

29773

**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**3-METİLKOLANTREN'İN SIÇANLARIN YAŞLANMA
SÜRECİNDE RADİKAL SÜPÜRÜCÜ ENZİMLER VE TOPLAM
GLUTATYON DÜZEYİNE OLAN ETKİSİ**

İsmet Yılmaz

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**MALATYA
1995**

**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**3-METİLKOLANTREN'İN SIÇANLARIN YAŞLANMA
SÜRECİNDE RADİKAL SÜPÜRÜCÜ ENZİMLER VE TOPLAM
GLUTATYON DÜZEYİNE OLAN ETKİSİ**

İsmet Yılmaz

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

“ Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne”

İş bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan :



Prof.Dr. Engin M.GÖZÜKARA

Üye :



Doç.Dr. Kayahan FIŞKIN

Üye :

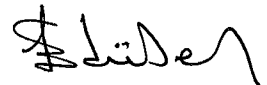
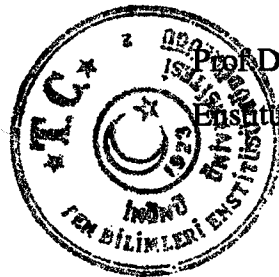


Yrd.Doç. Dr. A. Alev KARAGÖZLER

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...26./12/1995



Dr. Eşref Yüksel
Enstitü Müdürü

Eşim Zeynep ve Kızım Rumeysa'ya

ÖZET

Yüzyıllar boyunca canlılarda oksijenin görevi solunumdaki fonksiyonu ile özdeşleş tirilmiştir. Oksijenli solunumda amaç fazla enerji elde etmek ve bu iş için de glukozu yakıt maddesi olarak hücreye alabilmektir. Glukoz'un su ve CO₂'e kadar parçalandığı bu işlem sırasında, hidrojen atomları elektronlarla birlikte (O₂) molekülüne taşınır ve bu sayede su oluşur. Tüm hücrelerde süregelen olan bu işlem esnasında moleküler oksijenin kısmi indirgenmesi söz konusu olabilmektedir. Bunun sonucunda, süperoksit, tekil oksijen, hidroksil , hidrojen peroksit vb. adlar alan reaktif oksijen türevleri olarak adlandırılan radikaller oluşmaktadır. Bu radikallerin tümü biyolojik sistemler için zararlıdır. Çünkü bu radikaller, protein inaktivasyonuna, DNA hasarına ve lipid peroksidasyonu gibi oksidatif zararlara neden olup, hücrenin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü bozarak hücreye zarar verirler.

Vücudumuzu oluşturan her hücremizde adı geçen bu radikallere karşı Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon redüktaz (GSSGR) vb. enzimlerden oluşan radikal süpürücü enzim sistemi dediğimiz bir savunma mekanizması ile A, E, C gibi antioksidatif vitaminlerden oluşan yardımcı savunma mekanizmaları mevcuttur. Bu savunma mekanizmaları oksidatif stres yaratan kirli hava, sigara, radyasyon gibi faktörlerle beraber dış ve iç etkenler karşısında bazı durumlarda yetersiz kalmaktadırlar. Bunun sonucunda kanser, diabetes mellitus, aterosklerozis, akciğer rahatsızlıkları, kas ve göz hastalıkları gibi yaşlanmaya bağlı olan dejeneratif rahatsızlıklar oluşmaktadır.

Çalışmamızın konusu, yaşlanma ve karsinogenik ajanların indüksiyonu sonucunda antioksidatif savunma mekanizmasında meydana gelebilecek değişikliklerin ortaya konması, yaşlanma ve karsinogenezisin enzimatik ilişkisinin araştırılması ve sonuçta antioksidatif savunma mekanizmasında rol alan radikal süpürücü enzimlerden SOD,

Se-bağımlı GSH-Px, Se-bağımsız GSH-Px, CAT enzim aktivitelerinin ve toplam Glutasyon düzeyindeki değişimin araştırılmasıdır.

Yapılan deneyler sonucunda, CAT, Se-bağımlı GSH-Px ve Se-bağımsız GSH-Px aktivitelerinde 3-MC indüklenmesi ve yaşlanmaya bağlı olarak bir artma ($P < 0.01$) fakat SOD aktivitesi ve toplam glutasyon miktarında ise belirgin bir azalma saptanmıştır ($0.001 < P < 0.01$).



ABSTRACT

The role of oxygen in living things as a function of respiration has been known for centuries. The aim of oxygen respiration is to obtain excess energy by taking glucose as a fuel source inside the cell. During the decomposition of glucose to water and CO₂, hydrogen atoms with electrons are carried to molecular oxygen and as a result water is formed. This phenomena plays an important role in all cells, during this period partial reduction of oxygen could take place. As a result, reactive oxygen derivatives named as süperoxide, singlet oxygen, hydrogen peroxide radicals, etc. would be produced. These radicals are extremely harmful to all biological systems as they might cause oxidative destruction as protein inactivation, DNA destruction and lipid peroxidation also the cell structure and functionality may be destroyed and damaged.

In the every cell that formes our body, against to previously reported these radicals, there are defence mechanism named radical scavenger enzyme system consist of Superoxide dismutase (SOD), Catalase(CAT), Glutathione peroksidase (GSH-Px), Glutathione reductase (GSSGR) etc. enzymes and auxiliary defence mechanism consist of antioxidative vitamins such as A,E,C. The defence mechanism could be insufficient due to inner and outer effect, oxidative stress forming air pollution, smoking, radiation etc. As a result, degenerative diseases such as cancer, diabetes mellitus, atherosclerosis, lung diseases, muscle and eye irritation could occur which are mostly dependent on aging

It is the aim of this study, to get an insight to differences in antioxidative defence mechanism, which could be the results of the aging and carcinogenic agents induction and to investigate the enzymatic relationship between aging and carcinogenesis, next, to determine the role of radical scavenger in antioxidative defence mechanism such as

SOD, Se-dependent GSH-Px, Se-independent GSH-Px and CAT by determining enzymatic activity and then to search the total glutathione level difference.

Experimental results showed that, CAT, Se-dependent GSH-Px and Se-independent GSH-Px activities increase ($P < 0.01$) depending upon 3-MC induction and aging. However significant decrease in SOD activity and total glutathione level are also observed ($0.001 < P < 0.01$).



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde yardımlarını esirgemeyen, tüm konularda desteğini içtenlikle ve titizlikle sürdürerek hoşgörüsü , sabrı ve de bilgisi ile çalışmalarına ışık tutan, doktora danışmanlığımın kabulü sırasındaki her türlü zorluklara katlanarak bana bu tez konusunu öneren, çok büyük yardım ve ilgilerini gördüğüm danışman hocam Doç.Dr.Kayahan FIŞKIN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın deneysel aşamalarının gerçekleşmesinde, Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji laboratuvarını kullanmama imkan vererek katkıda bulunan Biyoloji Bölüm Başkanlığına ve tüm elemanlarına teşekkür ederim.

Deney materyali olarak kullandığımız sıçanların temininde büyük kolaylık sağlayan İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Merkezi (DETAM) başkanlığına ve hayvanların üretilmesi ve beslenmesi aşamalarında büyük yardımlarını gördüğüm Yrd. Doç.Dr. Muharrem BALKAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tüm çalışmalar boyunca desteğini gördüğüm Kimya Bölüm Başkanlığına , hocalarıma ve Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma, Ayrıca tezin yazımı esnasında bana yardımcı olan Yrd. Doç.Dr. Turgay Seçkin, Arş. Grv. Dr. Bülent Alıcı ve Arş.Grv.Dr. İsmail Özdemir'e teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmayı İ.Ü.A.F. / 92/09 kod no'lu projeyle destekleyen İnönü Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı başkanlığına teşekkür ederim.

Son olarak, doktora öğrenimim boyunca bana sabırla katlanan ve manevi desteğini gördüğüm aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1. GİRİŞ.....	1
1.1. Moleküler Oksijen.....	1
1.2. Serbest Oksijen Radikalleri.....	6
1.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$).....	6
1.2.2. Hidroksil Radikali (HO^{\cdot})	10
1.2.3. Tekil (Singlet) Oksijen (1O_2)	13
1.2.4. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	15
1.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu.....	18
1.3.1. Fagositozda Serbest Oksijen Radikallerinin Üretimi.....	25
1.4. Serbest Oksijen Radikallerinin Yaptığı Hasarlar.....	27
1.4.1. Membran Lipidlerine Etkileri	27
1.4.2. Proteinlere Etkileri	31
1.4.3. Karbohidratlara Etkileri	32
1.4.4. Nükleik Asitlere Etkileri.....	34
1.5. Serbest Oksijen Radikallerinin Neden Olduğu Patolojik Durumlar.....	36
1.5.1. Serbest Oksijen Radikalleri Kanser İlişkisi	36
1.5.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Yaşlanmaya Etkisi	42
1.5.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Ateroskleroz ve Reperfüzyon- İskemideki Fonksiyonları.....	46
1.5.4. Diabette Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü.....	49
1.5.5. Serbest Oksijen Radikalleri ve Göz Hastalıkları.....	51
1.5.6. Serbest Oksijen Radikalleri ve Akciğer Rahatsızlıkları.....	52
1.6. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Oluşturulan Hücrel Savunma Mekanizması.....	52
1.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD, Süperoxide Oxidoredüctase : EC 1.15.1.1.).....	56

1.6.2. Katalaz (CAT: H ₂ O ₂ Oxidoreductase: EC 1.11.1.6).....	59
1.6.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px: Glutathione: H ₂ O ₂ Oxidoreductase EC 1.11.1.9).....	61
1.6.4. Glutatyon-S-Transferazlar (GST, EC 2.5.1.18)	62
1.6.5. Glutatyon Redüktaz (GSSGR, EC 1.6.4.2)	63
1.7. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	63
1.7.1. Vitaminler.....	63
1.7.1.1. E Vitamini	63
1.7.1.2. C Vitamini (Askorbik asit)	65
1.7.1.3. Karatenoidler ve A Vitamini.....	67
1.8. Enzimatik Olmayan Diğer Antioksidanlar.....	68
1.8.1. Melatonin	68
1.8.2. Glutatyon	68
1.9. Çalışmanın Amacı.....	70
2. DENEYSEL BÖLÜM	71
2.1. Materyal ve Yöntem	71
2.1.1. Deneyleerde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	71
2.1.2. Materyal	71
2.1.3. Metod	71
2.2. Protein Tayini	72
2.3. Enzim Aktivite Tayinleri	74
2.3.1. Katalaz Aktivite Tayini ve Hesaplanması	74
2.3.2. Se-Bağımlı ve Se- Bağımsız Glutatyon Peroksidaz Aktivite Tayini ve Hesaplanması	75
2.3.3. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini ve Hesaplanması	76
2.3.4. Toplam Glutatyon (GSH ve GSSG) Miktar Tayini Hesaplanması...	78
2.4. İstatiksel Hesaplamalar	79
3. BULGULAR.....	80

3. BULGULAR.....	80
3.1. Katalaz Enzim Aktivitesi Sonuçları	80
3.2. Se-Bağımlı GSH-Px Aktivitesi Sonuçları	83
3.3. Se-Bağımsız GSH-Px Aktivitesi Sonuçları.....	86
3.4. SOD Aktivitesi Sonuçları	89
3.5. Toplam Glutasyon Miktarı Sonuçları	92
4. SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI	95



ŞEKİLLER DİZİNİ**Sayfa**

Şekil 1.1. Moleküler Oksijen Kaynaklı Reaktif Ara ürünler	2
Şekil 1.2. Moleküler Oksijenin Aktivasyonu	3
Şekil 1.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşum Mekanizması	4
Şekil 1.4. Oksijenin Tekil Formu	5
Şekil 1.5. Serbest Oksijen Radikallerinin Farklı Şekillerde Oluşumları	6
Şekil 1.6. Elektron Transport Zinciri	9
Şekil 1.7. Moleküler ve Tekil Oksijenin Son Orbitaldeki e ⁻ Dağılımları.....	13
Şekil 1.8. Hidrojen Peroksitin Rol aldığı Metabolik Yollar	17
Şekil 1.9. Hidroperoksil Radikalinin Tepkime Mekanizması.....	18
Şekil 1.10. Sitokrom P-450 ve Peroksil Radikalinin Neden Olduğu (+) BP-7,8 diol'ün epoksidasyonunun Sterokimyası	24
Şekil 1.11. Araşidonik Asit Metabolizmasında Serbest Oksijen Radikallerinin Sentezi	24
Şekil 1.12. HO ₂ ⁻ Radikali Tarafından Başlatılan Lipid Peroksidasyonu.....	28
Şekil 1.13. Linolenik Asitden Malondialdehit ve Diğer Peroksidasyon Ürünlerinin Oluşumu	29
Şekil 1.14. Guaninin Hidroksilasyonu	37
Şekil 1.15. NO Aracılığıyla Guanilat Siklaz Enziminin Aktivasyonu	39
Şekil 1.16. Kimyasal Karsinogenezisin Oluşum Mekanizması	41
Şekil 1.17. İskemi-Reperfüzyonda o-LDL ve Köpük Hücre Oluşumu	48
Şekil 1.18. Diabetde Oluşan Endotel Hasarı	50
Şekil 1.19. Antioksidatif Savunma Mekanizması	53
Şekil 1.20. Ksantin Oksidaz Sistemi	56
Şekil 1.21. Süperoksit Radikalinin Dismutasyon Mekanizması	57
Şekil 1.22. Katalaz Enziminin Etki Mekanizması	60
Şekil 1.23. GSH-Px Enziminin Katalitik Mekanizması	62
Şekil 1.24. α- Tokoferol	64

Şekil 1.25. Vitamin E'nin Antioksidatif Etki Mekanizması	65
Şekil 1.26. C Vitamininin Genel Formülü	66
Şekil 1.27. C Vitamininin Oksidasyonu	66
Şekil 1.28. A Vitamininin Kimyasal Yapısı	67
Şekil 1.29. Glutasyonun Okside ve Redükte Formunun Genel Yapısı	69
Şekil 3.1.1. 2 saatlik 3-MC İndüksiyonundan Sonra Katalaz Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi	80
Şekil 3.1.2. 8 saatlik 3-MC İndüksiyonundan Sonra Katalaz Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi	81
Şekil 3.1.3. 12 saatlik 3-MC İndüksiyonundan Sonra Katalaz Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi	82
Şekil 3.2.1. 2 saatlik 3-MC İndüksiyonundan Sonra Se-Bağımlı GSH-Px Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi	83
Şekil 3.2.2. 8 saatlik 3-MC İndüksiyonundan Sonra Se-Bağımlı GSH-Px Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi	84
Şekil 3.2.3. 12 saatlik 3-MC İndüksiyonundan Sonra Se-Bağımlı GSH-Px Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi	85
Şekil 3.3.1. 2 saatlik 3-MC İndüksiyonundan Sonra Se-Bağımsız GSH-Px Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi	86
Şekil 3.3.2. 8 saatlik 3-MC İndüksiyonundan Sonra Se-Bağımsız GSH-Px Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi	87
Şekil 3.3.3. 12 saatlik 3-MC İndüksiyonundan Sonra Se-Bağımsız GSH-Px Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi	88
Şekil 3.4.1. 2 saatlik 3-MC İndüksiyonundan Sonra SOD Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi	89
Şekil 3.4.2. 8 saatlik 3-MC İndüksiyonundan Sonra SOD Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi	90
Şekil 3.4.3. 12 saatlik 3-MC İndüksiyonundan Sonra SOD Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi	91

Şekil 3.5.1. 2 saatlik 3-MC İndüksiyonundan Sonra Toplam Glutasyon Miktarının Yaşlanmayla Değişimi	92
Şekil 3.5.2. 8 saatlik 3-MC İndüksiyonundan Sonra Toplam Glutasyon Miktarının Yaşlanmayla Değişimi	93
Şekil 3.5.3. 12 saatlik 3-MC İndüksiyonundan Sonra Toplam Glutasyon Miktarının Yaşlanmayla Değişimi	94



TABLolar DİZİNİ**Sayfa**

Tablo 1. Serbest Radikal Oluşumu.....	19
Tablo 2. Serbest Radikal Hasarı.....	19
Tablo 3. Belli Başlı Oksijen Radikali Kaynakları.....	19
Tablo 4. 4-hidroksinonenal'in Önemli Biyokimyasal Özellikleri.....	30
Tablo 5. Bazı Aminoasitlerin Oksidasyon Ürünleri.....	33
Tablo 6. Okside Olmuş Nükleobazlar.....	35
Tablo 7. Yaşlanmaya Bağlı Olarak Oluşan Mitokondriyal Değişim.....	45
Tablo 8. Endojen Kaynaklı Antioksidanlar.....	54
Tablo 9a. Eksojen Kaynaklı Antioksidanlar.....	55
Tablo 9b. Eksojen Kaynaklı Antioksidanlar.....	56



SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP: Adenozin difosfat

ATP: Adenozin trifosfat

GTP: Guanozin trifosfat

FAD: Flavin adenin dinükleotid (okside)

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotid (redükte)

NADPH: β - Nikotinamid adenin dinükleotid 3'-fosfat (redükte)

cAMP: Siklik adenozin monofosfat

cGMP: Siklik guanozin monofosfat

MPO : Miyeloperoksidaz

EPO : Eozinofil peroksidaz

PUFA: Poli doymamış yağ asidi

MDA : Malondialdehid

EDTA: Etilen diamintetraasetikasit

DTPA :Dietilen triaminpentaasetikasit

DTNB : 5-5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit)

BSA : Bovine Serum Albumin

3-MC : 3-Metilkolantren

DMSO : Dimetilsülfoksid

PAH : Polisiklik aromatik hidrokarbon

LDL : Low Density Lipoprotein

EDRF : Endothelium-derived relaxing factor

PDGF : Platelet kaynaklı büyüme faktörü

TXA₂ : Tromboksan A₂

5-HT : 5-hidroksitriptamin

PAI : Plasminojen aktivatör inhibitörü

TF : Doku faktörü

PAF : Platelet Activating Factor

PBS: Phosphate Buffer Saline (Fosfat tamponu)

BLM: Bleomisin

$^1\text{O}_2$: Tekil Oksijen

$\text{O}_2^{\cdot -}$: Süperoksit anyon radikali

HO^{\cdot} : Hidroksil Radikali

HO_2^{\cdot} : Hidroperoksil radikali

$\text{O}_2^{\cdot -}$: Peroksit radikali

SOD : Süperoksit Dismutaz

GSH-Px : Glutatyon Peroksidaz

CAT : Katalaz

GSSGR: Glutatyon Redüktaz.

GSSG : Okside Glutatyon (Toplam Glutatyon)

GSH : Redükte Glutatyon

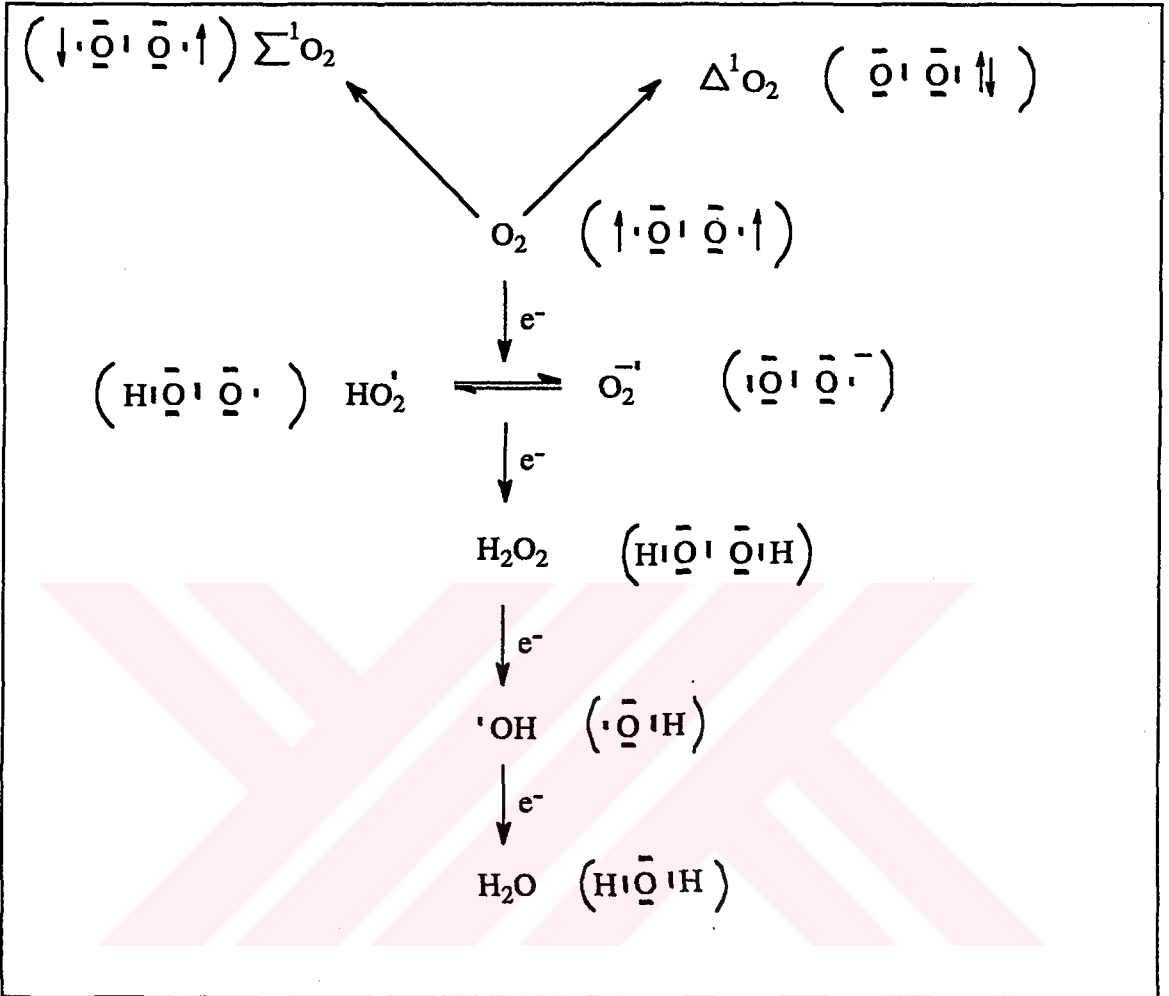
cyt-P 450: Sitokrom P450

I. GİRİŞ:

1.1. MOLEKÜLER OKSİJEN :

Moleküler oksijen bütün canlılar için toksik etkili olup, atmosferdeki değerinin % 20 artması ile toksisite kendini gösterir. Canlılar için oksijenin önemi iki temel fonksiyonu görmesinden kaynaklanır. Bunlardan birincisi; oksijenin yapısal bir fonksiyonu olup canlı organizmaları oluşturan moleküllerin yapısına katılması ve besin kaynağı olan maddelerin yapısındaki ana elementlerden biri olmasıdır. Oksijenin yapısal görevi bütün canlılar için geçerli olup, her canlının yapısındaki 100 atomdan yaklaşık 25 tanesi oksijen atomudur (1).

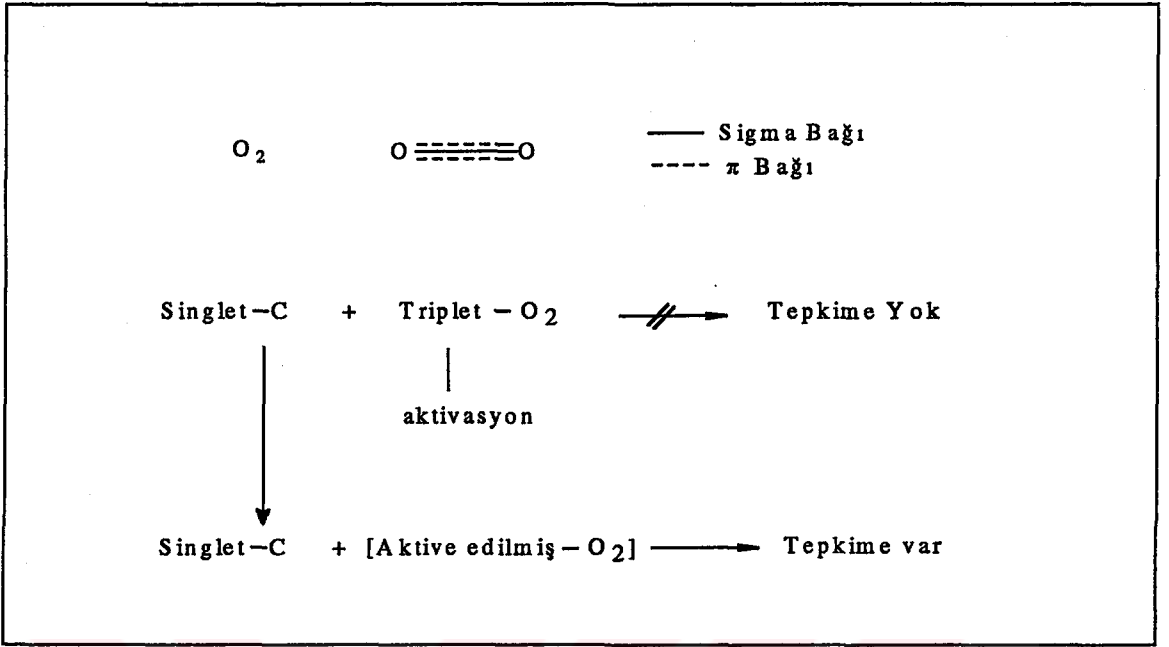
Canlıların moleküler oksijene olan gereksinimi ve toleransına göre aerobik, anaerobik, ve fakültatif anaerobik oldukları bilinir. Zorunlu aeroplarda oksijene acil ve zorunlu bağımlılık, elektron transport sisteminde son elektron alıcısı olarak oksijeni kullanmalarından ileri gelir. Zorunlu anaeroplarda ise moleküler oksijen varlığına tolerans gösterilmez. Fakültatif anaeroplarda oksijenli ortamda yaşayabilirlerse de ya oksijeni hiç kullanmazlar veya oksijeni sınırlı bir düzeye kadar metabolize ederler, ancak hiçbir zaman oksido-redüksiyon tepkimelerinde oksijeni son elektron alıcısı olarak kullanmazlar (1, 2). Aerobik koşullarda yaşayan canlılar için, oksidatif fosforilasyonun ATP sağlaması yanında sayısız faydalarıyla beraber çok önemli tehlikeleri de vardır. Oksidatif fosforilasyonda dioksijen molekülünün 4 elektronluk indirgenmesi ile H₂O nun oluşması esastır. Mitokondriyal elektron akışının küçük bir kısmında (%3-5) çeşitli fizyolojik ve fotofizyolojik durumlarda olduğu gibi oksijenin kısmi indirgenmesi gerçekleşmektedir. Dioksijenin bir, iki, üç elektronluk kısmi indirgenmesi sonucunda sırasıyla O₂^{-•}, H₂O₂ ve HO^{-•} radikalleri oluşmaktadır (2). Tekil oksijenle beraber belirtilen bu radikaller, potansiyel hasar etkeni ürünler olarak sınıflandırılıp reaktif oksijen türleri, reaktif oksijen ara ürünleri veya serbest oksijen radikalleri olarak isimlendirilirler (şekil 1.1).



Şekil 1.1. Moleküler oksijen kaynaklı reaktif ara ürünler (3).

Moleküler oksijenin canlılardaki toksik etkisinin gerçek nedeni oksijenin aktif türleri olan serbest oksijen radikalleridir. Moleküler oksijenin tek elektron ile kısmi indirgenmesi sonucu oksijenin reaktif türleri olan serbest oksijen radikalleri oluşur ve bu radikaller oksijenin toksik etkisinin tamamından sorumludur (1, 4).

Oksijenin atmosferik formu, triplet temel hal düzeyinde bulunan ve reaktif olamayan biradikal şeklindedir (5). Diğer atom veya moleküllerle reaksiyona girdiğinde tekil temel hali olan aktif duruma geçer (şekil 1.2).

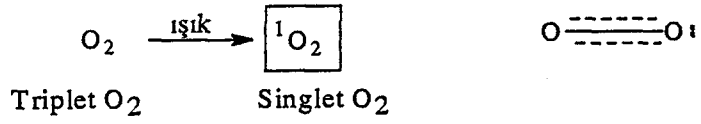


Şekil 1.2. Moleküler oksijenin aktivasyonu (6).

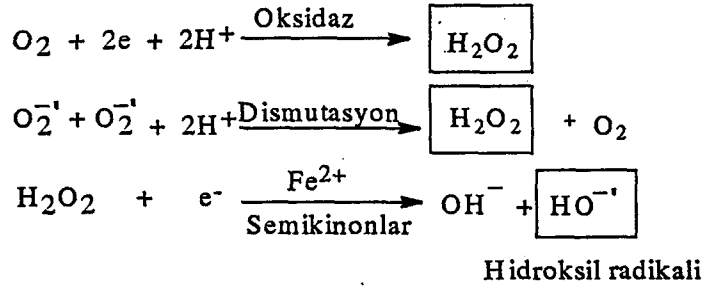
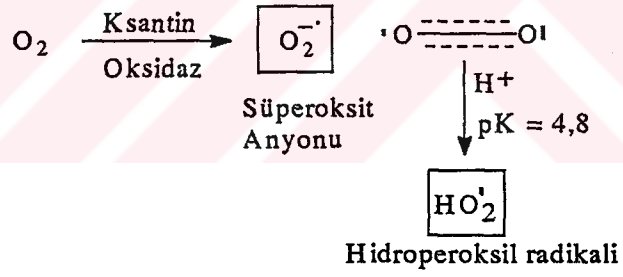
Bu prosesinde ya fotodinamik yolla fiziksel olarak çok reaktif bir ürün olan ve kararlı olmayan elektron çifti içeren oksijenin tekil formu (${}^1\Delta_g$, 1O_2) veya kimyasal yolla üretilen süperoksit ve onun indirgenme ürünleri olan H_2O_2 ve hidroksil radikali gibi ürünler oluşabilir (şekil 1.3).

Bu radikallerin başlıcaları; süperoksit anyon radikali ($O_2^{-\bullet}$), hidroksil radikali ($HO^{-\bullet}$) singlet (tekil) oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroperoksit (HO_2^\bullet) ve peroksit (O_2^{2-}) radikalidir (4, 7) (şekil 1.4).

a) Fiziksel Olarak:



b) Kimyasal İndirgenme:

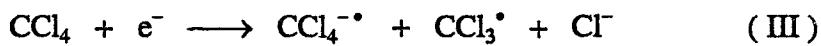


Şekil 1.3. Serbest oksijen radikallerinin oluşum mekanizması (6).

$\sigma^* 2p$	○	○	○	○	○
$\pi^* 2p$	↑ ↑	↑↓ ○	↑↓ ↑	↑↓ ↓	↑ ↓
$\pi 2p$	↑↓ ↑↓	↑↓ ↑↓	↑↓ ↑↓	↑↓ ↑↓	↑↓ ↑↓
$\sigma 2p$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
$\sigma^* 2s$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
$\sigma 2s$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
$\sigma^* 1s$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
$\sigma 1s$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
	Oksijen molekülünün temel hali	Tekil oksijen ${}^1\Delta_g \text{O}_2$ (delta)	Süperoksit O_2^-	Peroksit O_2^{2-}	Tekil oksijen ${}^1\Sigma_g^+ \text{O}_2$ (sigma)

Şekil 1.4. Oksijenin Tekil Formu (8).

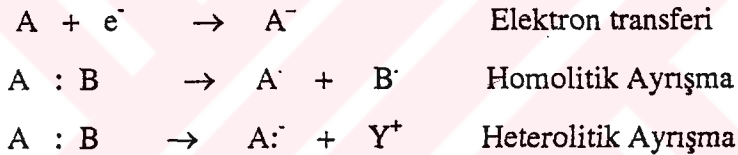
Serbest radikaller, ortaklanmamış elektrona sahip molekül veya molekül fragmentleri olarak tanımlanabilir. Ortaklanmamış elektronlar serbest radikallere paramanyetizm gibi karakteristik özellikler kazandırdıklarından dolayı bu radikallerin kimyasal reaktiviteleri genelde yüksektir. Ortaklanmamış elektron varlığı serbest radikallerde iyonun üstüne koyu bir nokta ile gösterilmektedir. (R^\bullet) Serbest radikaller; pozitif, negatif veya elektriksel olarak nötral olabilirler (9):



- I. tepkimede fenotiyazin tipi ilaç olan prometazin, hidroksil radikali tarafından prometazin radikal katyonuna yükseltgenmektedir.
- II. tepkimede ise oksijen, süperoksit radikal anyonuna indirgenmektedir.
- III. tepkimede ise CCl_4 den CCl_3 (triklorometil) radikalinin oluşumu sözkonusudur.

Serbest oksijen radikalleri 3 yolla oluşur (şekil 1.5):

- 1) Elektron transferi : Normal bir moleküle tek bir elektron eklenir ve bir tane serbest radikal meydana gelir.
- 2) Homolitik parçalanma : Normal bir molekülde kovalent bağın ayrışması ile iki tane serbest radikal oluşur.
- 3) Heterolitik parçalanma: Normal bir molekülden tek bir elektron kaybedilerek iki iyon meydana gelir.



Şekil 1.5. Serbest oksijen radikallerinin farklı şekilde oluşumları (10).

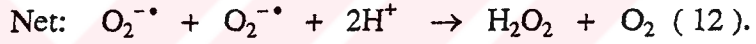
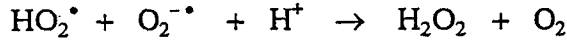
Serbest oksijen radikalleri, hem çevresel etkenler, hemde organizmadaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan radikallerdir. Radikalleri indükleyen çeşitli faktörler vardır ve bunlar organizmada eksojen ve endojen kaynaklı olarak oluşurlar (11).

1.2. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ:

1.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$):

Moleküler Oksijen; dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu elektronlar paylaşılmadığında ayrı ayrı orbitallerde bulduklarında ve spinleri aynı

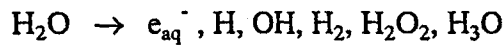
yönde olduğu zaman en düşük enerji seviyesindedirler. Bu dış orbitallerden her biri birer elektron daha kabul edebilir. Orbitalerin tek elektron alması ile süperoksit anyonu ($O_2^- \cdot$), iki elektron alması ile peroksil anyonu (O_2^{2-}) oluşur. Süperoksit radikali bir oksitleyici gibi davranarak bir elektron daha alabilir, böylece oluşan peroksil anyonu ortamdan iki proton alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturabilir. Veya süperoksit radikali aldığı elektronu başka bir elektron alıcıya vererek tekrar oksijene oksitlenebilir ve böylece bir indirgeyici (redüktör) olarak davranabilir. Yada iki süperoksit radikali birbiri ile etkileşerek biri oksitlenirken diğeri ise indirgenir ve böylece H_2O_2 ve O_2 meydana gelir:



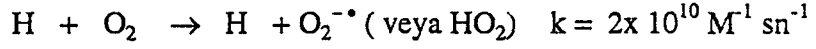
Süperoksit radikallerinin ortamdan temizlendiği bu tepkimeye “ dismutasyon tepkimesi “ denir (1). Süperoksit radikali membranları kolayca geçemediğinden belirli bir tahrip edici etkisi yoktur. Doğada çoğunlukla redüktif ve H_2O_2 kaynağı olarak iş görür. Nitrik oksit (NO) ile reaksiyonu fizyolojik bir öneme sahiptir. Canlılarda süperoksit radikallerinin oluşumu farklı nedenlerden dolayı gerçekleşmektedir. Bu nedenlerin başlıcaları:

1) Çeşitli kimyasal bileşikler ve fiziksel etkenler canlılarda süperoksit radikali oluşumuna neden olurlar. Bazı durumlarda görünür bölge ışınları da dahil olmak üzere özellikle bütün yüksek enerjili elektromanyetik ışınlar oksijenli ortamdan süperoksit radikalleri oluştururlar. Yüksek enerjili ışınlardan özellikle beta, gama ve x ışınları süperoksit radikalleri yanısıra , doğrudan diğer radikallerin oluşumunda sağlarlar. Böyle bir ışın sulu ortamdan geçince suyun radyolitik parçalanmasına neden olur.

$h\nu$



Sulu ortam oksijen içeriyorsa, aşağıdaki tepkimelerle süperoksit radikali kolaylıkla oluşur:



Organik moleküllerin bulunduğu sulu ve oksijenli ortamda radikal oluşumu iki kat daha artar. Canlı bir sistem susuz ve oksijensiz düşünülmemiyeceğine göre yüksek enerjili ışınların aynı etkiyi daha kolay göstereceği açıktır (1).

