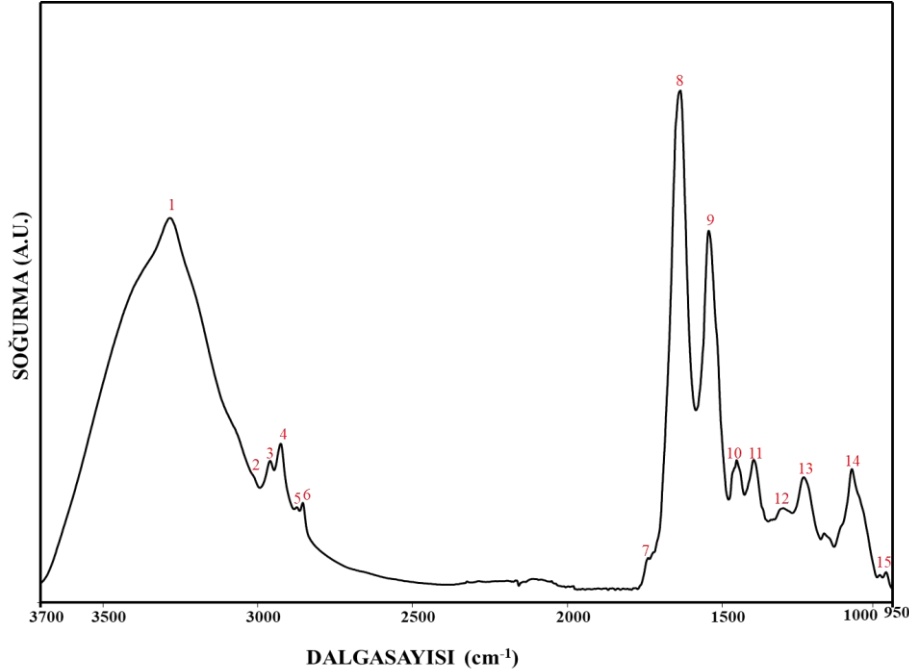
24 ve 48 saatlik DB ve GTX-III uygulanan gruplar ile kontrol arasındaki değişimlerin istatistiksel olarak anlamlılığının hesaplanması için Mann Whitney-U testi kullanılmıştır. Sonuçlar "ortalama \pm standart sapma" olarak verilmiştir. p

değeri 0,05'ten küçük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş, anlamlılık derecesi * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ olarak belirtilmiştir.

BULGULAR

Bir moleküldeki herhangi bir bağ veya bağ grubu FTIR spektrumlarında karakteristik soğurma

bantları oluşturur. Dolayısıyla her bir bant belirli bir bağ ya da bağ grubuna atfedilebilir (30). Şekil 1'de kontrol grubuna ait bir fare karaciğeri spektrumundaki başlıca soğurma bantları gösterilmiştir. Şekilde bantlar numaralandırılmış ve bu bantların literatüre göre tanımları Tablo 1'de belirtilmiştir.



Şekil 1. Kontrol grubuna ait fare karaciğerinin 3700-950 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki ATR-FTIR spektrumu.

Tablo 1. Fare karaciğer dokusunun infrared spektrumundaki başlıca soğurma bantları (26,31-33).

Bant No	Dalga Sayısı (cm^{-1})	Tanım
1	3283	Amid A: Proteinlerin N-H gerilmesi, polisakkaritlerin O-H gerilmesi ve moleküller arası H bağlanması
2	3012	Olefinik=CH titreşim gerilme: Doymamış lipitler
3	2961	CH₃ antisimetrik gerilme: Çoğunlukla lipitler, az miktarda proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler
4	2927	CH₂ antisimetrik gerilme: Çoğunlukla lipitler, az miktarda proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler
5	2874	CH₃ simetrik gerilme: Çoğunlukla proteinler, az miktarda lipitler, karbonhidratlar ve nükleik asitler
6	2854	CH₂ simetrik gerilme: Çoğunlukla lipitler, az miktarda proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler
7	1743	Karbonil ester (C=O) gerilme: Çoğunlukla trigliseritler ve kolesterol esterleri
8	1640	Amid I: Proteinler (%80 C=O gerilme)
9	1545	Amid II: Proteinler (%60 N-H bükülme, %40 C-N gerilme)
10	1453	CH₂ bükülme: Çoğunlukla lipitler, az miktar proteinler
11	1398	COO⁻ simetrik gerilme: Yağ asitleri ve amino asit yan grupları
12	1308	Amid III: Proteinler (%40 C-N gerilme, %30 N-H bükülme, %20 C-C gerilme)
13	1237	PO₂⁻ antisimetrik gerilme: Çoğunlukla nükleik asitler ve az miktar fosfolipitler
14	1081	PO₂⁻ simetrik gerilme: Nükleik asitler ve fosfolipitler C—O gerilme: Polisakkaritler, glikolipitler
15	971	C-N⁺-C gerilme: Nükleik asitler, RNA'nın riboz-fosfat ana zincir titreşimleri

Şekil 1 ve Tablo 1'den görüldüğü üzere fare karaciğer spektrumu; lipitler, karbonhidratlar, proteinler ve nükleik asitlerdeki fonksiyonel gruplardan kaynaklanan birçok bant içeren son derece karmaşık bir spektrumdur. Bu nedenle, kontrol grupları ile DB ve GTX uygulanmış gruplar arasındaki farklılıkları daha iyi ayırt edebilmek için spektral analizler 3 ayrı dalga sayısı aralığında ($3700-3025\text{ cm}^{-1}$, $3025-2800\text{ cm}^{-1}$ ve $1800-950\text{ cm}^{-1}$) gerçekleştirilmiştir. Detaylı analizlerin gerçekleştirildiği bu üç spektral bölgedeki şekillere (Şekil 2, 3, 4) bakıldığında, DB ve GTX uygulamasından 24 saat sonra elde edilen bütün spektrumlar kontrol spektrumundan oldukça farklı olmasına rağmen, 48 saat sonra elde edilen spektrumların bazılarının kontrol grubuna çok yakın ve benzer olduğu, bazılarının ise kontrol grubundan uzak ve farklı olduğu görülmüştür. Örneğin $3700-3025\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığındaki Amid A bantına bakıldığında (Şekil 2A ve 2B) DB ve GTX uygulamasından 24 saat sonra analiz edilen karaciğer spektrumlarının kontrol spektrumundan son derece farklı ve uzak olduğu, ancak 48 saat sonra analiz edilen karaciğer spektrumlarının kontrol spektrumuna daha yakın olduğu görülmektedir. C-H gerilme bölgesinde 24 saatlik DB uygulamasının kontrol spektrumundan oldukça farklı ve uzak olduğu ancak 48 saatlik DB uygulamasının kontrol grubuna biraz daha yaklaştığı görülmektedir (Şekil 3A). Aynı

bölgedeki GTX verilmiş fare karaciğer spektrumlarına bakıldığında ise 24 saatlik ve 48 saatlik uygulama spektrumlarının birbirine çok yakın olduğu, her ikisinin neredeyse üst üste çakıştığı ve kontrol spektrumundan oldukça uzakta ve farklı oldukları görülmektedir (Şekil 3B). Parmak izi bölgesinde ($1800-950\text{ cm}^{-1}$) hem DB'nin hem de GTX'in 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinin sonunda elde edilen spektrumların birbirine çok benzediği ve ikisinin de kontrol spektrumundan oldukça uzak olduğu görülmektedir (Şekil 4A ve 4B). Bu şekillerden de anlaşılacağı gibi DB ve GTX'in 24 saatlik uygulaması karaciğer dokusu üzerinde önemli değişiklikler meydana getirirken, 48 saat sonra bu etkilerin bazıları normale dönmekte bazılarının etkisi ise aynen devam etmektedir. Bu sonuç, aşağıda açıklanacağı gibi spektrumların bant sinyal şiddetleri, sinyal şiddeti oranları, bant dalga sayısı ve genişliği analizlerinden elde ettiğimiz sayısal analiz sonuçları ile daha detaylı olarak ortaya konmuştur (Tablo 2-5).

