

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mustafa Serkan YALÇIN

**HEPATİTLİ HASTALARDA ANTİOKSİDAN ENZİMLERİNİN
SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD), GLUTATYON PEROKSİDAZ (GSH-Px)
VE KATALAZ (CAT) AKTİVİTE DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA 2007

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

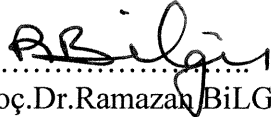
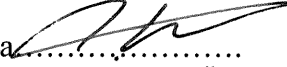
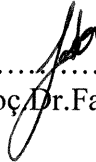
**HEPATİTLİ HASTALARDA ANTİOKSİDAN ENZİMLERİNİN
(SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD), GLUTATYON PEROKSİDAZ (GSH-Px)
VE KATALAZ (CAT)) AKTİVİTE DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**

Mustafa Serkan YALÇIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez **17.18.**/2007 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oy Birliği/Oy
Çokluğu İle Kabul Edilmiştir.

İmza.......... İmza.......... İmza..........
Yrd.Doç.Dr.Ramazan BİLGİN Prof.Dr.S.Seyhan TÜKEL Yrd.Doç.Dr.Fatma ÇEVİK
DANIŞMAN ÜYE ÜYE

Bu tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

**Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi
tarafından desteklenmiştir.**

Proje No: FEF 2007 YL 19

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEPATİTLİ HASTALARDA ANTİOKSİDAN ENZİMLERİNİN
SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD), GLUTATYON PEROKSİDAZ
(GSH-Px) VE KATALAZ (CAT) AKTİVİTE DÜZEYLERİNİN
İNCELENMESİ

Mustafa Serkan YALÇIN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Ramazan BİLGİN

Yıl : 2007 **Sayfa**: 41

Jüri : Yrd. Doç.Dr. Ramazan BİLGİN

Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL

Yrd. Doç.Dr. Fatma ÇEVİK

Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif stresin kronik karaciğer rahatsızlıklarının patogeneğinde etkin rol oynadığı bilinmektedir. Bu çalışmada antioksidan savunma sistemlerinden Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzimlerinin Hepatit C'li hastalardaki aktiviteleri aynı yaş grubundaki sağlıklı kontrollere ait aktivite düzeyleri ile karşılaştırılmıştır. Hepatit C'li hastalarda SOD seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşük bulunurken ($p<0,05$), CAT aktivitesi anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,0001$). Ayrıca GSH-Px aktivite düzeyinde ise kontrol grubuna göre anlamlı bir yükselme tespit edilmiştir ($p<0,05$)

Anahtar Kelimeler: Hepatit C, Oksidatif Stres, Antioksidan Enzimler

ABSTRACT

MSc THESIS

**DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES
SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD), GLUTATHIONE PEROXIDASE
(GSH-Px) and CATALASE (CAT) in PATIENT with HEPATITIS
INFECTION**

Mustafa Serkan YALÇIN

**DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF SCIENCE
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA**

Supervisor : Asist. Prof.Dr.Ramazan BİLGİN

Year : 2007 **Pages:** 41

Jury : Asist. Prof:Dr.Ramazan BİLGİN

Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL

Asist. Prof.Dr. Fatma ÇEVİK

Oxidative stress caused by reactive oxygene species plays an efficient role in pathogenesis of chronical liver diseases. In this study, we investigated activity levels of some of the antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the patient with Hepatitis C and the results were compared with that of healty same aged controls. A significant decrease of SOD activities in patients with Hepatitis C compared with control group were found ($p<0,05$), On the other hand, a statistically significant increase of CAT activities in patients with hepatitis C compared with control group were found ($p<0,0001$). Furthermore, a significant increase of GSH-Px activities in patients with hepatitis C compared with control group were found ($p<0,05$)

Key Words: Hepatitis C, Oxidative Stress, Antioxidant Enzyme

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında değerli zamanımı, düşünce ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Ramazan BİLGİN'e, ayrıca sayın hocalarım Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL'e, Doç. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e, Yrd. Doç. Dr. Fatma ÇEVİK'e;