2) Canlı organizmalar radikal oluşumuna neden olan çevre koşullarından tümüyle izole edilseler bile ; eğer moleküler oksijeni metabolize ediyorsa , organizmalarındaki pek çok tepkimelerle $\text{O}_2^{\cdot -}$ üretirler. Canlılarda $\text{O}_2^{\cdot -}$ üreten başlıca önemli tepkimeler şunlardır:

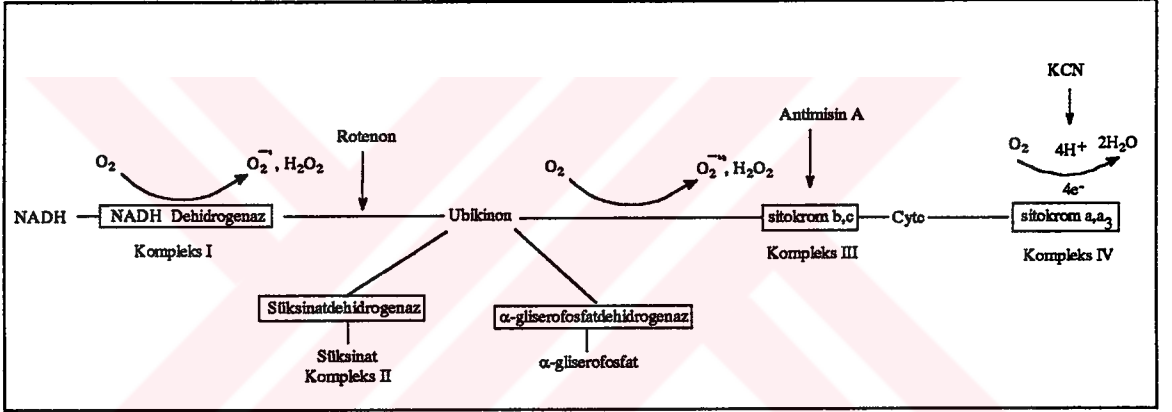
a) Hidrokinonların, lökoflavinlerin ve katekolaminlerin, tiollerin , indirgenmiş boyaların, tetrahidropteridin, ferrodoksin ve hemoproteinlerin otooksidasyonu tepkimelerinde $\text{O}_2^{\cdot -}$ üretilebilir (13).

b) Çeşitli enzimatik tepkimelerde $\text{O}_2^{\cdot -}$ oluşur. Bu enzimlere ksantin oksidaz, dihidroorotat dehidrogenaz ve bir grup flavoprotein dehidrogenazlar örnek verilebilir.

c) Bazı oksidaz ve hidroksilaz enzimleri de katalitik etkileri sırasında ara ürün olarak $\text{O}_2^{\cdot -}$ üretirler. Bunlara mikrozomal hidroksilazlar, triptofan dioksigenaz, galaktoz oksidaz örnek verilebilir.

d) Canlılarda süperoksit radikallerinin üretildiği bölgelerin başında mitokondri gelir. Moleküler oksijenin en önemli kullanım yerinin mitokondri iç zarındaki elektron transport sistemi olduğu hatırlanırsa, radikal üretimi beklenen bir sonuçtur. Bilindiği gibi mitokondrideki oksijen tüketiminin çok büyük bir kısmından elektron transport sistemi sorumludur ve sistemdeki son elektron alıcısı oksijendir. Mitokondri iç zarındaki elektron transportu sırasında ubikinondan (koenzim Q) sonra sitokromlar elektronları

tek tek taşınır ve bu elektronlar sitokrom a_3 'ün bağladığı bir molekül oksijenin suya indirgenmesi için dört elektron gerekmesi ve diğer taraftan elektronların sitokromlarda tek tek taşındığı gerçeği göz önüne alınır, elektron transportunun son tepkimesinin (sitokrom oksidaz tepkimesinin) en önemli $O_2^- \cdot$ üretim bölgesi olması beklenebilir. Oysa bu bölgede $O_2^- \cdot$ yapıldığı tespit edilmemiştir. Buna karşın mitokondri elektron transport sisteminde $O_2^- \cdot$ üreten iki bölgenin bulunduğu belirlenmiştir. Bunlardan birincisi bir flavoprotein olan NADH dehidrogenaz bölgesidir. Mitokondri zarında üretilen süperoksit radikallerinin üçte biri bu bölgeden kaynaklanır. İkinci bölge ise koenzim-Q -sitokrom-b bölgesi olup, ubikinonun otooksidasyonu elektron transport sisteminde üretilen süperoksit radikallerinin üçte ikisini oluşturur. Elektron transport sisteminde kullanılan oksijenin % 1-5' i $O_2^- \cdot$ oluşumu ile sonuçlanır. (şekil 1.6)

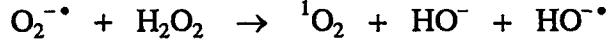


Şekil 1.6 Elektron transport zinciri (14)

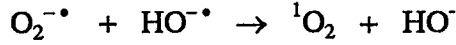
e) Ayrıca önemli ölçüde süperoksit radikalleri fagositoz sırasında fagositoz yapan hücreler (nötrofil, eozinofil ve makrofajlar) tarafından amaçlı ve enzimatik olarak üretilirler (1).

Süperoksit radikali üreten tepkimelerde yapılan bu ilk radikal, bir seri tepkimelerle diğer serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olur. Ortamda biriken süperoksit radikallerinin girebileceği başlıca tepkimeler aşağıdaki gibi özetlenebilir :

- 1) Süperoksit radikali, kendiliğinden dismutasyona uğrayabilir.
- 2) Ortamdan bir proton alarak perhidroksil radikali (HO_2^\bullet) oluşturabilir.
- 3) Hidrojen peroksit ile tepkimeye girerek hidroksil radikali (HO^\bullet) ve tekil oksijen ($^1\text{O}_2$) oluşturabilir.



- 4) Veya diaçil peroksitlerle olduğu gibi, diğer tepkimelerle tekil oksijen yapımına neden olur.



Oluşumlarına süperoksit radikallerinin neden olduğu bu radikaller, diğer radikalik tepkimeleri başlatırlar ve süperoksidin kendisinden çok daha reaktif ve toksik etkilidirler. Bu nedenle süperoksit radikalleri oluştukları anda uzaklaştırılmazlarsa diğer radikallerin oluşması kaçınılmazdır (1).

1.2.2 Hidroksil Radikali (HO^\bullet) :

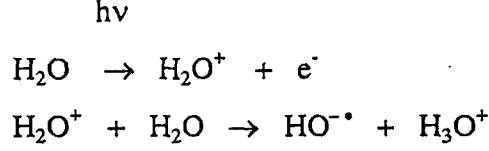
1934 yılında Haber ve Weiss, hidrojen peroksidin $\text{O}_2^{\bullet-}$ ile indirgenmesiyle hidroksil radikali oluşabileceğini göstermişlerdir.



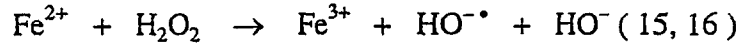
Daha sonraları araştırmacılar canlılarda fizyolojik olarak önemli miktarda HO^\bullet üretilmeyeceğine inanıyorlardı. Çünkü $\text{O}_2^{\bullet-}$ nin H_2O_2 ile etkileşiminin hız sabitinin süperoksit radikallerinin kendiliğinden dismutasyonu ile yarışamayacağını kabul ediyorlardı. 1978 yılında redoks katalizör olarak görev yapan bir metal, örneğin şelat yapmış demir varlığında Haber-Weiss tepkimesinin biyolojik sistemlerde de çalıştığı ve önemli miktarda HO^\bullet üretildiği gösterildi (1).

In vivo şartlarda hidroksil radikali yapımına neden olabilen önemli tepkimeler şunlardır:

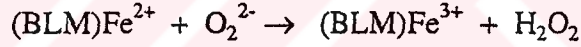
1. İyonlaştırıcı radyasyonun suya etkisi ile



2. Fenton tepkimesi ile,

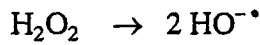


Fenton tepkimesi belirli bir liganta bağlı demir aracılığı ile olur. Kanser tedavisinde kullanılan Bleomisin (BLM) demir bağladıktan sonra aşağıdaki tepkimelerle etkisini gösterir (7):

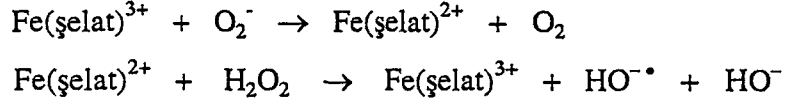


3. Ozona elektron transferi ile HO^{\bullet} oluşabilir. Bu nedenle ozon toksisitesinde HO^{\bullet} nin rolü vardır.

4. Hidrojen peroksidin fotolizisi ile ;

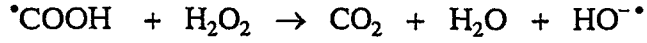


5. *İnvivo* şartlarda HO^{\cdot} üretimi bakımından en önemli tepkime Haber-Weiss tepkimesidir. *İnvivoda* $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalinin H_2O_2 ile HO^{\cdot} üretmesi şelat yapmış demir tarafından katalizlenir.



şelat yapmış demir gereksinimi bakımından bu tepkime Fenton tepkimesine benzer.

6. Radikal tepkimeleri ile oluşabilen bir organik radikal, H_2O_2 ile tepkimeye girerek HO^{\cdot} üretebilir.



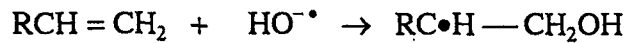
Oksijen radikalleri içinde en reaktif olanı , bundan dolayı en toksik olanı hidroksil radikalidir. HO^{\cdot} üretildiği yerde hemen her molekül ile tepkimeye girebilir ve radikal tepkimelerini başlatabilir. Hidroksil radikalinin katıldığı başlıca tepkimeler üç grupta toplanabilir:

a) Hidrojen çıkarma tepkimeleri:



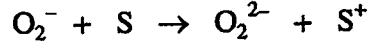
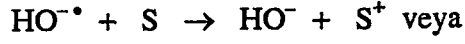
Böylece organik radikal oluşumuna neden olurlar.

b) Hidroksil radikali, katılma tepkimeleri ile çift bağ içeren aromatik bileşiklere katılır, aromatik aminoasitlerin hidroksilasyonuna neden olur:



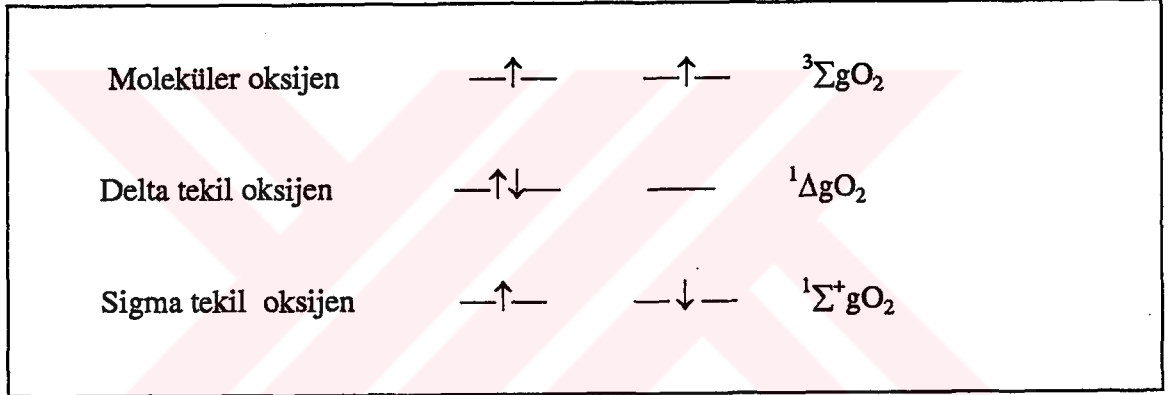
Aromatik halkaya katılma tepkimeleri ile hidroksilasyonların yanısıra, toksik etkili aldehitlerin oluşumuna da neden olurlar.

c) Organik ve inorganik bileşiklerde elektron transfer tepkimelerine neden olur. Aynı etkiyi $O_2^{\cdot -}$ radikali de gösterir.



1.2.3 Tekil (Singlet) Oksijen (1O_2) :

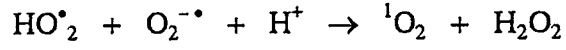
Enerji absorpsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış dış elektronları spinlerini değiştirebilirler. Oksijenin bu şekilde uyarılmış durumunda dış iki elektron ayrı ayrı veya aynı orbitali işgal edebilirler. Oksijenin bu iki formuna tekil (singlet) oksijen (1O_2) denir.



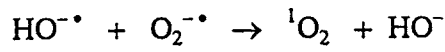
Şekil 1.7. Moleküler ve tekil oksijenin son orbitaldeki e^- dağılımı (12)

Tekil oksijenin delta formunda ($^1\Delta_g O_2$) iki elektron aynı orbitalde bulunur ve spinleri birbirine zıttır, diğer orbital boştur. Tekil oksijenin sigma formunda ($^1\Sigma^+_g O_2$) ise iki elektron ayrı ayrı orbitallerdedir ve spinleri birbirine zıttır (şekil 1.7.). Sigma formunun enerjisi daha fazladır, daha az kararlıdır ve sulu çözeltilerde yarı ömrü 10^{-11} saniyedir. Delta formunun yarı ömrünün daha uzun olması ($2 \times 10^{-6} sn$) nedeniyle gözlenen kimyasal reaktivitelerden delta formunun sorumlu olduğu kabul edilmektedir. Tekil oksijenin her iki formuda aldığı enerjiyi ışık enerjisi halinde vererek eski durumlarına dönebilirler. *In vivo* şartlarda tekil oksijen üretimine neden olan başlıca önemli tepkimeler şunlardır:

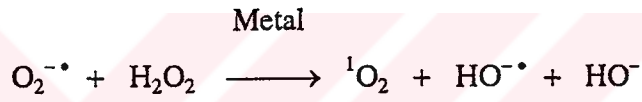
1. Süperoksit radikali üretilen ortamda kendiliğinden dismutasyon ile;



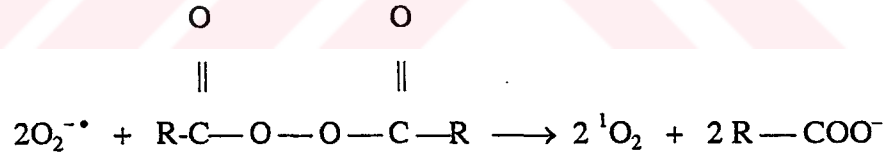
2. $\text{O}_2^{\bullet-}$ ile HO^\bullet nın etkileşmesi ile;



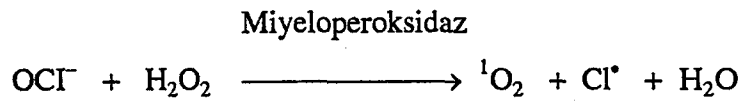
3. Haber-Weiss tepkimesi ile;



4. Süperoksit radikallerinin diaçilperoksitlerle tepkimesinde;



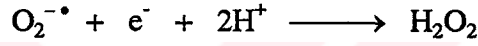
5. Fagositoz yapan hücrelerde fagositoz sırasında H_2O_2 ve halojen bağımlı miyeloperoksidaz enzimi ile;



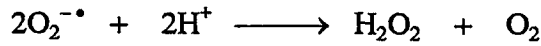
Tekil oksijenin delta formu boş bir dış orbital içerdiğinden çok güçlü nükleofil olarak davranarak yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren bütün bileşiklerle tepkimeye girer (1).

1.2.4. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

H₂O₂, süperoksit anyon radikaline benzer özelliklere sahiptir ve reaksiyona girdiği maddeye bağlı olarak yükseltgen ve indirgen olarak görev yapabilir. Bunun yanısıra zararlı oksijen radikallerinin oluşumundan sorumludur. Hidrojen peroksit, moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 elektron, süperoksidin ise 1 elektron alması ile oluşmaktadır. H₂O₂ membranlardan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır.

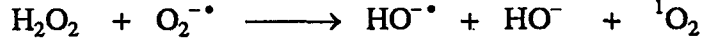


Ancak biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi süperoksidin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Tepkime sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon tepkimesi olarak bilinir.



Bu tepkime ya kendiliğinden ya da süperoksit dismutaz tarafından katalizlenir. Kendiliğinden dismutasyon pH 4.8 de en hızlıdır. Süperoksidin SOD tarafından dismutasyonu ise daha geniş bir pH aralığında katalizlenir. Özellikle kendiliğinden dismutasyonun yavaş olduğu nötral ya da alkali pH da enzimatik dismutasyon daha belirgindir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri arasına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksit

ile tepkimeye girerek, en reaktif ve en zarar verici oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.

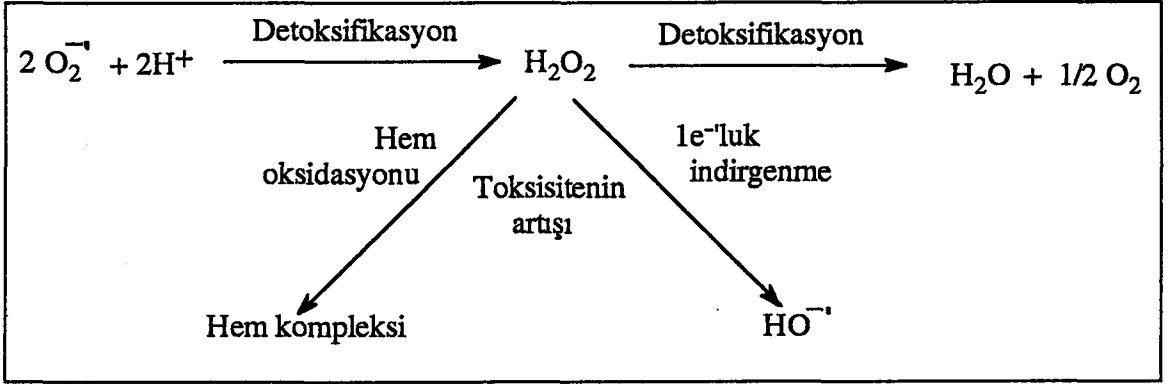


Bu tepkimeye daha önce de bahsedildiği gibi Haber-Weiss tepkimesi adı verilir. Bu tepkime ya katalizör varlığında ya da katalizörsüz gerçekleşebilir. Fakat, katalizörsüz tepkime oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekil ise oldukça hızlıdır. Bu tepkimede önce ferri demir (Fe^{3+}) süperoksit tarafından ferro demire (Fe^{2+}) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak "Fenton tepkimesi" ile hidrojen peroksitten $\text{HO}^{\cdot -}$ ve OH^- üretilir (17). Tepkimenin mekanizması aşağıdaki gibidir (18):



Görüldüğü gibi süperoksit, hem hidrojen peroksit kaynağı hem de geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisidir. İndirgenmiş geçiş metalleri (demir ve bakır gibi) okside şekillerine göre hidrojen peroksitle daha reaktifler. EDTA(Etilendiamin tetraasetikasit) gibi bazı şelatlayıcı ajanlar hidroksil radikal oluşumunu Haber-Weiss tepkimesi aracılığıyla aktive ederken, DTPA (Dietilentriaminpentaasetikasit) gibi bazı bileşikler ise inhibe ederler. EDTA, demir iyonlarının lipid peroksidleri ile olan tepkimenin hızını ise düşürür.

Hidrojen peroksitin oksijen metabolizmasındaki önemini açıklaması bakımından aşağıdaki şekil 1.8 çok önemlidir:



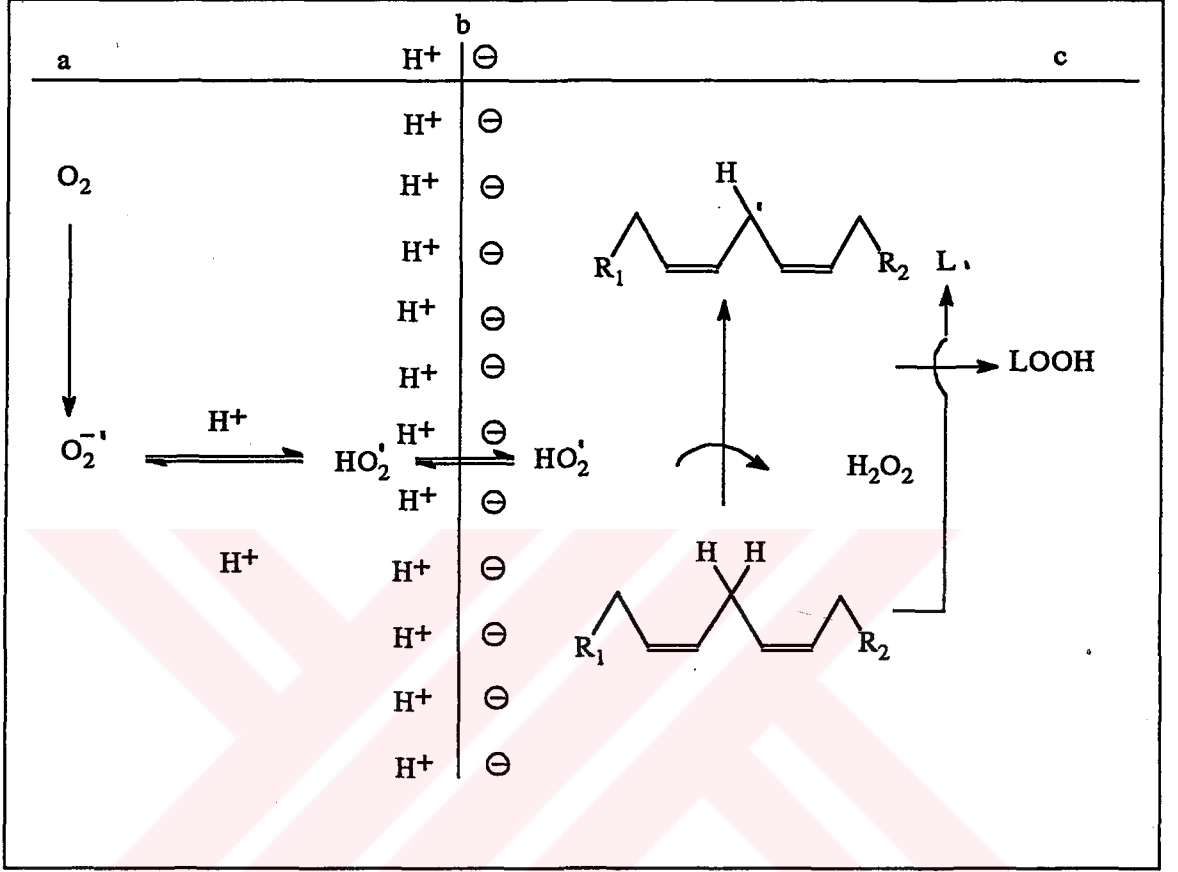
Şekil 1.8. Hidrojen peroksidin rol aldığı metabolik yollar (6).

Yukarıdaki şekilde de görüldüğü gibi bir yandan detoksifikasyon diğer taraftan toksisitedeki artış görülmektedir. Yani hidrojen peroksit oksijen toksisitesi ve detoksifikasyonu arasında bir köprü görevi görmektedir (6).

Reaktif oksijen türlerinin diğer bir grubu ise, organik peroksitler (ROOH) ve bunların homolitik degradasyonu ile oluşan alkoksil (RO[•]) ve hidroperoksil (ROO[•]) radikalleridir. Şekil 1.9 da hidroperoksil radikalının tepkime mekanizması görülmektedir.

1.3. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN OLUŞUMU

Serbest oksijen radikalleri, zigot döneminden itibaren natal ve postnatal dönemlerde organizmanın canlılığı devam ettikçe doğal olarak normal biyolojik işlemler sırasında oluşmaları yanında organizmaya girince hastalık oluşturabilecek veya yabancı madde etkisini gösterecek durumlarda da belirli oranlarda oluşurlar (tablo 1, tablo 2).

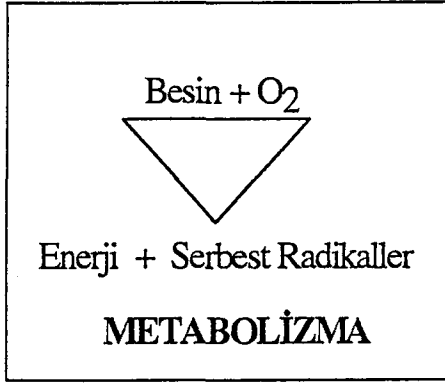


Şekil 1.9. Hidroperoksil radikalinin tepkime mekanizması (6).

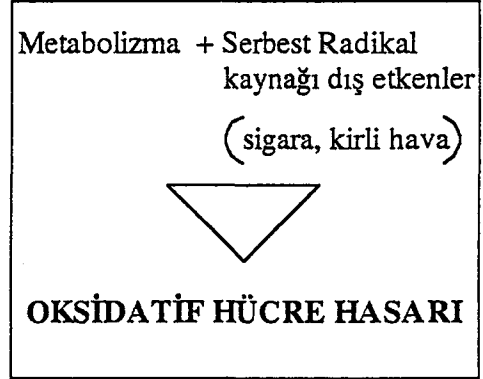
a: Oksijenin indirgenmesi ve plazmatik boşluktaki protanasyonu

b: Hidroperoksil radikalinin membran içine girişi

c: Membrandaki bir yağ asidinden hidrojen ayrılması ve lipid peroksidasyonu ürünü olan hidroperoksitlerin (LOOH) oluşumu



Tablo 1. Serbest radikal oluşumu



Tablo 2. Serbest radikal hasarı

Belli başlı serbest oksijen radikali kaynakları aşağıdaki tabloda verilmiştir Tablo 3.

<p>I. Normal Biyolojik İşlemler</p> <ul style="list-style-type: none"> - Oksijenli Solunum - Katabolik ve Anabolik İşlemler <p>II- Oksidatif stres yapıcı durumlar</p> <ol style="list-style-type: none"> 1- İskemi-Hemoraji-Travma, radyoaktivite Entoksikasyon 2- Ksenobiotik maddelerin etkisi <ol style="list-style-type: none"> a) İn hale edilenler b) Alışkanlık yapanlar c) İlaçlar 3- Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu 4- Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma 5- Uzun süreli metabolik hastalıklar 6- Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını <p>III- Yaşlanma süreci</p>

Tablo 3. Belli başlı serbest oksijen radikali kaynakları (19).

Normal biyolojik işlemlerden mitokondrilerdeki oksijenli solunum sırasında olduğu gibi, anabolik ve katabolik işlemler sırasında da molekül düzeyindeki tepkimelerde elektron kaçışları olur ve bu sırada bir miktar serbest oksijen radikalleri oluşur. İskemi, hemoraji, travma , entoksikasyonlar, radyoaktivite etkisi veya allerjik durumlarda mitokondrilerdeki aerobik oksidatif fosforilasyon dengesi etkilenir ve elektron taşıma sisteminden elektron kaçakları daha fazla olur ve serbest oksijen radikallerinin düzeyi artar. Ayrıca hücre içi Ca'un artışı ile oksidatif strese neden olan enzimler aktive olup, lipid peroksidasyonu ve protein dekarboksilasyonu uyarılır, mediatör maddelerin ve reaktif oksijen türlerinin oluşumları fazlalaşır (20). Sayılan etkenlerden özellikle radyasyon, doğrudan HO^{-•} kaynağı olması nedeniyle oldukça önemlidir.

İnhale edilen ksenobiotik maddeler, gittikçe kirlenmekte olan doğada gün geçtikçe sayı ve miktarca artış göstermektedirler; Sigara dumanı, kirli hava, ozon, Nitrojen dioksit (NO₂), benzen, kükürt dioksit (SO₂), karbon monoksit (CO), uçucu insektisitler, belli başlılarıdır.

Alışkanlık yapıcı maddelerden alkol ve uyuşturucular, merkezi sinir sistemi ve diğer sistemik etkileri yanında özellikle homeostazisi bozarak aşırı serbest oksijen radikali oluşumu ve dolayısıyla doğal antioksidanların tüketim artışına yol açmaktadırlar. Sitostatik ilaçlardan , Nitrofurantoin, Bleomisin, Daxorubisin ve Adriamisin'in yararlılıkları yanında serbest oksijen radikallerinin üretimini arttırdıkları bilinmektedir. Oksidan moleküllerin artışına yol açan nedenler arasında katekolaminlerin düzeyi, stres sırasında arttığına göre stresin homeostazisi etkilemedeki önemi ve birçok hastalığı uyarıcı özelliği daha anlaşılır olmaktadır.

Başta infeksiyöz ajanlar olmak üzere birçok nedenle artmış olan lökotrienler, PAF (Platelet activating factor : Trombosit aktive edici faktör), prostaglandinler gibi mediatör maddeler, polimorf çekirdekli nötrofiller, monosit, eozinofil ve granulositleri aktive ederler. Bu hücreler aktive olunca hem doku lezyonunun olduğu yerde birikirler, hemde serbest oksijen radikalleri salgırlar. İşte bu sırada infeksiyöz ajanlarla savaş için gerekli olan serbest oksijen radikalleri, kan hücreleri tarafından aşırı salgılanacak olursa bu kez yarar yerine zararlı olmaya başlayacaklardır.

Kronik metabolik hastalıklardan özellikle ateroskleroz, diabet ve yüksek LDL kolesterol en çarpıcı örneklerdir. Kanser, romatoid artrit, katarakt, parkinson ve yaşlanma prosesi, oksidan moleküllerin etkin olduğu kabul edilen hastalıklar arasında sayılmaktadır. Organizmada serbest Fe^{2+} ve Cu^{2+} gibi metallerin varlığı veya daha doğrusu fazlalığı serbest oksijen radikallerinin oluşumunu hızlandırıcı bir etki yapar.

Fagositozda oksijen radikallerinin tartışılmaz gerekliliği yanısıra, pek çok biyokimyasal tepkimenin gerçekleşmesi de oksijen radikallerine bağlıdır. Oksijen kullanan oksidaz ve flavoprotein dehidrogenazlar, hidrojen peroksit üretiyorlarsa bu oluşum sırasında $O_2^- \cdot$ radikali zorunlu ara üründür. Diğer taraftan bazı tepkimelerde moleküler oksijen kullanılmasa bile tepkimede radikal üretilebilir ve tepkime radikal aracılığı ile başarılabılır. Buna guanilat siklaz ile katalizlenen tepkime örnek verilebilir. Guanilat siklaz, SOD ile aktive olur, $HO^- \cdot$ temizleyen bileşikler ve CAT enzimi ile etkinliği durdurulur. Buna göre guanilat siklaz tepkimesinde H_2O_2 bağımlı Fenton tepkimesi ile $HO^- \cdot$ üretilir ve enzimin etkinliği için hidroksil radikali gereklidir.

Mikrozomal hidroksilasyonlar, prostaglandin sentezi ve inflamasyonda oksijen radikallerine bağımlı ve radikal üretilen olaylardır. İnflamasyon oluşumunda en önemli radikal $HO^- \cdot$ dir. Hidroksil radikali hyaluronik asidi kolaylıkla depolimerize eder. Antiinflamatuvar ilaçların hidroksil radikaline yüksek affiniteleri vardır ve hidroksil radikalini temizleyerek etki gösterirler.

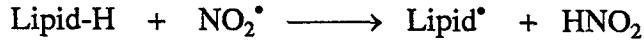
Mikrozomal hidroksilasyon ve radikal üreten radikal bağımlı tepkimelerde membranlarda bulunan kinon veya türevleri elektron taşıyıcı olarak fonksiyon görürler. Bu bileşikler radikal üretimi için elektronları redüktör bileşiklerden (NADH, NADPH, indirgenmiş flavinler, C vitamini vb.) alarak oksijene verirler. Preprotrombindeki glutamik asitlerin karboksilasyonu C vitamini, NADH, oksijen ve CO_2 bağımlıdır. Karboksilasyon tepkimesinin SOD ile inhibe edilmesi, CAT dan etkilenmesi tepkimede $O_2^- \cdot$ üretildiğinin ve tepkimenin bu radikale bağımlı olduğunu kanıtlar. Tepkime sırasında kinon elektronları NADH den alıp oksijene verir, $O_2^- \cdot$ üretilir. $O_2^- \cdot$ veya $HO^- \cdot$, CO_2 ile tepkimeye girerek aktivasyonu sağlar ve karboksilasyon bu aşamadan sonra gerçekleşir.

Çoğaltılması mümkün olan yukarıdaki örneklerde görüldüğü gibi toksik etkilerin yanısıra oksijen radikallerinin üretimi normal biyolojik fonksiyonun ayrılmaz bir parçasıdır. Fiziksel etkenlerin yanısıra pekçok kimyasal bileşikler, özellikle hidroksillenmiş bileşikler, oksijen radikali üretimine neden olurlar. Bazı bileşikler ise, mikrozomlarda hidroksillendikten sonra radikal üretmeye başlarlar ve bunlarda genellikle karsinojen olarak bilinen bileşiklerdir. Hidroksillenmiş bileşiklerden 6-hidroksidopamin, 6-aminodopamin, 6,7-dihidroksitriptamin, alloksan gibi bileşikler ve antineoplastik ilaç olarak kullanılan, yapılarında kinon türevi içeren bleomisin, streptonigrin, mitomisin B ve C ,organizmada oksidasyon-redüksiyon döngüsüne girerek serbest oksijen radikalleri üreten kimyasal bileşiklerdir (21, 22, 23).

Peroksizomlar, çok önemli hücre içi H₂O₂ kaynağıdır. Bu organeldeki D-amino-asid oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksil asid oksidaz ve yağ asidi açıl-CoA oksidaz gibi oksidazlar süperoksit üretmeden bol miktarda hidrojen peroksit üretimine sebep olurlar. Ancak peroksizomlarda CAT aktivitesi de çok yüksek olduğu için bu organelden sitozole ne kadar hidrojen peroksit geçtiği bilinmemektedir.

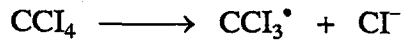
Hücrelerde serbest oksijen radikali üretimi bazı yabancı toksik maddeler tarafından büyük oranda arttırılabilir. Bu maddeler ya doğrudan serbest oksijen radikali üretirler veya antioksidan aktiviteyi düşürürler. Bu tip maddeler 4 grupta incelenebilir:

1- Toksinin kendisi bir serbest radikaldir.Kirli havanın rengini veren azot dioksit (NO₂[•]) gazı böyle bir maddedir. Bu radikal iyi bir lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır.

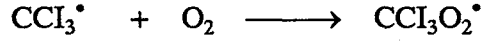


2- Toksin bir serbest radikale metabolize olur. Mesela , toksik bir bileşik olan karbon tetraklorür karaciğerde sitokrom P-450 tarafından triklorometil serbest radikaline dönüştürülür.

cyt. P-450



Bu radikalin oksijenle tepkimesi neticesinde meydana gelen peroksil radikali de kuvvetli bir lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır.



Sonuçta, serbest oksijen radikali üretimi karaciğerde antioksidan savunmayı aşır selüler membranların oksidatif yıkımı ve önemli bir doku hasarına neden olurlar (24).

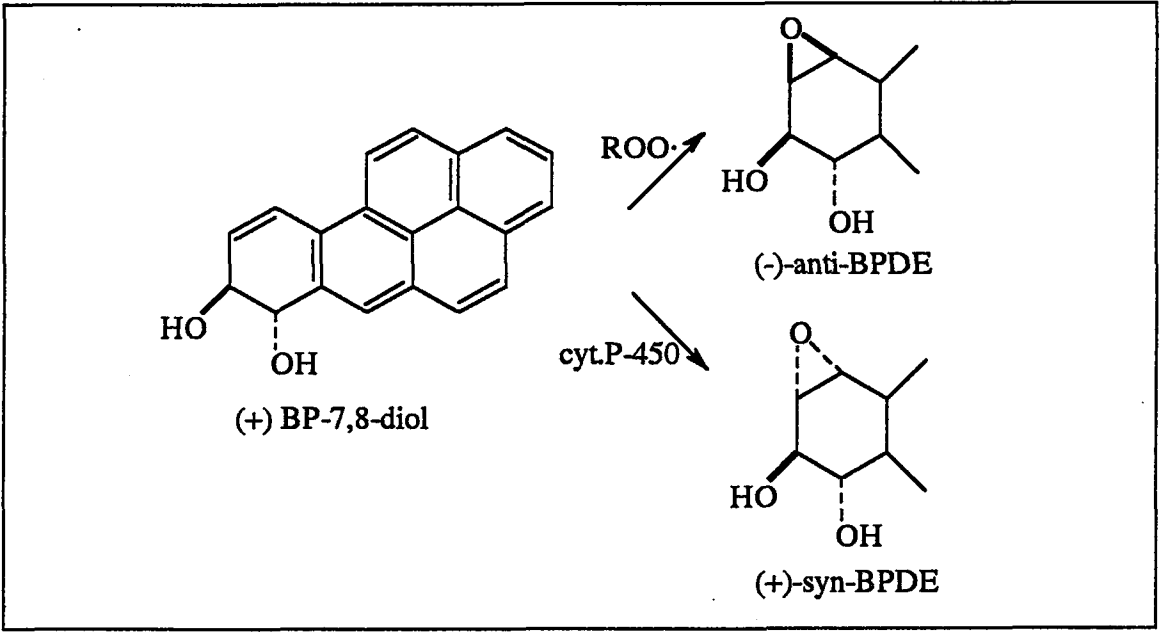
3. Toksinin metabolizması sonucu, serbest oksijen radikalleri oluşabilir. özellikle karaciğerde biriken paraquat , bir serbest oksijen radikaline indirgendikten sonra tekrar yükseltgenerek rejenere edilirken beraberinde oksijen indirgenir. Böylece bol miktarda süperoksit üretilmiş olur. Diabetik bir ajan olan alloxan da paraquat gibi etki eder.