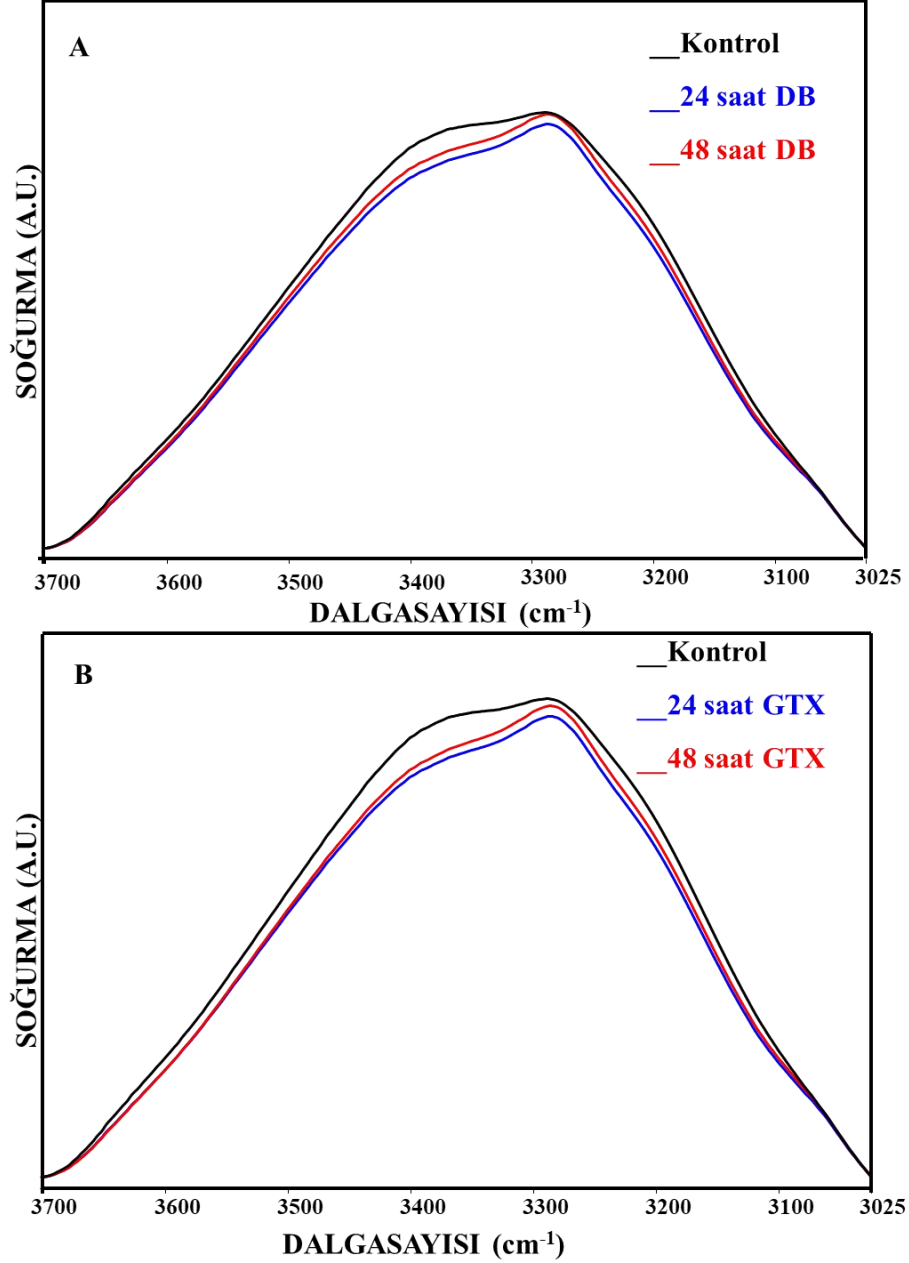
ATR-FTIR spektrumunda bantların sinyal şiddetleri ve/veya altında kalan alan o fonksiyonel grubun ait olduğu molekülün dokudaki miktarı hakkında bilgi verir (31). Tablo 2'de DB ve GTX'in 24 ve 48 saatlik uygulama gruplarının sinyal şiddeti değerleri kontrol grubuyla karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.

Tablo 2. Kontrol, DB ve GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş fare karaciğer dokusunun başlıca fonksiyonel gruplarının sinyal şiddeti değerlerindeki değişiklikler (İstatistiksel olarak anlamlılık kontrol grubuna göre hesaplanmış olup, derecesi $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$ şeklinde gösterilmiştir. ↓: Kontrol grubuna göre sinyal şiddetindeki azalmayı; ↑: Kontrol grubuna göre sinyal şiddetindeki artışı göstermektedir).

Bant No	Dalga Sayısı	Kontrol	24 Saat DB	48 Saat DB	24 Saat GTX	48 Saat GTX
1	3283	3,388±0,184	3,245 ± 0,136*↓	3,292 ± 0,19	3,216 ± 0,168*↓	3,256 ± 0,089
2	3012	0,0038±0,0005	0,0032±0,0004*↓	0,0028±0,0002**↓	0,0034±0,0002*↓	0,0029±0,0006*↓
3	2961	0,255 ± 0,025	0,29 ± 0,025*↑	0,283 ± 0,029	0,289 ± 0,017*↑	0,288 ± 0,013*↑
4	2927	0,265 ± 0,029	0,308 ± 0,032*↑	0,294 ± 0,034	0,307 ± 0,026*↑	0,304 ± 0,018*↑
5	2874	0,152 ± 0,014	0,176 ± 0,017*↑	0,170 ± 0,019	0,176 ± 0,014*↑	0,175 ± 0,015*↑
6	2854	0,154 ± 0,015	0,177 ± 0,014*↑	0,171 ± 0,016	0,179 ± 0,015*↑	0,176 ± 0,015*↑
7	1743	0,057 ± 0,008	0,063 ± 0,009	0,062 ± 0,005	0,065 ± 0,005	0,063 ± 0,005
8	1640	0,897 ± 0,115	1,120 ± 0,109*↑	1,099 ± 0,131*↑	1,126 ± 0,090**↑	1,117 ± 0,094*↑
9	1545	0,564 ± 0,108	0,770 ± 0,102*↑	0,761 ± 0,125*↑	0,778 ± 0,081*↑	0,774 ± 0,093*↑
10	1453	0,210 ± 0,042	0,271 ± 0,037*↑	0,269 ± 0,029*↑	0,273 ± 0,028*↑	0,273 ± 0,029*↑
11	1398	0,202 ± 0,041	0,271 ± 0,039*↑	0,267 ± 0,047*↑	0,272 ± 0,030*↑	0,272 ± 0,031*↑
12	1308	0,120 ± 0,026	0,168 ± 0,025*↑	0,166 ± 0,033*↑	0,169 ± 0,020*↑	0,167 ± 0,021*↑
13	1237	0,152 ± 0,040	0,218 ± 0,035*↑	0,211 ± 0,041*↑	0,220 ± 0,029*↑	0,219 ± 0,034*↑
14	1081	0,152 ± 0,028	0,218 ± 0,045*↑	0,196 ± 0,034*↑	0,211 ± 0,031*↑	0,223 ± 0,037**↑
15	971	0,017 ± 0,006	0,029 ± 0,006*↑	0,026 ± 0,006*↑	0,027 ± 0,004*↑	0,031 ± 0,008**↑

Şekil 2A, kontrol ve DB uygulamasından, Şekil 2B ise kontrol ve GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş fare karaciğeri spektrumunun 3700-3025 cm^{-1} dalga sayısı aralığını göstermektedir. Bu bölgede yer alan ve Amid A bantı olarak isimlendirilen bant proteinler, polisakaritler ve sudan sinyaller almaktadır (34). Çalışmamızda örnekler hazırlanırken su ortamdan tamamen uzaklaştırıldığı için suyun bu banta katkısı

ihmal edilebilir ve bu bantın sadece polisakaritler ve proteinlerden kaynaklandığı kabul edilebilir. Şekil 2A, B ve Tablo 2'den görüldüğü üzere DB ve GTX'in 24 saatlik uygulama süresi sonunda, bu bantın sinyal şiddeti anlamlı derecede azalmıştır. 48 saatlik uygulama süresine bakıldığında ise kontrol grubu ile DB ve GTX grupları arasında anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmektedir.