Yüksek Lisans çalışma laboratuvarındaki hocalarım Arş.Gör. Özlem ALPTEKİN, Hasan KARADAĞ, Deniz YILDIRIM ve Ahmet UMAY'A ayrıca kan örneklerinin sağlanmasında yardımcı olan Ç.Ü Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarından Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul KAHRAMAN ve Dr. Salih ÇETİNER'e;

Hayatımın her döneminde yanımda olan benden; maddî manevî desteklerini esirgemeyen değerli babam Kuttusi YALÇIN annem Ayşe YALÇIN kardeşlerim Selda ve Hakan YALÇIN' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IX
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Radikaller.....	1
1.2. Radikallerin Oluşumu.....	1
1.2.1. Kovalent Bağların Homolitik Kırılması.....	1
1.2.2. Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi.....	2
1.2.3. Normal Bir Moleküle Elektron Transferi.....	2
1.3. Oksijen ve Oksijen Radikalleri.....	2
1.4. Canlılarda Oksijen Radikallerinin Yapımı.....	3
1.4.1. Endojen Kaynaklı Serbest Radikal Üretim Kaynakları.....	4
1.4.2. Eksojen Kaynaklı Serbest Radikal Üretim Kaynakları.....	4
1.5. Başlıca Reaktif Oksijen Kaynakları.....	5
1.5.1. Süperoksit.....	5
1.5.2. Hidrojen Peroksit.....	7
1.5.3. Hidroksil Radikal.....	7
1.5.4. Nitrik Oksit.....	10
1.6. Serbest Radikallerin Etkileri.....	11
1.6.1. Lipitlere Etkileri.....	11
1.6.2. Proteinlere Etkileri.....	12
1.6.3. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri.....	12
1.6.4. Karbohidratlara Etkileri.....	13
1.7.Radikal Kaynakları.....	13

1.8. Enzimatik Antioksidanlar.....	14
1.8.1. Süperoksit Dismutaz.....	14
1.8.2. Glutatyon Peroksidaz.....	16
1.8.3. Katalaz.....	17
1.9. Hepatit.....	18
1.9.1. Viral Hepatitler.....	18
1.9.1.1. Hepatit A Virüsü.....	18
1.9.1.2. Hepatit B Virüsü.....	19
1.9.1.3. Hepatit C Virüsü.....	19
1.9.1.4. Hepatit D Virüsü.....	19
1.9.1.5. Hepatit E Virüsü.....	20
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	21
3. MATERYAL VE METOD.....	23
3.1. Materyal Metod.....	23
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	23
3.3. Metod.....	23
3.3.1. Süperoksit Dismutaz Enzim Tayini.....	23
3.3.2. Glutatyon Peroksidaz Enzim Tayini.....	25
3.3.3. Katalaz Enzim Tayini.....	26
3.3.4. Hemoglobun Tayini.....	27
3.3.5. Protein Tayini.....	28
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	29
4.1. Bulgular.....	29
4.1.1. Protein Tayinine Ait Bulgular.....	29
4.1.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayinine Ait Bulgular.....	30
4.1.3. Katalaz Aktivitesi Tayininine Ait Bulgular.....	31
4.1.4. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi Tayininine Ait Bulgular.....	32
4.2. Tartışma.....	33
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	35
5.1. Sonuçlar.....	35
5.2. Öneriler.....	35

KAYNAKLAR.....	36
ÖZGEÇMİŞ.....	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. Oksijen ve nitrik oksitten oluşan başlıca reaktif türler.....	4
Çizelge 4.1. Protein standartlarının 750 nm’de alınan absorbans değerleri.....	29
Çizelge 4.2. Kontrol grubu ve hepatit C’li hastalara ait süperoksit dismutaz aktivite değerleri.....	30
Çizelge 4.3. Kontrol grubu ve hepatit C’li hastalara ait katalaz aktivite değerleri.....	31
Çizelge 4.4. Kontrol grubu ve hepatit C’li hastalara ait glutatyon peroksidaz aktivite değerleri.....	32

ŒEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Œekil 4.1. Standart Protein Eğrisi.....29

SİMGELER ve KISALTMALAR

SOD	: Süperoksit dismutaz
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
CAT	: Katalaz
MDA	: Malondialdehit
HB	: Hemoglobin
PROT	: Protein
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentetaz
GSH	: Glutatyon
GSSG	: Okside glutatyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
NADPH	: Ninotinamid adenin dinükleotid fosfat
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat

1. GİRİŞ

1.1. Radikaller

Radikaller; dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron içeren kimyasal türlerdir. Böyle bir kimyasal tür basit bir atom ya da kompleks yapılı bir organik molekül olabilir. Kimyasal ve biyokimyasal tepkimelerin tümü atomların dış orbitallerindeki elektronlar seviyesinde gerçekleşir.

Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması söz konusu kimyasal türün reaktivitesini çok fazla arttırdığı için, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir. Elementlerin bir kısmı, atomik yapılarında paylaşılmamış elektron içerdiklerinden, doğada atomları halinde değil, moleküler halde bulunurlar. Örneğin hidrojen, karbon, azot, oksijen ve diğer bazı elementler doğada atomları halinde serbest bulunmazlar. Soygazlar gibi elementlerde ise bütün orbitalleri elektronlarla doyurulduğu için serbest atom halinde bulunabilirler ve reaktiviteleri yoktur.

1.2. Radikallerin Oluşumu

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel ve kimyasal olaylar nedeniyle sürekli bir radikal oluşumu vardır. Hücrelerdeki metabolik olaylar sırasında farklı tür ve miktarlarda radikaller oluşmaktadır. Radikaller pozitif yüklü veya yüksüz olarak bulunabilirler. Radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşurlar (Cheeseman ve Slater, 1993).

1.2.1. Kovalent Bağların Homolitik Kırılması

Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar veya yüksek sıcaklık (500–600°C) kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir. Organik moleküllerdeki bağların heterolitik kırılması durumunda zıt yüklü iyon çiftleri oluşur ve bu türler de reaktiftirler.

1.2.2. Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi

Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa, radikal formu oluşur.

Örneğin askorbik asit, glutatyon ve tokoferoller (E vitamini) gibi hücrel antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formları oluşur. Glutatyon (GSH) radikalleri indirgerken, kendisinin tiyil radikali oluşur (GS[•]) oluşur. İki tiyil radikalının birbiriyle tepkimesi sonucu oluşan tür ise glutatyonun oksitlenmiş (GSSG) formudur.

1.2.3. Normal Bir Moleküle Elektron Transferi

Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa, bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksitin ($O_2^{\bullet -}$) oluşumuna neden olur. Bu mekanizma ile radikal yapımı biyolojik sistemlerde yaygın olarak gerçekleştiğinden canlılar için önemlidir. Canlılarda çok sayıda enzimatik olmayan tepkimelerle süperoksit üretilir. Süperoksit radikalının yapımındaki artış, oksijenin diğer radikal türlerinin ve diğer atom merkezli radikallerinin oluşumu için etkin rol oynar (Akkuş, 1995).

1.3. Oksijen ve Oksijen Radikalleri

Moleküler oksijen (atmosferik oksijen) dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu elektronlar, spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken minimum enerji seviyesindedirler. Radikal tanımına göre oksijen “diradikal” yapıya sahip bir moleküldür. Oysa oksijenin reaktivitesi beklenin aksine çok düşüktür. Diradikal yapıya sahip olan oksijenin herhangi bir moleküle tepkimeye girebilmesi için, tepkimeye gireceği molekülün de benzer yapıya (farklı orbitallerde spinleri aynı yönde elektron içermesi) sahip olması gerekir.