Yine, antikarsinojen bir madde olan doxorubicin, DNA replikasyonunu inhibe ederken muhtemelen önemli miktarda süperoksit ve hidroksil radikali üretimine de sebep olur (25).

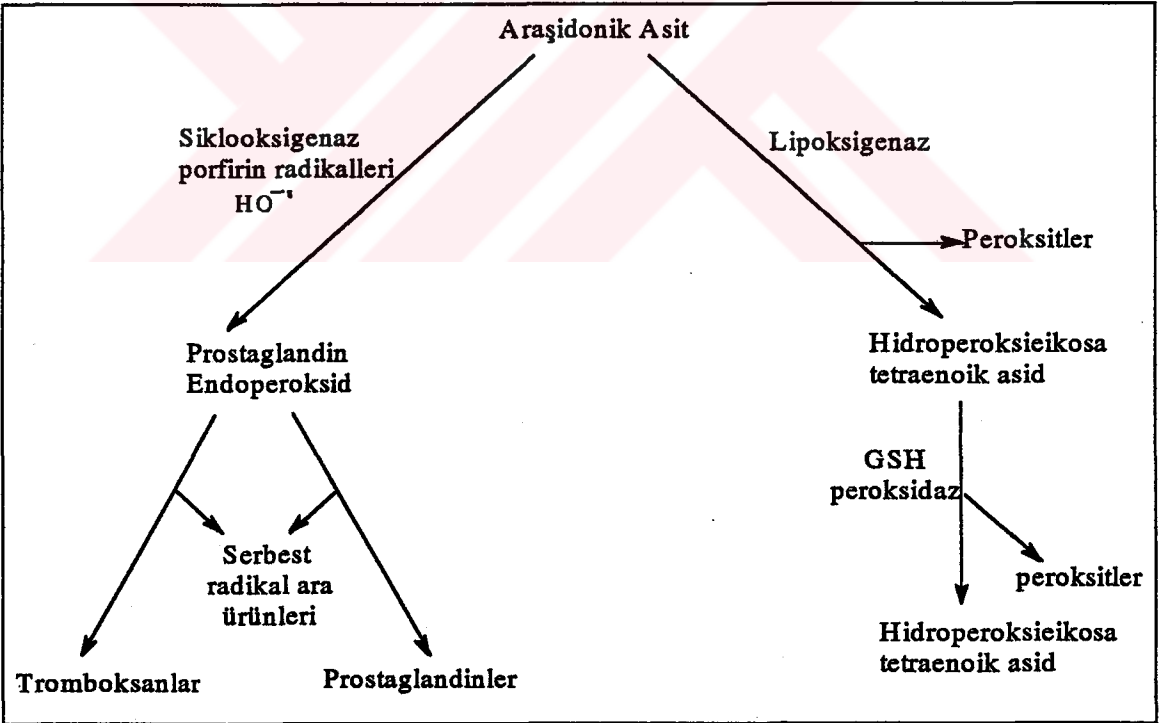
4. Toksin, antioksidan aktiviteyi düşürür. Mesela parasetamolün karaciğerde sitokrom P-450 tarafından metabolizması glutatyonla reaksiyona giren ve miktarını azaltan bir ürün meydana getirir.

Bir hem proteini olan sitokrom P-450, birçok endojen bileşiğin ve ksenobiyotiğin hidroksilasyonunu katalize eder. Bu reaksiyonlarda oksijen kaynağı olarak moleküler oksijeni kullandığı gibi peroksitleri de (ROOH) kullanabilir (şekil 1.10). Böylece bir peroksidaz gibi etki eder. Ancak alkol ve asetonla indüksiyonunda olduğu gibi bazı hallerde sitokrom P-450 aşırı miktarda süperoksit üreten bir izoenzime dönüşür (26, 27).

Araşidonik asit metabolizması da reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranında araşidonik asidin salınımına yol açar (28). Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu da çeşitli serbest oksijen radikal ara ürünleri meydana gelir (29) (şekil 1.11).



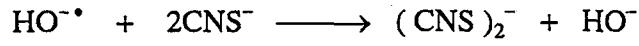
Şekil 1.10. Sitokrom P-450 ve peroksil radikallerinin neden olduğu (+)-BP-7,8-diol'ün epoksidasyonunun stereokimyası (20).



Şekil 1.11. Araşidonik asit metabolizmasında serbest oksijen radikallerinin sentezi (19).

Serbest oksijen radikallerinin enzimatik üretilmesi önemli bir soruyu akla getirir. Bir enzimatik tepkimede özellikle 1O_2 ve $HO^- \cdot$ gibi süper reaktif radikaller üretiliyorsa enzimin radikallerden korunma mekanizmasının bulunması gerekir. Aksi durumda enzimin radikal üretmesi intihar etmesi demektir. Bu soruya genellikle verilen yanıt şudur; Radikal, enzimin kısmi olarak duyarsız bir bölgesinde ve üretilen radikali yakalayacak reaktif bileşiğe yakın bir bölgede üretilir. Radikal üretilen ortamda oksitlenebilen bir bileşik varsa, radikal ile tepkimeye girerek enzimi koruyabilir.

Örneğin; radikal üretilen ortamda tiosiyanat (CNS^-) varsa ve $HO^- \cdot$ üretiliyorsa, CNS^- hidroksil radikali ile tepkimeye girerek daha az reaktif olan ve yalnızca sistein ve triptofan aminoasitleriyle tepkimeye girebilen (CNS) $_2^-$ radikali oluşur.



Ayrıca radikal üreten enzimler veya radikal kullanan enzimler genellikle radikale duyarlı amino asitleri içermezler veya içerseler bile bu amino asitler aktif merkezde bulunmaz. Örneğin, alyuvar dismutazi, methionin ve triptofan gibi radikale duyarlı amino asitleri içermezler, radikale daha dayanıklı glutamik asit bakımından zengindir.

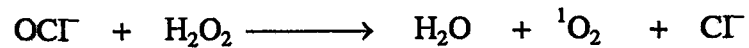
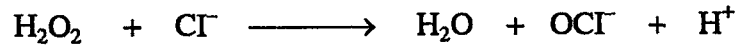
1.3.1. Fagositozda Oksijen Radikalleri Üretimi

Fagositoz, oksijenin toksik ürünlerinin önemli ölçüde katkıda bulunduğu bir olaydır. Fagositoz yapan hücrelerde fagositoz sırasında glukoz ve oksijen tüketiminin arttığı 1939 yıllarından beri bilinmesine rağmen bunun nedeni ancak 1970 yıllarından sonra anlaşılmıştır. Fagositozda glukoz tüketiminin artması, heksosmonofosfat metabolik yolunun aktive olmasının bir sonucudur. Oksijen tüketiminin artması ise fagositoz yapan hücrenin mitokondri elektron transport sisteminden bağımsızdır. Çünkü, burada artan oksijen tüketimi siyanid, antimisin A, oligomisin gibi mitokondri solunum inhibitörlerine duyarsızdır. Fagositozda artan oksijen tüketiminin tamamı, enzimatik olarak $O_2^- \cdot$ ve bunun sonucu olarak H_2O_2 yapımı şeklinde kullanılır. Fagositik lökositlerin plazma zarlarının dijitionin, yağ asitleri, deoksikolat, lektinler gibi bileşiklerle veya opsonize edilmiş partiküller, bakteri ve mantarlar gibi fagosite edilen partiküller ile uyarılmasıyla bir taraftan fagozom oluşmaya başlarken, uyarıdan yaklaşık

10 saniyelik bir gecikme fazından sonra oksijen tüketimi hızla artar ve bir kaç dakika içinde 10-15 katına çıkar, kullanılan oksijen ile fagosite edilen partikül sayısı arasında lineer bir ilişki görülmüştür (19).

Fagositoz hücrelerin plazma zarında NADH oksidaz ve NADPH oksidaz, fagositoz sırasında artan oksijen tüketiminden sorumludurlar. Normal koşullarda inaktif durumda bulunan bu iki enzim, uyarı ile aktive olurlar ve elektron kaynağı olarak NADH ve özellikle de NADPH kullanarak oksijeni süperoksit radikallerine indirgeyip fagozom içine verirler. Fagozom içi pH'nın hücreninkinden daha düşük olması nedeniyle üretilen süperoksit radikalleri kendiliğinden dismutasyon ile H_2O_2 yaparlar. Fagozom SOD ile CAT içermediğinden, fagozom içinde $O_2^{\cdot -}$ ve H_2O_2 kaçınılmaz olarak birikir. SOD ve CAT içeren ortamda hücre fagozom oluştursa bile yuttuğu partiküllü parçalayamaz veya bakteriyi öldüremez. Bu nedenle radikal üretimi ve fagozom içinde süperoksit radikali ile hidrojen peroksit birikimi fagositoz için zorunludur. İnsan nötrofillerinde NADPH oksidazlar dışında, fagozom membranında bulunan ve uyarı ile süperoksit radikali üreten sitokrom b bulunur. Bu sitokromun endoplazmik retikulum ve mitokondriyel sitokrom b'den bağımsız olduğu gösterilmiştir. Fagozomda $O_2^{\cdot -}$ ve H_2O_2 birikimi yalnız başına fagositik fonksiyon için yetersizdir. Hidrojen peroksit, peroksidazlar tarafından kullanıldığı zaman fagositoza katkıda bulunur. Peroksidazlar, hidrojen peroksit ve bir halojen (Cl^- , Br^- , I^-) ile birleştikleri zaman mikroorganizma ve tümörlere karşı vücudun en önemli savunma sistemlerinden birini oluştururlar (30).

Bu amaçla nötrofil ve monositler miyeloperoksidaz (MPO) eozinofiller ise eozinofil peroksidaz (EPO) içerirler. Peroksidazlar hidrojen peroksit ile birlikte halojenleri aktive ederek toksik ara ürünlere çevirirler. Çoğunlukla toksik ara ürün hipokloik asit dir (31, 32).

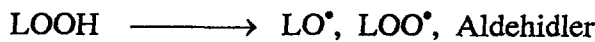
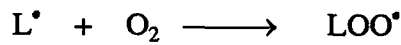
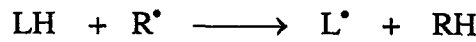


Peroksidasyon ile fagosite edilen partikülün halojenlenmesi sağlanır. Yukarıdaki tepkime ve Haber-Weiss tepkimesi ile $^1\text{O}_2$ ve $\text{HO}^- \cdot$ üretilir. Fagositoz sırasındaki kemilüminesansın nedeni, fagositoz sırasında tekil oksijen ve organik radikal üretimidir. Fagozom, CAT ve SOD içermediğinden hidrojen peroksit ve süperoksit radikallerinin birikimine olanak verir. Bu nedenle fagosite edilen partikülün lipid, protein, karbohidrat ve nükleik asitlerin yapıları kısa sürede bozulur ve fagozom içine salınan, lizozomal enzimler başta olmak üzere çeşitli enzimlerle parçalanması temin edilir, özellikle radikallerin oluşumuna neden olduğu toksik aldehitler, organik radikaller ve kloraminler fagozom ortamında birikirler. Fagositoz sırasında konakçı hücre de üretilen toksik ürünlerden etkilenir. Fagozomdan hücreye geçen süperoksit radikalleri SOD, hidrojen peroksit ise Se-GSH-Px ve CAT tarafından temizlenir.

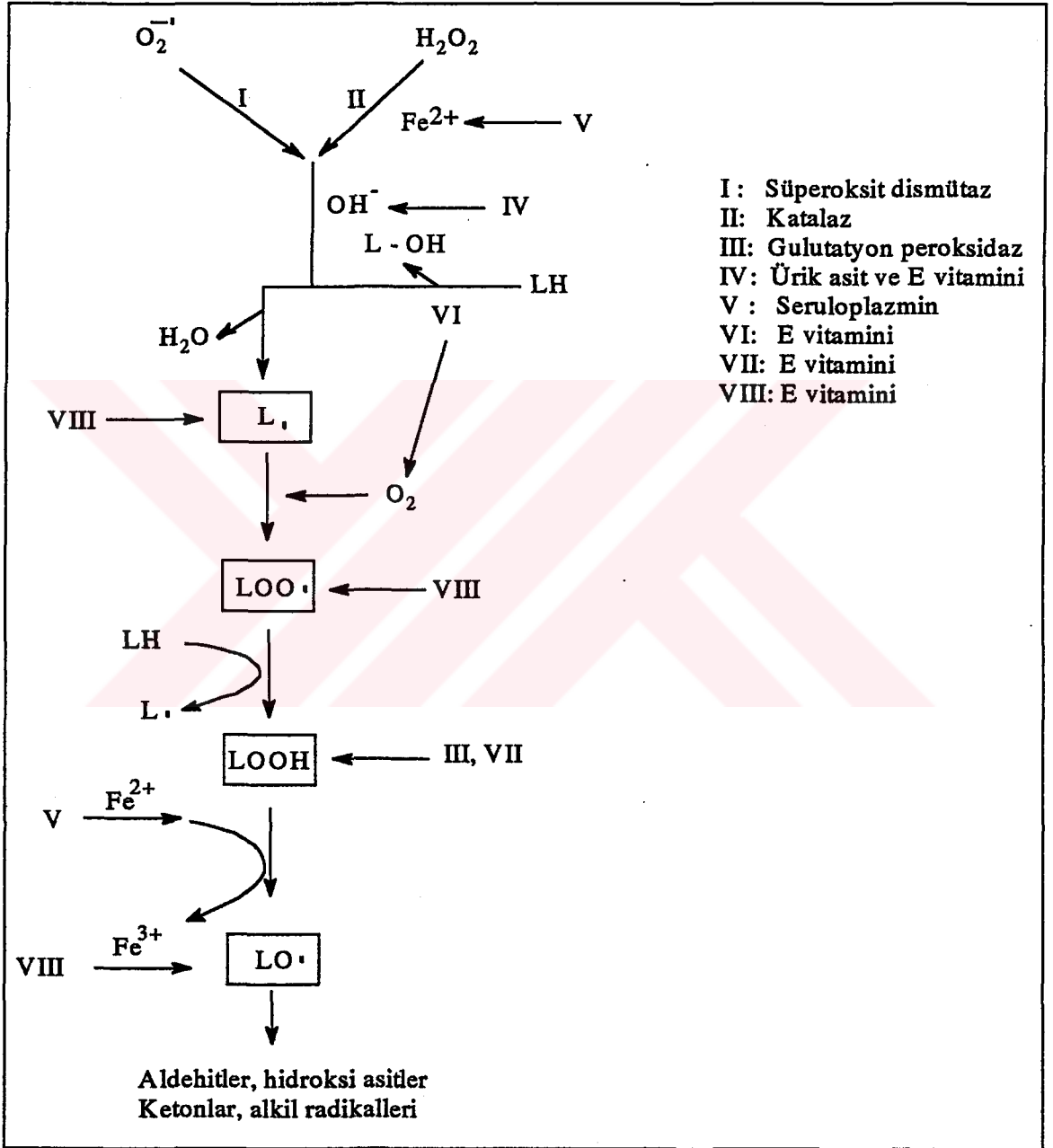
1.4. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN YAPTIĞI HASARLAR

1.4.1. Membran Lipidlerine Etkileri

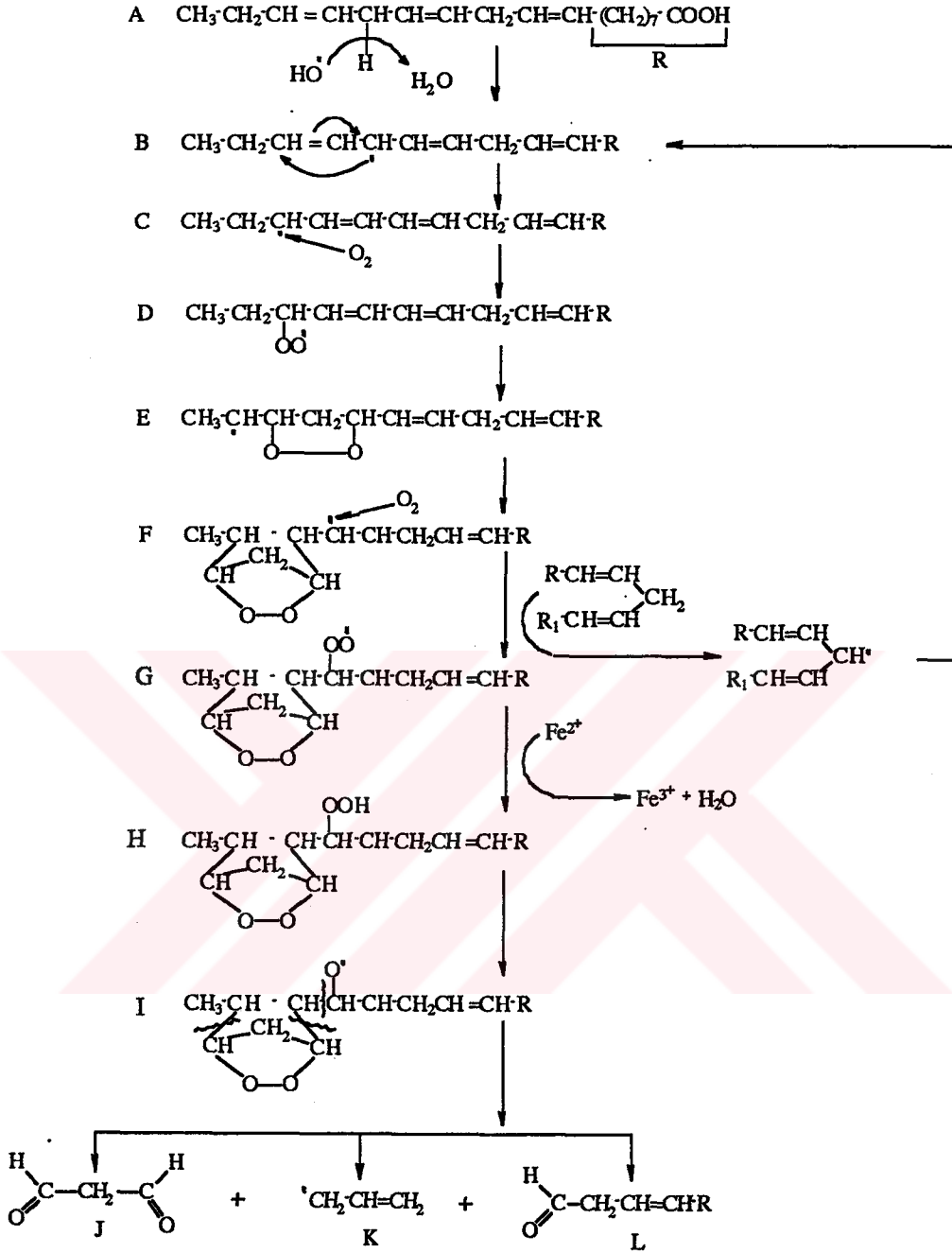
Pek çok biyomolekül serbest radikallerden etkilenir. Fakat belki de en çok lipidler bu etkiye hassastır (4). Hücre membranı polidoymamış yağ asitlerince (PUFA) zengindir ve kolayca bu etkiye maruz kalır (33). Bu tepkime, çok zarar verir, çünkü zincirleme olarak devam eder. Yağ asidi LH, hedef PUFA ve R^{\cdot} başlatıcı okside edici radikal iken PUFA' nın oksidasyonu ile yağ asidi radikali (L^{\cdot}) meydana gelir. Buna hızla oksijenin ilavesi ile yağ asidi peroksil radikali (LOO^{\cdot}) oluşur. Peroksil radikali zincirleme tepkimenin taşıyıcısıdır. Bu radikal başka bir yağ asidini (LH) oksitleyerek yeni bir zincir tepkimesini başlatır. Bu sırada oluşan lipid hidroperoksidi (LOOH) yıkılarak daha reaktif radikalleri ve aldehidleri oluşturur (şekil 1.12).



Peroksidasyonla oluşan malondialdehit (MDA), membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Bu da deformasyon, iyon transformu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar (34,35).



Şekil 1.12. HO_2^\bullet radikali tarafından başlatılan lipid peroksidasyonu (19).



A: Başlama

B: Dien konjugasyonu ve serbest radikal stabilizasyonu

C: Moleküller oksijen saldınısı

D: Lipid peroksi radikali

E: Lipid endoperoksi radikali

F: Molekül içi düzenleme

G: Radikal zincir reaksiyonu (ilerieme)

H: Lipid hidroperoksi parçalanma

I: Lipid alkoksi radikali

J: Aldehid

K: Alkil radikali

L: Lipid aldehit

Şekil 1.13. Linolenik asidden malondialdehid ve diğer peroksidasyon ürünlerinin oluşumu (19).

Aldehidler, lipid hidroperoksidlerinin yıkımı sırasında daima oluşurlar ve pek çoğu biyolojik olarak aktiftir. Bunlardan en iyi bilinenleri malondialdehid ve 4-hidroksi nonenal dir (36). Bu maddeler oluşum yerlerinden kolayca diffuze olur ve hücrenin diğer bölümlerinde hasara yol açarlar. Oluşan bu aldehidlerden MDA membran doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunun işareti olup, lipid peroksidasyonunun en önemli göstergesi olarak kabul edilir (9) (şekil 1.13).

Serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden 4-hidroksi-alkenal türevi olan 4-hidroksi-nonenal bileşiği çok önemli biyolojik özelliklere sahiptir (37, 38). Tablo.4.

<ul style="list-style-type: none"> - DNA sentezini İnhibisyonu - Genotoksik - Ribonükleotid redüktazın inhibisyonu - Tiol grupları ile etkileşme - Kemotaksisin uyarılması - Adenil siklazın uyarılması - Protein kinaz C'nin inhibisyonu - Fosfolipaz C ve G- proteinlerine etkisi - GSH-transferazın substratı

Tablo 4. 4-hidroksi-nonenal'in önemli biyokimyasal özellikleri (37, 38).

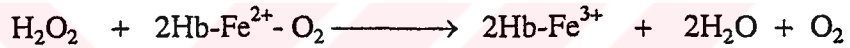
Membran lipidlerinin polidoymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu, membranda çeşitli hasarlara sebep olabilmektedir. Bu genellikle membran akışkanlığının azalması ve membranın iyonik gradientinin bozulması şeklinde olur. Bu otooksidasyon tepkimesi, hidroksil, hidroperoksil veya tekil oksijen radikalleri tarafından gerçekleştirilir. Reaktivitesi az olan süperoksit anyon radikali veya hidrojen peroksid bu tepkimede rol almazlar. Yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri ile etkileşmesinde ilk olarak, karbon zincirindeki $-CH_2$ grubundan bir hidrojen atomu uzaklaştırılır ve ardından bu karbon

atomu ortaklanmamış elektronlara sahip olduğundan bir lipid karbon radikali olarak adlandırılır ve moleküller arası hızlı bir şekilde yeniden düzenlenme sonucunda konjuge dien yapısı oluşur. Moleküler oksijenin bu yapıya katılması ile hidroperoksil radikalleri meydana gelir. Bu radikallerin de indirgenmesi ile lipid hidroperoksitleri oluşur. Zincirleme tepkimeler başladıktan sonra $O_2^{\cdot -}$ daha toksik etkili olur, çünkü alkoksi (RO^{\cdot}) ve hidroperoksit ile tepkimeye girerek 1O_2 ve Haber-Weiss tepkimesi ile hidroksil radikalının oluşumu gerçekleşmektedir. Hidroksil radikalının doymamış yağ asitlerinden hidrojen çıkarma ile başlattığı tepkimelerin aksine, 1O_2 doğrudan doymamış yağ asitleriyle tepkimeye girerek hidroperoksitlerin oluşumuna neden olur. Birden fazla çift bağ içeren doymamış yağ asitlerinin membranlardaki fazlalığı nedeniyle lipid peroksidasyonu membranlardaki yapısal değişimin en önemli sebebidir (39, 40, 41).

1.4.2. Proteinlere Etkileri

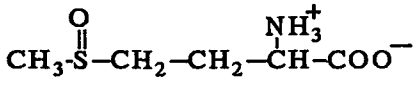
Proteinler ve nükleik asitler, lipidlerden daha az serbest radikal etkisine maruz kalırlar. Proteinlerle etkileşim sonucu pek çok residüde modifikasyon meydana gelir. Sonuçta peroksit ve karboniller oluşur. Karboniller protein hasarının ölçümünde kullanılır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan , tirozin, fenilalanin, histidin, methionin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest oksijen radikallerinden daha kolaylıkla etkilenirler. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu tepkimeler sonucu, immunoglobulin G (IgG) ve albumin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur ve normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Örneğin, serum proteinlerinde, kataraktlı lens proteinlerinde ve inflamatuvar eklem hastalığı olan kişilerin sinoviyal sıvılarındaki IgG'lerinde serbest radikal hasarı saptanmıştır (19). Yine serbest oksijen radikalleri ile etkileştirilen IgG'lerin romatoid faktör antikörleri ile bağlanmalarının arttığı görülmüştür ve sonuçta oluşan bu immün kompleks, daha fazla radikal oluşumunun temel nedenidir. Proteinler üzerine olan serbest oksijen radikal hasarı birikmişse yada belirgin proteinlerin spesifik bölgesi üzerinde yoğunlaşmışsa hücrenin canlılığı bakımından zararlı etki yaparlar.

Süperoksit radikalleri başta sistein, triptofan ve tirozin olmak üzere bütün aminoasitlerle, perhidroksil radikali ise $O_2^{\cdot -}$ 'den daha etkili olarak sistein, fenilalanin, histidin, serin ve methionin amino asitleri başta olmak üzere bütün amino asitlerle tepkimeye girerler. Buna rağmen bu iki radikalın amino asitlerle tepkimesi, $HO^{\cdot -}$ radikalinden 10^6 - 10^9 kez daha yavaştır. $O_2^{\cdot -}$, $HO_2^{\cdot -}$ radikalleri ile H_2O_2 'nin biyolojik moleküllerle tepkimelerinin yavaş olması nedeniyle , radikallerin gözlenen toksik etkisinin 1O_2 ve $HO^{\cdot -}$ 'den kaynaklandığı kabul edilmektedir. Belirtilen aminoasitlerin oksidasyonu sonucu oluşan bileşiklerden bazıları aşağıdaki gibidir (tablo 5.). Hem proteinleri de serbest oksijen radikallerinden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin $O_2^{\cdot -}$ veya H_2O_2 ile tepkimesi methemoglobin oluşumuna sebep olur.

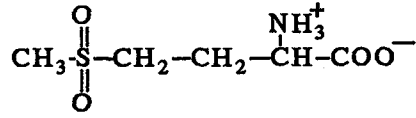


1.4.3. Karbohidratlara Etkileri

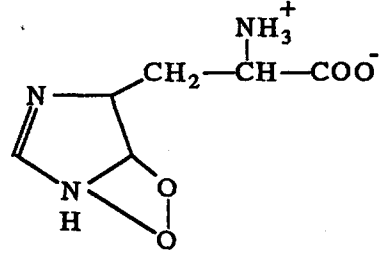
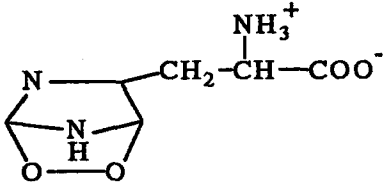
Serbest oksijen radikallerinin karbohidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu H_2O_2 , peroksidler ve okzoaldehidler meydana gelirler Bunlar diabet ve sigara içimi ile ilgili kronik hastalıklar gibi patalojik proseslerde önemli rol oynarlar. Okzoaldehidler, DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar. Polidoymamış yağ asitleri ve karbohidrat oksidasyonunun bir ürünü olan glyoxal'ın hücre bölünmesini inhibe ettiği kaydedilmiştir. Bağ dokusunun önemli bir mukopolisakkaridi olan hyaluronik asid, sinoviyal sıvıda da bol bulunur. İnflamatuar eklem hastalıklarında sinoviyal sıvıya çok sayıda polimorf hücreler geçerler ve muhtemelen immün komplekslerle aktivasyonu sonucu ekstraselüler sıvıya H_2O_2 ve $O_2^{\cdot -}$ salgırlar. Bu radikallerin invitro olarak hyaluronik asidi parçaladıkları gösterilmiştir. Hyaluronik asidin parçalanması inflamatuvar eklem hastalıklarında sinoviyal sıvının karakteristik bir özelliğidir (19).



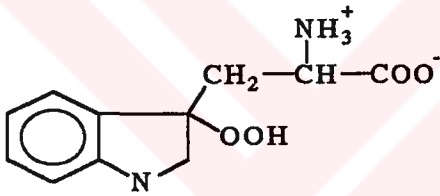
Methionin sülfoksit



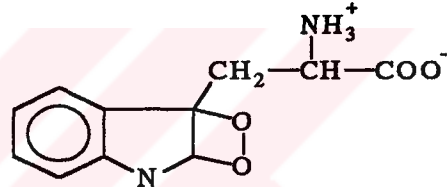
Methionin sülfan



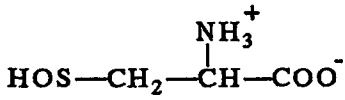
Histidin endoperoksitler



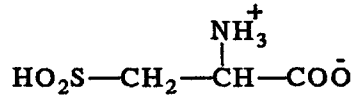
Triptofan hidroperoksit



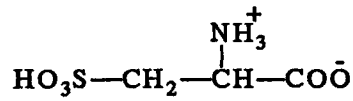
Triptofan endoperoksit



Sistein sülfenat



Sistein sülfinat

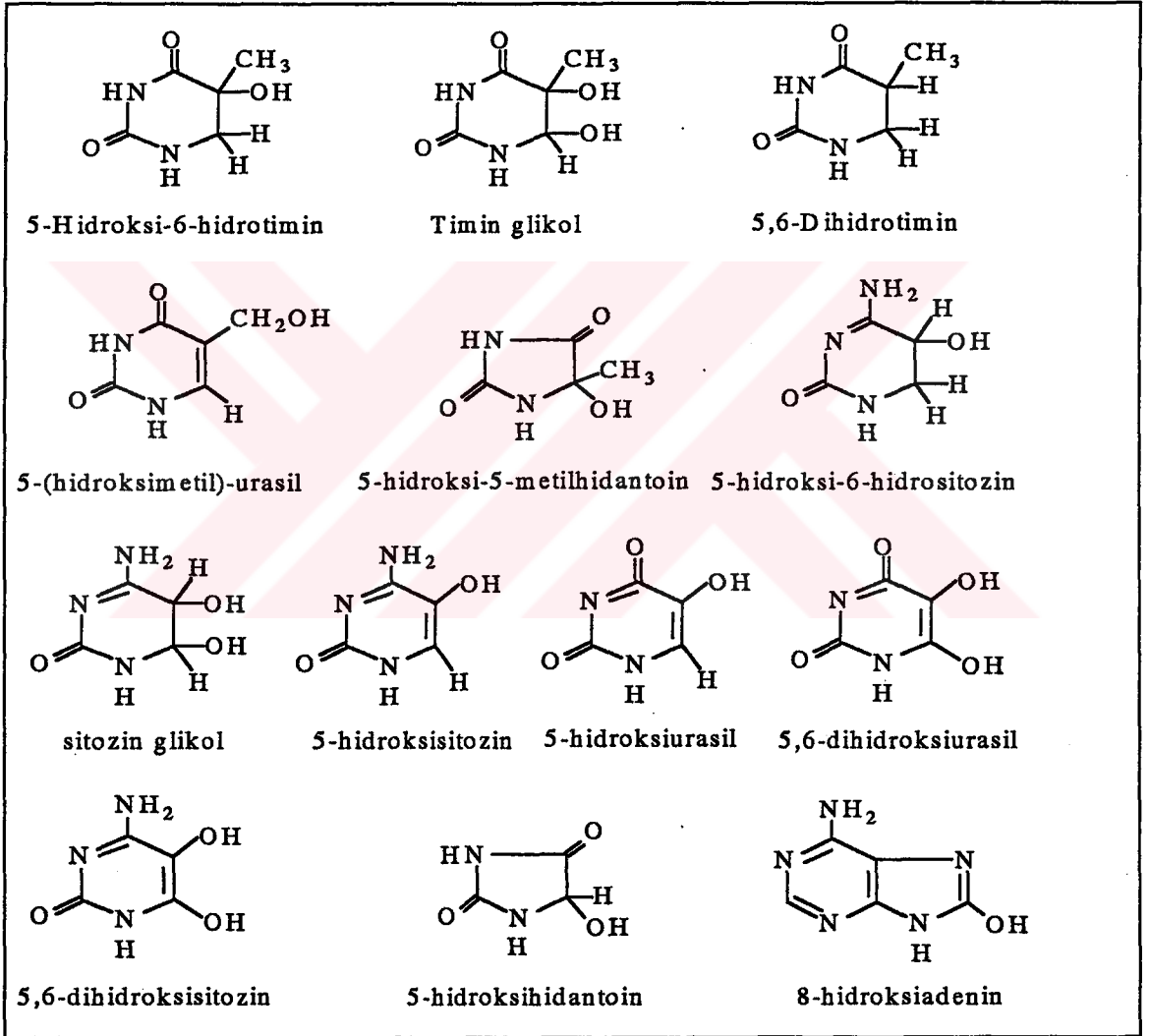


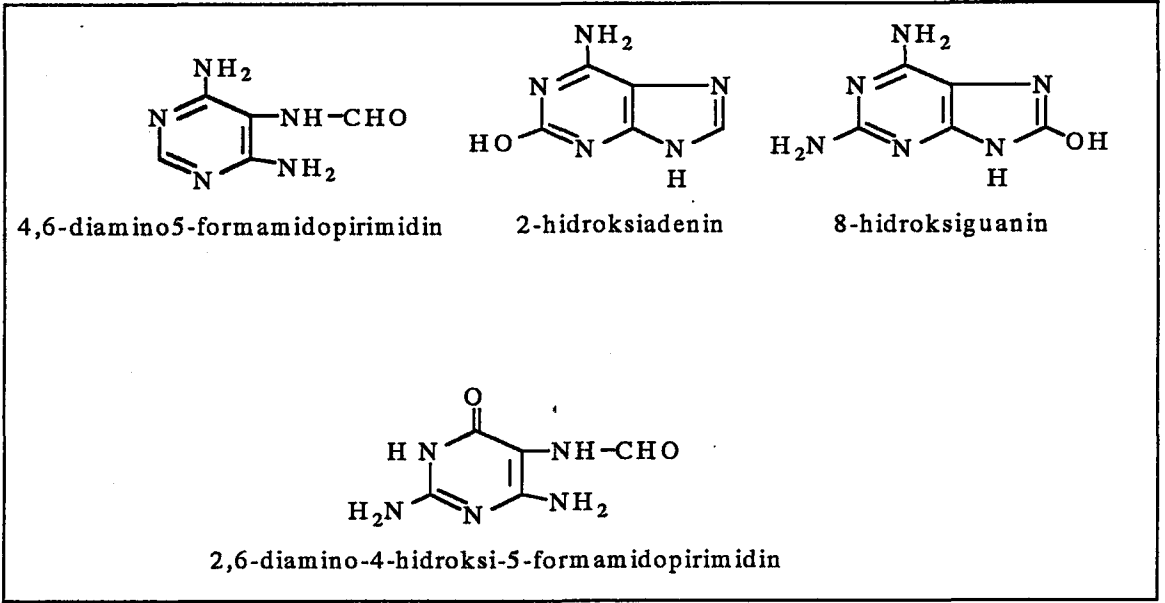
Sistein sülfonat

Tablo 5. Bazı aminoasitlerin oksidasyon ürünleri (42).

1.4.4. Nükleik Asitlere Etkileri

DNA'da serbest radikaller için önemli bir hedeftir. Proteinlerde olduğu gibi hızlı zincir tepkimeleri görülmez. Hasarın belirgin olması için bölgeye spesifik, yüksek şiddette olması ve de onarım mekanizmasına etki etmesi gerekir. DNA üzerine olan oksidatif etki idrarda okside olmuş nükleobazların saptanması ile takip edilebilir (19).