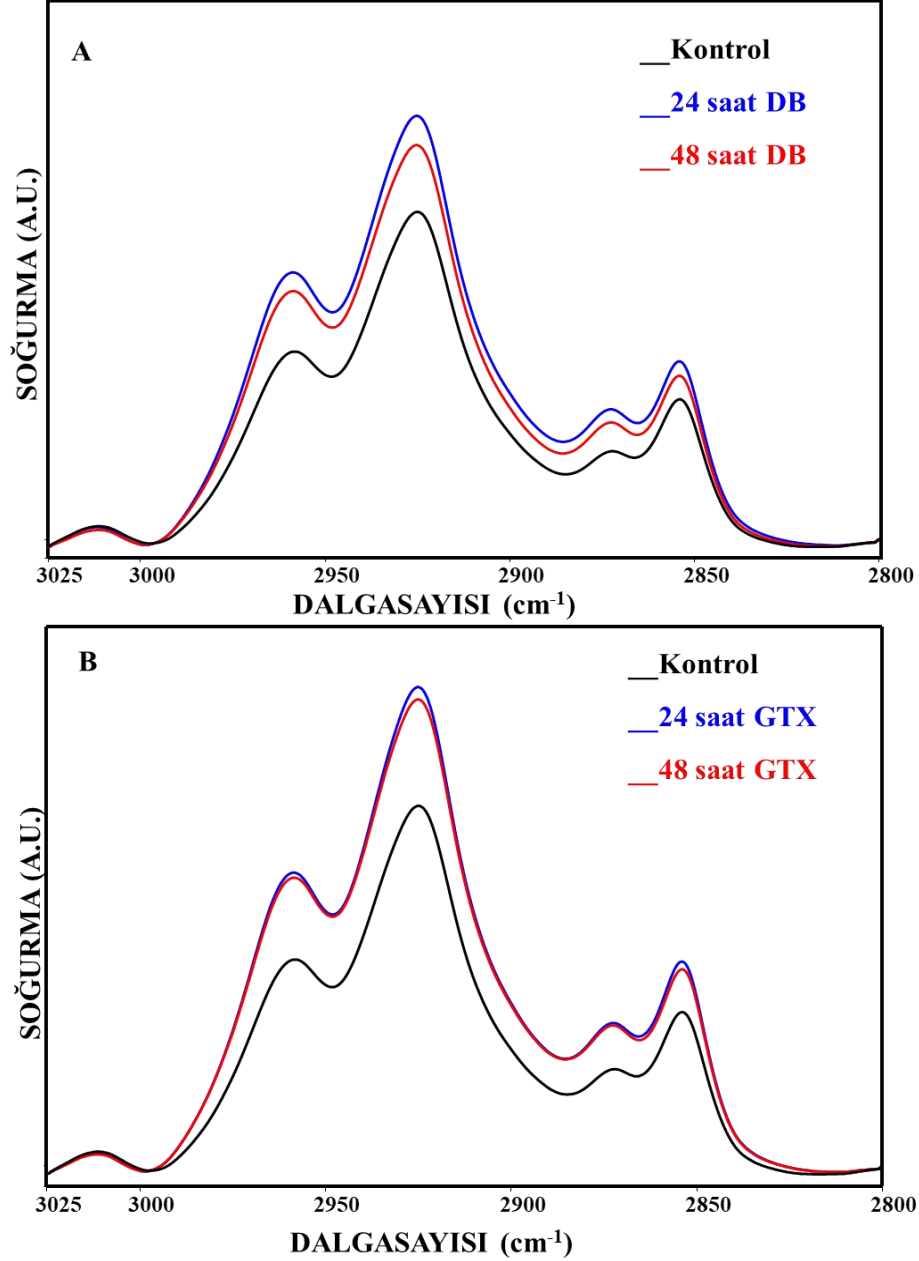
Şekil 2. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş fare karaciğer dokularının 3700-3025 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektrumları (Spektrumlar CH_2 antisimetrik gerilme bantına göre normalize edilmiştir).

Şekil 3A, kontrol ve DB uygulamasından, Şekil 3B ise kontrol ve GTX uygulamasından 24 ve 48 saat incelenmiş grupların karaciğer spektrumlarının 3025-2800 cm^{-1} dalga sayısı aralığını göstermektedir. C-H gerilme bölgesi olarak adlandırılan bu bölgedeki bantlar sırasıyla

olefinik $\text{HC}=\text{CH}$ gruplarındaki CH gerilme titreşimlerinden, CH_3 ve CH_2 antisimetrik gerilme titreşimlerinden, CH_3 ve CH_2 simetrik gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Olefinik= CH bantı sistemdeki doymamış lipitler, CH_3 antisimetrik, CH_2 antisimetrik ve CH_2 simetrik

bantları ağırlıklı olarak doymuş lipitlerden ve CH₃ simetrik bantı ise ağırlıklı olarak proteinlerden sinyaller almaktadır (16). Tablo 2'den görüldüğü gibi DB ve GTX'in 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinin sonunda Olefinik=CH bantının sinyal şiddeti anlamlı derecede azalmıştır. Tablo 2 ve Şekil 3A'dan görüldüğü üzere doymuş lipitlerden kaynaklanan CH₃ antisimetrik, CH₂ antisimetrik ve CH₂ simetrik bantlarının sinyal şiddeti değerleri 24

saat DB uygulanmış gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış, 48 saatlik uygulama grubunda ise bantların sinyal şiddetlerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak, GTX grupları incelendiğinde hem 24 hem de 48 saatlik uygulama gruplarında doymuş lipitlerden kaynaklanan bantların sinyal şiddetlerinin anlamlı derecede arttığı görülmüştür.



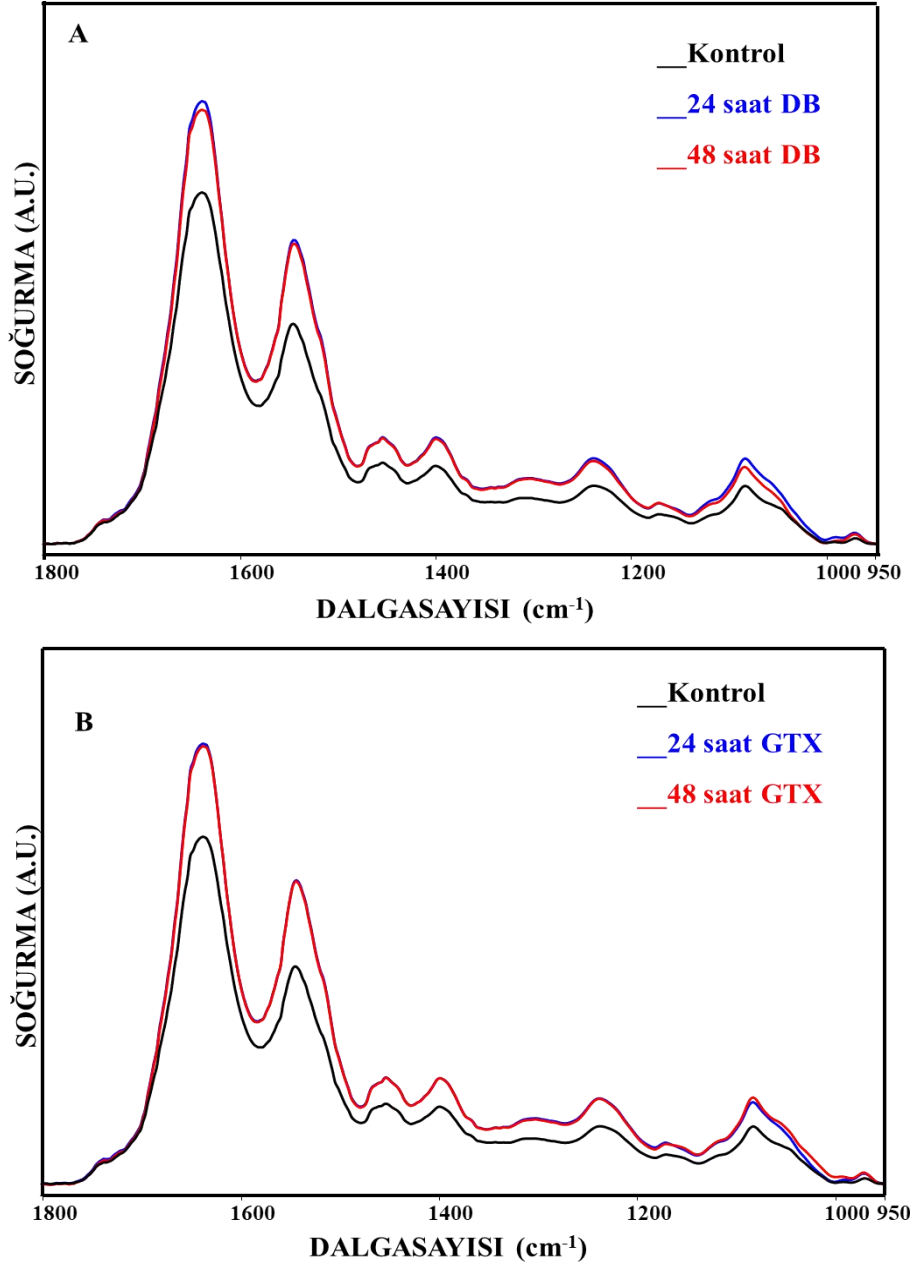
Şekil 3. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş fare karaciğer dokularının 3025-2800 cm⁻¹ dalga sayısı aralığındaki spektrumları (Spektrumlar Amid A bantına göre normalize edilmiştir).