Oysa başta organik moleküller olmak üzere, atom ve moleküller orbitallerinde elektronları anti paralel ve eşleşmiş olarak içerirler veya paylaşılmamış elektronlar bağlara katılmışlardır. Bunun sonucu olarak oksijenin diğer moleküllere olan reaktivitesi son derece kısıtlanmıştır. Bu kısıtlama “spin kısıtlaması” olarak adlandırılır. Canlıların oksijeni kullanabilmesi için, oksijene elektron transferi yaparak spin kısıtlamasını aşmaları gerekir. Bu işlem için canlılar geçiş elementleri sınıfından bazı metal iyonlarından yararlanırlar.

Geçiş elementlerinden Fe, Cu, Mn, Zn, Co ve Mo vücudun gereksinim duyduğu başlıca eser elementler olup, bu elementler dış orbitallerinde bir veya daha fazla sayıda paylaşılmamış elektron içerirler. Canlılarda oksijeni kullanan enzimler ya da oksijenle etkileşime giren proteinler, bu elementlerden en az bir tanesini içermek zorundadırlar (Aust ve ark., 1985).

Biyolojik sistemlerde “radikaller” kavramından bahsedildiğinde genel olarak oksijen merkezli radikaller akla gelir. Oksijen dışında da radikaller oluşmaktadır. Bu anlayışın başlıca haklı gerekçeleri şunlardır:

1. Diğer atom merkezli radikaller büyük bir hızla oksijenle tepkimeye girerler ve tepkimede paylaşılmamış elektron oksijen atomu üzerine kayar; radikal özelliği oksijen atomu üzerinde devam eder.

2. Moleküler oksijen hücrelerde devamlı olarak kullanılan bir moleküldür. Oksijeni kullanabilmek için elektron transferi ile spin kısıtlamasının aşılması gerekir. Bu nedenle de oksijen metabolizması sırasında reaktif radikal türlerinin oluşması kaçınılmazdır.

3. Elektrofilik bir atom olan oksijen, dış orbitaline elektron alarak biyomolekülleri oksitler, bu sırada kendisinin radikal türleri oluşur. Metal iyonları oksijenin bu tür oksitleyici etkilerini hızlandırır.

1.4. Canlılarda Oksijen Radikallerinin Yapımı

Oksijen bulunan bir ortamda çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle oksijen radikalleri yapılabilir. Özellikle oksijenin metabolize edildiği canlılarda önemli

değişimlerde radikal üretimi gerçekleşir. Hücrelerde oluşabilen oksijen radikalleri ile oksijen içeren reaktif türlerin önemli olanları Çizelge 1,1.'de görülmektedir.

Oksijen radikalleri dış kaynaklı (ekzojen) ve iç kaynaklı (endojen) olarak oluşmaktadır. Normal metabolik olaylar sırasında ara ürün olarak oluşabilmektedir. Bu radikaller belirli seviyenin üzerine çıktığı zaman canlı için ciddi tehlikeler oluşturmaktadır. Ancak tamamen istenmeyen yapılar değildirler ve bazı proseslerde bunların varlığı gerekmektedir.

Çizelge 1,1. Oksijen ve nitrik oksitten oluşan başlıca reaktif türler.

	Tür Adı		Tür Adı
$^1\text{O}_2$	Singlet oksijen	HO_2^\cdot	Hidroperoksil radikali
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Süperoksit	NO^\cdot	Nitrik oksit
H_2O_2	Hidrojen peroksit	NO_2	Nitrojen dioksit
$^\cdot\text{OH}$	Hidroksil radikali	NO_2^+	Nitril katyonu
ROO^\cdot	Peroksil radikali	ONOO^-	Peroksinitrit
ROOOH	Hidroperoksit	ONOO^\cdot	Peroksinitrit radikali
RO^\cdot	Alkoksil radikali	N_2O_3	Dinitrojen trioksit

1.4.1. Endojen Kaynaklı Serbest Radikal Üretim Kaynakları

- ❖ Mitokondriyal elektron transport sistemi reaksiyonları
- ❖ Oksijenaz enzimlerinin reaksiyonları
- ❖ Antimikrobiyal aktivite sırasında oluşan solunum patlaması
- ❖ Otooksidasyon reaksiyonları

1.4.2. Eksojen Kaynaklı Serbest Radikal Üretim Kaynakları

- ❖ Radyoaktivite
- ❖ Ultrason
- ❖ Ksenobiyotikler (Yabancı kimyasallar) (Sies, 1991)

Vücudumuzda oluşabilen radikallerin sayısı yüzlerce farklı tür şeklinde ifade edilebilirse de, bu radikaller arasında süperoksit, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve hidroksil radikalının özel yerleri vardır (Kenneth, 1998).