Tablo 6. Okside olmuş nükleobazlar (43).

Hem HO^\bullet hemde $^1\text{O}_2$, nükleik asitler ile pürin veya pirimidin arasında ayırım yapmaksızın tepkimeye girerler. Hidroksil radikali, nükleik asitlerde doymuş karbon atomlarından hidrojen atomu çıkarır veya çift bağlara katılma tepkimeleri ile sonuçlanan süreçlerde rol alırlar. Hidroksil radikallerinin pürin, pirimidin bazları ve pentozlarla tepkimeye girme hız sabiti moleküllerin diffüzyon limitine yakındır ($10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sn}^{-1}$). Bu nedenle nükleik asitlere yakın bir bölgede üretilen her hidroksil radikali, kolaylıkla tepkimeye girme yeteneğine sahiptir (44). Tekil oksijenin nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha sınırlıdır. Deoksiribonükleotidlerin $^1\text{O}_2$ ile tepkimeye girme hızları $\text{dG} \geq \text{dT} > \text{dC} \approx \text{dA}$ şeklindedir. $^1\text{O}_2$ güçlü bir oksitleyici olduğundan guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay tepkimeye girer (45). İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona kanserleşmeye ve ölüme yol açarlar (46, 47). Sitotoksisite, büyük oranda, nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA,

serbest radikallerden kolay zarar görebilen önemli bir hedeftir (48, 49, 50). T lenfosit leri genelde serbest radikal saldırısına karşı daha hassastırlar. *İn vitro* deneylerde serbest oksijen radikallerinin, T-süpresör hücreleri için T-helper hücrelerine göre daha sitotoksik oldukları gösterilmiştir. Bu bulgular, serbest radikal tepkimelerinin , immün süpresör hücrelerin otoimmün tepkimeleri kontrol etmelerini engelleyebilecekleri tarzındaki görüşü desteklemektedir.

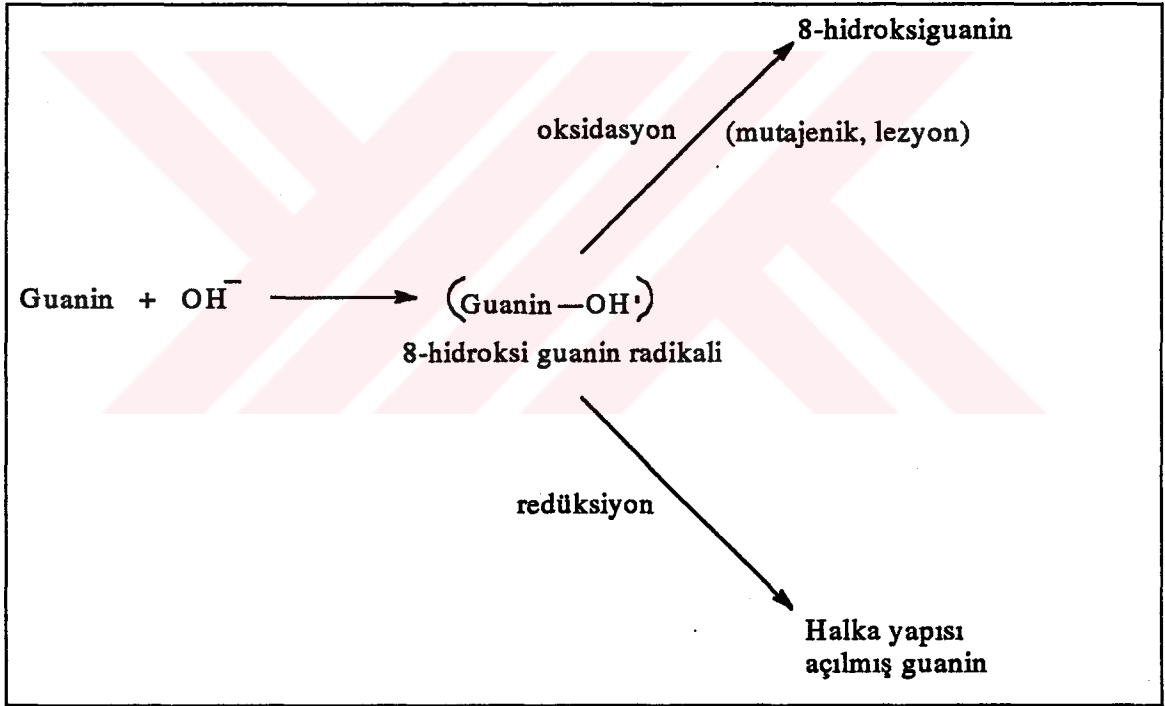
1.5. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN NEDEN OLDUĞU PATOLOJİK DURUMLAR

Serbest oksijen radikallerinin oluşturdukları çeşitli hasarlardan dolayı pekçok hastalığın patogeneğinde önemli rol oynarlar. Diabet ve diabet komplikasyonlarının gelişimi, kroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psoriasis romatoid artrit, Behçet hastalığı, çeşitli deri, kas ve göz hastalıkları, kanser ve diğer yaşlılık hastalıkları gibi birçok hastalıkta serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir (51, 52, 53, 54). Ancak bu hastalıkların çoğunda, serbest radikallerin hastalığın sebebi mi, yoksa bir sonucu olarak mı meydana geldikleri tam olarak bilinmemektedir. Yaptığımız çalışmalar ile ilgili olarak özellikle kanser ve yaşlanmanın belirtilen radikallerle ilişkisi ve öne sürülen mekanizmalar detaylıca incelenecektir. Kanser oluşumunun % 75-80 lik kısmının çevresel şartlardan %30-40 lık bir kısmının ise beslenme ile ilişkili olduğu bilinmektedir (55, 56, 57).

1.5.1. Serbest Oksijen Radikalleri Kanser İlişkisi

Serbest oksijen radikalleri, karsinogenezisin ilerleme basamağında çok daha fazla etkin rol oynamaktadırlar. Çeşitli klinik ve epidemiyolojik çalışmalar, serbest oksijen radikalleri, lipid peroksidasyonu ve peroksidasyon ürünleri ile karsinogenezis arasında bir ilişki bulunduğunu göstermiştir. Birçok karsinojen maddenin hücre etrafındaki oksidatif stresi artırarak kansere sebep olduğu anlaşılmıştır. Bu maddeler, SOD, GSH-Px ve CAT aktiviteleri dahil hücrenin antioksidan savunmasında ani ve sürekli bir

azalmaya sebep olurlar. Serbest radikaller, kanserin başlangıç, ilerleme ve gelişme safhalarında etkili olmakla beraber bu etki ilerleme safhasında daha belirgin diğer safhalarda ise nisbeten azdır (58, 59). Serbest radikal etkisi sonucu DNA ve kromozomlarda kırılma ve onkogenlerde aktivasyon meydana gelir. Süperoksit üretimi özellikle mitokondride fazla olduğundan mitokondrial DNA daha fazla hasar görür (60). DNA yakınlarında sentezlenen hidroksil radikalleri pürin ve pirimidin bazlarına saldırarak mutasyonlara sebep olurlar (61). Oksidatif sresten en çok etkilenen bazlar, DNA' daki Guanin ve sitozindir. Deoksiguanozindeki 8 nolu karbona bir oksijen atomunun bağlanması ile 8-hidroksiguanozin oluşturur. Bu bileşik fizyolojik pH'da 8-oxo guanozine dönüştür ki bu da DNA 'da anormal baz dizilişine ve böylece mutasyonlara neden olur (62). Aynı şekilde oksidatif şartlarda deoksisitozinden 5-hidroksisitozin meydana gelir (şekil 1.14).



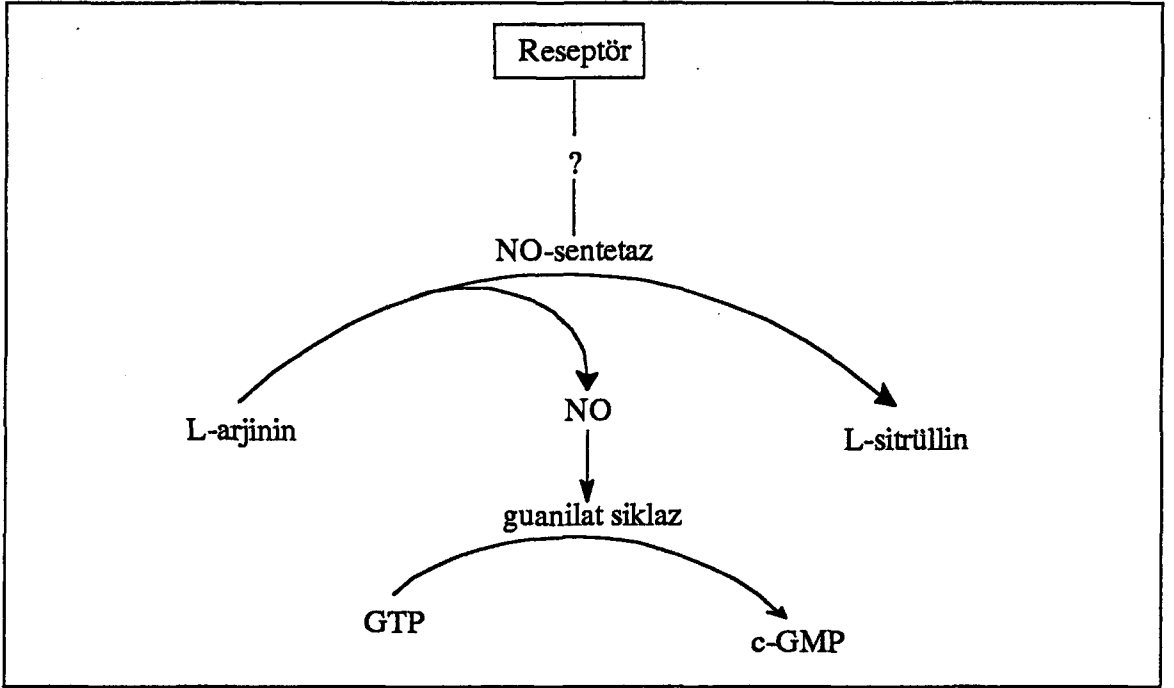
Şekil 1.14. Guaninin hidroksilasyonu (19).

Guanindeki halka yapısının açılması DNA replikasyonunu durdurur ve bu bileşiğin DNA'yı tamir edici enzimler tarafından ortadan kaldırılması yeni hatalara sebep olur.

Süperoksit radikali proteinlerdeki bütün aminoasitlerle tepkimeye girebilir. Örneğin, organik radikal (R-S*) aracılığı ile disülfit oluşumuna neden olur.

Sistein aminoasitlerinin pekçok protein aktivitesi ve konformasyonu için önemli fonksiyon gördüklerinden, bu tip bir oksidasyon proteinlerin yapı ve fonksiyonunun bozulmasına neden olur. Sistein bağımlı enzimlere, cAMP düzeyini ayarlayan iki membran enzimi olan adenilat siklaz ve fosfodiesteraz örnek verilebilir. Bu iki enzim hücrede cAMP düzeyini kontrol ederler. cAMP hücre bölünmesinin önemli bir düzenleyicisidir. Pekçok tümör sisteminde bu iki enzim aktivitesinin ve cAMP düzeyinin , normal hücrelerle karşılaştırıldığında anormal olduğu bilinmektedir. Proteinlerde perotein-disülfid redüktaz aktivitesinin artması $O_2^- \cdot$ 'nin neden olduğu disülfid artışının bir sonucudur. Süperoksit, oksitleyici bir bileşik olmasının yanısıra, aldığı tek elektronu alıcısına vererek indirgeyici olarak da davranabilir. Süperoksit, özellikle metal iyonlarını indirgeyerek hücrede metal iyonlarının oksidasyon-redüksiyon düzeyini bozar. Örneğin, ferrik demiri ferroz formuna indirger (19).

Hücrede pekçok enzim kofaktör olarak metal iyonlarını kullandıklarından kofaktörlerin oksidasyon-redüksiyon düzeyindeki değişimi onların aktivitelerini de etkiler. Metal iyonlarından özellikle demirin oksidasyon düzeyinin kanserde önemli olduğunu gösteren deliller vardır. Ayrıca Fe^{2+} , hücrede H_2O_2 ile $O_2^- \cdot$ arasındaki tepkime ile (Fenton Tepkimesi) tekil oksijen ve hidroksil radikalinin oluşumunu katalizler. Bu iki radikal de tümör hücrelerinde üretildikleri bilinmektedir. Hidroksil radikali ile tepkimeye girerek onu ortamdaki uzaklaştıran dimetilsülfoksit, lösemi ve nöroblastoma hücrelerinde biyokimyasal ve morfolojik farklılaşmayı önler. Hidroksil radikalinin GTP'den cGMP sentezini katalizleyen guanilat siklaz enzimini aktive ettiği bulunmuştur. cGMP, cAMP gibi hücre bölünmesinin regülasyonunda fonksiyonu olan bir bileşiktir. Çeşitli kötü huylu tümörlerde guanilat siklaz aktivitesi ve cGMP düzeyinin yüksek olduğu bulunmuştur.



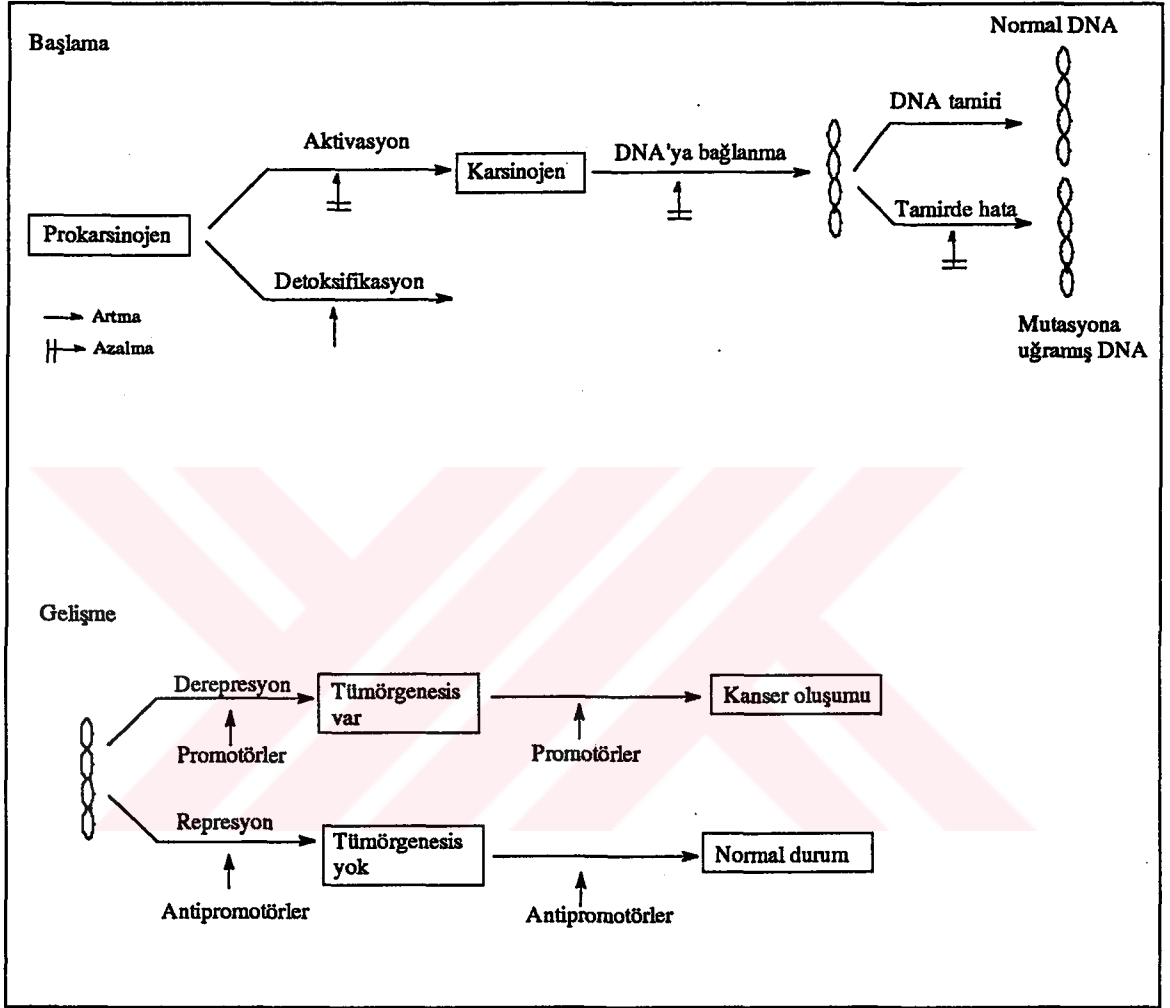
Şekil 1.15. NO aracılığıyla guanilat siklaz enziminin aktivasyonu (19).

Ayrıca, kısa ömürlü ve oldukça reaktif bir oksijen türevi olan nitrik oksit (NO), hücredeki haberci moleküllerden birisi olup, muskarinik veya histamin reseptörleri gibi çeşitli reseptörlerin aktivasyonu sonucu NO-synthetaz tarafından L-arjininden sentezlenir (63). Nitrik oksit, biyolojik sistemlerde artık bir medyatör olarak tanımlanmaktadır. Endotelde oluşan ve relaksasyon faktörü olarak tanımlanan maddenin NO olduğu anlaşılmıştır. NO bir nörotransmitterdir, trombosit agregasyonunu önler ve makrofaj fonksiyonunda önemli bir rolü vardır. Guanilat siklaza etki ederek guanozin trifosfattan (GTP) siklik guanozin mono fosfat (cGMP) sentezini sağlar ve bu molekül aracılığı ile etki eder (şekil 1.15). NO, Fe-S proteinlerden demiri çıkararak yerine kendisi bağlanır. Böylece fenton tepkimesini uyarır ve bu mekanizma ile karsinogenezisde rol oynar (19).

Araşidonik asit metabolizmasının inhibitörleri ile tümör ilerlemesi durdurulmuştur. Bu da lipid peroksidasyonu ile karsinogenezis arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Nitekim araşidonik asidin hidroperoksi yağ asitleri gibi bazı metabolik ürünlerinin tümör oluşumuna götürebileceği kaydedilmiştir. Linoleik ve araşidonik

asidin ilk otooksidasyon ürünlerinin (hidroperoksi ve hidroksi yağ asitleri gibi) kolon mukoza DNA sentezini ve ornitin dekarboksilaz aktivitesini arttırdığı saptanmıştır.

Kimyasal karsinogenezisde , karsinojen maddelerin elektrofilik metabolitlerinin kritik bir öneme sahip oldukları gösterilmiştir. Özellikle bu kimyasallardan aromatik aminlerin bir kısmı öncül bir kısmı da esas karsinojen madde özelliğindedirler. Esas karsinojen formda olanlar, hücre bileşenlerini etkileyerek neoplastik transformasyona neden olurlar ve birçok metabolik yolun son ürünleridir. Kimyasal karsinojenlerin metabolizmaları sonucunda enzimatik veya nonenzimatik olarak üretilen serbest radikal türevleri yüksüz ve ortaklanmamış elektrona sahip olduklarından dolayı aşırı reaktiftirler. Birçok genin aktivitesi redoks tepkimeleri ile kontrol edilmektedir. Serbest radikaller de redoks tepkimelerini başlattıklarından dolayı oksidatif stres, bazı genlerin aktive olmasına sebep olur (21, 47). Sonuçta, serbest radikaller onkogenleri aktive ederek hücre çoğalmasını arttırmırlar. Nitekim hücre çoğalması ve farklılaşmasında rol alan transkripsiyon faktörlerini kodlayan c-fos, c-myc, c-jun ve b-aktin genleri ile bir transkripsiyon faktörü olan NF_κB geni serbest radikaller tarafından aktiveleştirilirler. Buna ilaveten tümör supressör genlerinin serbest radikaller tarafından inaktive edilmesi karsinogenezisin başlamasına sebep olabilir (şekil 1.16). Çeşitli kimyasal karsinojenlerle yapılan çalışmalarda oluşan serbest radikallerin, direkt DNA'ya etki ederek kanser oluşmasına sebep oldukları anlaşılmış ve bu kimyasal karsinojenlerin özellikle binlerce kimyasalın bulunduğu sigara dumanında çok fazla bulunduğu (Özellikle polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), aza-arenler, aromatik aminler, N-nitrosoaminler, aldehidler.) belirtilmiştir (9, 55). Kalsiyum homeostazisi nin serbest radikaller tarafından bozulması da karsinogeneziste çok önemli rol oynar (64).



Şekil 1.16. Kimyasal karsinogenezisin oluşum mekanizması (55).

Hücre zarının normal yapısının serbest radikal etkisi sonucu bozulması hücre içi kalsiyum miktarının artmasına sebep olur. Kalsiyum-kalmodulin etkileşimi birçok protein kinaz enzimini aktive eder. Protein kinazlar da S6 kinazı aktive ederler. S6 kinaz, protein sentezinin aktivasyonunda ve hücre çoğalmasında rolü olduğu sanılan

ribozomal S6 proteinini fosforile ederek aktifleştirir. Böylece hücre çoğalması arttırılır. Buna ilaveten, hücre çoğalması ve farklılaşması dahil birçok hücre içi olayı düzenleyen protein kinaz C de oksidatif stresle aktifleşir.

Tümörlerde oksijen metabolizmasının normal olmayıp, oksijen toksisitesinin başlıca sebebinin antioksidan savunma mekanizmasındaki yetersizlik olabileceği ileri sürülmüştür. Tümörlerde SOD ve diğer antioksidan enzimlerin aktivitelerinde genelde azalma gözlenmiştir.

1.5.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Yaşlanmaya Etkisi

Yaşlanma önlenemeyen, kronolojik, biyolojik, sosyal ve psikolojik boyutları olan bir süreçtir (65). İnsan ömrünün en fazla 100-110 yıl olmasına karşın, günümüzde ortalama ömür 70 yılı aşmıştır. Madem ki her canlı toplumda yaşlanma sırasında ölme probabilitesi, gittikçe artış gösteren bir parabol çizer, o halde yaşlanma olayını açıklığa kavuşturmak için öyle bir biyolojik olay saptanmalıdır ki, zaman içindeki gelişimi yukarıda belirttiğimiz parabolik eğriye paralel seyretsin. Bu konuda ileri sürülmüş olan hipotezler değişik ve yetersiz olmakla beraber, hepsi sonuç olarak bir ortak çizgide birleşirler: *Yaşlanmanın bütün devrelerinde hücreler ve hücreler arası dokuda bir “ yıpranma olayı”nın varlığı bir gerçektir.* Fakat, bu sonucu hazırlayan yıpranma düzeneği hakkında çeşitli varsayımlar ortaya atılmıştır. Bu konu ile uğraşan araştırmacıların bazıları yalnızca dış etkenler üzerinde durarak kozmik ışıklardan tutun da ısı enerjisi flüktüasyonlarına; ağır su birikimine, hatta yerçekimi etkisine kadar çeşitli sebepler düşünmüşlerdir. Diğer bir grup araştırmacı ise, doğal iç etkenlere dayanarak otointoksikasyon, oto-antikorlar ve somatik mutasyonlar üzerinde durmuşlardır. Daha başkaları da morfogenetik olaylar üzerinde durarak doğal program yetersizliği ve diferansiyasyonun bir sonucu olarak yıpranma olayını açıklamak istemişlerdir (66). Yaşlanmadaki organik yıpranmanın işlevsel sonucu, homeostaz potansiyel gücünün zayıflamasıdır; yani çeşitli etkenlere karşı yaşlanmış organizma, iç ortamını sabit tutmakta zorluk çekmektedir. Yaşlanmanın organlar düzeyindeki belirtileri işlevlerin azalması şeklinde belirlenir, doku ve hücrede yaşlanma, aktif parenkim dokusunun

azalmasıdır; subselüler düzeyde ise hücre organelleri ve biyolojik elemanların moleküler düzeydeki değişimleri, yaşlanma belirtileri olarak ortaya çıkar (67).

Metabolizma sırasında elektronların oksijene tek olarak eklenmesiyle, aktif oksijen ara maddeleri meydana gelir ve bunların ikisi serbest radikalleri oluşturur: hidroperoksil ve hidroksil radikali. Fizyolojik pH değerlerinde hidroperoksi radikali süperoksit anyon radikali şeklinde bulunur. Süperoksit, özellikle hücrel elektron transport zincirlerindeki pekçok metabolik süreçlerde meydana gelir. Örneğin, mitokondri ve endoplazmik retikulumda , zincirin çeşitli komponentleri ile elektronlar oksijene aktarılır. Tüketilen oksijenin %85'i mitokondriyel düzeyde kullanılır. Dejeneratif hastalıklarla yaşlanma arasındaki ilgi, olasılıkla, dokulardaki moleküler oksijen konsantrasyonuna bağlıdır. Böylece mitokondriler, memelilerde (ve belki de aşağı organizmalarda bile) bir “ biyolojik saat “ işlevini üstlenmiş olmaktadır. Doymamış yağ asitleri gibi kompleks moleküller, oksidatif hasara uğramaya özellikle uygundur. Doymamış lipid moleküllerinden hidrojen atomlarının kolayca ayrılması ile karbon merkezli bir radikal oluşur (şekil.1.13). Bu gibi radikaller oksijenle hızlı tepkimeye girerek, oksijen radikallerini oluştururlar. Lipid oto-oksidasyonu (peroksidasyon) bir kez başlayınca, zincirleme tepkimeyle gelişir ve peroksil radikali doymamış lipid moleküllerini etkileyerek hidrojen atomu kopmasına neden olur. Lipid oto-oksidasyonunun primer ve stabil ürünleri lipid hidroperoksidleridir. Dejeneratif süreçlerin belirteçleri olarak fluoresan yaşlılık pigmentleri uzun zamandan beri bilinmektedir. Bu pigmentler yaşlanmış dokularda lipid peroksidasyon ürünlerinin amino asid, fosfolipid ve DNA' daki primer amino grupları ile tepkimeleri sonucu meydana gelirler. Oluşan polimerik lipopigmentler renklerine, fluoresan özelliklerine, çözücüde eriyebilmelerine ve kimyasal yapılarına göre “ preceroid “, “ ceroid “ ve lipofuscin “ olarak nitelendirilirler (65, 66).

Genel formüllerinin $RN=CH-CH=CHNHR$ olduğu sanılmaktadır. Yaşlanma ile birlikte lipofuscin sentezi artar ve memelilerde özellikle sinir sistemi, kardiyak ve kas lifleri gibi postmitotik (bölünmeyen) hücrelerde birikir (68, 69). Normal Lipidlerin lizozomlarda

metaller tarafından katalizlenen peroksidasyon tepkimeleri sonucunda lipofuscine oluşmaktadır.

Serbest oksijen radikallerinin en reaktif olan hidroksil radikali etkisine bütün organik moleküller hedef olabilirler. Bununla beraber moleküller çevreye göre radikal saldırısı sonuçları değişik olabilir; eğer organik molekül sitozol içinde ise ve yakınındaki diğer moleküllere oranla uzakta ise, hidroksil radikali saldırısı çok fazla olasılıkla yalnızca bir miktar intramoleküler hasara neden olabilir. Diğer yandan, daha kompakt biyolojik yapılarda örneğin zarlarda, moleküller o kadar yanyanadır ki intermoleküler “cross-linkage” olasılığı çok yüksektir. Başka bir deyişle, hidroksil radikali saldırısı, sitozolik bileşenlere kıyasla membran bileşenlerinde daha büyük hasara neden olur (70, 71). Böylece hücre membranı hasarının, hücre yaşlanmaya neden olacağı düşüncesi önem kazanmaktadır. 1956 yılında **Denham Harman**, “yaşlanma sürecinin belli başlı nedeninin serbest oksijen radikallerinin sürekli oluşumu olduğu” düşüncesini ileri sürmüştür. Yaşlanmanın membran varsayımı ise ilk kez 1978 yılında **Zs-Nagy** tarafından ortaya atılmıştır. Hücre yaşlanmanın fizyolojik düzeneği, kısır bir döngü şeklinde çalışarak hücrelerin işlevsel bozukluğuna yol açar. Şöyle ki:

- Serbest oksijen radikali hasarı sonucu, hücre membranının K^+ ve su için geçirgenliği bozulur;
- Hücreler K^+ u içerde biriktirir ve su kaybeder; fakat membran potansiyeli devam etmektedir;
- Hücre kolloidler giderek daha yoğunlaşır, enzim işlevleri yavaşlar;
- Sonuçta; RNA ve protein sentezi yavaşlar, yaşlılık pigmentleri ve diğer ürünler birikir.

Yukarıda açıklanan yaşlanmanın membran varsayımı dikkate alınır, yaşlanma sırasında bütün homeostatik sistemlerde saptanan potansiyel gücü azalışında reseptörler sisteminde uyarı eşiğinin yükselmesi ortak bir neden olarak kabul edilebilir. Reseptörlerin uyarı eşiği yükselince, her türlü etkene karşı homeostatik sistemler işlev kazanmakta gecikecekler veya, belli düzeyler için hiç tepki gösteremeyecekler ve çevreye uyum zayıflayarak yıpranma oluşacaktır. Bu durum, yaşlanmanın açıklanması

nı sağlar. Yaşlanma sebebi olarak bilinen oksidatif hasardan en fazla etkilenen organel oksidanlar için en büyük oluşum yeri olması sebebiyle mitokondridir. Yaşlanmaya bağlı olarak mitokondride meydana gelen değişikliklerin tümü aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (72, 73, 74, 75, 76, 77). Tablo 7.

Ölçülen Parametre	Etki	Organ	Çalışılan Hayvan
Oksidant Üretimi ve Hasar			
$O_2^{\cdot -}$ ve H_2O_2 üretimi	Artma	Kalp	Sıçan
$O_2^{\cdot -}$ ve H_2O_2 üretimi	Artma	Karaciğer	Çeşitli ...
$O_2^{\cdot -}$ ve H_2O_2 üretimi	Artma	Böbrek, Kalp	Çeşitli...
mtDNA'nın Oksidatif Hasarı	Artma	Beyin, Diafram kası	İnsan
mtDNA'nın Oksidatif Hasarı	Artma	Karaciğer	Sıçan
Mitokondrial DNA'da Yaşlanma			
mtDNA'da delesyon	Artma	Beynin değişik bölgeleri	İnsan
mtDNA'da delesyon	Artma	Diafram kası, çeşitli org...	İnsan
mtDNA'da nokta mutasyonu	Artma		İnsan
mtDNA'da dimerleşme	Artma	Beyin, kalp, böbrek	Fare
mtDNA-protein çapraz bağı	Artma	Karaciğer	Sıçan
Membran ve Elektrolit değişikliği			
Kompleks I	Azalma	Beyin	Eşek
Kompleks I ve IV	Azalma	Beyin	Eşek
Kardiopilin düzeyi	Azalma	Kalp, nonsinaptik nöron	Sıçan
Mabran kolesterol/fosfolipid	Artma	Kalp	Sıçan
Membran Akışkanlığı	Azalma	Karaciğer	Sıçan
Su içeriği	Azalma	Kalp	Sıçan
Membran Potansiyeli	Azalma	limfosit	Fare
ADP/ O	Değişiklik yok	Değişik.	Değişik

Tablo 7. Yaşlanmaya bağlı olarak oluşan mitokondriyal değişim (72).

Sonuç olarak, tüm bu sonuçlara rağmen serbest oksijen radikallerinin yaşlanmanın sebebi mi yoksa sonucu mu olduğunu söylemek çok zordur. Ancak, radikallerin en azından başlamış olan yaşlanma olayını hızlandırdıkları ve yaşlanma ile beraber ortaya çıkan birçok hastalığın patogenezinde önemli rol oynadıkları söylenebilir (78, 79).

1.5.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Ateroskleroz ve Reperfüzyon-İskemideki Fonksiyonları

Arterlere yerleşen kolesterol'ün birincil olarak düşük dansiteli lipoproteinlerden (LDL: Low Density Lipoproteins) kaynaklandığı bilinmekte ve vücutta artmış LDL konsantrasyonunun ateroskleroz riskini arttırdığı tahmin edilmektedir. Ateroskleroz gelişmesinde ilk ve en erken basamaklardan biri de köpük hücrelerinin arterlerde birikmeye başlamasıdır, (köpük hücreleri oksitlenmiş LDL'yi içlerine almış makrofajlar olarak tanımlanabilir). Köpük hücreleri kolesterol içeren sıvı damlacıklarla dolu yapılardır ve yağlı ateroskleroz lezyonlarında anahtar rol oynarlar. LDL kanda serbest oksijen radikalleri için önemli bir hedeftir ve LDL'nin oksidasyonu aterosklerozun gelişiminde rol oynar (69). Yapılan çalışmalar LDL'nin oksidatif değişiminin makrofajlarca daha fazla tutulmasına ve makrofajların köpük hücrelerine dönüşümüne yol açtığını göstermektedir. Aterosklerotik lezyonlardan izole edilen LDL'nin yapı ve biyolojik özellikleri açısından doğal LDL'den farklı olduğu fakat o-LDL'ye çok benzediği gösterilmiştir. Makrofajların köpük hücresi meydana getirmek üzere modifiye LDL'leri almaları doğal LDL'ye göre daha kolaydır. LDL oksidasyonu LDL fosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ile başlar. Peroksidasyonu başlatan serbest radikallerin, hücrelerde muhtemelen lipoksigenaz enzimleri tarafından üretildikleri tahmin edilmektedir. Çünkü, lipoksigenaz inhibitörleri hücrelerin yol açtığı oksidatif LDL modifikasyonunu tamamen inhibe ederler. o-LDL'nin köpük hücresi oluşumunda ve aterogenezdeki rolü kesin olarak saptanmıştır

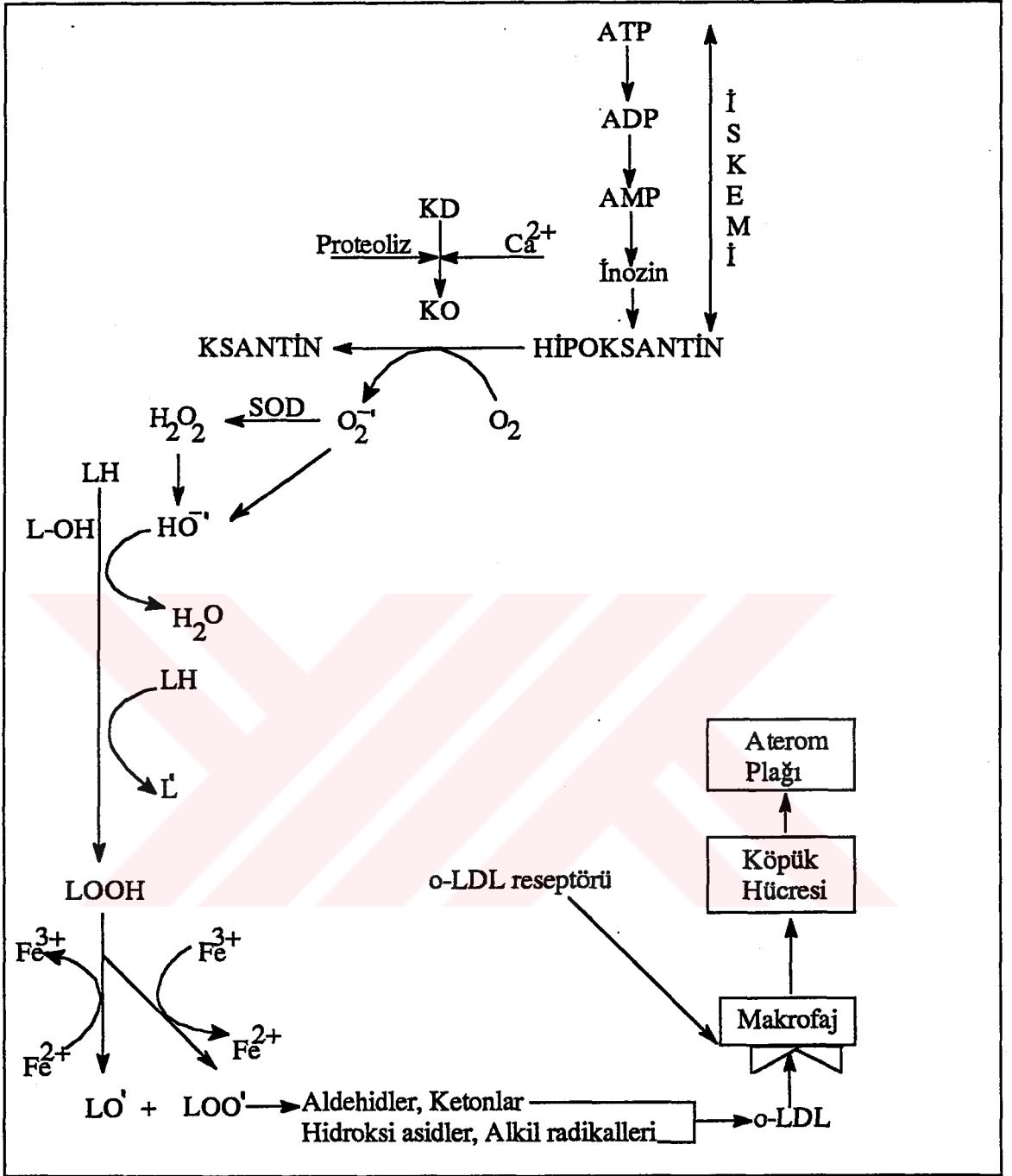
Şekil.1.17. o-LDL, aterojenik olaya dört farklı yolla katılır:

- 1-) o-LDL, makrofajlar tarafından süpürücü "scavenger" reseptörler aracılığıyla alınır, böylece köpük hücresi ve lezyon oluşumuna neden olur.
- 2-) o-LDL, monositler için düz kas hücreleri ve endotelden salınan faktörler gibi kimyasal çekici bir maddedir. Makrofajların damar çeperine göç etmelerini hızlandırır. Ayrıca, o-LDL makrofajların damar çeperinden plazmaya kaçışını engelleyerek, arter çeperinde kalış süresini de uzatır.