Çalışmamızda analiz edilen diğer bölge 1800-950 cm⁻¹ dalga sayısı aralığındaki parmak izi bölgesidir. Bu bölge kolesterol esterleri, trigliseritler, proteinler, nükleik asitler, vb. birçok molekülden kaynaklanan farklı spektral bantlar

içermektedir. Şekil 4A, kontrol ve DB, Şekil 4B ise kontrol ve GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş karaciğer spektrumlarının 1800-950 cm⁻¹ dalga sayısı aralığını göstermektedir. Bu bölgede 1640 ve 1545 cm⁻¹'de gözlenen Amid I ve

Amid II bantları sistemdeki proteinlerden sinyal almaktadır (18). Şekil 4A ve B'den görüldüğü gibi bu bantların sinyal şiddetleri, DB ve GTX gruplarının hem 24 hem de 48 saatlik uygulama gruplarında anlamlı derecede artmıştır. 1453 cm^{-1} 'de gözlenen CH_2 bükülme bantı lipid ve proteinlerdeki titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Şekil 4A ve B'den görüldüğü gibi bu bantın sinyal şiddeti DB ve GTX uygulamasının hem 24 saat hem de 48 saatlik uygulama gruplarında anlamlı derecede artmıştır. Benzer şekilde sistemdeki yağ asitleri ve aminoasitlerden kaynaklanan bir bant olan 1398 cm^{-1} 'deki COO^- simetrik gerilme bantının sinyal şiddeti de DB ve GTX'in hem 24 hem de 48 saatlik uygulama gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (35). Aynı şekilde

1308 cm^{-1} 'de gözlenen ve proteinlerden sinyal alan bir diğer bant olan Amid III bantı hem 24 hem de 48 saatlik DB ve GTX uygulanmış gruplarda anlamlı derecede artmıştır (32). 1237 ve 1081 cm^{-1} 'de ortaya çıkan PO_2^- antisimetrik ve PO_2^- simetrik bantları, ağırlıklı olarak nükleik asitlerdeki ve fosfolipitlerdeki fosfat gruplarından sinyaller almaktadır (18). Şekil 4A ve B'den görüldüğü gibi DB ve GTX'in hem 24 hem 48 saatlik uygulama gruplarında bu bantların sinyal şiddeti anlamlı derecede artmıştır. 971 cm^{-1} dalga sayısında ortaya çıkan C-N⁺-C gerilme bantı nükleik asitlerden kaynaklanan özel bir banttır (36). Şekil 4A, B ve Tablo 2'den görüldüğü gibi bu bantın sinyal şiddeti DB ve GTX'in hem 24 hem de 48 saatlik uygulama gruplarında anlamlı derecede artmıştır.



Şekil 4. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş fare karaciğer dokularının 1800-950 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektrumları (Spektrumlar Amid A bantına göre normalize edilmiştir).

Çalışmamızda, DB ve GTX'in 24 ve 48 saatlik uygulamalarının lipitlerin ve proteinlerin yapıları ve bileşimindeki ve bu moleküllerin birbirlerine göre durumları üzerindeki etkilerini ortaya çıkarmak amacıyla bazı oran hesaplamaları yapılmıştır. Örneğin bazı spesifik lipit fonksiyonel gruplarının (olefinik=CH bantı, karbonil ester gerilme bantı, CH₂ ve CH₃ antisimetrik gerilme bantları) sinyal şiddeti değerlerinin doymuş lipitlerden kaynaklanan bantların (CH₃ antisimetrik + CH₂ antisimetrik + CH₂ simetrik) sinyal şiddetleri toplamına bölünmesiyle elde edilen oranlar lipitlerdeki yapısal değişimleri belirlemek için kullanılmıştır. Çalışmamızda analiz edilen oranlar Tablo 3'te verilmiştir. Sistemin doymamışlık seviyesi üzerindeki değişimleri hesaplamak amacıyla olefinik=CH/lipit oranı hesaplanmıştır. Tablo 3'ten görüldüğü gibi bu oran bütün gruplarda anlamlı derecede azalmış ve hatta 48 saatlik uygulama gruplarında bu etki daha belirgin ortaya çıkmıştır. Sistemdeki fosfolipitlerin zincir uzunlukları hakkında bilgi veren CH₂/lipit oranı 24 saatlik DB uygulamasından sonra anlamlı derecede azalırken, 48 saatlik uygulama süresi sonunda anlamlı bir değişiklik ortaya çıkmamıştır (37). GTX uygulanmış grupta ise bu oran hem 24 hem de 48 saatlik uygulama gruplarında anlamlı derecede

azalmıştır. Sistemdeki metil konsantrasyonu hakkında bilgi veren CH₃/lipit oranı tüm gruplarda anlamlı derecede artmıştır (18). Sistemin karbonil durumu hakkında bilgi veren C=O/lipit oranı tüm uygulama gruplarında anlamlı derecede azalmıştır.

Dokudaki proteinlerde meydana gelen yapısal değişimler hakkında bilgi sahibi olabilmek için proteinlerden kaynaklanan Amid I ve Amid II bantlarının sinyal şiddeti değerleri birbirine bölünmüştür (35). Tablo 3'ten görüldüğü üzere Amid I/Amid II oranı DB ve GTX'in hem 24 hem de 48 saatlik uygulama gruplarında anlamlı derecede azalmıştır. Ayrıca çalışmamızda lipit ve protein konsantrasyonlarının birbirlerine göre değişimlerini kıyaslamak amacıyla lipit ve proteinlerden kaynaklanan spektral bantların sinyal şiddeti oranı da analiz edilmiştir. Lipit/protein oranı; CH₃ antisimetrik, CH₂ antisimetrik ve CH₂ simetrik gerilme bantlarının sinyal şiddetleri toplamının, Amid II bantının sinyal şiddeti değerine bölünmesiyle hesaplanmıştır. Tablo 3'ten görüldüğü üzere bu oran DB'nin 24 saatlik uygulama grubunda anlamlı derecede artarken, 48 saatlik uygulama grubunda anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. GTX uygulamasından sonra ise bu oran hem 24 hem de 48 saatlik uygulama gruplarında anlamlı derecede artmıştır.

Tablo 3. Kontrol, DB ve GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş fare karaciğer dokusunun bazı fonksiyonel gruplarının sinyal şiddeti oranı, dalga sayısı ve bant genişliği değerlerindeki değişiklikler (İstatistiksel olarak anlamlılık kontrol grubuna göre hesaplanmış olup, derecesi p<0,05*, p<0,01**şeklinde gösterilmiştir. ↓: Kontrol grubuna göre azalmayı; ↑: Kontrol grubuna göre artışı göstermektedir.)

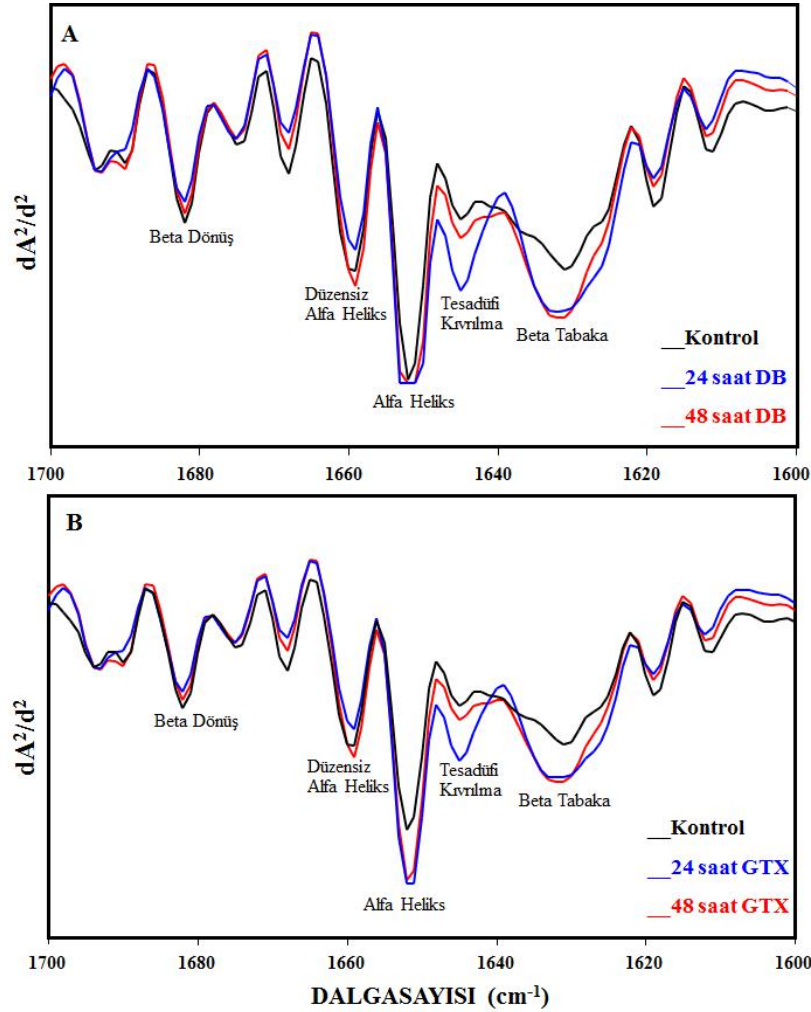
Dalga Sayısı	Kontrol	24 Saat DB	48 Saat DB	24 Saat GTX	48 Saat GTX
Oran					
Olefinik=CH / lipit	0,0056± ,0006	0,0046±0,0004*↓	0,0038±0,0002**↓	0,0044 0,0004*↓	0,0038±0,0008**↓
CH₂/lipit	0,392 ± 0,003	0,352±0,006**↓	0,379 ± 0,013	0,372 0,014**↓	0,370±0,010**↓
CH₃/lipit	0,368 ± 0,003	0,375 ± 0,005*↑	0,378±0,003**↑	0,374 ± 0,005*↑	0,376 ± 0,004*↑
C=O/lipit	0,088 ± 0,003	0,082 ± 0,002*↓	0,083 ± 0,003*↓	0,083 ± 0,002*↓	0,082 ± 0,005*↓
Amid I/ amid II	1,609 ± 0,123	1,460 ± 0,062*↓	1,452 ± 0,066*↓	1,451 ± 0,037*↓	1,448 ± 0,051*↓
Lipit/ protein	0,982 ± 0,114	1,131±0,011**↑	1,014 ± 0,038	1,007 ± 0,017*↑	1,013 ± 0,045*↑
Dalga Sayısı					
CH₂ antisim. gerilme	2927,064±0,26	2927,531±0,17*↑	2927,435±0,30*↑	2927,753±0,205**↑	2927,435±0,24*↑
CH₂ sim. gerilme	2854,604±0,26	2854,948±0,14*↑	2855,033±0,17*↑	2854,9±0,06*↑	2854,87±0,064*↑
Amid I	1639,894±0,21	1640,393±0,13**↑	1640,327±0,22*↑	1640,432±0,19**↑	1640,255±0,14*↑
Bant Genişliği					
CH₂ antisim. gerilme	11,06±0,104	11,280±0,08**↑	11,29±0,238*↑	11,310±0,145*↑	11,343±0,161**↑
Amid I	41,753±0,868	39,016±0,084**↓	40,07±0,421*↓	38,865±0,542**↓	39,83±0,535*↓

Kızılötesi spektrumundaki CH₂ antisimetrik ve simetrik bantlarının pozisyonu hücre zarındaki lipidlerin açıl zincirlerinin düzen ve düzensizlik durumunu incelemek için kullanılır. Bu bantların dalga sayısı değerlerinde meydana gelen herhangi bir artış daha esnek açıl zincirlerinin varlığını yani hücre zarının daha düzensiz hale geçtiğini göstermektedir (16). Tablo 3'ten görüldüğü üzere bu bantların dalga sayıları DB ve GTX'in hem 24 hem de 48 saatlik uygulama gruplarında yüksek değerlere doğru kaymıştır. CH₂ antisimetrik gerilme bantının bant genişliğindeki değişimler membran dinamiği hakkında bilgi vermektedir (37). Tablo 3'ten görüldüğü üzere bu bantın genişliği, DB ve GTX'in 24 ve 48 saatlik uygulama gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır.

Çalışmamızda proteinlerde meydana gelen konformasyonel değişimler hakkında bilgi sahibi olabilmek için Amid I bantının dalga sayısı ve bant genişlik değerleri analiz edilmiştir (31). Bu bantın dalga sayısı ve bant genişliği değerlerindeki değişimler Tablo 3'te verilmiştir. Bu tablodan görüldüğü üzere Amid I bantının dalga sayısı değeri DB ve GTX'in 24 ve 48 saatlik uygulama gruplarında anlamlı derecede artarken, bant

genişliği tüm gruplarda anlamlı derecede azalmıştır.

1700-1600 cm⁻¹ aralığında bulunan Amid I bantı proteinlerden kaynaklı ayrışmamış bantlar içermektedir. Amid I bantına ikincil türev vektör normalizasyonu uygulanmasıyla karakteristik bileşenlerin tepe frekansları ayrıntılı bir şekilde tanımlanmaktadır. Böylece protein ikincil yapısında meydana gelen değişimler detaylı bir şekilde tespit edilmektedir (19). Şekil 5A ve B, 1700-1600 cm⁻¹'deki kontrol, 24 ve 48 saat DB ve GTX uygulanmış fare karaciğerinin ikincil türev kızıllötesi spektrumlarını göstermektedir. İkincil türev spektrumunda proteinlerdeki beta dönüş (turn) yapıları 1684 cm⁻¹'de, düzensiz alfa-heliks yapıları 1659 cm⁻¹'de, alfa-heliks yapıları 1651 cm⁻¹'de, tesadüfi kıvrılma yapıları 1640 cm⁻¹'de, beta-tabaka yapıları 1633 cm⁻¹'de negatif bantlar olarak temsil edilmektedir (19,38). Tablo 4'te bu protein ikincil yapılarının sayısal karşılaştırması verilmiştir. Şekil 5A, B ve Tablo 4'ten görüldüğü üzere; beta dönüş ve düzensiz alfa-heliks yapıları, DB ve GTX'in 24 ve 48 saatlik uygulama gruplarında anlamlı derecede azalmıştır. Alfa-heliks, tesadüfi kıvrılma ve beta tabaka yapıları ise tüm uygulama gruplarında anlamlı derecede artmıştır.



Şekil 5. Kontrol, DB (A) ve GTX (B) uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş fare karaciğer spektrumlarının 1700-1600 cm⁻¹ dalga sayısı aralığındaki ikincil türev spektrumları.

Tablo 4. Kontrol, DB ve GTX uygulamasından 24 ve 48 saat sonra incelenmiş fare karaciğer dokusunun başlıca protein ikincil yapı değerlerindeki değişiklikler (İstatistiksel olarak anlamlılık kontrol grubuna göre hesaplanmış olup, derecesi $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ şeklinde gösterilmiştir).