3-) o-LDL, arter duvarındaki hücreler için sitotoksikdir. Hücresel hasar, endotel hasarı oluşturabilir.

4-) o-LDL, EDRF (NO) aracılığı ile düz kas gevşemesini inhibe eder.

İskemi (yani kan akımının azalması) dolaşımsal problemlere veya cerrahi gelişimlere bağlı olsun, ilgili alanda doku hasarına yol açan bir olgudur. Bu iskemi dönemini izleyen reperfüzyonda (daha önceden iskemik olan dokunun kan ve oksijene yeniden kavuşması) ise, dokuda bu kez yüksek doku oksijen gerilimi oluşur ve bu durum iskemi esnasında başlatılan serbest radikal reaksiyonlarına ve lipid peroksidasyonuna yol açar (15, 80). Özellikle hidroksil radikalinin miyokarda yapısal değişikliklere yol açtığı ve *in vitro* uygulanan SOD'un bu değişiklikleri önlediği, dolayısıyla serbest oksijen radikallerinin gerçekten hasarla ilgili oldukları gösterilmiştir (74, 81, 82, 83, 84). Miyokarda birçok serbest radikal kaynağı bulunduğundan, bu radikallerin en önemli üretim yerini belirlemek oldukça zordur. Çünkü farklı periyodlu iskemi ve reperfüzyondan sonra serbest oksijen radikal leri farklı kaynaklardan üretilirler. Dolayısıyla iskemi periyodundan sonra radikaller bir veya iki kaynağa bağlıyken, perfüzyon geciktirilirse, diğer bazı kaynaklar da önemli hale gelirler.



Şekil.1.17. İskemi-Reperfüzyonda o-LDL ve köpük hücre oluşumu (19).

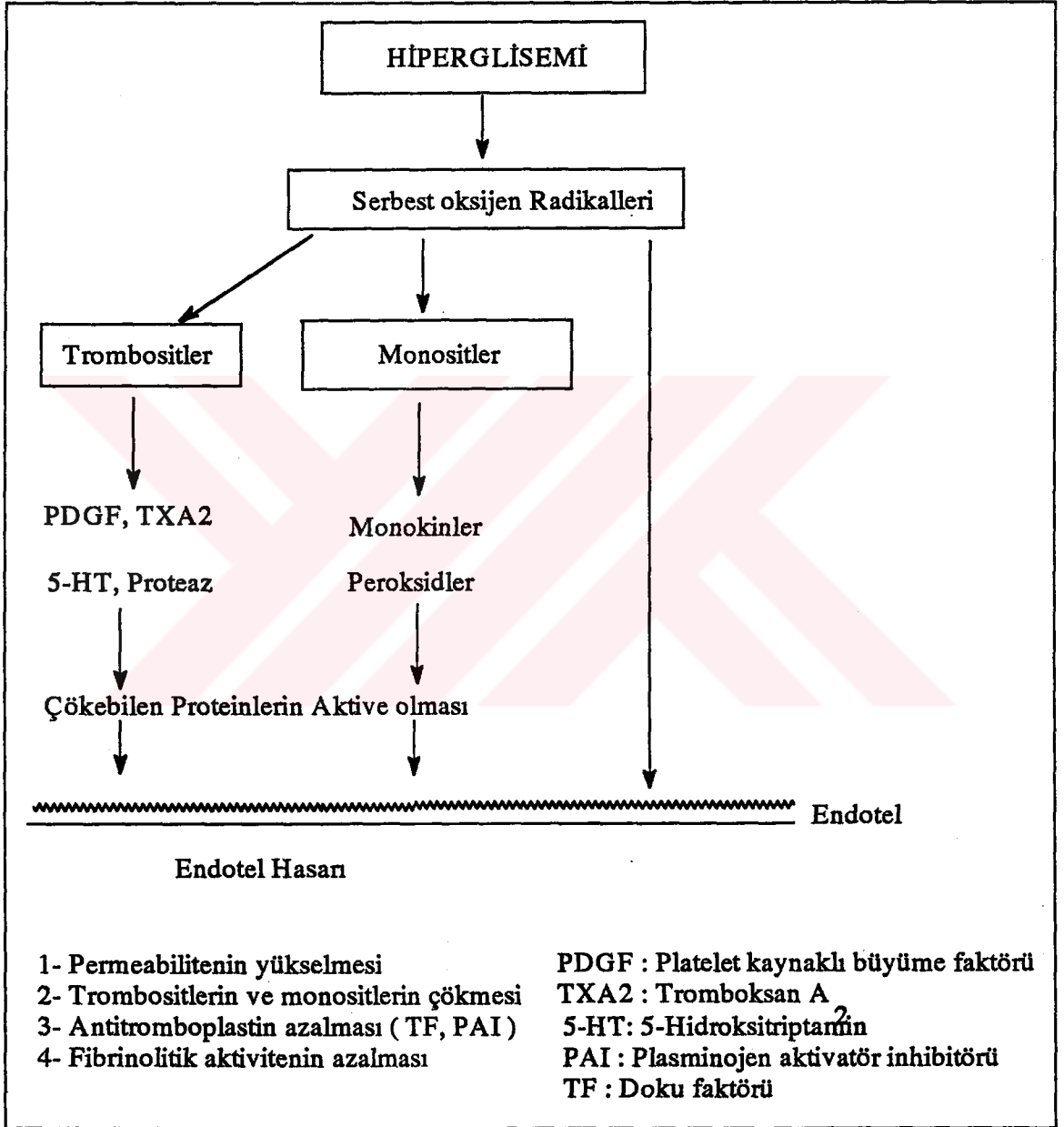
1.5.4. Diabette Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü

Diabet hastalığı kandaki yüksek şeker miktarı (hiperglisemi) ile tanımlanır. Şeker hastaları, kandaki şeker miktarının regüle eden insülin hormonunu yeterli düzeyde üretemezler. Oksidatif stres diabet ve diabetin daha sonraki komplikasyonlarının patogeneğinde önemli bir rol oynar. Enzimatik olmayan glikozilasyon, otooksidatif glikozilasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yolu aktivitesi, inflamatuvar mediatörlerin düzeyleri ile antioksidan savunma sistemindeki değişiklikler, hipoksi ve iskemik reperfüzyon hasarı sonucu oluşan lokalize doku hasarı diabette oksidatif stresi arttıran mekanizmalardır. Diabet hastalarında yüksek miktarlarda lipid peroksidasyon düzeyi gözlemlendiğinden, aterosklerozda olduğu gibi serbest radikallerin diabet hastalığına özgü damar komplikasyonlarının ve sinir sistemlerindeki bozuklukların oluşumuna neden olduğu tahmin edilmektedir (19).

Kanda yüksek miktarda bulunan glukoz, proteinlerin amino grupları ile tepkimeye girerek proteinlerin değişimine neden olur. Bu zincirleme tepkimeler esnasındaki en önemli ara ürünlerden ketoaminler, tepkimeler sonucunda vücutta parçalanmayan ve hücrelerin zarar görmesine neden olan maddelere dönüşürler. Diabet hastalığında oluşan oksidatif stres sonucunda trombositler ve monositler aktive edilerek, endotel hasarlarının oluşumuna neden olurlar. Bu hasarlar şekil 1.18 de görüldüğü gibi permeabilitenin yükselmesi, antitromboplastinin ve fibrinolitik aktivitesinin azalması şeklinde olur.

Diabetin başlamasında oksidasyonun rol oynadığına ait verilerin çoğu, deney hayvanlarında diabeti oluşturan 2 ilaç olan alloksan ve streptozotosin ile yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Bu kimyasal maddelerin her ikisi de oksidan madde meydana getirerek langerhans adacıklarını selektif olarak tahrip ederler. Bunlardan alloksan, intraselüler redükthanlar olan askorbat ve tiollerle reaksiyona girerek onların antioksidan etkilerini engeller ve böylece oksidan üretimine sebep olurlar. Diabette plazma lipoproteinlerinde, eritrosit membranı lipidlerinde ve çeşitli dokularda lipid peroksidasyonunun arttığına dair çok sayıda çalışma bulunmakla beraber bu artışta

enzimatik (araşidonik asid yolu) ve nonenzimatik (otooksidatif) lipid peroksidasyonundan hangisinin daha çok sorumlu olduğu bilinmemektedir (85). Ancak, hem lipoksigenaz yolu ile prostaglandinlerden hem de süperoksit ve hidrojen peroksit etkisi sonucu enzimatik olmayan yolla diğer lipidlerden lipid peroksidlerinin meydana geldiği sanılmaktadır.



Şekil.1.18. Diabette oluşun endotel hasarı (19).

Diabet komplikasyonlarında lipidlere ilaveten protein oksidasyonu da artar. Özellikle, ekstraselüler proteinlerden kollajen, elastin, laminin, kristalin ve miyelin kılıfındaki proteinlerde meydana gelen değişiklikler önemlidir. Sonuçta, bu proteinlerce zengin olan dokularda (lens, damar, basal membranlar gibi) meydana gelen yapısal değişiklikler katarakt, mikroanjyopati, ateroskleroz ve nefropati gibi diabete bağlı rahatsızlıklarda önemli rol oynar.

1.5.5. Serbest Oksijen Radikalleri ve Göz Hastalıkları

Göz, aşırı miktarda serbest radikal etkisine maruz kalan bir organdır. Çünkü, yaşlanma ile birlikte artan oranda ultraviyole ışığının tesirinde kalır. Göz, bu radikallerin etkisine yatkın olduğu gibi yeterli miktarda antioksidan savunma sistemlerine de sahiptir. Gözde yüksek konsantrasyonlarda antioksidan enzimler, serbest radikal tutucuları ve süperoksit üretimi inhibitörleri bulunur. Omurgalıların retinaları diğer canlılarından mg başına 5-10 kat daha fazla oksijen tüketir. Bu yüzden retinal gibi ışığa duyarlı maddelerin oksijenle etkileşimi sonucu tekil (singlet) oksijen meydana gelir. Retina hem ışığın fotoreseptörler ve retinal pigment epitelyumu üzerine olan direkt etkileri hem de termal hasar ve buna eşlik eden inflamasyondan dolayı, ışığın zararlı etkilerine maruz kalır. Çünkü, retinada H_2O_2 üreten fotosensitize edici ajanlar ile serbest radikallerden oldukça etkilenen çoklu doymamış yağ asitlerinden fazla miktarda bulunurlar. Katarakt veya halk arasında aksu, akbasma, perde denilen rahatsızlık, dünyada en sık görülen göz hastalıklarından birisidir. Kataraktlı hastaların lens ön kamera sıvılarında H_2O_2 üretimi oldukça fazladır (86). Hidrojen peroksit, özellikle Na-K pompasının hızını düşürür. Katarakta metiyonin ve sistein gibi amino asitlerinin oksidasyon ürünleri yüksek düzeydedir. Lens proteinlerinin fotosensitizasyon sonucu oksidasyonları artar. Disülfit bağlarının oluşumu sonucu protein agregasyonu meydana gelir. Kataraktlı lenslerden izole edilen proteinlerde fazla miktarda metiyonin sülfoksit kalıntıları saptanmıştır. Yine, triptofandan ultraviyole ışınların etkisi sonucu meydana gelen parçalanma ürünü kinureninlerin kataraktlı lens proteinlerinde fazlaca buldukları görülmüştür.

1.5.6. Serbest Oksijen Radikalleri ve Akciğer Rahatsızlıkları

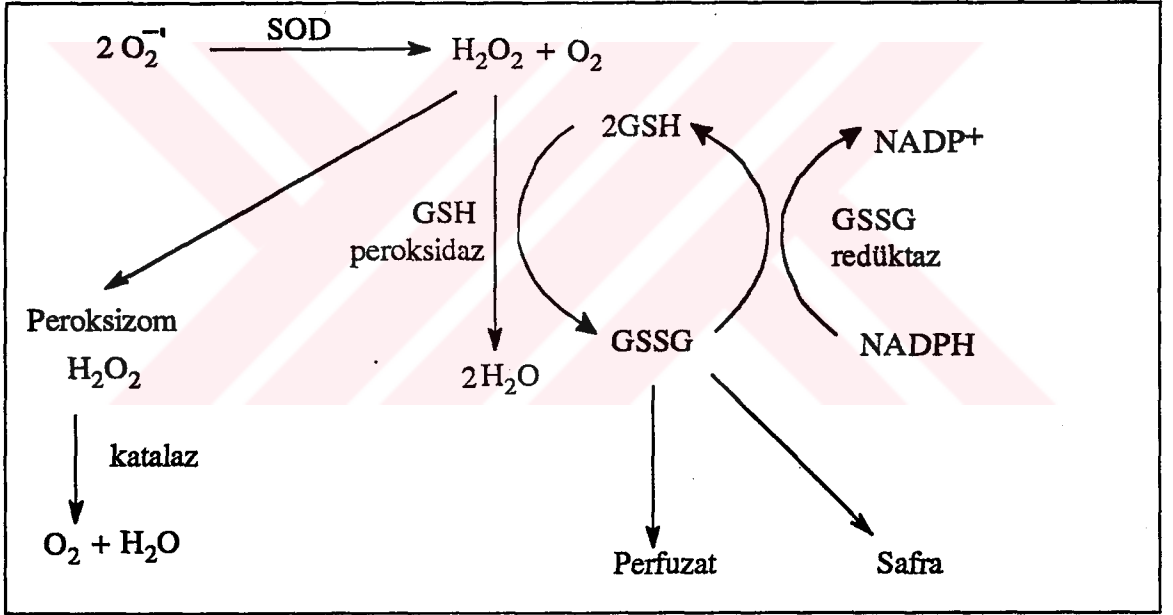
Serbest radikallerin amfizem, bronkopulmoner displazi, pnömokoniozis, bleomisin toksisitesi, parakuat toksisitesi, bütilhidroksitoluen toksisitesi, mineral tozu toksisitesi, sigara dumanı toksisitesi, respiratuar distres sendromu ve astım bronşale gibi birçok akciğer hastalıklarının patogeneğinde rol aldıkları kaydedilmiştir. Serbest oksijen radikalleri astımın önemli özellikleri olan epitelyal hasar ve mukus hipersekresyonuna sebep olurlar. Astımlı kişilerin makrofaj ve lökositlerinden önemli miktarda serbest oksijen radikalleri salıverilir. Bu radikaller bronşial düz kas tonusunu da doğrudan etkilerler. Serbest radikaller, hücre zarındaki araşidonik asid metabolizmasında etki ederler. Özellikle H_2O_2 araşidonik asitten prostaglandin, prostasiklin, tromboksan ve lökotrien sentezini artırır (19). Akciğer açısından bu ürünlerin en önemlisi tromboksan A_2 (TXA_2)'dir. TXA_2 vazokonstrüksiyona sebep olur. Bu yüzden akciğerlerin $O_2^- \cdot$ ve H_2O_2 'ye maruz kalması sonucu vazo- ve bronkokonstrüksiyon ve ödem gelişir.

1.6 Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Oluşturulan Hücresel Savunma Mekanizması

Normal düzeyde kaldıkları sürece zararlı etkileri olmadığına göre, serbest oksijen radikalleri ile mücadele oldukça önemlidir. Serbest oksijen radikallerinin organizmadaki düzeylerini artırıcı etkenler olarak özellikle “ oksidatif stres yapıcı nedenler”in ve risk faktörlerinin iyi belirlenmesi, bunlardan uzak durulması ve mücadele edilmesi ilk yapılması gereken girişim olmalıdır. Serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir (87). Bunlar “*antioksidan savunma sistemleri*” veya kısaca “*antioksidanlar*” olarak bilinirler (88, 89, 90, 91) (şekil 1.19).

Serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerine karşı alınabilecek önlemleri 5 basamakta inceleyebiliriz:

- 1-) Toksik oksidanları oluşum aşamasında durdurmak,
 - 2-) Oksidanların oluşuktan sonra yok edilmesi,
 - 3-) Sekonder oksidanların oluşumuna yol açan zincir tepkimelerini durdurmak,
 - 4-) Hücrelerin antioksidan kapasitesini arttırmak,
 - 5-) Sekonder olarak oluşan toksik metabolitlerin ve mediatörlerin yok edilmesi (10).
- Antioksidan sistemler, endojen (tablo.8) ve eksojen veya farmakolojik antioksidanlar (Tablo.9) olarak iki büyük grupta toplanabilir.



Şekil 1.19. Antioksidatif savunma mekanizması (92).

Enzimatik	
Süperoksit Dismutaz (SOD)	$O_2^{\cdot -}$ detoksifikasyonu
Katalaz	H_2O_2 detoksifikasyonu
Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)	H_2O_2 detoksifikasyonu
Enzimatik olmayan	
Lipid fazda çözünenler	
α - tokoferol	E vitamini
β - Karoten	A vitamini öncülü
A vitamini	
Sıvı fazda çözünenler	
Glutatyon	
Askorbik asit	C vitamini
Ürik asit	Radikal süpürücü
Sistein	" " " "
Bilirubin	" " " "
Albumin	LOOH, HOCl temizleyicisi
Seruloplazmin	SOD'ye benzer mekanizma
Transferrin	Dolaşımdaki demire bağlanır
Laktoferrin	" " " "
Ferritin	Doku demirine bağlanır
Yardımcı Enzimler	
NADPH-kinon oksidoredüktaz	
Epoksid hidrolaz	
GSSG-redüktaz	
Semidehidroaskorbat redüktaz	
Methionin sülfoksit redüktaz	
DNA tamir enzimleri	
Konjugasyon Enzimleri:	
UDP-glukoronil transferaz	
Sülfotransferaz	
GSH- Transferaz	

Tablo.8 Endojen Kaynaklı Antioksidanlar (10, 42).

Ajan Sınıfı	Spasifik Ajan	Etki Mekanizması
Ksantin oksidaz inhibitörleri	Allopurinol Oksipurinol Folik asit Pterin aldehid Tungsten	Ksantin oksidaz etkisi ile süperoksid oluşumunu inhibe ederler.
Proteaz inhibitörleri	Soya fasulyesi tripsin inhibitörü Diğer serin proteaz inhibitörü Fenilmetilsülfonil florür	Ksantin dehidrogenazdan ksantin oksidaz oluşumunu inhibe ederler.
NADPH Oksidaz İnhibitörler	Adenozin Lokal anestetikler Kalsiyum kanal blokerleri Nonsteroid antiinfl. NADPH' a karşı monoklonal antikorlar Cetiedil Difenilin İyodür	Makrofaj ve nötrofillerde NADPH oksidaz etkisi ile süperoksid oluşumunu inhibe ederler.
Süperoksit Dismutaz	Doğal SOD Polietilen glikol-SOD	$O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ reaksiyonunu katalizler
Katalaz	Doğal katalaz Polietilen glikol-katalaz	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ reaksiyonunu katalizler
Nonenzimatik serbest radikal süpürütçüleri	Mannitol Albumin Dimetil sülfoksit (DMSO) Dimetil tiyodre 17-Aminostereoidler Glutasyon Ürat temizleyicisi Biluribin	HO [•] temizleyicisi LOOH, HOCl “ $Fe^{3+} + O_2^{\cdot -} \rightarrow Fe^{2+}$, HO [•] temizleyicisi HO [•] , H ₂ O ₂ , HOCl temizleyicisi LOOH, O ₂ ^{• -} temizleyicisi HO [•] , H ₂ O ₂ temizleyicisi HO [•] , O ₂ ^{• -} temizleyicisi
Demir redüklenmesini inhibe eden ajanlar	Desferroksamin Apo transferrin Seruloplazmin	Serbest Fe ³⁺ bağlar

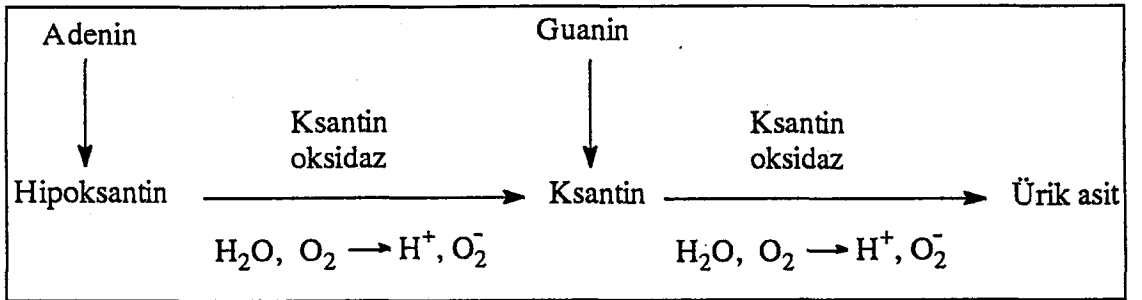
Tablo 9a. Eksojen kaynaklı antioksidanlar (10).

Ajan Sınıfı	Spesifik Ajan	Etki Mekanizması
Endojen antioksidanların aktivitesini artıran ajanlar	Oltipraz Ebselen Glutasyon Asetil sistein	Endojen glutasyon peroksidaz aktivitesini artırırlar
Antinötrofil ajanlar	Antinötrofil serum Antiadezyon etkili ajanlar	Dolaşımdaki nötrofilleri yok eder. Nötrofillerin endotele adezyonunu önlerler

Tablo 9b. Eksojen kaynaklı antioksidanlar (10).

1.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD, Superoxide Oxidoreductase : EC 1.15.1.1)

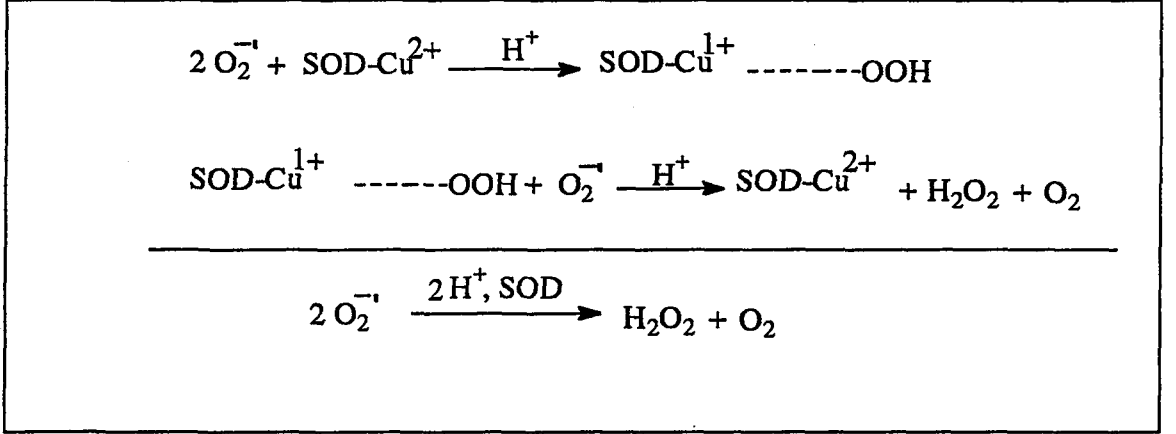
Süperoksit radikallerinin canlılarda üretildiği uzun yıllar bilinmesine rağmen, bu radikallerin temizlenmesi ile ilgili herhangi bir enzimatik etkinlik 1968 yılına kadar bilinmiyordu. 1968 yılında Fridowich ve arkadaşları, daha önce alyuvarlardan saflaştırılan fakat herhangi bir enzimatik aktivitesi bulunduğu saptanamayan, bakır içeren mavi bir proteinin (Erythrocuprein) ksantin oksidaz deney sistemine eklendiğinde sitokrom c'nin indirgenmesini inhibe ettiğini buldular (93). Ksantin oksidaz tepkimesinde süperoksit radikali oluştuğu ve bu radikalın sitokrom c'yi indirgediği daha önceden biliniyordu.



Şekil 1.20. Ksantin oksidaz sistemi (1).

Böylece daha önce başta alyuvarlar olmak üzere çeşitli dokulardan saflaştırılan, fonksiyonu bilinmeyen ve elde edildiği dokuya göre hemocuprein, erythrocuprein,

cerebrocuprein, hematocuprein, vb. diye adlandırılan proteinlerin birer enzim oldukları ve süperoksit radikallerinin dismutasyonunu katalizledikleri gösterildi (şekil.1.21)



Şekil 1.21. Süperoksit radikalının dismutasyon mekanizması (94, 95, 96, 97, 16).

Süperoksit dismutazın, süperoksit anyonuna olan etkisi şu şekildedir: Süperoksit anyonu, Cu^{2+} ve bir arjinin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır. Bu bağlanma sonucunda süperoksitten bir elektron Cu^{2+} 'ye transfer olurken Cu^{1+} ve moleküler oksijen meydana gelir. İkinci bir süperoksit anyonu Cu^{1+} 'dan bir elektron, bağlanma ortağından ise iki proton alarak hidrojen peroksidi oluştururken, enzim tekrar Cu^{2+} formuna dönmüş olur. Bilindiği gibi süperoksit radikalleri kendiliğinden dismutasyona uğrayabilirler. Kendiliğinden dismutasyonun hız sabiti $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{sn}^{-1}$ dir. Buna göre süperoksit radikalleri sulu ortamda fazla birikmezler ve bu nedenle SOD ile katalizlenen dismutasyon önemsiz gibi görülebilir. Oysa iki önemli faktör enzimatik katalizin önemini belirgin şekilde ortaya koyar: Birincisi, SOD ile enzimatik dismutasyonun hız sabiti pH 7.4'de $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{sn}^{-1}$ dir. Bu da kendiliğinden dismutasyondan 10^4 kez daha hızlı bir dismutasyon avantajı sağlar. İkinci bir avantaj ise hücrelerde SOD derişiminin $\text{O}_2^- \cdot$ radikallerinin steady state derişiminden yaklaşık 10^5 kez daha fazla olmasıdır. Örneğin SOD'ın karaciğer hücrelerindeki derişimi 3×10^{-5} molarıdır. Bu nedenle enzimin bulunduğu ortamda iki $\text{O}_2^- \cdot$ radikalının birbirleriyle çarpışma olasılıkları enzim ile

çarpışma olasılığından 10^5 kez daha azdır. Böylece bu iki faktör gözönüne alındığında pH 7.4'de enzim ile katalizlenen $O_2^- \cdot$ radikallerinin dismutasyon hızı, kendiliğinden dismutasyondan 10^9 kez daha hızlıdır. Enzimin fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır (98, 99). Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD enziminin çeşitli canlı türlerindeki dağılımı incelendiğinde, bazı türlerin aerobik koşulları neden tolere etmedikleri anlaşılabilir. Mikroorganizmalardan en yüksek yapılı canlılara kadar, aerobik koşullarda yaşayan canlıların bütün doku, hücre ve hücre organelleri SOD içerirler (100, 101).

Bütün canlılardaki SOD enzimi, kofaktör olarak içerdiği metal iyonuna göre 3 grupta toplanabilir.

a) Bakır ve Çinko İçeren Dismutazlar (Cu,Zn-SOD) :

Cu ve Zn'nun rol aldığı bu enzim, en yüksek katalitik etkiyi göstermektedir. ($k= 2 \times 10^9 M^{-1}sn^{-1}$) ve dimer yapıda olup herbiri 1 Cu ve 1 Zn iyonu ihtiva eden, molekül ağırlığı 16.000 olan benzer iki alt üniteden oluşmaktadır. Esas bulunduğu yerler, ökaryotik hücrelerin sitozolü ve eritrositlerdir. Enzimin etkinliği için bakır mutlaka gerekli iken; çinko Co^{2+} , Hg^{2+} veya Cd^{2+} ile yer değişebilir. Dismutasyon, önceden de bahsedildiği gibi bakır ile $O_2^- \cdot$ radikali arasındaki etkileşimle başarılıdır. Bu enzim mitokondri matriksi dışında ökaryotik hücrenin her organeline bulunan bir dismutazdır. Genel olarak hücrede en bol bulunan izoenzim Cu,Zn-SOD'dur. Ve bu enzim 21 no lu kromozomda lokalizedir.

b-) Mangan İçeren Dismutazlar

Prokaryotik hücreler molekül ağırlığı 40.000 olan, birbirinin aynı iki alt birimden oluşan ve enzimin alt birimi başına birer atom mangan bağlı olan bir dismutaz içerirler. Mitokondri matriksinde lokalize olan bu enzim 80.000 molekül ağırlığında tetramer

c-) Demir ve Mangan İçeren Dismutazlar (Fe-SOD, Mn-SOD)

Bazı bakteriler birden fazla SOD içerirler. Bunlardan biri, bütün prokaryotlarda bulunan Mn-SOD olup hücre sitoplazmasında bulunur. Bazı bakteriler, (örneğin E. coli) periplazmik bölgelerinde demir içeren bir SOD bulundurlar (Fe-SOD). Bu tip mikroorganizmalarda matriks enziminin (Mn-SOD) endojen $O_2^- \cdot$ radikallerine karşı; demir içeren dismutazın (Fe-SOD) ise çevreden gelen radikallere karşı koruyucu fonksiyon gördüğü tahmin edilmektedir (102).

1.6.2. Katalaz (CAT: H_2O_2 Oxidoreductase : EC 1.11.1.6)

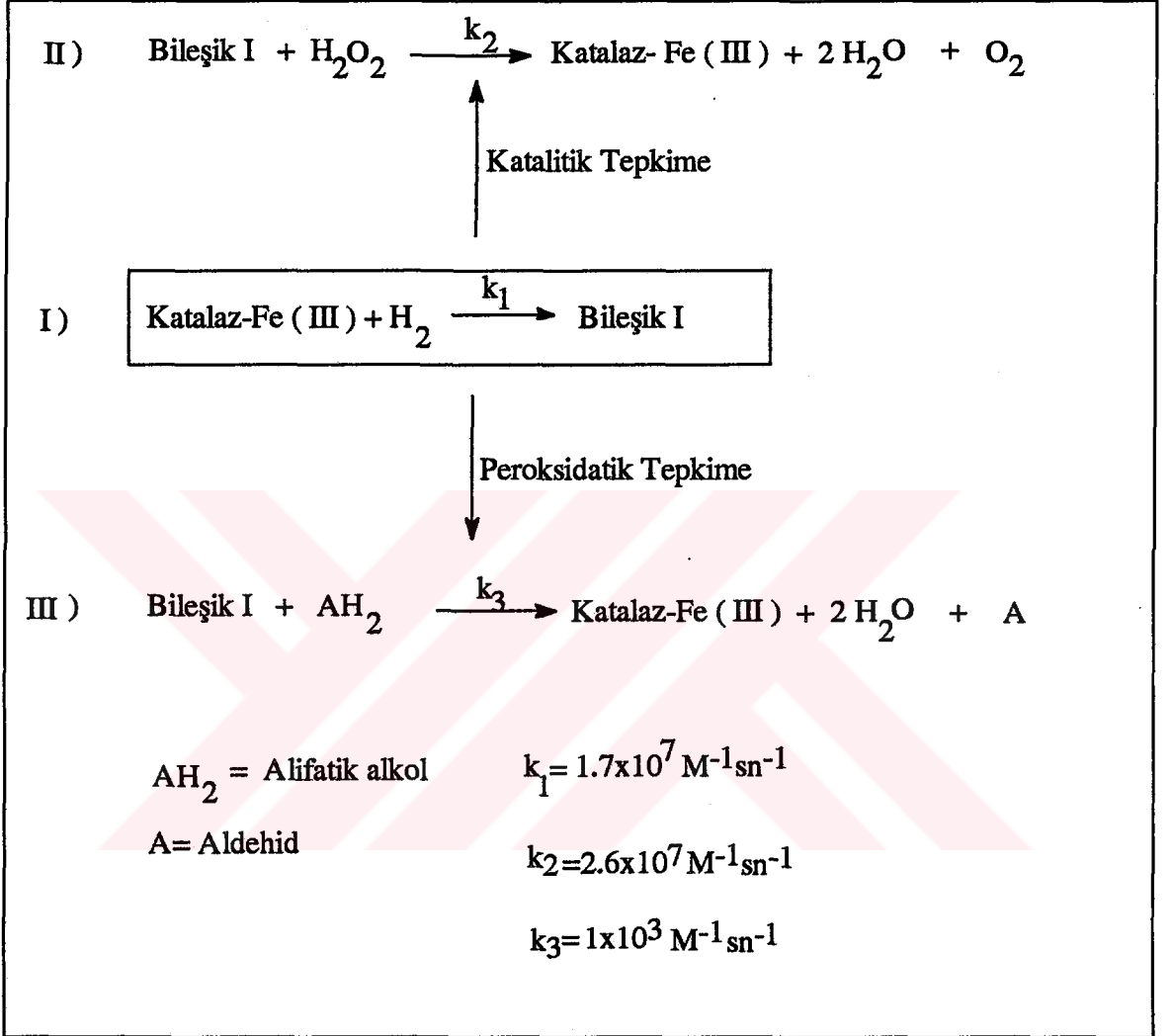
CAT, bütün memeli hücrelerinde genellikle karaciğer peroksizomları, böbrek veya beyin peroksizomları ve diğer dokular gibi subselüler organellerin iç kısmında bulunur. CAT, ayrıca rat kalbi mitokondri matriksinde de bulunmaktadır. CAT, tetramerik yapıya sahip molekül ağırlığı 240.000 olan aktif merkezinde 4 tane “ ferrihem ” grubu ihtiva eden bir hemoproteindir. Bu enzim kataliz görevini iki değişik yoldan gerçekleştirmektedir (102):

1-) H_2O_2 'nin dismutasyonu (katalitik tepkime)

2-) Alifatik alkollerin peroksidasyonu (peroksidatik tepkime)

Enzimin etki mekanizması şematik olarak 3 ana basamakta incelenmiştir:

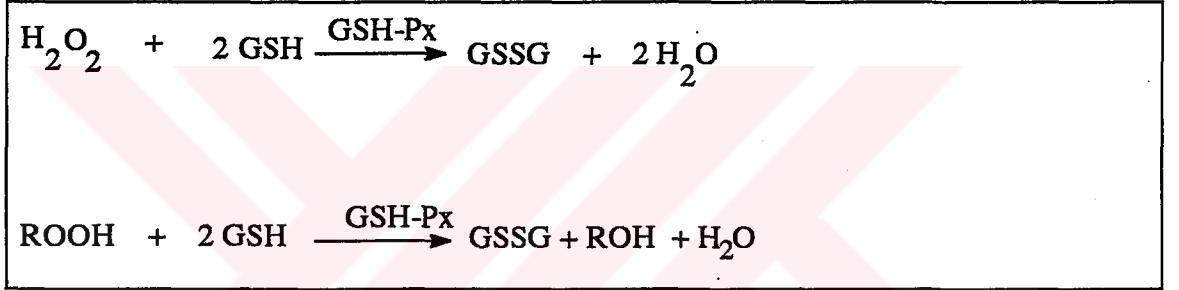
CAT'ın indirgen özelliği hidrojen peroksit ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere özgüdür. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmez.