Dalga Sayısı	Kontrol	24 Saat DB	48 Saat DB	24 Saat GTX	48 Saat GTX
Beta Dönüş	-0,082 ± 0,011	-0,060±0,002**↓	-0,065 ± 0,010*↓	-0,058± 0,005*↓	-0,049 ±0,010**↓
Düzensiz Alfa Heliks	-0,158 ± 0,009	-0,131±0,002**↓	-0,134±0,008**↓	-0,130±0,001**↓	-0,124 ±0,011**↓
Alfa Heliks	-0,321 ± 0,009	-0,332± 0,008*↑	-0,339 ± 0,006*↑	-0,327± 0,006*↑	-0,348 ±0,025**↑
Tesadüfi Kıvrılma	-0,083± 0,005	-0,173± 0,01**↑	-0,112±0,019**↑	-0,138 ± 0,021**↑	-0,122± 0,037*↑
Beta Tabaka	-0,160 ± 0,005	-0,178±0,006**↑	-0,166 ± 0,003*↑	-0,172±0,004**↑	-0,168 ± 0,004

TARTIŞMA

Doymamış yağ asitlerinden kaynaklanan olefinik=CH bantının sinyal şiddeti ve/veya altında kalan alan ve olefinik=CH/lipit oranı sistemdeki lipit peroksidasyonunu belirlemek için bir indeks olarak kullanılabilir (18). Çalışmamızda, DB ve GTX'in 24 saatlik uygulama süresi sonunda olefinik=CH bantının sinyal şiddetinin ve olefinik=CH/lipit oranının anlamlı derecede azaldığı görülmüştür (Tablo 2 ve 3). Daha önceki çalışmalarda DB ve GTX'in oksidatif stres indükleyerek dokuda serbest radikallerin oluşumuna sebep olduğu gösterilmiştir (27,39). Bu serbest radikaller dokudaki lipitler, proteinler ve nükleik asitlerle tepkimeye girerek onların yapısını bozmaktadır. Eğer bunlar lipitlerle tepkimeye girerse sistemde bir lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonu başlar ve bu reaksiyonlar lipitlerin parçalanmasına sebep olur. Doymamış yağ asidi zincirlerindeki çift bağların lipit peroksidasyonu oluşturan maddelere karşı son derece duyarlı olduğu ve lipit peroksidasyonunun doymamış yağ asitlerinin yani olefinik bağların azalmasına sebep olduğu bilinmektedir (40,41). Dolayısıyla, 24 saat DB ve GTX uygulaması tarafından indüklenen olefinik=CH bantının sinyal şiddeti ve olefinik=CH/lipit oranındaki azalma sistemdeki lipit peroksidasyonunun bir sonucu olabilir. DB ve GTX uygulamasından sonra sistemdeki doymamış yağ asidi miktarındaki azalmaya ek olarak CH_2 /lipit ve karbonil/lipit oranlarında anlamlı azalmalar, CH_3 /lipit oranında anlamlı artış meydana gelmiştir (Tablo 3). Bu sonuçlar lipitlerin parçalanarak daha kısa zincirli lipitler oluşturmasından ve sonuçta lipit yapısında meydana gelen önemli değişikliklerden kaynaklanmış olabilir (33). Sonuç olarak, 24 saatlik DB ve GTX uygulamasından sonra dokuda oluşan serbest radikallerin, lipitlerin yağ asidi zincirlerinde oluşturduğu hasar sonucunda lipitlerin parçalanmasına sebep olduğu ileri sürülebilir. DB ve GTX'in 48 saatlik uygulama sonuçlarına bakıldığında genel olarak 24 saatlik uygulama sonuçları ile paralel ve istatistiksel olarak anlamlı olarak değiştiği görülmüştür. Bu sonuç, karaciğer

dokusunda 24 saat içinde ortaya çıkmış olan lipit peroksidasyonunun etkilerinin 48 saat sonra da devam ettiğini göstermektedir.

DB'nin 24 saatlik uygulama süresi sonunda, sistemdeki doymuş lipitlerin miktarında artış gözlenmiştir. DB'nin 48 saatlik uygulama gruplarına bakıldığında ise doymuş lipitlerin miktarında kontrol grubuna göre anlamlı bir değişikliğin olmadığı görülmüştür. Bu sonuç DB'nin lipit metabolizmasında 24 saat içinde meydana getirdiği değişikliğin 48 saatlik süre sonunda normale döndüğünü göstermektedir. GTX uygulamasından sonra ise 24 saatlik uygulama grubunda doymuş lipit miktarında önemli derecede bir artış olduğu ve bu artışın 48 saatlik uygulama grubunda normale dönmediği yani GTX'in toksik etkisinin 48 saat boyunca devam ettiği ortaya çıkmıştır. Bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak, Kükner vd. 2016, DB ve GTX uygulamasından sonra farelerde karaciğer yağlanması meydana geldiğini ışık mikroskopu ile belirlemiştir (15). Önceki çalışmalarda karaciğer yağlanmasının dokuda sadece lipit miktarında artışa değil aynı zamanda glikojen miktarında önemli oranda azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (42,43). Bu sonuç, Amid A bantının analizinden elde ettiğimiz sonuç ile desteklenmektedir (Şekil 2A, B). Daha önce de belirtildiği gibi 3283 cm^{-1} 'deki Amid A bantı proteinlerden, polisakaritlerden ve sudan sinyaller almaktadır. Biz çalışmamızda, suyu ortamdaki azot gazı yardımıyla uzaklaştırdığımız ve başlıca protein bantları olan Amid I ve II bantlarının sinyal şiddetlerinde anlamlı artışlar gözlediğimiz için bu banttaki azalma glikojendeki azalmaya atfedilebilir (26,31,34,44). Dolayısıyla, DB ve GTX'in 24 saatlik uygulama sonrasında sistemdeki glikojen konsantrasyonunda azalmaya sebep olduğu söylenebilir. Amid A bantı, DB ve GTX uygulamasından 48 saat sonra incelendiğinde, bantın sinyal şiddetinin kontrol değerlerine yaklaştığı ve kontrolle arasında anlamlı bir fark olmadığı ortaya çıkmıştır (Şekil 2B). Bu sonuç 48

saatlik süre içinde glikojen metabolizmasının normale döndüğünü göstermektedir.

Proteinlerden kaynaklanan bantların (Amid I, II ve III) sinyal şiddetinin DB ve GTX uygulamasından 24 saat sonra incelenen karaciğer dokusunda anlamlı derecede arttığı ortaya çıkmıştır. Protein miktarındaki bu artış sistemdeki protein sentezindeki bir artıştan kaynaklanıyor olabilir. Literatürde DB zehirlenmesinden sonra aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz gibi karaciğer enzimlerinde artış gözlemlendiği rapor eden çalışmalar mevcuttur (4,12,27). Dolayısıyla karaciğerdeki protein miktarında gözlediğimiz bu artış DB ve GTX'e bağlı zehirlenme sonrası ortaya çıkan enzimlerin sentezindeki artıştan kaynaklanmış olabilir. Protein bantlarına ilave olarak hem aminoasitlerden hem de yağ asitlerinden sinyaller alan bir bant olan COO⁻ simetrik gerilme bantında da artış gözlenmiştir. Bu banttaki artış hem proteinler hem lipitlerde artış meydana geldiği sonucunu desteklemektedir. DB ve GTX uygulamasından 48 saat sonra incelenen dokuların analiz sonuçlarına bakıldığında, söz konusu bantların sinyal şiddeti değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı artışlar olduğu görülmüştür. Bu sonuç, uygulamadan 48 saat sonra da DB ve GTX'in protein sentezi üzerindeki toksik etkisinin devam ettiğini göstermektedir.

Sonuçlarımız, DB ve GTX'in hem 24 hem de 48 saatlik uygulama süresinin sonunda Amid I/Amid II oranında anlamlı bir azalma olduğunu ortaya çıkarmıştır. Dokuda meydana gelen herhangi bir patolojik durumun, Amid I/Amid II oranında düşmeye ve dolayısıyla protein yapısında değişikliğe sebep olduğu önceki FTIR çalışmalarında gösterilmiştir (16,45). Bundan başka DB ve GTX'in hem 24 hem de 48 saatlik uygulamasından sonra Amid I bantının dalga sayısında yüksek değerlere doğru bir kayma, bant genişliğinde ise bir daralma gözlenmiştir. Bu kayma ve daralma proteinlerde konformasyonel bir değişim olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak Amid I bantının dalga sayısı ve bant genişliği değerlerinde gözlenen değişiklikler ve Amid I/II oranındaki azalma DB ve GTX uygulamasının proteinlerde konformasyonel ve yapısal değişimler meydana getirdiğini ve bu değişimlerin etkisinin 48 saat boyunca devam ettiğini göstermektedir.

DB ve GTX uygulamasının proteinlerin ikincil yapısı üzerinde meydana getirdiği etkiler ile ilgili daha detaylı bilgi sahibi olabilmek için gerçekleştirilen ikincil türev vektör normalizasyonu, DB ve GTX'in hem 24 hem de 48 saatlik uygulamasından sonra beta dönüş ve düzensiz alfa heliks yapılarında azalma, alfa-heliks, beta tabaka ve tesadüfi kıvrılma yapılarında ise artış olduğunu ortaya çıkmıştır. Bütün gruplarda gözlenen tesadüfi kıvrılma yapısındaki artış karaciğerde DB ve GTX'in protein denaturasyonuna sebep olduğunu ve bu etkinin 48 saat boyunca devam ettiğini göstermektedir (19).

Karaciğerde ortaya çıkmış olan protein denaturasyonu sistemdeki serbest radikallerin miktarındaki artıştan kaynaklanmış olabilir (46).

Lipit/protein oranı sistemdeki lipit ve protein metabolizmasında meydana gelen değişimler ve hücresel fonksiyonlarda çok önemli olan lipit ve/veya protein asimetrisi hakkında bilgi vermektedir (18). DB'nin 24 saatlik uygulaması sonrasında lipit/protein oranı anlamlı derecede artmıştır. Çalışmamızda hem lipit hem protein miktarında artış gözlemlendiğinden lipit/protein oranındaki bu artış sistemdeki lipit miktarındaki artışın protein miktarındaki artıştan daha fazla olduğunu göstermektedir (37). Ayrıca bu artış DB uygulamasından 24 saat sonra karaciğer hücre zarlarının lipit asimetrisinde değişiklik olduğunu göstermektedir (47). DB uygulamasından 48 saat sonra incelenen karaciğer dokusunda lipit/protein oranında kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu durum 48 saatlik süre içinde lipit metabolizmasının normale dönmüş olmasından kaynaklanmış olabilir. GTX uygulanan gruplara bakıldığında hem 24 hem de 48 saatlik süre sonunda lipit/protein oranında anlamlı artışlar olduğu görülmüştür. Yani lipit/protein oranında gözlenen değişiklik DB uygulamasından 48 saat sonra normale dönmüş olmasına rağmen GTX uygulamasının etkileri 48 saat boyunca devam etmiştir.

Lipitler hücre membranının ana bileşenleri olduğundan onların düzeni ile ilgili parametreler ve akışkanlıkları, membran fonksiyonlarının normal bir şekilde sürdürebilmesi için önemlidir. Çalışmamızın sonuçları, DB ve GTX'in karaciğer dokusundaki membran düzeninde bir azalmaya sebep olduğunu ve bu değişikliğin 48 saatlik süre sonunda hala devam ettiğini göstermektedir (18). Membran düzeninde ortaya çıkan bu azalma, DB ve GTX tarafından oluşturulan oksidatif strese bağlı olabilir. Benzer şekilde, membran akışkanlığı tüm gruplarda anlamlı derecede artmıştır. Bu durum, membranda meydana gelen akışkanlık artışının 48 saatlik süre boyunca devam ettiğini göstermektedir (16). Bu artışın sebebi lipit kompozisyonunda meydana gelen değişimler olabilir.

Nükleik asitlerden kaynaklanan başlıca bantlar olan PO₂⁻ antisimetrik, PO₂⁻ simetrik ve C-N-C gerilme bantları analiz edildiğinde bütün bu bantların sinyal şiddetlerinde artış olduğu yani sistemdeki nükleik asit miktarında DB ve GTX uygulamasından sonra anlamlı bir artış meydana geldiği görülmüştür. DB ve GTX'in sistemdeki nükleik asit miktarı üzerinde meydana getirdiği artış, 48 saatlik uygulama süresi boyunca devam etmiştir. Bu sonuç DB ve GTX uygulamasının gen ekspresyonu seviyesinde bir değişiklik meydana getirdiğini göstermektedir ve protein konsantrasyonu ve yapısında tespit ettiğimiz bulgular ile uyum içindedir.

Bütün sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, DB'nin karaciğer dokusunda meydana getirdiği

lipit peroksidasyonu, protein ve nükleik asitlerin miktar, yapı ve konformasyonundaki, lipit düzen ve akışkanlığındaki değişiklikler, 48 saatlik süre içinde normale dönmezken, doymuş lipitler ve glikojen metabolizmasının normale dönmesi için bu süre yeterli olmuştur. DB'nin içindeki toksik madde olan GTX saf halde verildiğinde ise sonuçların tümü etken doz DB uygulamaları ile paralel çıkmış ancak 48 saatlik süre de normale dönme oranı DB verilmiş gruba göre daha az gözlenmiştir. Bu durum, DB'nin içindeki GTX miktarının saf olarak verilen konsantrasyona tam denk gelmemiş olmasından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca, DB'nin içinde GTX'ten başka antioksidan, antiradikal ve antimikrobiyal özellik gösteren birçok fenolik madde olduğu bilinmektedir (48). Bu fenolik maddeler, DB'nin içindeki GTX'in dokuda yarattığı toksik etkinin iyileşmesine katkı sağlamış olabilir.

Dolayısıyla, tüm bu faktörler GTX'in saf halinin etki süresinin daha uzun olmasına sebep olmuş olabilir.

Zehirlenmelere neden olan DB, bazı hastalıkların tedavisinde halk tarafından yaygın olarak kullanıldığı için, alternatif tıpta çok önemlidir. Sonuç olarak, 24 saatlik DB ve GTX uygulaması karaciğer dokusu üzerinde önemli toksik etkiler oluşturmaktadır ve bu toksik etkilerin hepsinin normale dönmesi için 48 saatlik süre yeterli değildir. Bu çalışmanın sonuçları, DB'nin etki süresini öğrenmek ve DB zehirlenmesi vakalarında hastaların tedavi ve taburcu sürelerini belirlemek için faydalı olabilir. Bu çalışma, DB'nin fare karaciğer dokusu üzerindeki zamana bağlı yapısal, kompozisyonel ve fonksiyonel etkilerini moleküler düzeyde ortaya koyan ilk çalışmadır.