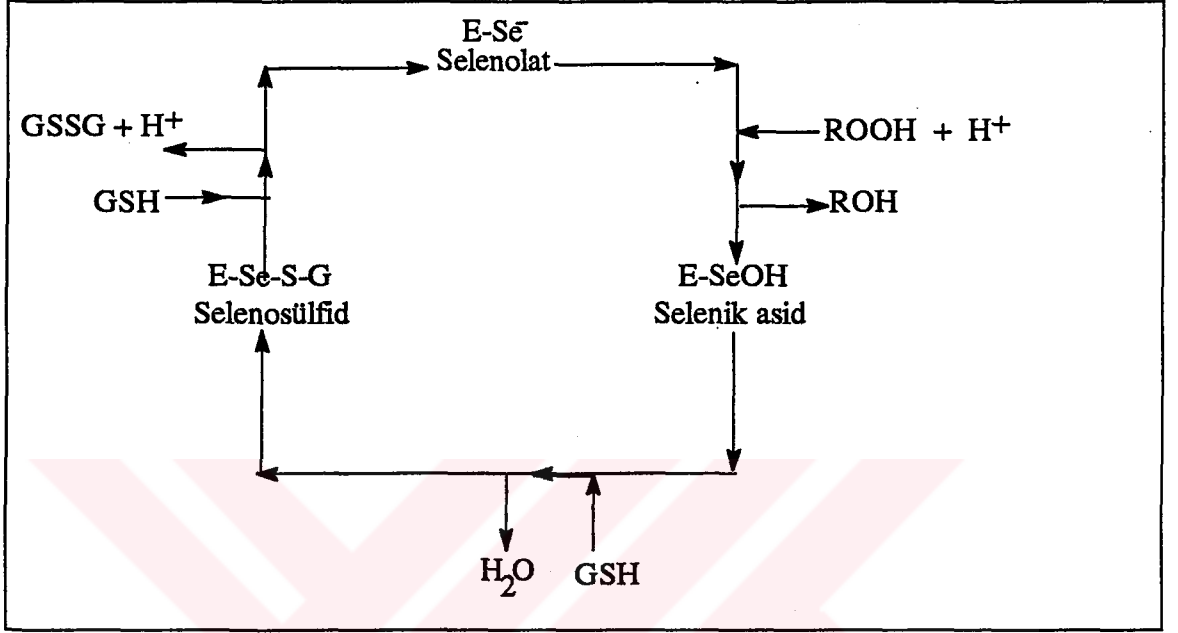
Şekil 1.22. Katalaz enziminin etki mekanizması (102).

1.6.3 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px: glutathione : H₂O₂ oxidoreductase, EC 1.11.1.9)

Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Molekül ağırlığı 85.000 olup tetramerik, 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Glutasyon peroksidaz aşağıdaki reaksiyonları katalizler:



Glutasyon peroksidaz enziminin selenyuma bağımlı ve bağımsız iki izomeri vardır. Selenyum bağımlı glutasyon peroksidaz enziminin aktif merkezinde enzime kovalent bir şekilde bağımlı selenosistein formunda, selenyum bulunmaktadır. Bu enzim, substrat olarak hem H₂O₂'yi hem de organik peroksitleri (Örneğin Kümene hidroperoksit) kullanabilir (103, 104, 105). Buna karşılık, selenyum bağımsız formu sadece lipid hidroperoksitlerini (Kümene) substrat olarak kullanabilir. Fosfolipid hidroperoksil glutasyon peroksidaz olarak da isimlendirilen enzimin bu formunun molekül ağırlığı 20.000 dalton olup monomerik ve sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger. GSH-Px'in selenolat formu (E-Se) peroksid substratını alkole indirgerken, kendisi okside selenik aside dönüşür (E-Se-OH). Glutasyon bu evrede reaksiyona katılarak selenosülfit'i (E-Se-S-G) oluşturur. İkinci bir glutasyonun selenosülfit'e bağlanması ile enzim aktif formu olan selenolat formuna dönerken, glutasyon okside hale dönüşür (19) (şekil 1.23).



Şekil.1.23 GSH-Px'in katalitik mekanizması (19).

GSH-Px'in fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikallerin peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller (106, 107, 108, 109, 110).

1.6.4. Glutatyon - S- Transferazlar (GST, EC 2.5.1.18)

Glutatyon-S- transferazlar herbiri iki alt birimden oluşmuş (dimerik) bir enzim ailesi olup ilk defa 1961 yılında tanımlanmışlardır. Başta araşidonik asid ve lineolat hidroperoksidleri olmak üzere lipid peroksidlerine karşı GSH-S-transferazlar Se-bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir savunma mekanizması oluştururlar. Bu enzimlerin antioksidan aktivitelere ilave olarak başka biyokimyasal fonksiyonlara

sahip oldukları bilinmektedir. Örneğin; hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi taşıyıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Ayrıca Lökotrien C4'ün sentezi, lökotrien C sentez aracılığı ile lökotrien A4'ün GSH ile bağlanması sonucu olur. Bu reaksiyon GSH-S-transferazlar tarafından katalizlenmektedir. Bu enzim prostaglandin sentezinde PG izomeraz etkisine de sahiptir (19).

1.6.4 Glutasyon Redüktaz (GSSGR, EC. 1.6.4.2)

Glutasyon redüktaz, GSSG (okside glutasyon)'u GSH (redükte glutasyon)'a NADPH'a bağımlı olarak katalizleyen bir flavoproteindir. Çok sayıda farklı organizmadan elde edilen bu enzim 50 Kd subüniteli bir dimer yapısındadır. Alt ünitelerde iki sistemin rezidüsü arasında bir disülfid köprüsü kurulması ile sonuçta okside glutasyon meydana gelir. Daha sonra bu molekül pentoz fosfat yolundan sentezlenen NADPH + H⁺ varlığında Glutasyon redüktaz ile redükte hale geçer. Herbir alt ünite , bir FAD taşıyıcı alt birim, Bir NADP taşıyıcı alt birim ve bir iç yüzey alt birimi olmak üzere üç yapısal alt birim içermektedir (111).



1.7. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

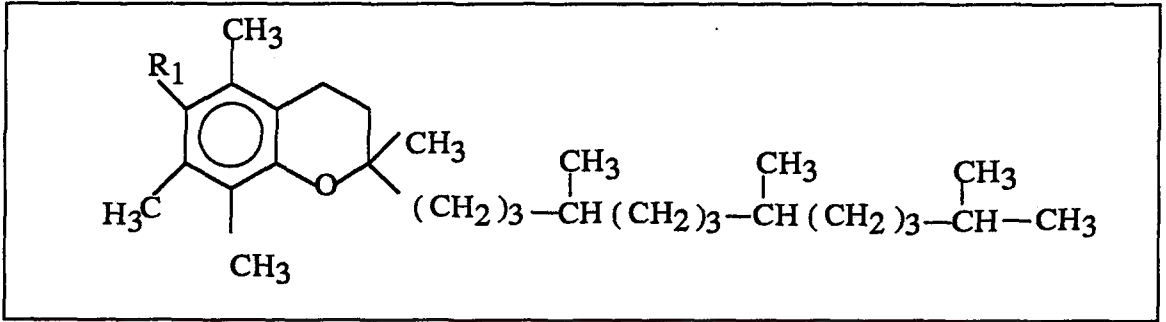
1.7.1. Vitaminler

1.7.1.1. E Vitamini

1925 yılında Evans ve Bishop isimli araştırmacılar farelerin üremeleri için gerekli bir maddeden bahsetmişlerdir. Bu mikro besin maddesi D vitamininden sonra alfabetik sıraya göre E vitamini olarak tanımlanmıştır. 1936 yılında tokoferol (tocopherol) ismini alan bu vitamin ile beslenemeyen fareler dünyaya canlı yavru getiremedik

lerinden dolayı, tokoferol kelimesi Yunanca da tocos (doğum) ve pherin (ortaya çıkarmak) sözcüklerinden türetilmiştir.

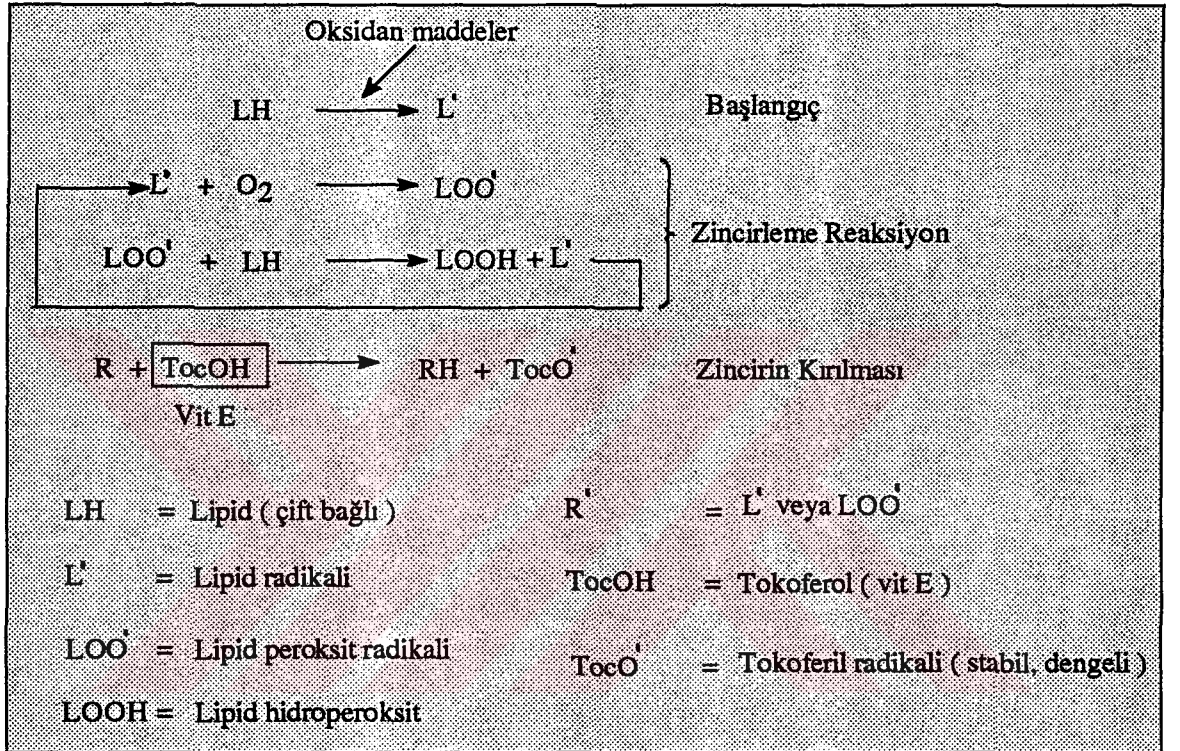
Tokoferoller veya bilinen adıyla E vitamini bir grup maddenin ismidir. Bu maddeler aşağıda görüldüğü gibi kroman halkasına bağlı hidrokarbon zincirinden ibarettir. Ayrıca benzen halkasındaki grupların proton (H^+) veya metil (CH_3) olması halinde tokoferoller d-alfa, d-beta, d-gama, ve d-delta diye adlandırılırlar (şekil 1.24).



Şekil 1.24. α -Tokoferol'un kimyasal formülü (112).

Antioksidan aktivitesi en yüksek olan tokoferol d- α tokoferoldür. Yapısında bulunan fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halka vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır. E vitamini doğada özellikle yağlı bitkilerde bulunduğundan, temel görevi bitkilerdeki yağları oksidatif hasardan (yağların bozunması) korumaktır (113, 114). Aynı olay insan vücudu için düşünüldüğünde E vitamini yağda çözünen bir vitamin olduğu için ince barsaklar tarafından kolayca absorbe edilerek vücudun tüm dokularına taşınarak depolanır. Dokular da hücrelerden ibaret olduğundan E vitamini hücre zarının etrafında depolanarak koruyucu bir tabaka oluşturur (115). E vitamini bir antioksidan olarak, zararlı serbest oksijen radikallerini ortamdan yok eder, radikallerin ana hedefi olan ve hücre zarında bulunan doymamış yağ asitlerini koruyarak, hücrenin yaşamının devam etmesini sağlar (40) (şekil 1.25). Ayrıca SH- grupları ihtiva eden enzimler ve A vitamini gibi oksidasyona hassas maddeler de E vitamini tarafından oksidatif hasarlardan korunurlar. Artmış E vitamini alımı immun cevapları güçlendirmektedir, bu ise vücudun kansere karşı savunması ile ilintili olabilir (116, 117, 118). Vitamin E trombositlerin siklooksijenaz aktivitesini arttırarak ve buna bağlı olarak prostaglandin

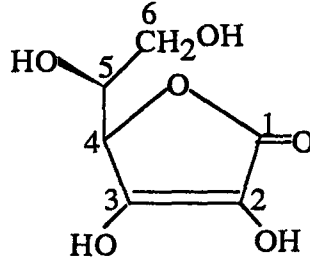
üretimini azaltarak trombosit agregasyonunu düzenler. Ayrıca GSH-Px enziminin bir parçası olan selenyumun kaybedilmemesinde önemli rol oynamaktadır. Hücre membranlarının bir komponenti olan E vitamini, serbest oksijen radikalleri tarafından oluşturulan lipid peroksidasyonunu engellediği gibi, çoklu doymamış fosfolipidlerle etkileşerek, membranların kararlı olmasını sağlarlar. (38).



Şekil .1.25. Vitamin E'nin antioksidatif etki mekanizması

1.7.1.2. C Vitamini (Askorbik asit)

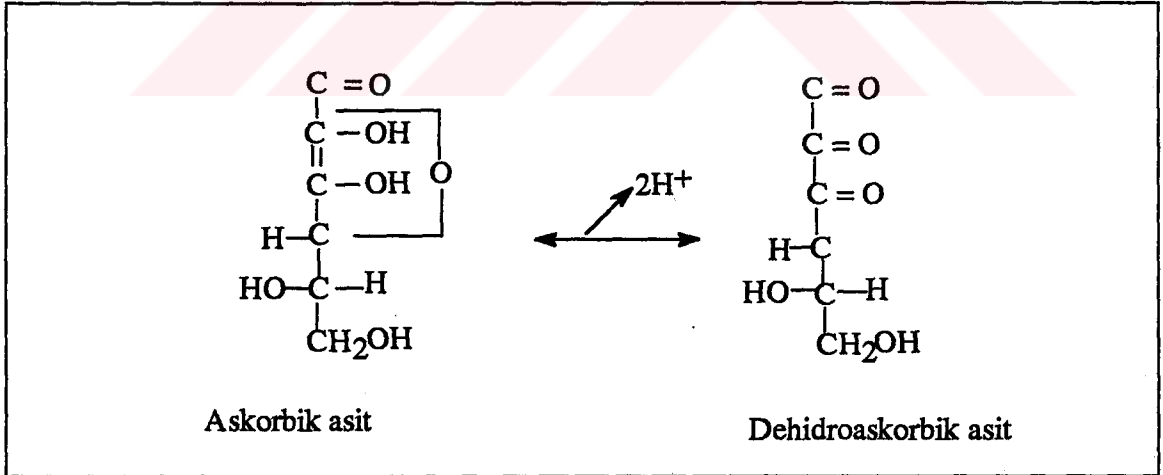
Askorbik asit, yapıca glukoz ve diğer altı karbonlu monosakkaritlere benzeyen, kapalı formülü (C₆H₈O₆) olan bir ketolaktondur. Vitaminler içinde en kararsız olanıdır (şekil 1. 26).



L-askorbik asit

Şekil 1.26. C vitaminin genel formülü

C vitamini, organizmada birçok hidroksilasyon tepkimelerinde indirgeyici ajan olarak görev yapar (119). Kollajen sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir. Tirozinden epinefrin sentezinin dopamin β -hidroksilaz basamağında, tirozin yıkılımlında, p-hidroksi fenil piruvatın homojentisat oksidasyonunda, safra asitlerinin sentezindeki 7- α - hidroksilaz başlangıç basamağında ve lizinden karnitin sentezinde rol alır. Demirin emiliminde enzimatik olmayan bir yol ile indirgeyici bir yol oynar. Mide de ferri demirin ferro demire indirgenip, emiliminde görev alır. Çok güçlü bir indirgeyici ajan olan askorbik asit, semidehidroaskorbat radikal ara ürünü üzerinden kolaylıkla dehidroaskorbik aside okside olur (şekil 1.27.).

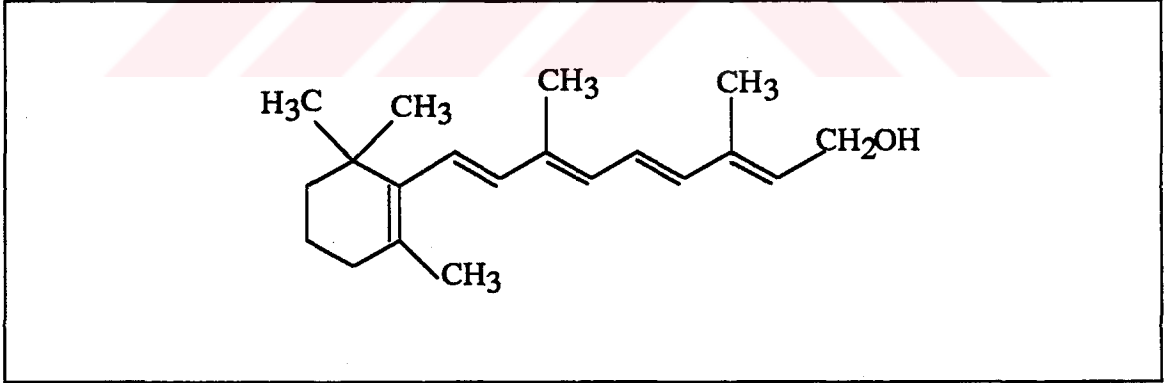


Şekil 1.27. C vitaminin oksidasyonu (19).

Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı, aynı zamanda güçlü bir antioksidan olan C vitamini süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolaylıkla tepkimeye girerek bu radikalleri temizler. Bu antioksidan etkisinin yanında oksidan etkisi de mevcuttur. Çünkü C vitamini ferri demiri ferro demire indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek seltüler ajandır. Bu yolla askorbat, proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonlarında H_2O_2 ile etkileşmeye uygun olan ferro demire dönüştürür. Yani süperoksit üretimine katkıda bulunur. Bu özelliğinden dolayı C vitamini, serbest radikal tepkimelerinin önemli bir katalisti veya bir pro-oksidan olarak değerlendirilir (119).

1.7.1.3. Karatenoidler ve A Vitamini

A vitamininin metabolik ön maddesi olan β -karoten, bitki pigmentlerinden olan karatenoid familyasının bir üyesidir (şekil 1. 28). β -karotenin, tekil oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikallerini temizlediği ve peroksit radikalleri ile direkt olarak etkileşerek antioksidan vazife gördüğü tesbit edilmiştir (19). Tuzlu su balıklarında A_1 (retinol₁) formunda bulunan bu vitamin tatlı su balıklarında ise A_2 (retinol₂) şeklinde bulunmaktadır.



Şekil 1.28 A vitamininin kimyasal formülü

1.8. Enzimatik Olmayan Diğer Antioksidanlar

1.8.1. Melatonin

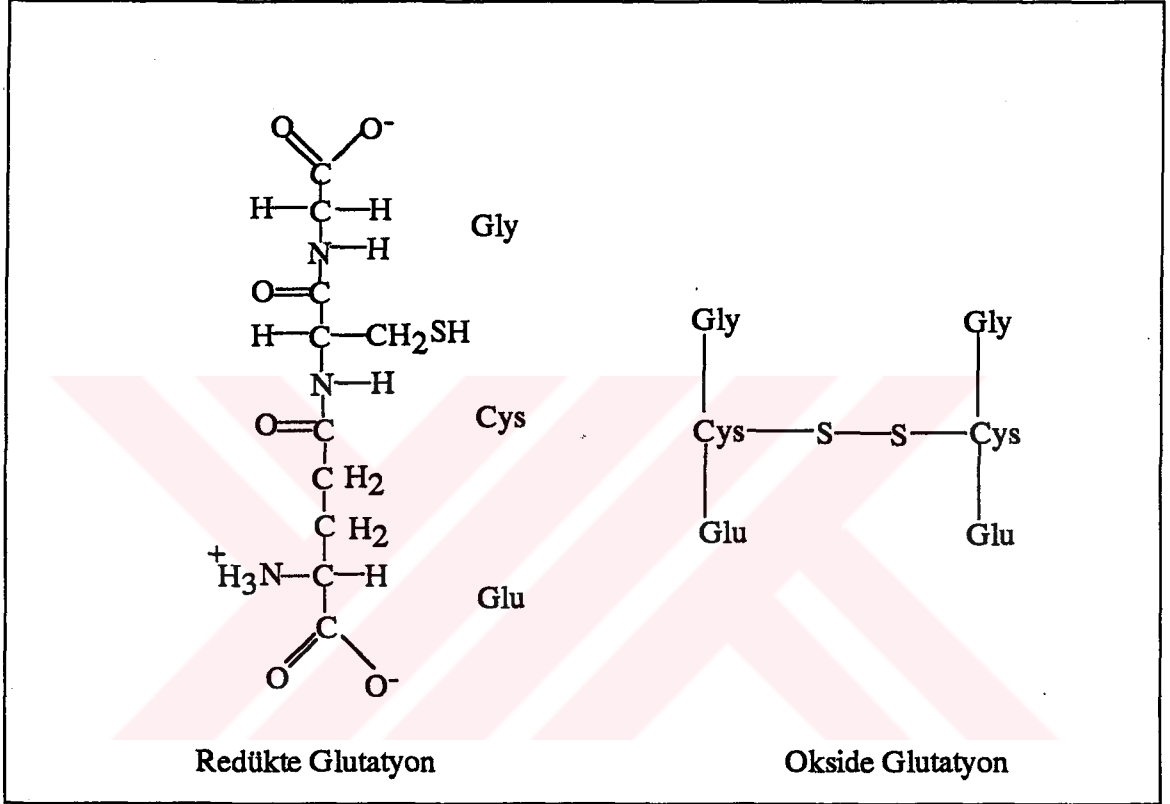
Melatonin, en toksik radikal olan HO^{\cdot} radikalini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Melatonin, HO^{\cdot} radikali ile tepkimeye girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüşür ki bunun da ortamdaki O_2^{\cdot} radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterdiği kaydedilmiştir. Ayrıca serbest oksijen radikalleri oluşturmak suretiyle kansere sebep olan safrol'un DNA üzerindeki hasarının melatonin tarafından çok etkili bir şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir. Melatonin'in antioksidan olarak diğer önemli bir özelliği de lipofilik olmasıdır. Dolayısı ile hücrenin hemen hemen bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan beyin bariyeri gibi bariyerleri de kolayca geçer. Böylece çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir. Melatoninin hücre çekirdeğine girebilmesi onun DNA'yı oksidatif hasarlardan koruması bakımından diğer antioksidanlara göre çok daha üstün bir özelliğini teşkil eder. Yaşlanma ile birlikte melatonin azalmasının yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogeneğinde önemli olabileceği düşünülmektedir (19).

1.8.2. Glutatyon

Tabiatta çok yaygın bir şekilde bulunan bu sülfürlü bileşik 1921 yılında Hopkins tarafından bulunmuştur. İlk önce glutmil-sisteinden ibaret bir dipeptit olduğu zannedilmiştir. Fakat 1929 yılında kristal halde elde edildikten sonra yapısının tripeptit olduğu anlaşılmıştır (111) (şekil 1.29).

Karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç olmadan sentezlenebilen bu tripeptit, glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden meydana gelmiştir (120, 121). Çok önemli bir antioksidan olan GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle tepkimeye girerek hücreleri oksidatif hasarlara karşı korur (122).

Bunun dışında, proteinlerdeki -SH gruplarını redükte halinde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur. Böylece, fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller (123, 124).



Şekil 1.29 Glutatyonun okside ve redükte formunun genel yapısı (124)

GSH, eritrositleri, lökositleri ve göz lenslerini oksidatif strese karşı korumada hayati bir öneme sahiptir. Eritrosit zarını H_2O_2 den, lökositleri fagositozda kullanılan oksidan maddelerden ve lens proteinlerini oksidatif hasardan korur (19).

1.8.3. Çalışmanın Amacı:

Bu çalışmada karsinogen madde indüksiyonu ve yaşlanmaya bağlı olarak vücudun serbest oksijen radikallerine karşı oluşturduğu antioksidatif savunma mekanizmasındaki değişikliğin gözlenmesi, ayrıca yaşlanma ile karsinogenezis ilişkisinin detaylı incelenmesi amaçlanmıştır. Tümörlerde oksijen metabolizmasının normal olmayıp, oksijen toksisitesinin başlıca sebebinin antioksidatif savunma mekanizmasındaki yetersizlik olabileceği ileri sürülmüştür ve antioksidatif enzimlerden başta SOD olmak üzere GSH-Px ve CAT gibi enzimlerin aktivitelerinde genelde azalma gözlenmiştir (132, 133, 137, 138, 139, 140).

Çalışmamızda yeterli sonuçlarla desteklenmeyen tümörlü dokularda özellikle SOD aktivitesindeki değişimi fikrinin araştırılması hedeflenmiştir. Tümör oluşumunda, tümörlerde ya da karsinogenik maddelerin etkileri sonucunda GSH miktarının artıp artmadığını araştırmak ise ayrı bir hedef olarak seçilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda tümörlü dokularda GSH miktarının arttığı gözlenmiştir. Bunun nedeninin ise, tümör hücrelerinde hekzos monofosfat yol hızının ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesinin artışına paralel olarak NADPH ve Glutasyon redüktaz ile GSSG'den GSH oluşumunun arttığı fikri ileri sürülmüştür (133). Yapılan çalışmalar sonucunda, 3-MC ile indüklenen sıçanlarda CAT, Se-bağımlı ve Se-bağımsız GSH-Px enzim aktivitelerinde yaşlanmaya bağlı olarak bir artma, SOD aktivitesi ve toplam glutasyon miktarında ise azalma saptanmıştır. Özellikle SOD aktivitesi ve toplam GSSG düzeyindeki sonuçlarla beraber diğer tüm sonuçlar, 3-MC gibi kuvvetli bir karsinogen ile indüklenme karşısında yaşlı hayvanlardaki antioksidatif savunma mekanizmasının yetersiz kaldığı görüşünü destekler niteliktedir.

2. DENEYSEL BÖLÜM

2.1. Materyal ve Yöntem

2.1.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyisel çalışmalar süresince kullanılan sitokrom-c, ksantin, ksantin oksidaz, GSSG (Okside glutatyon), GSH (Redükte glutatyon), BSA (Bovine serum albumin), DTNB{ (5-5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asid) }, GSSG-redüktaz, SOD (Süperoksid dismutaz), Kümene hidroperoksit, NADPH (β -Nikotinamid Adenin dinükleotid (redükte)), NaN_3 (Sodyum Azid), $\text{m-H}_3\text{PO}_4$ (meta- fosforik asid), Sigma Chemical Company'den Na_2CO_3 , CuSO_4 , Na,K-Tartarat, Folin-fenol reagent, NaOH, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , EDTA (Etilen diamintetraasetik asid), H_2O_2 , Merck firmasından temin edildi. 3-MC (3-Metil Kolantren), ise Prof.Dr. Engin M. Gözükara aracılığı ile USA'dan bir laboratuvardan hediye olarak alınmıştır.

2.1.2 Materyal

Bu çalışmada deney materyali olarak İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesine bağlı Deneysel Tıp Araştırma Merkezi (DETAM)'dan sağlanan wistar cinsi erkek sıçanlar (Wistar rat rattus) kullanılmıştır. 2, 12 ve 17 aylık en az 5'li gruplar halinde yapılan çalışmalar esnasında sıçanlar 3-MC enjeksiyonlarından 2, 8 ve 12 saat sonra deneye alınmışlardır.

2.1.3 Metod

İlk önce yukarıda belirtildiği gibi yaş gruplarına ayrılan sıçanlara, kuvvetli bir karsinojen olan 3-MC (25 mg/kg) enjeksiyonu intraperitoneal olarak yapıldı (144). Enjeksiyon sonrası sürelerin (2, 8 ve 12 saat) dolmasıyla beraber, boyun kemikleri kırılarak öldürülen sıçanların karaciğer dokuları çıkarıldı ve çıkarılan bu

dokular derhal PBS (Fosfat tamponu, pH 7.4) tamponuyla perfüze edilip, tamamen kanından temizlendikten sonra buz izolasyonu altında kurutma kağıdı ile kurutulup, tartıldı. Tartılan karaciğerler, 1/5 w/v oranında PBS tamponu (pH 7.4) eklenerek yine buz izolasyonu altında PCV, Kinematica, Status homojenizatörü ile tüm doku parçalanıncaya kadar homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar, VWR Branson Scientific sonifikatörde 30 saniyelik aralıklarla 3 defa 30 saniye süreli sonifiye edilerek özellikle peroksizom membranının parçalanması neticesinde bu organelde lokalize olan CAT enziminin açığa çıkarılması sağlanmıştır. Homojenizasyon ve sonifiye işlemlerinin ardından 17.000 rpm'de, +5 °C'de 15 dakika Ole Dich 157.MP mikrosantrifüj aletiyle santrifüj işlemi ile tüm enzim aktiviteleri ve protein tayininin yapılacağı süpernatant elde edildi. Süpernatant örnekleri, enzim aktivite ve protein tayinleri yapıncaya kadar derin dondurucuda - 40°C' de saklandı.

2.2. Protein Tayini

Karaciğer dokusundan elde edilen süpernatantlardan enzim aktivite tayinleri yapılmadan önce 1 ml süpernatantdaki protein miktar tayini için Lowry yöntemi uygulandı (125). Bu yöntem için çözeltiler ve hazırlanışları aşağıdaki gibidir:

A Çözeltisi:

100 Hacim : % 2'lik Na_2CO_3 'ın 0.1 N NaOH' teki çözeltisi

1 Hacim : % 2'lik Na,K- Tartarat çözeltisi

1 Hacim : % 1'lik CuSO_4 çözeltisi

A çözeltisi, yukarıda belirtilen her üç çözeltinin ayrı ayrı hassas bir şekilde hesaplarının yapılması ve deney başlamadan hemen önce belirtilen hacim oranlarında karıştırılmasıyla taze olarak hazırlandı.

B Çözeltisi :

Folin Fenol Belirteci : 1 hacim

Bidestile su : 1 hacim

BSA Çözeltisi :

Standart protein çözeltisi olarak kullanılan BSA (Bovine Serum Albumin)

1 mg/mL konsantrasyonundaki stok çözültiden örneklerin çalışma aralığına göre 10, 20, 30, 40, 50,.. µg/mL'lik çözültileri hazırlandı

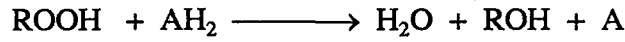
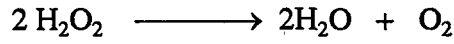
Protein tayin işlemi ise aşağıda belirtilen sıraya göre yapıldı :

- 1) Her deney için 2 kör ve örneğin çalışma aralığına bağlı olarak değişik konsantrasyonlarda BSA'lar ve numuneler için ayrı tüpler kullanıldı ve her tüpe A çözültisinden 2.5 mL eklendi.
- 2) Kör numune tüpleri hariç BSA tüplerine belirtilen hacimlerde BSA çözültilerinden numune tüplerine ise deney şartlarına bağlı olarak 2, 4,.. µL'lik örnek çözültileri tüpün duvarlarına damlacıklar şeklinde eklendi.
- 3) İki kez vorteksle karıştırılan bu tüpler 10 dk bekletildi.
- 4) 1:1 oranında hazırlanan Folin-fenol belirtecinden tüm tüplere 250 µL eklendi. Tekrar vorteksle iki kez karıştırılan bu tüpler, renk oluşumunun sonuçlanması için karanlıkta 45 dk beklemeye bırakıldı.
- 5) Bu sürenin bitiminde karanlık ortamdan çıkarılan çözültilerdeki protein tayinleri Philips PU. 8715 UV/VIS spektrofotometresi kullanılarak 695 nm'deki absorbans değişiminden hesaplandı.
- 6) Standart BSA çözültileri ile hazırlanan çalışma (kalibrasyon) grafiğinden yararlanılarak her örnek tüpündeki süpernatanın 1 mL sindeki protein miktar tayini hesaplandı.

2.3. Enzim Aktivite Tayinleri

2.3.1 Katalaz Aktivite Tayini ve Hesaplanması

Bütün hayvan ve bitki hücrelerinde bulunan ve aşağıdaki tepkimeleri katalizleyen CAT enziminin aktivite tayini Luck H. (126) yöntemine göre yapıldı.



AH_2 : Değişik substratlar

Gerekli Çözeltiler:

1/15 M konsantrasyonda Na, K-fosfat tamponu (Na_2HPO_4 - KH_2PO_4) pH: 7

Derişik H_2O_2 çözeltisi

Yöntem :

Hassas olarak hazırlanmış Na-K-fosfat tampon çözeltisinin 100 mL'sine 160 μL H_2O_2 çözeltisi eklendi. Hazırlanan bu çözeltiden 1000 μL alınıp kör olarak kullanıldı. Numunelerin CAT içeriğini saptamak için yapılan aktivite tayinine başlarken, hazırlanan bu karışıma, deney çalışma aralığı dikkate alınarak 15 μL den başlayarak gittikçe artan hacimlerde süpernatant eklendi ve bir kez karıştırılıp Philips PU. 8715 UV/VIS spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda 30 sn süre boyunca absorbans değişimi okundu. Okunan bu optik dansite farkından mL'deki enzim ünite sayısı aşağıdaki formül gereği hesaplandı.

$$C = \frac{\Delta\text{OD} \times \text{1dk} \times 1000}{0.036 \times \mu\text{L süpernatant}}$$

2.3.2 Se-Bağımlı ve Se-Bağımsız Glutatyon Peroksidaz Aktivite Tayini ve Hesaplanması

Se-bağımlı ve Se-bağımsız olmak üzere iki izomeri bulunan GSH-Px enziminin rol aldığı tepkimeler aşağıdaki gibi olup, aktivite tayini için Lawrance R.A.; ve Burk R.F yöntemi uygulanmıştır (127).



Gerekli Çözeltiler:

Tampon Çözelti	: 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4 + 5 \text{ mM EDTA}$ içeren çözelti tampon çözelti olarak kullanılmıştır. pH: 7
NaN_3 (Sodyum azid)	: 1 mM
GSH (Redükte glutatyon)	: 2 mM
H_2O_2	: 0.25 mM
NADPH	: 0.2 mM
GSSG Redüktaz	: 1.2U/mL

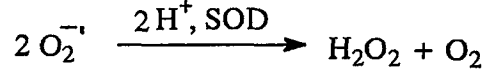
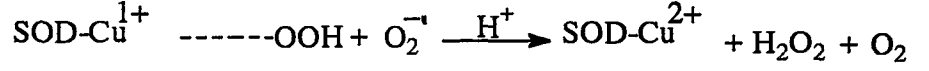
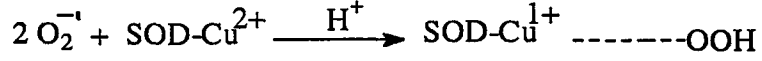
Yöntem:

Belirtilen derişimlerde hazırlanan çözeltilerle önce kör ardından da örnek deneyleri yapılmıştır. Bunun için 1 mL tampon, 10 µL NADPH, 10 µL GSH, 10 µL NaN₃ ve 2 µL GSSG Redüktaz çözeltileri spektrofotometre küvetine kondu. 37°C de 5 dk süre ile inkübasyona tabii tutulan çözelti karışımına Se-bağımlı GSH-Px aktivite tayininde H₂O₂; Se-bağımsız GSH-Px ölçümlerinde ise Kümene hidroperoksit ilave edilerek ve bir kez karıştırdıktan sonra kör deneme için Philips PU. 8715 UV/VIS spektrofotometrede 340 nm deki absorbans değişimi (1 dk.) gözlemlendi. Numune deneyleri için ise H₂O₂ ve Kümene hidroperoksit eklendikten sonra belirli miktarlarda süpernatant ilave edilerek kör denemeleri için yapılan işlemlerde olduğu gibi 340 nm deki absorbans değişimi okunarak enzim aktivite tayini şu formülle hesaplandı:

$$C = \frac{\Delta OD}{6220/mL} \quad \Delta OD: \text{Optik Dansite Farkı}$$

2.3.3 Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini ve Hesaplanması

Hücrel antioksidatif savunma mekanizmasının en önemli enzimi olan SOD, süperoksit radikallerinin dismutasyonunda görev almaktadır. Ksantin-ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit radikallerinin sitokrom c'yi indirgemesinin SOD tarafından inhibisyonu temeline dayanan enzim aktivite deneyi McCord J.M; Fridovich I yöntemine(128) göre yapılmış olup, detaylar aşağıdaki gibidir.



Gerekli Çözeltiler:

A Çözeltisi: 0.76 mg (5µmol) ksantin'in 10 mL 0.001 N NaOH'daki çözeltisi ve 24.8 mg (2µmol) sitokrom c'nin 100 mL 50mM pH 7.8 ve 0.1 mM EDTA içeren fosfat tamponundaki çözeltisi karıştırılır. Bu çözelti, +4°C de 3 gün kararlıdır.

B Çözeltisi: Taze hazırlanan ksantin oksidazın 0.1 mM EDTA'daki çözeltisi 0.2U/mL.

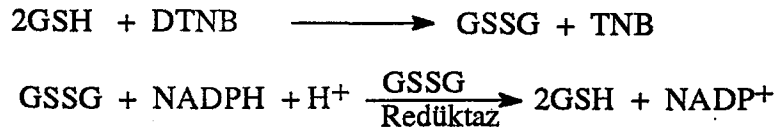
Yöntem :

- 1) 3 mL'lik spektrofotometre küvetine 2.9 mL A çözeltisi eklendi.
- 2) Dha sonra 50 µL örnek ilave edildi.
- 3) Tepkime 50 µL B çözeltisinin eklenmesiyle başlatıldı.
- 4) Hızlı bir şekilde, Philips PU. 8715 UV/VIS spektrofotometrede 550 nm deki absorbans değişimi okundu.
- 5) Kör okuması yapılırken örnek yerine 50µL bidestile su eklendi.
- 6) Kalibrasyon grafiği çizmek için belli konsantrasyondaki ($5 \cdot 10^{-7}$ M) SOD çözeltisinin 5 µL, 10µL ve 15 µL deki bilinen değerlerine karşılık elde edilen % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. Bu işlem için saf SOD enzimine ihtiyaç vardır. Sonuçta % inhibisyon aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\Delta OD (\text{Örnek})}{\Delta OD (\text{Kör})} \times 100$$

2.3.4 Toplam Glutasyon (GSH ve GSSG) Miktar Tayini Hesaplanması

Bir δ -glutamil-sistein-glisin olan glutasyon aerobik yaşamın zararlı yan ürünlerinden hidrojen peroksit ve organik peroksitler ile tepkime vermesiyle detoksifikasyonda önemli bir rol oynamaktadır. Miktar tayini Anderson M.E.; yöntemine (129) göre yapılan toplam glutasyonun hücrelerde genelde steady-state durumunda GSH / GSSG oranı yaklaşık olarak 100: 1 oranında korunmaktadır. Bu yöntemde gerçekleşen tepkimeleri özetleyecek olursak;



Gerekli Çözeltiler:

Stok tampon çözeltisi: 143 mM sodyum fosfat + 6.3 mM Na₄-EDTA pH 7.5

Günlük tampon çözeltisi : stok tampon çözeltisine 0.248 mg/mL olacak şekilde NADPH eklenir ve bu çözelti günlük hazırlanıp +4°C de saklanır.

DTNB { 5, 5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asid) } : 6 mM DTNB, stok tampon çözeltisiyle hazırlandı ve derin dondurucuda saklandı.

GSSG Redüktaz: Enzim konsantrasyonu 266 U / mL olacak şekilde stok tampon çözeltisiyle seyreltildi ve +4°C de saklandı.

Yöntem :

Toplam glutasyon (GSH + GSSG) miktar tayini için hesaplanan hacimlerde günlük tampon çözeltisi ve DTNB işaretlenmiş tüplere kondu. Bu deney tüpleri, ortamın sıcaklığı 30°C olacak şekilde su banyosunda 12-15 dk süreyle inkübasyonda bekletildi. Hacim tamamlamak için hesaplanan bidestile su miktarları deney tüplerine eklendi. Çözeltiler bu şekilde pastör pipeti ile iki kez karıştırılarak homojenliğin sağlanmasına çalışıldı ve sürenin bitiminde spektrofotometre küvetine alınan karışıma glutasyon

redüktaz ve süpernatın eklenmesiyle Philips PU. 8715 UV/VIS spektrofotometrede 412 nm de absorbans değişimi okundu.

Standart grafiği için gerekli çözeltiler ve yöntem:

- 1) 60 mg GSSG (okside glutatyon) NADPH bulundurmıyan 5 mL sodyum fosfat pH 7.5 tamponu içinde çözüldü.
- 2) Bu karışımdan 1 mL alınarak 250 µL % 25'lik meta-fosforik asit ile karıştırılır.
- 3) Hacim küçük olduğundan tüm denemeler eppendorf tüpünde yapılmakta olup, bu aşamada +5°C de 17.000 rpm de 15 dk sanrütüj işlemlle ham enzim kaynağı olan süpernatın elde edildi.
- 4) Süpernatandan 500 µL alınıp 1 mL NADPH'sız tamponla sulandırıldı.
- 5) Son olarak, bu çözeltiden 2, 4, 6, 8, 10 µL alınarak glutatyon miktar tayini için yapılan ve yukarıda anlatılan işlemler aynen uygulanarak standart grafiği çizildi ve bu grafikten süpernatınlarıdaki toplam glutatyon miktarları GSSG= 2 GSH eşitliği dikkate alınarak redükte glutatyon (GSH) cinsinden hesaplandı

Tüm bu enzim aktivite ve toplam glutatyon miktar tayininden hesaplanan değerler Lowry protein tayininde bulunan değerlere bölünerek; CAT, Se-bağımlı ve Se-bağımsız GSH-Px enzimleri için µmol / mg total protein, SOD enzimi için ng/mg total protein, Toplam glutatyon miktarı için ise nmol/mg total protein olarak hesaplandı.

2.4. İstatiksel Hesaplamalar

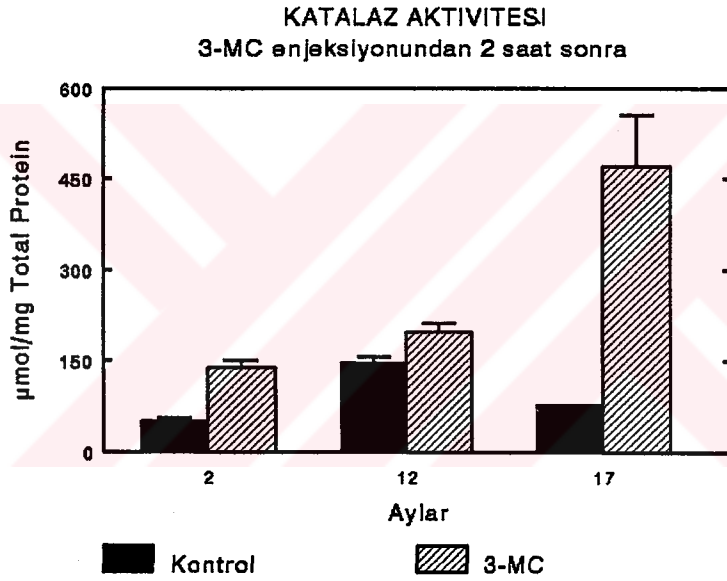
Yapılan tüm enzim aktivite ve protein tayini deneylerinden elde edilen sonuçlar istatiksel olarak irdelenmiş ve t-students testi (Slide write Plus, version 5.0, Advanced Graphics Software, 1992) uygulanarak sonuçlar arasındaki farklar önem dereceleriyle kıyaslanmıştır

3. BULGULAR

3.1. Katalaz Enzim Aktivitesi Sonuçları

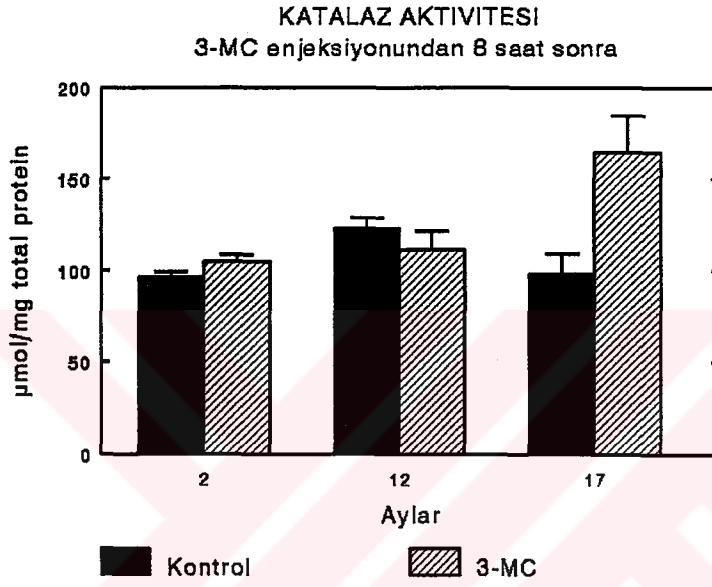
Kuvvetli bir karsinojen olan 3-MC (3-metil kolantren) enjeksiyonundan 2 saat sonra ölçülen CAT aktivite sonuçlarının 2, 12 ve 17 aylık sıçan karaciğerinden elde edilen süpernatanlardaki değişimi şekil 2.1’de görülmektedir.

Şekilde de görüldüğü gibi tüm yaş gruplarındaki sıçanlarda kontrole nazaran 3-MC enjeksiyonlu sıçanlarda yaşlanma ile birlikte CAT enzim aktivitesinde belirgin bir artış ($P < 0.01$) gözlenmektedir.



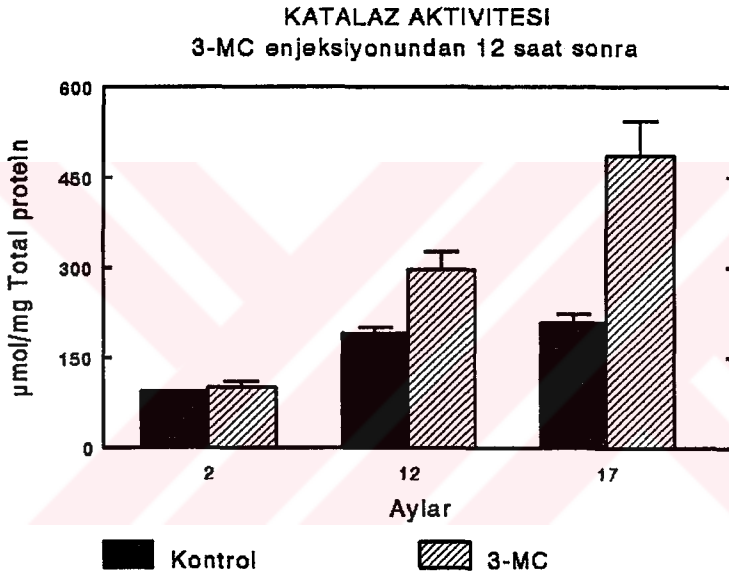
Şekil 3.1.1 2 saatlik 3-MC indüksiyonundan sonra Katalaz Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi.

8 saatlik 3-MC indüklemesiyle CAT enzim aktivitesinin yaşlanma ile ilişkisi şekil 2.2 de görülmektedir. Bu sonuçlar 2 saat 3-MC ile indüklenen hayvanlardan elde edilen sonuçlarla kıyaslandığında 8 saatlik indükleme de çok belirgin bir artış olmamakta hatta 12 aylık hayvanlar da kontrole göre bir azalma görülmektedir.



Şekil 3.1.2 8 saatlik 3-MC indüksiyonundan sonra Katalaz Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi.

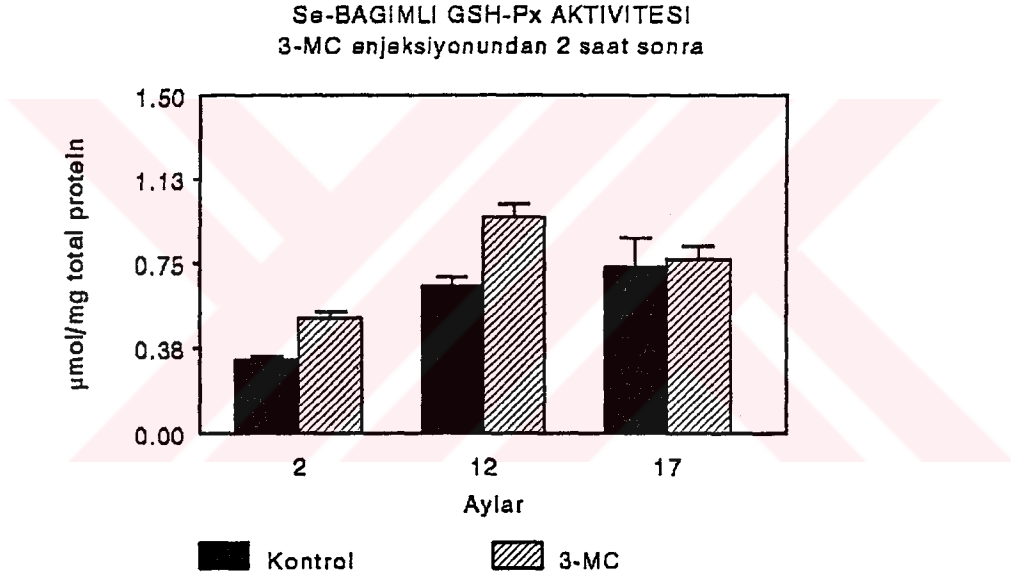
Şekil 3.3. den de görüldüğü gibi 12 saatlik 3-MC indüksiyonu sonucunda tüm yaş gruplarındaki sıçanlarda CAT enziminde belirgin bir artış söz konusudur.



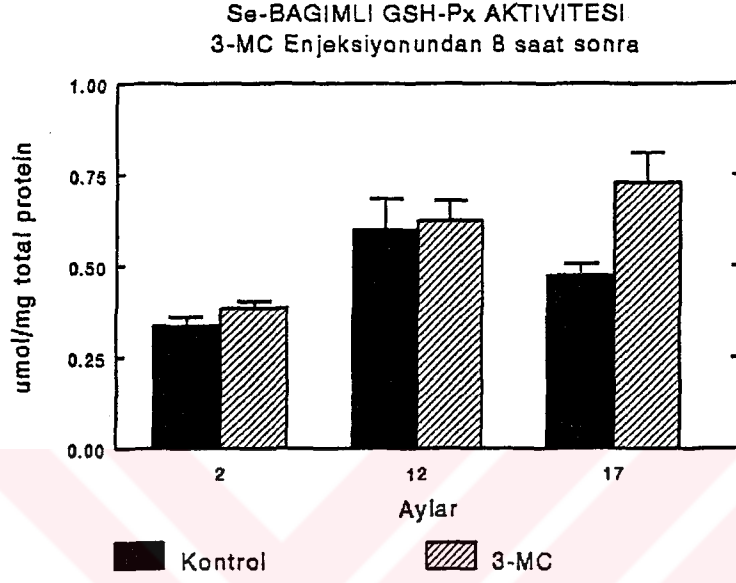
Şekil 3.1.3 12 saatlik 3-MC indüksiyonundan sonra Katalaz Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi.

3.2. Se-Bağımlı GSH-Px Aktivitesi Sonuçları

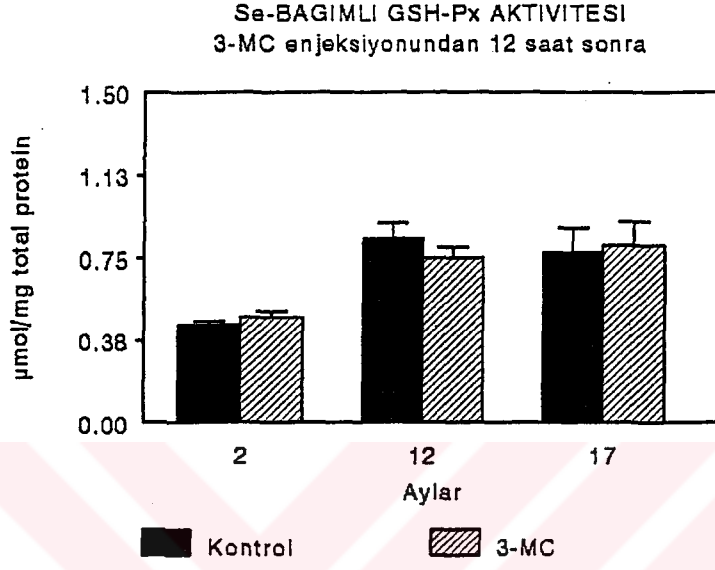
Şekil 2.4. de 2 saat süreli 3-MC enjeksiyonu sunucunda Se-bağımlı GSH-Px aktivitesinin zamanla değişimi, şekil 2.5. de 8 saat süreli 3-MC indüklemesiyle Se-bağımlı GSH-Px enzim aktivitesinin zamanla değişimi, şekil 2.6. da ise 12 saat süreli 3-MC indüklemesinin yine aynı enzim aktivitesinde zamana bağlı olarak oluşturduğu değişiklikler görülmektedir.



Şekil 3.2.1 2 saatlik 3-MC indüksiyonundan sonra Se-Bağımlı GSH-Px Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi.



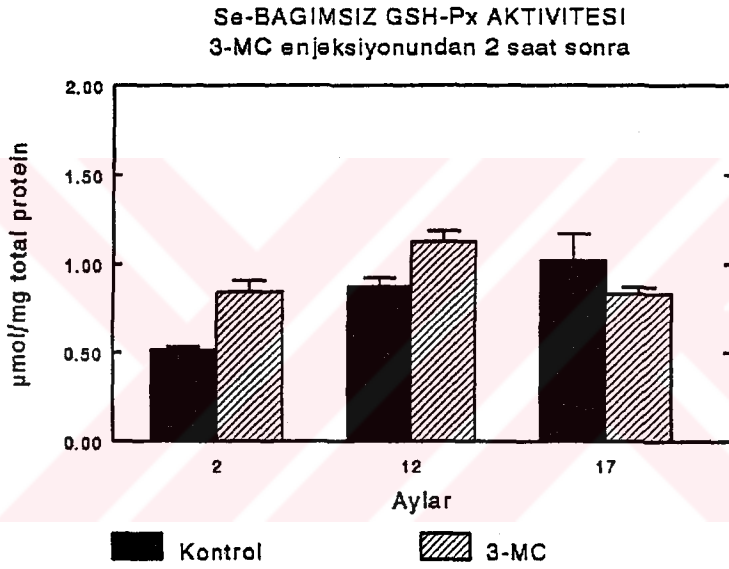
Şekil 3.2.2. 8 saatlik 3-MC indüksiyonundan sonra Se-Bağımlı GSH-Px Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi.



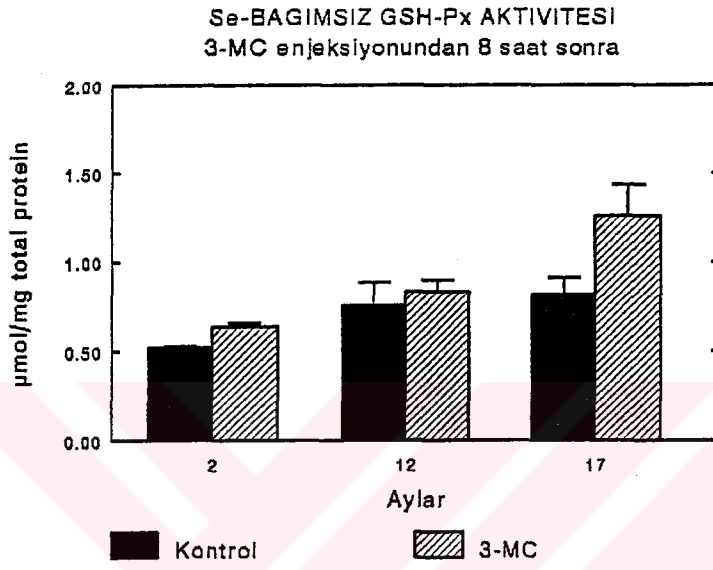
Şekil 3.2.3. 12 saatlik 3-MC indüksiyonundan sonra Se-Bağımlı GSH-Px Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi.

3.3. Se -Bağımsız GSH-Px Aktivitesi Sonuçları

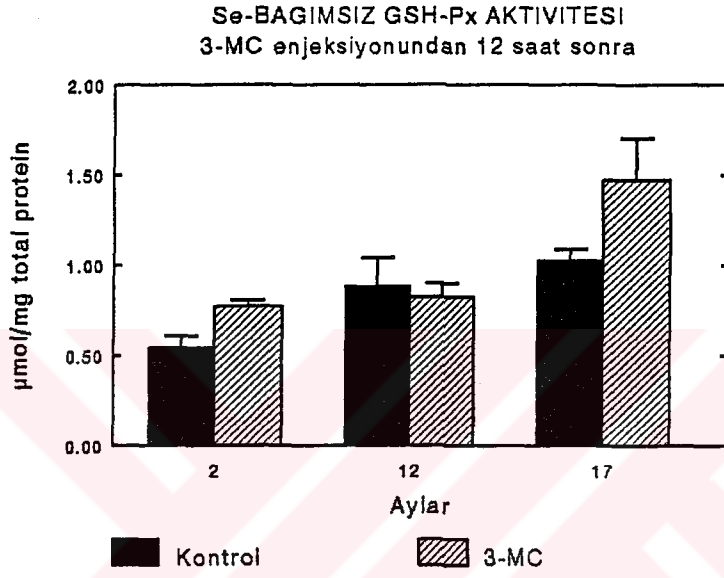
Şekil 3.3.1, 3.3.2 ve 3.3.3 de Se-bağımsız GSH-Px aktivitesinde belirli zaman dilimlerindeki 3-MC indüklenmesinin zamana bağlı olarak meydana getirdiği değişiklikler görülmektedir.



Şekil 3.3.1 2 saatlik 3-MC indüksiyonundan sonra Se-Bağımsız GSH-Px Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi.



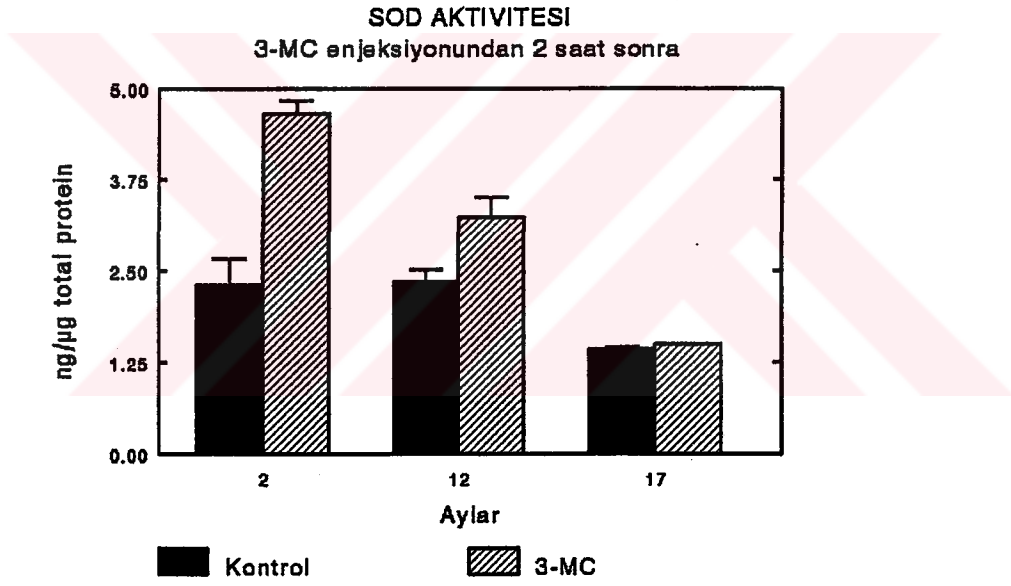
Şekil 3.3.2 8 saatlik 3-MC indüksiyonundan sonra Se-Bağımsız GSH-Px Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi.



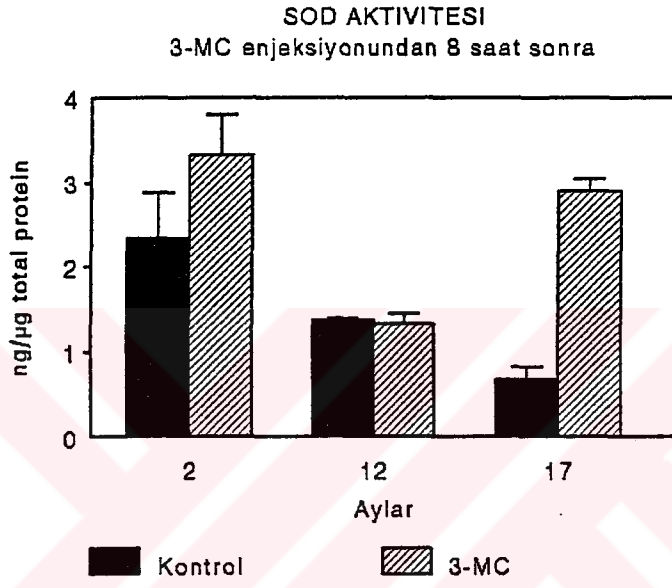
Şekil 3.3.3 12 saatlik 3-MC indüksiyonundan sonra Se-Bağımsız GSH-Px Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi.

3.4. SOD Aktivitesi Sonuçları

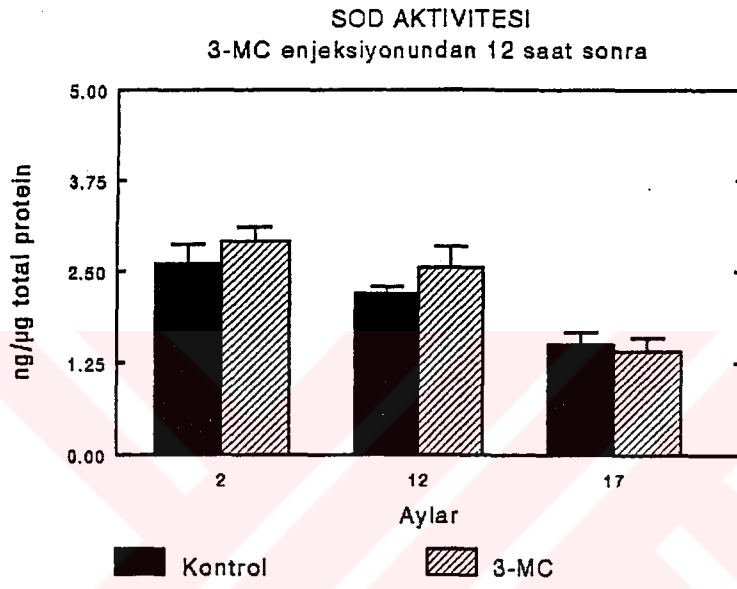
Antioksidatif savunmanın en önemli enzimi olan SOD enziminin yine belirli sürelerdeki karsinojen madde indüksiyonunun ardından farklı yaş gruplarındaki sıçanlarda meydana gelen aktivitedeki değişiklikler şekil 3.4.1, 3.4.2 ve 3.4.3 de görülmektedir. Bu sonuçlar katalaz , Se-bağımlı ve bağımsız GSH-Px enzim aktivite sonuçlarıyla karşılaştırıldığında SOD enzim aktivitesinde indüklemenin ardından zamana bağlı olarak belirgin bir azalma görülmektedir.



Şekil 3.4.1 2 saatlik 3-MC indüksiyonundan sonra SOD Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi.



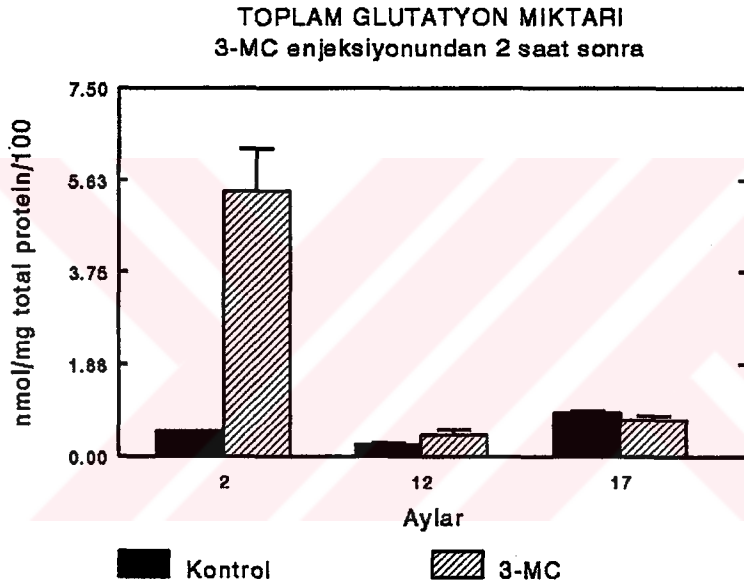
Şekil 3.4.2 8 saatlik 3-MC indüksiyonundan sonra SOD Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi.



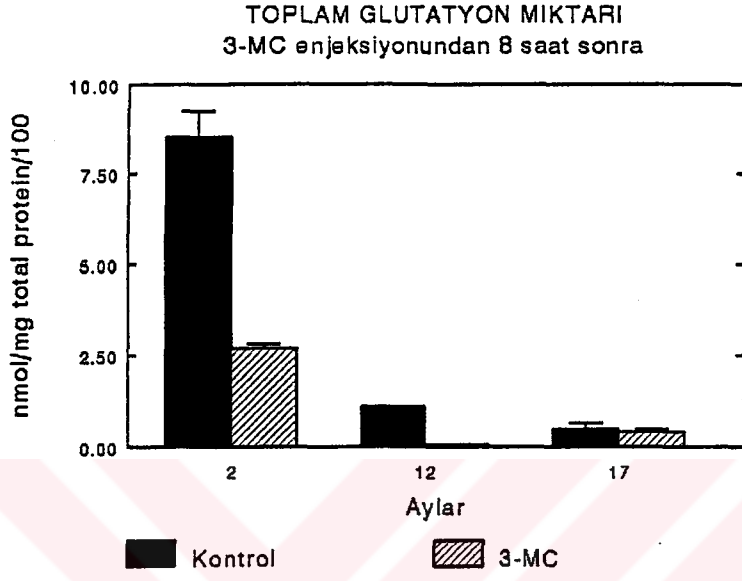
Şekil 3.4.3 12 saatlik 3-MC indüksiyonundan sonra SOD Aktivitesinin Yaşlanmayla Değişimi.

3.5. Toplam Glutasyon Miktarı Sonuçları

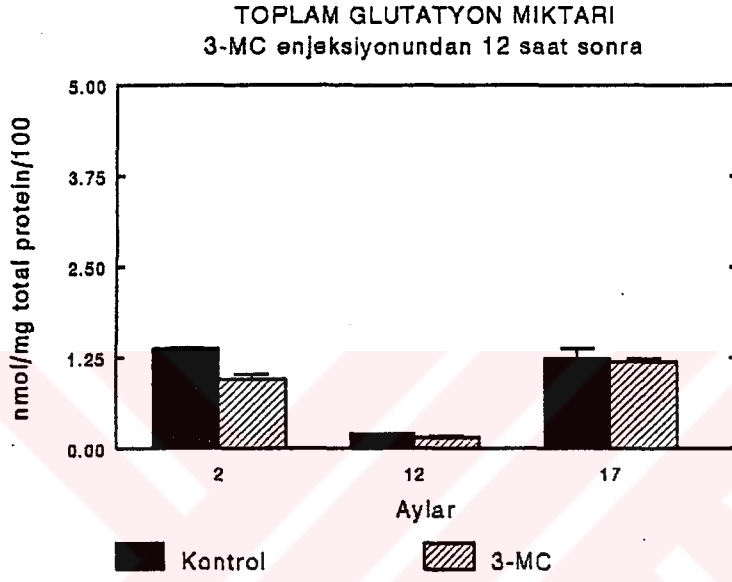
Şekil 3.5.1, 3.5.2 ve 3.5.3 de 3-MC enjeksiyonundan 2, 8 ve 12 saat sonra deneye alınan 2, 12 ve 17 aylık hayvanlardaki toplam glutasyon miktar değişimi görülmektedir.



Şekil 3.5.1 2 saatlik 3-MC indüksiyonundan sonra Toplam Glutasyon Miktarının Yaşlanmayla Değişimi.



Şekil 3.5.2 8 saatlik 3-MC indüksiyonundan sonra Toplam Glutasyon Miktarının Yaşlanmayla Değişimi.



Şekil 3.5.3 12 saatlik 3-MC indüksiyonundan sonra Toplam Glutasyon Miktarının Yaşlanmayla Değişimi.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI

Antioksidatif savunma mekanizmasını oluşturan enzimler olan CAT, Se-bağımlı ve bağımsız GSH-Px, SOD enzimleriyle beraber toplam GSSG miktar tayinin yaşlanma ile ilişkisini açıklamak ve özellikle serbest oksijen radikallerinin neden olduğu ileri sürülen karsinogenezisin oluşum mekanizmasında destekleyici sonuçlar elde etmek amacıyla yapılan çalışmamızda elde edilen bulgularla, bu konuda daha önce yapılmış olan araştırmaların sonuçları karşılaştırılmıştır.

Yapılan çalışmalar neticesinde CAT , Se-bağımlı ve Se-bağımsız GSH Px enzim aktivitelerinde 3-MC indüklenmesiyle ve yaşlanmaya bağlı olarak bir artış ($P < 0.01$), fakat SOD aktivitesi ve toplam glutatyon miktarında ise belirgin bir azalma ($0.001 < P < 0.01$) saptanmıştır. 2 saatlik 3-MC indüklemesinin ardından 2 aylık sıçanlarda katalaz enzim aktivitesi kontrol deneyinde $51.35 \mu\text{mol} / \text{mg}$ total protein, 3-MC indüklenmiş sıçanlarda $138.75 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ($P < 0.01$) iken 12 aylık ve 17 aylık sıçanlarda söz konusu durumlardaki aktiviteler sırasıyla; $147.4 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein, $197.9 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ($P < 0.05$); ve $76.85 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein, $469.9 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ($P < 0.05$) olarak bulunmuştur. Özellikle 17 aylık sıçanlarda kontrol deneyine göre CAT miktarında belirgin bir artma olmaktadır. 8 saatlik 3-MC indüklenmesi neticesinde 2 , 12 ve 17 aylık sıçanlardan elde edilen CAT enzim aktivitesi sonuçlarını irdeliyecek olursak 2 aylıklarda kontrol $96.45 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein, deney $104.80 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ($P < 0.05$), 12 ve 17 aylıklarda ise sırasıyla; 123.07 , $111.63 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ($P > 0.01$), 98.1 , $164.2 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ($P < 0.01$) şeklindedir. 12 saatlik 3-MC indüklenmesi sonucunda ise 2 aylık hayvanlarda yine kontrol ve deney sırasıyla, 94.05 , $100.64 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ($P < 0.05$); 190.8 , $296.9 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ($P < 0.01$); 209.9 , $485.9 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ($P < 0.01$) dir.

Jozwiak ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise eritrositlerde CAT aktivitesinde yaşlanmayla beraber bir artışın olduğu bildirilmektedir (130). Elde edilen sonuçlar nedeniyle yaşlanma ile enzim aktivitesi artışına gerekçe olarak, “karsinojen madde indüklemesinin hücrel antioksidatif savunma mekanizmasına yaptığı sinerjistik etkiden kaynaklandığı” fikri ileri sürülebilir.

Se-bağımlı GSH-Px enzim aktivitesinde de yaşlanma ve 3-MC indüklenme sürelerine paralel olarak belirgin artışlar gözlenmiştir. 2 saatlik 3-MC indüklemesiyle 2 aylık sıçanlarda Se-bağımlı GSH-Px aktivite sonuçları, kontrol 0.352 $\mu\text{mol/mg}$ total protein, deney (3-MC verilmiş) 0.509 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ($P<0.01$); 12 aylık sıçanlarda; kontrol 0.651 $\mu\text{mol/mg}$ total protein, deney 0.954 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ($P< 0.05$); 17 aylık ratlarda kontrol 0.733 $\mu\text{mol/mg}$ total protein, deney 0.771 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ($P< 0.05$) olarak bulunmuştur. 8 saatlik indüklenme sonucunda elde edilen sonuçlar; 2 , 12 ve 17 aylık sıçanlarda sırasıyla; kontrol 0.338 $\mu\text{mol/mg}$ total protein , deney 0.384 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ($P < 0.05$); kontrol 0.598 $\mu\text{mol/mg}$ total protein, deney 0.624 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ($P< 0.05$), kontrol 0.475 $\mu\text{mol/mg}$ total protein, deney 0.727 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ($P<0.01$) şeklindedir. 12 saat süreli indüklenme sonuçları ise yine 2, 12 ve 17 aylık sıçan sırasına göre; kontrol 0.446 $\mu\text{mol/mg}$ total protein, deney 0.481 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ($P<0.05$) ; kontrol 0.840 $\mu\text{mol/mg}$ total protein, deney 0.752 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ($P < 0.05$); kontrol 0.778 $\mu\text{mol/mg}$ total protein, deney 0.809 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ($P<0.05$) olarak bulunmuştur.