KAYNAKLAR

1. Koca I, Koca AF. Poisoning by mad honey: A brief review. *Food Chem Toxicol.* 2007;45:1315-1318.
2. Yilmaz O, Eser M, Sahiner A et al. Hypotension, bradycardia and syncope caused by honey poisoning & Resuscitation. 2006;405-8.
3. Ullah S, Ullah Khan S, A.Saleh T, et al. Mad honey: uses, intoxicating/poisoning effects, diagnosis, and treatment. *RSC Adv* [Internet]. 2018;8(33):18635-46. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C8RA01924J>
4. Çetin N, Marçıl E, Kıldırın M, ve ark. Deli Bal ile Hepatotoksisite. *Türkiye Acil Tıp Derg.* 2009;(June 2009):84-6.
5. Gunduz A, Turedı S, M.Russel R, et al. Clinical review of grayanotoxin/mad honey poisoning past and present. *Clin Toxicol.* 2008;46(5):437-42.
6. Pişkin Ö, Arslan Y.D, Aydın B.G, ve ark. Clinical features and laboratory findings in mad honey intoxication: a retrospective study. *SiSli Etfal Hastan Tıp Bul / Med Bull Sisli Hosp.* 2017;(2):125-32
7. Gunduz A, Turedı S, Uzun H, et al. Mad honey poisoning. *Am J Emerg Med.* 2006;24(5):595-8.
8. Sahin H, Yıldız O, Kolaylı S. Effects of Mad Honey on Some Biochemical Parameters in Rats. *J Evidence-Based Complement Altern Med.* 2016;21(4):255-9.
9. Yuki T, Yamaoka K, Yakehiro M, et al. State-dependent action of grayanotoxin I on Na⁺ channels in frog ventricular myocytes. *J Physiol.* 2001;534(3):777-90.
10. Maejima H, Kinoshita E, Seyema I, et al. Distinct sites regulating grayanotoxin binding and unbinding to D4S6 of Na V 1.4 sodium channel as revealed by improved estimation of toxin sensitivity. *J Biol Chem.* 2003;278(11):9464-71.
11. Kafa B, Kırıl F. Streptozotocin ile Deneysel Diyabet Oluşturulan Ratlarda Karaciğer Enzimleri ve Serum Proteinlerindeki Elektroforetik Değişiklikler. 2006; 001.
12. Sari Dogan F, Ozaydin V, Incealtın O, et al. A case of acute hepatitis following mad honey ingestion. *Turkish J Emerg Med* [Internet]. 2015;15(4):185-6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tjem.2014.09.003>
13. Aşçıoğlu M, Özesmi Ç, Dogan P, et al. Effects of acute Grayanotoxin-I administration on hepatic and renal functions in rats. *Turkish J Med Sci.* 2000;30(1):23-7.
14. Silici S, Yonar M.E, Sahin H, et al. Analysis of grayanotoxin in Rhododendron honey and effect on antioxidant parameters in rats. *J Ethnopharmacol.* 2014;156:155-61.
15. Kukner A, Ilter G, Rasgele P, et al. The Effect of Rhododendron Honey on Mice Liver Tissue. *Int J Morphol.* 2016;34(3):842-7.
16. Cakmak G, Zorlu F, Severcan M, et al. Structural and Functional Variations in Rat Liver Microsomal. *Anal Chem.* 2011;2438-44.
17. Garip S, Gozen A.C, Severcan F. Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of Bacillus and Micrococcus isolates. *Food Chem* [Internet]. 2009;113(4):1301-7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.063>
18. Cakmak G, Severcan M, Zorlu F, et al. Structural and functional damages of whole body ionizing radiation on rat brain homogenate membranes and protective effect of amifostine. *Int J Radiat Biol.* 2016;92(12):837-48.

19. Garip S, Yapici E, Ozek N, et al. Evaluation and discrimination of simvastatin-induced structural alterations in proteins of different rat tissues by FTIR spectroscopy and neural network analysis. *Analyst*. 2010;135(12):3233–41.
20. P. Viccellio. Systemic poisonous plant intoxication. In: *Handbook of Medical Toxicology* Washington. 1993. p. 718.
21. Ozhan H, Akdemir R, Yazıcı M, et al. Cardiac emergencies caused by honey ingestion: A single centre experience. *Emerg Med J*. 2004;21(6):742–4.
22. Jansen S, Kleerekooper I, Hofman Z, et al. Grayanotoxin poisoning: “Mad honey disease” and beyond. *Cardiovasc Toxicol*. 2012;12(3):208–15.
23. Yaylaci S, Ayyıldız O, Aydın E, et al. Is there a difference in mad honey poisoning between geriatric and non-geriatric patient groups? *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(23):4647–53.
24. Binnetoglu E, Dindar S, Şengül E, ve ark. Mad honey poisoning; how much observe? *Abant Med J*. 2012;1(1):32–4.
25. Cakmak-Arslan G, Emir S, Goc-Rasgele P, et al. Investigation of the Toxic Effects of Rhododendron Honey on Mouse Cardiac Muscle Tissue Lipids at Molecular Level. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2020; 26(2): 287-294.
26. Cakmak-Arslan G, Haksoy H, Goc-Rasgele P, et al. Determination of the dose-dependent toxic effects of mad honey on mouse liver using ATR-FTIR spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2020; 228: 1-9.
27. Silici S, Doğan Z, Sahin H, et al. Acute effects of grayanotoxin in rhododendron honey on kidney functions in rats. *Environ Sci Pollut Res*. 2016;23(4):3300–9.
28. Yonar D, Ocek L, Tiftikcioglu BI, Zorlu Y, Severcan F. Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis diagnosis from cerebrospinal fluids via Fourier transform infrared spectroscopy coupled with multivariate analysis. *Sci Rep [Internet]*. 2018;(April 2017):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19303-3>
29. Kardas M, Gozen A.G, Severcan F. FTIR spectroscopy offers hints towards widespread molecular changes in cobalt-acclimated freshwater bacteria. *Aquat Toxicol [Internet]*. 2014;155:15–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.027>
30. Diem M, Boydston-White S. Infrared spectroscopy of cells and tissues: shining light onto a novel subject. *Appl Spectrosc*. 1999;53(4).
31. Cakmak G, Togan I, Uğuz C, et al. FT-IR spectroscopic analysis of rainbow trout liver exposed to nonylphenol. *Appl Spectrosc*. 2003;57(7):835–41.
32. Elibol-Can B, J.Dogru E, Severcan M, et al. The effects of short-term chronic ethanol intoxication and ethanol withdrawal on the molecular composition of the rat hippocampus by FT-IR spectroscopy. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011;35(11):2050–62.
33. Severcan F, Sahin I, Kazancı N. Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes-evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2005;1668(2):215–22.
34. Cakmak G, Togan I, Severcan F. 17β-Estradiol induced compositional, structural and functional changes in rainbow trout liver, revealed by FT-IR spectroscopy: A comparative study with nonylphenol. *Aquat Toxicol*. 2006; 77:53-63.
35. Demir P, B.Akkas S, Severcan M, et al. Ionizing radiation induces structural and functional damage on the molecules of rat brain homogenate membranes: a Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study. *Appl Spectrosc*. 2015;69(1):154–64.
36. Cakmak G, M.Miller L, Zorlu F, et al. Amifostine, a radioprotectant agent, protects rat brain tissue lipids against ionizing radiation induced damage: An FTIR microspectroscopic imaging study. *Arch Biochem Biophys [Internet]*. 2012;520(2):67–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2012.02.012>
37. Turker S, Severcan M, Ilbay G, et al. Epileptic seizures induce structural and functional alterations on brain tissue membranes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr [Internet]*. 2014;1838(12):3088–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.08.025>
38. Toyran N, Zorlu F, Severcan F. Effect of stereotactic radiosurgery on lipids and proteins of normal and hypoperfused rat brain homogenates : A Fourier transform infrared spectroscopy study. *Int J Radiat Biol*. 2005; 81:12, 911-918. Available from: <https://doi.org/10.1080/09553000600571022>
39. Eraslan G, Kanbur M, Karabacak M, et al. Effect on oxidative stress, hepatic chemical metabolizing parameters, and genotoxic damage of mad honey intake in rats. *Hum Exp Toxicol*. 2018;37(9):991–1004.
40. De Zwart L.L, N.Meerman J.H, M.Commandeur J, et al. Biomarkers of free radical damage - markers for atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(1–2):202–26.
41. Moore D.J, Sills H.R, Mendelsohn R. Peroxidation of erythrocytes: FTIR spectroscopy studies of extracted lipids, isolated membranes, and intact cells. *Biospectroscopy*. 1995;1(2):133–40.
42. Gu J, Zhang Y, Xu D, et al. Ethanol-induced hepatic steatosis is modulated by glycogen level in the liver. *J Lipid Res*. 2015;56(7):1329–39.

43. Peng C, Chiappini F, Kascakova S, et al. Vibrational signatures to discriminate liver steatosis grades. *Analyst*. 2015;140:1107–18.
44. Melin A, Perromat A, Deleris G. Pharmacologic Application of Fourier Transform IR Spectroscopy : In Vivo Toxicity of Carbon Tetrachloride on Rat Liver. *Biopolymers*. 2000;57:160–168.
45. Gurbanov R, Bilgin M, Severcan F. Restoring effect of selenium on the molecular content, structure and fluidity of diabetic rat kidney brush border cell membrane. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2016;1858(4):845–54.
46. Davies K.J Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals. *J Biol Chem* [Internet]. 1987;262(20):9895–901. Available from: <http://www.jbc.org/content/262/20/9895.full.pdf>
47. Ozek S, Tuna S, Erson-Benson A, et al. Characterization of microRNA-125b expression in MCF7 breast cancer cells by ATR-FTIR spectroscopy. *Analyst*. 2010;135(12):3094–102.
48. Silici S, Sagdic O, Ekici L. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of *Rhododendron* honeys. *Food Chem* [Internet]. 2010;121(1):238–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.078>.