Se-bağımsız GSH-Px enzim aktivite sonuçları da Se-bağımlı GSH-Px Enzim aktivite sonuçları ile bir paralellik göstermekte olup, önemli farklar görülmemiştir. Di ilio ve arkadaşları, normal ve tümörlü insan meme dokusunda glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz ve glutatyon redüktaz aktivitelerini belirlemek için yaptıkları çalışmada her üç enzimin de, normal dokulara göre, tümörlü dokularda aktivitelerinin

arttığını bildirmişlerdir (131). Ayrıca Jozwiak ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada yaşlanmayla GSH-Px enziminin ilişkisi incelenmiş ve enzim aktivitesinin yaşlanmayla arttığını bildirmişlerdir (130). Bu konuda yapılan bir diğer çalışmada da GSH-Px enzim aktivitesinde (Se bağımlı ve bağımsız) göğüs kanserli hastalarda normale oranla bir artışın olduğu kaydedilmiştir (132). Serbest oksijen radikallerinin hücre içi düzeylerinin artmasının neoplastik dönüşüm evresini hızlandırabileceğine ilişkin kanıtlar vardır. Biyokimyasal olarak tümör hücreleri, normal hücrelerden pek çok farklılıklar gösterirler. Bu farklılıklardan biri de içerdikleri süperoksit dismutaz enzim düzeyidir. Transforme hücrelerinde SOD aktivitesindeki değişiklik önce *in vitro* çalışmalarda gözlenmiştir. İlk olarak SV-40 ile transforme edilen hücrelerde Mn-SOD aktivitesinin ve protein elektroforezinde de Mn-SOD protein bandının ya hiç bulunmadığı veya önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (133) . Bu bulgulardan sonra *in vivo* çalışmalar hızlanmıştır. *In vivo* kanser hücreleri ile yapılan ilk çalışmada da Morris-hepatoma 3924A ve Ehrlich ascites tümör hücrelerinin normal düzeyde Cu,Zn-SOD içerdikleri fakat enzimin mitokondri formu olan Mn-SOD'u hem aktivite hem de protein yönünden içermedikleri bulunmuştur (134, 135). SOD enziminin sitoplazmik formunun (Cu,Zn-SOD) aktivitesi çalışılan tümör çeşidine göre farklı bulunmuştur. Enzimin bu formunun tümör hücrelerinde genellikle azaldığı , bazı türlerde arttığı , bazılarında ise değişmediği gözlenmiştir (136, 137, 138). Gerçekte Cu,Zn-SOD enziminin tümör hücrelerindeki eksiklik derecesi tümörün farklılaşma derecesi ile orantılıdır. Az farklılaşmış tümör hücrelerinde Cu,Zn-SOD aktivitesi düşük iken iyi farklılaşmış tümörlerde ise enzim aktivitesi yüksektir. Bu da günümüzdeki verilerin yetersizliğini kanıtlamaktadır. Bir başka çalışmada deney hayvanlarında 3-MC ve hidralazin verilerek oluşturulan akciğer tümörü modellerinde tümör dokularında SOD aktivitelerinde anlamlı azalmalar olduğu kaydedilmiştir (139, 140).Yaptığımız çalışmada elde edilen SOD aktivitesi sonuçları bu konuda yapılan bazı araştırma sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. 2 saat 3-MC ile indüklenen sıçanlarda yapılan deneyler sonucunda kontrol SOD enzim aktivitesi 2.305 ng/μg total protein iken 3-MC ile indüklenen sıçanda 4.655 ng/μg total proteindir. Fakat 8 saat 3-MC ile indüklenmiş sıçanlarda elde edilen sonuçlarda, kontrol 2.335 ng/μg total protein,

indüklenen denekte ise 3.332 ng/µg total protein olduğu gözlenmiştir. Bu verilerimize göre; karsinojen madde ile indüklenme süresinin artması ile SOD enzim aktivitesinde belirgin bir azalma ($P < 0.001$) olduğu söylenebilir. 12 saatlik indüklemenin ardından, kontrol 2.605 ng/µg total protein, deney 2.905 ng/µg total protein değerleri bulunmuştur. Bu sonuçtan da anlaşılacağı gibi indüklenme süresi ile SOD aktivitesi arasında negatif bir korelasyon gözlenmektedir. SOD aktivitesi sonuçlarından, karsinojen madde ile indüklenme süresinin artması aktiviteyi kontrole kıyasla arttırırken yaşlanma ile ise kontrol ve deney sonuçlarının kendi aralarındaki mukayesesinde her iki halde de SOD aktivitesinde belirgin düşüşler gözleendiği sonucu çıkarılır.

3-MC gibi karsinojen maddeler, SOD, GSH-Px ve CAT aktiviteleri dahil hücrenin antioksidan savunmasında ani ve sürekli bir azalmaya neden olurlar. Serbest radikaller kanserin başlangıç, ilerleme ve gelişme evrelerinde etkili olmakla beraber bu etki ilerleme evresinde daha belirgin diğer evrelerde ise nisbeten daha azdır.

Kanser için önemli bir parametre olan doku GSH düzeyi, çeşitli kanser olgularının tümörlü dokularında ölçülmüştür. Murray ve arkadaşları, normal epitelyum ve fibroadenomada GSH miktarının normal olduğunu, apokrin metaplazi ve intraduktal karsinomada GSH miktarının arttığını göstermişlerdir (141). Tümörlü dokularda GSH miktarının artmasının nedeni henüz tam olarak açıklanamamış olmakla beraber, tümör hücrelerinde heksoz monofosfat yolunun hızının ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz aktivitesinin artışına paralel olarak NADPH ve GSSGR ile okside glutatyon (GSSG)' dan GSH oluşumunun arttığı ileri sürülmüştür. Engin A. ve arkadaşlarının deri kanserli hastalarda yaptıkları bir çalışmada, tümörlü dokularda ölçülen GSH miktarının tümör büyüme hızı ile pozitif bir korelasyon gösterdiği ileri sürülmüştür (142). Çalışmamızın sonuçları da 17 aylık yaşlı sıçanlarda 3-MC veriliminden 2 saat sonra GSSG miktarında azalış olduğunu, gençlerde ise artışa neden olduğunu göstermektedir. 8 ve 12 saat sonra ise genç ve yaşlı tüm sıçanlarda 3-MC'nin GSH seviyesini düşürdüğünü kanıtlamaktadır. Çünkü, mikrozom enzimleri yardımı ile her türlü toksikant metabolize edilip sitokromlar tarafından hidroksillenmekte ya da epoksi formuna

dönüştürülmektedir. Toksikantların mikrozomal enzimler tarafından detoksifikasyonu sırasında GSH'ların oksidasyonu toplam glutatyon ya da GSSG miktarının artışına GSH'ın azalmasına neden olmaktadır (111). Yukarıda adı geçen araştırma sonuçları, araştırmamızın GSH ile ilgili sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Kanserojen bir maddenin detoksifikasyonu sonucunda GSH'ın arttığı buna karşın GSSG miktarının azaldığı görülmektedir (şekil 3.5.1, 3.5.2 ve 3.5.3). Araştırmamızın amacına ulaştığı en önemli noktalardan biri, karsinojen bir maddenin metabolizması sonucu total (GSSG) miktarının azalıp GSH miktarının arttığıdır.

Keza SOD aktivitesindeki düşüşün saptanması da bir başka dikkate değer bulgumuzdur. Yaşlanma sonucunda RNA ve protein sentezinin yavaşladığı, yaşlılık pigmentleri ve diğer bazı ürünlerin birikiminin olduğu bilinmektedir. Özellikle epifiz hormonu olup serotoninin amino grubunun açılmesi ve hidroksil grubunun metillenmesiyle oluşan bir indol türevidir olan *melatonin* lipofilik özelliğinden dolayı hücrenin bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabilmesi sonucunda çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir. Yaşlanma ile birlikte melatonin azalmasının olduğu ve bunun da yaşlanmaya bağlı çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli olabileceği ve bu konularda yapılacak olan çalışmaların önemli bir eksikliği gidereceği fikrine varmak mümkündür (19, 143).

KAYNAKLAR

- 1 Kılınç, K.; Oksijen Radikalleri: Üretilmeleri, Fonksiyonları ve Toksik Etkileri, *Biyokimya Dergisi*, Cilt: X, Sayı: 2, 60-89, 1985
- 2 Cadenas, E.; Biochemistry of Oxygen Toxicity, *Biochem.*; 58, 79-110, 1989
- 3 Joenje, H.; Genetic Toxicology of Oxygen, *Mutation Research*, 219, 193-208, 1989
- 4 Halliwell, B.; Gutteridge, John M.C.; Oxygen Radicals and The Nervous System, *TINS*, 22-26, January 1985
- 5 Bors, W.; Saran, M.; Direct and Indirect Measurements of Oxygen Radicals, *Klin. Wochenschr.*; 69, 957-964, 1991
- 6 Elstner, E.F.; Oxygen Radicals- Biochemical Basis for their Efficacy, *Klin. Wochenschr.*; 69, 949-956, 1991
- 7 Dao, H. H.; De Paulet, A. C.; Paoletti R.; *Icosanoids and Cancer*, Rawen Press, New York, 1-10, 1984
- 8 Halliwell, B.; Gutteridge, M.C.; Role of Free radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease.: An overview. *Methods in Enzymology*. Part B. Edited by. Packer L.; Glazer A.N.; Academic Press, Inc. San Diego. Vol. 186, pp: 1-85. 1990.
- 9 Slater, T. S.; Free- Radical Mechanisms in Tissue Injury, *Biochem. J.* 222, 1-15, 1984
- 10 Tanırgan, G.; Koldaş, M.; Uras, F.; Serbest Radikaller, *Haseki Tıp Bülteni*, Cilt: 32, Sayı: 4, Ekim-Kasım -Aralık, 1994
- 11 Sies, H.; Role of Reactive Oxygen Species in Biological Processes, *Klin. Wochenschr.*; 69, 965-968, 1991
- 12 Southorn, P.A.; Powis G.; Free Radicals in Medicine. I.Chemical Nature and Biologic Reactions, *Mayo Clin. Proc.*; 63, 381-389, 1988
- 13 Fridovich, I.; Superoxide Radical : An Endogenous Toxicant, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 23, 239-257, 1983
- 14 Sohal, R.S.; Brunk U.T.; Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence, *Mutation Research*, 275, 295-304, 1992.

- 15 Van, L. F.; Free Radicals, *Analytical Chemistry*, Vol.65, No.12, June 15, 1993
- 16 Greenstock, C. L.; Oxy-Radicals and the Radiobiological Oxygen Effect, *Israel Journal of Chemistry*, Vol.24, 1-10, 1984
- 17 Wink, D. A.; Nims, R. W.; Saavedra, J. E.; Utermahlen, William E.; Ford, Peter C.; The Fenton oxidation mechanism: Reactivities of biologically relevant substrates with two oxidizing intermediates differ from those predicted for the hydroxyl radical, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 91, 6604-6608, July 1994
- 18 Hiraishi, H.; Terano, A.; Razandi, M.; Sugimoto, T.; Harada, T.; Ivey, K. J.; Role of Cellular Superoxide Dismutase against Reactive Oxygen Metabolite Injury in Cultured Bovine Aortic Endothelial Cells, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.267, 14812-14817, July 25, 1992
- 19 Akkuş, İ.; *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*. Mimoza yayınları, Konya, 1995
- 20 Marnett, L. J.; Ji C.; Modulation of Oxidant Formation in Mouse Skin in Vivo by Tumor-promoting Phorbol Esters, *Cancer Research (Suppl.)*, 54, 1886s-1889s, April 1, 1994
- 21 Feig, D. I.; Reid, T. M.; Loeb, L. A.; Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis, *Cancer Research (Suppl.)*, 54, 1890s-1894s, April 1, 1994
- 22 Li Y.; Trush, M. A.; Reactive Oxygen-dependent DNA Damage Resulting from the Oxidation of Phenolic Compounds by a Copper-Redox Cycle Mechanism, *Cancer Research (Suppl.)*, 54, 1895s-1898s, April 1, 1994
- 23 Garner, A.; Meeting Report: Discussion Meeting on Inorganic and Organic Radicals: their Biological and Clinical Relevance, *Int. J. Radiat. Biol.*; Vol. 48, No 4, 661-664, 1985
- 24 Oberley, L. W.; Buettner, G. R.; Role of Süperoxide Dismutase in Cancer: A Review, *Cancer Research*, 39, 1141-1149, April 1979
- 25 Goeptar, A. R.; Groot, Ed J.; Scheerens H.; Commandeur, Jan N.M.; Vermeulen, Nico P.E.; Cytotoxicity of Mitomycin C and Adriamycin in Freshly Isolated Rat Hepatocytes: The Role of Cytocrome P450, *Cancer Research*, 54, 2411-2418, May 1, 1994

- 26 Toshihisa, I.; The ATP- dependent glutathione S- conjugate export pump, *TIBS*, 17, 463-467, November 1992
- 27 Vericel, E.; Rey, C.; Calzada, C.; Haond P.; Chapuy P.H.; Lagarde M.; Age-Related Changes in Arachidonic Acid Peroxidation and Glutathione Peroxidase Activity in Human Platelets, *Prostaglandins*, Vol.43, No.1, January 1992
- 28 Rice, G.E.; Baker M.S.; The Effects of Free Radical Scavengers on Arachidonic Acid Metabolism by Ovine Placental Microsomes, *Gen. Pharmac.* Vol.22, No.6, 1109-1113, 1991
- 29 Pazdernik, T. L.; Layton, M.; Nelson, S. R.; Samson F. E.; The Osmotic/ Calcium Stress Theory of Brain Damage: Are Free Radicals Involved? *Neurochemical Research*, Vol.17, No.1, 11-21, 1992
- 30 Kettle, A. J.; Winterbourn, C. C.; Oxidation of Hydroquinone by Myeloperoxidase: Mechanism of Stimulation by Benzoquinone, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.267, No.12, 8319-8324, April 25, 1992
- 31 Trush, M. A.; Wilson, M. E.; Van, D. K.; The Generation of Chemiluminescence (CL) by Phagocytic Cells, *Methods in Enzymology*, Academic Press, Vol.LVII, 462-494, 1978
- 32 Markert, M.; Andrews, P. C.; Babior, B. M.; Measurement of O_2^- Production by Human Neutrophils. The Preparation and Assay of NADPH Oxidase-Containing Particles from Human Neutrophils, *Methods in Enzymology*, Academic Press, Vol.105, 358-365, 1984
- 33 Köse K.; Doğan P.; Kardaş Y.; Saraymen R.; Lipid Peroxidation and Antioxidant Activity in Rheumatoid Arthritis, *Tr. J. of Medical Sciences*, 22, 31-34, 1994
- 34 Yeo, H. C.; Helbock, H. J.; Chyu, D. W.; Ames, B. N.; Assay of Malondialdehyde in Biological Fluids by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Analytical Biochemistry*, 220, 391-396, 1994
- 35 Wong, J.W.; Ebeler, S. E.; Isseroff, R. R.; Shibamoto T.; Analysis of Malondialdehyde in Biological Samples by Capillary Gas Chromatography, *Analytical Biochemistry*, 220, 73-81, 1994
- 36 Lawrence, J. M.; Adrienne B.; Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients, *FASEB. J.*; 1: 441-445, 1987
- 37 Slater, T.F.; Free radical studies in relation to cancer and liver regeneration, *South African Journal of Science*, Vol.87, November/December 1991

- 38 Sies, H.; Michael, M.E.; Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage, *J.Photochem.Photobiol.B.*; 8, 211-224, 1991
- 39 Kreitner M.; Alth G.; Koren H.; Loew S.; Ebermann R.; A Quantitative Determination of Singlet Oxygen with Horseradish Peroxidase, *Analytical Biochemistry*, 213, 63-67, 1993
- 40 Liebler D. C.; Kling D.S.; Reed D. J.; Antioxidant Protection of Phospholipid Bilayers by α -Tocopherol: Control of α -Tocopherol status and Lipid Peroxidation by Ascorbic Acid and Glutathione, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.261, No.26, 12114-12119, September 15, 1986
- 41 Yoshikawa T.; Kokura S.; Tainaka K.; Itani K.; Oyamada H.; Kaneko T.; Naito Y.; Kondo M.; The Role of Active Oxygen Species and Lipid Peroxidation in the Antitumor Effect of Hyperthermia, *Cancer Research*, 53, 2326-2329, May 15, 1993
- 42 Sies H.; Biochemistry of Oxidative Stress, *Angew, Chem. Int. Ed. Engl.*; 25, 1058-1071, 1986
- 43 Dizdaroğlu M.; Oxidative Damage to DNA in Mammalian Chromatin, *Mutation Research*, 275, 331-342, 1992
- 44 Lafleur M.V.M.; Retel J.; Contrasting effects of SH-compounds on oxidative DNA damage : repair and increase of damage, *Mutation Research*, 295, 1-10, 1993
- 45 Sies H.; Menck, C. F.M.; Singlet oxygen induced DNA damage, *Mutation Research*, 275, 367-375, 1992
- 46 Satoh, M. S.; Lindahl T.; Enzymatic Repair of Oxidative DNA Damage, *Cancer Research (Suppl.)*, 54, 1899s-1901s, April 1, 1994
- 47 Reid, T. M.; Loeb, L. A.; Mutagenic Specificity of Oxygen Radicals Produced by Human Leukemia Cells, *Cancer Research*, 52, 1082-1086, March 1, 1992
- 48 Timothy J.McBride, Bradley D.P.; Lawrence A. L.; Mutagenic Spectrum Resulting from DNA Damage by Oxygen Radicals, *Biochemistry*, 30, 207-213, 1991
- 49 Halliwell, B.; Grootveld M.; The measurement of free radical reactions in humans, Some thoughts for future experimentation, *FEBS LETTERS*, Vol.213, No.1, 9-14, March, 1987
- 50 Frenkel K.; Oxidation of DNA Bases by Tumor Promoter-Activated Processes, *Environmental Health Perspectives*, Vol.81, 45-54, 1989

- 51 Halliwell, B.; Gutteridge, J. M.C.; The Importance of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Diseases, *Molec. Aspects Med.* Vol.8, 89-193, 1985
- 52 Cross, C. E.; Halliwell, B.; Borish, E. T.; Pryor, W.A.; Ames, B. N.; Saul R. L.; McCord, J. M.; Harman D.; Oxygen Radicals and Human Diseases (Davis Conference), *Annals of Internal Medicine*, 107, 526-545, 1987
- 53 Ames, B.N.; Dietary Carcinogens and Anticarcinogens, *Science*, Vol.221, 1256-1264, 23 September 1983
- 54 Southorn, P.A.; Powis, G.; Free Radicals in Medicine. II. Involvement in Human Diseases, *Mayo Clin. Proc.*; 63, 390-408, 1988
- 55 Clemens, M.R.; Free Radicals in Chemical Carcinogenesis, *Klin. Wochenshr.*; 69, 1123-1134, 1991
- 56 Helzlsouer, K. J.; Block G.; Blumberg J.; Diplock, A. T.; Levine, M.; Marnett, L. J.; Schulplein, R. J.; Spence, J. T.; Simic, M.G.; Summary of the Round Table Discussion on Strategies for Cancer Prevention: Diet; Food, Additives, Supplements, and Drugs, *Cancer Research (Suppl.)*, 54, 2044s-2051s, April 1, 1994
- 57 Gold, L. S.; Slone, T. H.; Stern, B. R.; Manley, N. B.; Ames, B. N.; Rodent Carcinogens: Setting Priorities, *Science*, Vol. 258, 261-265, October 9, 1992
- 58 Kozumbo, W.J.; Trush, M.A.; Kensler, T.W.; Are free radicals involved in tumor promotion ?, *Chem. Biol. Interactions*, 54, 199-207, 1985
- 59 Goldstein, B.D.; Czerniecki B.; Witz G.; The Role of Free Radicals in Tumor Promotion, *Env. Health Pers.* Vol.81, 55-57, 1989
- 60 Cerutti, P.A.; Prooxidant States and Tumor Promotion, *Science*, Vol.227, 375-381, 25 January 1985
- 61 Sigmund, A.W.; Leo, I.G.; Inflammation and Cancer: Role of Phagocyte-Generated Oxidants in Carcinogenesis, *Blood*, Vol.76, No 4(August 15), 655-663, 1990
- 62 Simic, M. G.; DNA Markers of Oxidative Processes in Vivo : Relevance to Carcinogenesis and Anticarcinogenesis, *Cancer Research (Suppl.)*, 54, 1918s-1923s, April 1, 1994
- 63 Murphy, M. E.; Sies H.; Reversible Conversion of Nitroxyl Anion to Nitric Oxide by Superoxide Dismutase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; Vol.88, 10860-10864, December 1991

- 64 Garner, A.; Meeting Report: Discussion Meeting on Inorganic and Organic Radicals: their Biological and Clinical Relevance, *Int. J. Radiat. Biol.*; Vol. 48, No 4, 661-664, 1985
- 65 Yardımcı, E.; Yaşlılık ve Beslenme, *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, Cilt: 3, Sayı: 5 159-161, Mayıs 1994
- 66 Sukyasyan, A.; Yaşlanma Olayı, *Klinik Gelişim*, 6, 2255-2258, 1993
- 67 Devasagayam, P.; Thomas A.; Decreased peroxidative potential in rat brain microsomal fractions during ageing, *Neuroscience Letters*, 103, 92-96, 1989
- 68 Brunk, U. T.; Jones, C. B.; Sohal, R. S.; A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis, *Mutation Research*, 275, 395-403, 1992
- 69 Dean, R. T.; Gebicki, J.; Gieseg S.; Grant A. J.; Simpson J. A.; Hypothesis: a damaging role in aging for reactive protein oxidation products ?, *Mutation Research*, 275, 387-393, 1992
- 70 Harman, D.; Free Radicals in Aging, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 84, 155-161, 1988
- 71 Harman, D.; Free Radical Theory of Aging, *Mutation Research*, 275, 257-266, 1992
- 72 Shigenaga, M. K.; Hagen, Tory M.; Ames, B. N.; Oxidative damage and mitochondrial decay in aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, Vol.91, 10771-10778, November 1994
- 73 Gadaleta, M. N.; Rainaldi, G.; Lezza, A.M.S.; Milella, F.; Fracasso, F.; Cantatore, P.; Mitochondrial DNA copy number and mitochondrial DNA deletion in adult and senescent rats, *Mutation Research*, 275, 181-193, 1992
- 74 Debrinski, M.C.; Shoffner, J.M.; Lott, M.T.; Wallace, D.C.; Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease, *Mutation Research*, 275, 169-180, 1992
- 75 Wallace, D. C.; Mitochondrial Genetics: A Paradigm for Aging and Degenerative Diseases ? , *Science*, Vol 256, May 1, 1992
- 76 Richter, C.; Reactive Oxygen and DNA Damage in Mitochondria, *Mutation Research*, 275, 249-255, 1992
- 77 Tumer, N.; Scarpace P. J.; Lowenthal D.T.; Geriatric Pharmacology: Basic and Clinical Considerations, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 32, 271-302, 1992

- 78 Yancik, R.; Ries L.; Cancer in Older Persons: Magnitude of the Problem- How Do We Apply, What We Know ?, *Cancer*, 74, 1995-2003, 1994
- 79 Cohen, H.J.; Biology of Aging as Related to Cancer, *Cancer*, 74, 2092-2100, 1994
- 80 Atamanalp, S.S.; Polat M.; Yıldırgan M. I.; Ertaş E.; Bakan N.; Akçay F.; The Effects of Süperoxide Dismutase, Deferoxamine and Their Combination on Gastric Mucosal Damage Due to Ischemia-Reperfusion, *Tr.J.of Medical Sciences*, 17, 201-205, 1993
- 81 Leopold, F.; Superoxide dismutase for therapeutic use: Clinical experience, dead ends and hopes, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 84, 123-131 1988
- 82 Steinberg, D.; Antioxidant Vitamins and Coronary Heart Disease, *The new England Journal of Medicine*, Vol.328, No.20, 1487-1489, May 20, 1993
- 83 White, C.R.; Brock, T.A.; Chang, L-Y.; Crapo, J.; Briscoe, P.; Ku, D.; Bradley W. A.; Gianturco, S. H.; Gore, J.; Freeman, B. A.; Tarpey, M. M.; Süperoxide and Peroxynitrite in Atherosclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; Vol.91, 1044-1048, February 1994
- 84 Barış, B.; Lung Cancer Chemoprevention with Antioxidant Vitamins, *Tr. J. of Medical Sciences*, 22, 63-64, 1994
- 85 Alataş, Ö.; İnal (Erden) M.; Erythrocyte Superoxide Dismutase Activity and Reduced Glutathione Level in Patients with Diabetes Mellitus, *Tr. J. of Medical Sciences*, 21, 9-11, 1994
- 86 Seddon, J.M.; Ajani, U.A.; Sperduto, R. D.; Hiller, R.; Blair, N.; Burton, T.; Farber, C.; Marilyn D.; Gragoudas, E. S.; Haller, J.; Miller, D.; Yannuzzi, T.; Lawrence, A.; Willet, W.; Dietary Carotenoids, Vitamins A,C, and E, and Advanced Age-Related Macular Degeneration, *JAMA*, Vol.272, No 18, 1413-1420, November 9, 1994
- 87 Carol, D.; De L'oxygene, *La Recherche* Vol.22, 228, 57-64, Janvier 1991
- 88 Fridovich, I.; Freeman Bruce, Antioxidant defenses in the lung, *Ann. Rev. Physiol.*; 48, 693-702, 1986
- 89 Pigeolet, E.; Corbisier, P.; Houbion, A.; Lambert, D.; Michiels, C.; Raes, M.; Zachary, M.D.; Remacle, J.; Glutathione Peroxidase, Superoxide Dismutase, and Catalase Inactivation by Peroxides and Oxygen Derived Free Radicals, *Mechanisms of Ageing and Development*, 51, 283-297, 1990

- 90 Troll, W.; Wiesner, R.; The Role of Oxygen Radicals as a Possible Mechanism of Tumor Promotion, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 25, 509-528, 1985
- 91 Burton, G.W.; Foster, D.O.; Perly, B.; Slater, T.F.; Smith, I.C.P.; Ingold, K.U.; Biological Antioxidants, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B 311, 565-578, 1985
- 92 Jaeschke, H.; Mitchell, J. R.; Use of Isolated Perfused Organs in Hypoxia and Ischemia Reperfusion Oxidant stress. *Methods in Enzymology*, Ed.By. Packer L., Glazer A.N.; Academic prees. Vol.186, pp: 752-759, 1990
- 93 Deby, C.; Goutier, R.; New Perspectives on the Biochemistry of Superoxide Anion and the Efficiency of Superoxide Dismutases, *Biochemical Pharmacology*, Vol.39, No.3, 399-405, 1990
- 94 Rigo, A.; Viglino, P.; Polarographic Determination of Superoxide Dismutase, *Analytical Biochemistry*, 68, 1-8, 1975
- 95 Oberley L.W.; Superoxide Dismutase, Vol. 1, CRC Press, Inc.; Boca Raton, Florida, 1982
- 96 Bolann, B. J.; Ulvik, R.J.; Improvement of a Direct Spectrophotometric Assay for Routine Determination of Superoxide Dismutase Activity, *Clin. Chem.*; 37/11, 1993-1999, 1991
- 97 Spitz, D. R.; Oberley L.W.; An Assay for Superoxide Dismutase Activity in Mammalian Tissue Homogenates, *Analytical Biochemistry*, 179, 8-18, 1989
- 98 McNamara, O. J.; Fridowich I.; Did radicals strike Lou Gehrig ? , *Nature*, Vol.362, 20-21, 4 March, 1993
- 99 Vartanyan, L.S.; Sadovnikova, I.P.; Gurevich, S.M.; Sokolova, I.S.; Generation of superoxide radicals in membranes of subcellular organelles of regenerating liver, Institute of chemical physics, Russian academy of sciences, Moscow. *Translated Biokhimiya*, Vol 57, No 5, 671-678, 1992
- 100 Weber, G.F.; Bruch H.P.; Die Pharmakologie der Superoxid-Dismutase, *Pharmazie*, 47, H.3, 159-167, 1992
- 101 Sun, Y.; Oberley L.W.; Li Y.; A simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase, 34/3, 497-500, 1988
- 102 Mavelli, I.; Rotilio, G.; Enzymatic Protection Against Intracellular Oxidative Processes. *Advances on oxygen radicals and radioprotectors*. Ed. Breccta A.; Greenstock C.L.; Tamba M.; Edizioni Scientifiche, 65-80, 1984

- 103 Natta, C.L.; Chen, I.C.; Chow, C.K.; Selenium and Glutathione Peroxidase Levels in Sickle Cell Anemia, *Acta Haematol.*; 83, 130-132, 1990
- 104 Wilson, David C.; Tubman, Richard, Bell, Noel, Halliday, Henry L.; McMaster, D.; Plasma manganese, selenium and glutathione peroxidase levels in the mother and newborn infant, *Early Human Development*, 26, 223-226, 1991
- 105 Chang, M.; Reddy, C.C.; Active Transcription of the Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase Gene In Selenium-Deficient Rats, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.181, No.3, 1431-1436, 1991
- 106 Chow, C.K.; Effect of Dietary Vitamin E and Selenium on Rats: Pyruvate Kinase, Glutathione Peroxidase and Oxidative damage, *Nutrition Research*, Vol.10, 183-194, 1990
- 107 Guemouri, L.; Artur Y.; Herbeth B.; Jeandel C.; Cuny G.; Siest G.; Biological Variability of Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, and Catalase in Blood, *Clin. Chem.*; 37/11, 1932-1937, 1991
- 108 Takahashi, K.; Cohen, H. J.; Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase Protein and Activity: Immunological Investigations on Cellular and Plasma Enzymes, *Blood*, Vol.68, No.3, 640-645, September, 1986
- 109 Gaetani, G.F.; Galiano, S.; Canepa, L.; Ferraris, A. M.; Kirkman, H. N.; Catalase and Glutathione Peroxidase are Equally Active in Detoxification of Hydrogen Peroxide in Human Erythrocytes, *Blood*, Vol.73, No.1, 334-339, January 1989
- 110 Ceylan, A.; Sayal, A.; Aydın, A.; Tanır, G.; Selen, A.; Sarılıklı Yenidoğanlarda glutasyon peroksidase ve Selenyum Değerleri, *Optimal Tıp Dergisi*, Cilt : 6, Sayı:2, 74-77,1993
- 111 Gözükara, E. M.; Biyokimya 2, 2.baskı, Evin matbaası, Malatya, 1994
- 112 Nakayama, T.; Suppression of Hydroperoxide -induced Cytotoxicity by Polyphenols, *Cancer Research (Suppl.)*, 54, 1991s-1993s, April1, 1994
- 113 McCay, P.B.; VITAMIN E: Interactions with Free Radicals and Ascorbate, *Ann. Rev. Nutr.*; 5, 323-340, 1985
- 114 Herbert, V.; Schalch W.; Antioxidants, Pro-oxidants, and Their Effects, *JAMA*, 7, Vol.272, No.21, 1660-1661, December 1994
- 115 VERIS (Vitamin E Research and Information Service) , *The Vitamin E Fact Book*, LaGrange, IL USA, 1-40, 1989

- 116 Sidney, S. M.; Effects of Vitamins C and E on N-Nitroso Compound Formation, Carcinogenesis, and Cancer, *Cancer*, 58, 1842-1850, 1986
- 117 Yu, M.W.; Jing, Z.Yu.; Blaner, W. S.; Santella, R. M.; Influence of Vitamins A, C, and E and β -Carotene on Aflatoxin B₁ Binding to DNA in Woodchuck Hepatocytes, *Cancer*, 73, 596-604, 1994
- 118 Horvath, P.M.; Ip, C.; Synergistic Effect of Vitamin E and Selenium in the Chemoprevention of Mammary Carcinogenesis in Rats, *Cancer Research*, 43, 5335-5341, November 1983
- 119 Meister, A.; Glutathione, Ascorbate, and Cellular Protection, *Cancer Research (Suppl.)*, 54, 1969s-1975s, April 1, 1994
- 120 Meister, A.; Glutathione, *The Liver Biology and Pathobiology*, edited by Arias I.; Popper H.; Schachter D.; Shafritz D.A.; Raven Press, New York, Chapter 17, 297-306, 1982
- 121 Munday, R.; Winterbourn, C. C.; Reduced Glutathione in Combination with Superoxide Dismutase as an Important Biological Antioxidant Defence Mechanism, *Biochemical Pharmacology*, Vol.38, No.24, 4349-4352, 1989
- 122 Tew, K. D.; Glutathione-associated Enzymes in Anticancer Drug Resistance, *Cancer Research* 54, 4313-4320, August 15, 1994
- 123 Erden, M.; Radyasyonun Bazı Eritrosit Enzimlerine Etkisi, *Tr.J.of Medical Sciences*, 16, 55-66, 1992
- 124 Stryer, L.; *Biochemistry*, Freeman W.H and Company, pp: 366-367, 1975
- 125 Lowry, O.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J.; Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.*; 193, 265-275, 1956
- 126 Lück, H.; *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd ed.; Verlag Chemie, Academic Press, 885-888, 1963
- 127 Lawrance, R. A.; Burk, R. F.; Glutathione Peroxidase Activity in Selenium-Deficient Rat Liver, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.71, No.4, 952-958, 1976
- 128 McCord, J. M.; Fridovich, I.; Superoxide Dismutase: An Enzymic Function for Erythrocyte Hemocuprein (Hemocuprein), *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.244, No.22, 6049-6055, November 25, 1969

- 129 Anderson, M.E.; Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide in Biological Samples, *Methods in Enzymology*, Edited by. Meister A.; Academic Press, inc. Vol.113, pp: 548-554, 1985
- 130 Jozwiak, Z.; Jasnowska, B.; Changes in Oxygen -Metabolizing Enzymes and Lipid Peroxidation in Human Erythrocytes as a Function of Age of Donor, *Mechanisms of Ageing and Development*, 32, 77-83, 1985
- 131 Ilio, C.D.; Sacchetta, P.; Baccio, G.D.; Rovera, G.L.; Federici, G.; Glutathione peroxidase, Glutathione-S-transferase and Glutathione reductase Activities in normal and neoplastic man breast Tissue, *Cancer Lett.*; 29, 37-42, 1985
- 132 Singh, S.V.; Xu, B.H.; Tkalcevic, G.T.; Gupta, V.; Roberts, B.; Ruiz, P.; Glutathione linked Detoxification Patway in Normal and Malignant Human Bladder Tissue, *Cancer Lett.*; Feb 28, 77(1), 15-24, 1994
- 133 Yamanaka, N.Y.; Deamer, D.; Superoxide dismutase Activity in WI-38 cell cultures. Effects of age, trypsinization and SV-40 transformation, *Physiol. Chem. Phys.*; 6, 95-106, 1974
- 134 Dionisi, D.; Galeotti, T.; Terranova, T.; Azzi, A.; Superoxide Radicals and Hydrogen peroxide Formation in Mitochondria From Normal and Neoplastic tissues, *Biochim. Biophys. Acta*, 403, 292-300, 1975
- 135 Sahu, S.K.; Oberley, L.W.; Stewens, R.H.; Riley, E.F.; Superoxide dismutase Activity of Ehrlich ascites Tumor cells, *J. Natl. Cancer Inst.*; 58, 1125-1128, 1977
- 136 Kılınç, K.; Kanserde Oksijen Radikalleri ve Süperoksit Dismutaz, *Biyokimya dergisi, cilt: XI, Sayı:3*, 59-76, 1986
- 137 Belce, A.; Gümüştas, M.K.; Tunalı, L.; Kökoğlu, E.; Yılmaz, G.; Akciğer Kanserlerinde Eritrosit Cu,Zn-SOD Aktivitesinin sijen Radikalleri ve Süperoksit Dismutaz, Değerlendirilmesi, *Klinik Gelişim*, 7, 3336-3337, 1994
- 138 Gonzales, R.; Auclair, C.; Voisin, E.; Gautero, H.; Dhermy, D.; Boivin, P.; Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase in Red Blood Cells from Patients with Malignant Diseases, *Cancer Research*, 44, 4137-4139, September 1984
- 139 He, R.; İnhibitory Effect of Micronutrients and BHA on lung Cancer Induced in Rats. *Ching Hua Chung Liu Tsa Chih*, 12, 421-424, 1990
- 140 Drozd, M.; Luciak, M.; Jendryczko, A.; Magner, K.; Changes in Lung Activity of Superoxide Dismutase and Copper Concentration During Lung Tumorigenesis by Hydralazine in Swiss Mice. *Exp. Pathol.* 32, 119-122, 1987

141 Murray, G.I.; Burke, M.D.; Ewen, S.W.B.; Glutathione Localization in Benign and Malignant Human Breast Lesion, *Br. J. Cancer*, 55, 605-609, 1987

142 Engin, A.; Glutathione Content of Human Skin Carcinomas, *Arch. Derms. Res.*; 257, 6, 1976

143 Karlson, P.; *Tıp ve Fen Bilimciler için Biyokimya*, Arkadaş tıp kitapları, 376-377, 1988

144 Vahakangas, K.; Nebert, D.W.; Pelkonen, O.; The DNA Binding of Benzo[a]pyrene Metabolites Catalysed by Rat Lung Microsomes In vitro and in Isolated Perfused Rat Lung, *Chem. Biol. Interactions*, 24, 167-176, 1979