Bu radikaller içinde süperoksit ve nitrik oksit temel radikaller sayılabilir. Çünkü süperoksit ve nitrik oksit enzimatik mekanizmalarla, devamlı olarak ve önemli derişimde üretilen radikallerdir. Ayrıca bu iki radikal, biyolojik sistemlerde tanıdığımız diğer bütün önemli radikaller ile radikal yapıda olmayan reaktif türlerin oluşumunu başlatabilecek özelliktedirler. Normal biyokimyasal tepkimeler sırasında oluşan oksijen radikalleri ile çeşitli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrik oksitin derişimleri genellikle çok düşüktür. Düşük derişimlerdeki reaktif türler, hücrelerin antioksidan sistemleri tarafından aktif olmayan şekilde dönüştürüldüklerinden önemli zararlı etkilere neden olmazlar. Ancak bu radikallerin yapımları çeşitli hastalık durumlarında artabilir, çoğunlukla da her iki radikal bileşik grubunun oluşumu birbiri ile paraleldir. Örneğin iltihap durumlarında aktifleşen lökositler aynı anda hem oksijen radikallerini hem de nitrik oksiti yüksek konsantrasyonlarda sentezlerler.

Nitrik oksit, oksijen radikalleri ile tepkimeye girerek veya oksijenli ortamda oksitlenerek, kendisinden çok daha reaktif türlerin oluşumuna neden olur. Oksijen radikallerinin aşırı yapımına neden olan etkilerin toplamı “oksidatif stres” olarak adlandırılır (Cormick ve ark., 1999).

1.5. Başlıca Reaktif Oksijen Radikalleri

1.5.1. Süperoksit

Canlılarda oluştuğu ilk gösterilen radikal olan süperoksit, başlıca şu mekanizmalarla üretilmektedir:

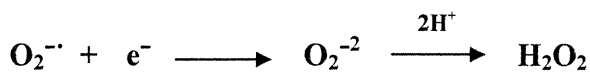
❖ İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotidler gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar.

❖ Başta çeşitli dehidrojenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali oluşabilir.

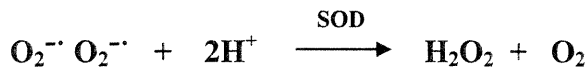
❖ Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin %1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH dehidrojenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır. Sitokrom oksidaz, Fe: Cu: Zn: Mg atomlarını 2:2:1:1 oranında içeren bir protein olup, süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz aktivitelerine sahiptir. Bu sayede, sitokrom oksidaz üzerinde süperoksit veya hidrojen peroksit oluşsa bile, içerdiği enzimatik aktivite sayesinde hızla ortamdaki temizlenir.

❖ Aktifleşen fagositik lökositler bol miktarda süperoksit üreterek; ürettikleri süperoksitleri fagozom içine ve buldukları ortama verirler. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır. Bu örnekte görüldüğü gibi radikal yapımı bazı hücrel fonksiyonlar için gerekli de olabilir (Steinman, 1982).

Hücrel koşullarda üretilen süperoksit, oksitleyici veya indirgeyici olarak davranabilir. Aldığı elektronu metal iyonuna, sitokrom C'ye veya bir radikale verirse tekrar oksijene oksitlenir. Oksijenden daha oksitleyici olan süperoksit bir elektron daha alırsa peroksi anyonuna indirgenir:



Yukarıdaki tepkime biyolojik moleküllerin oksidasyonuna neden olduğundan tercih edilmez. Aerobik canlılarda süperoksitlerin H_2O_2 'ye çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenir:



1.5.2. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitin enzimatik olmayan tepkimeleri sonucu oluşur.

Nötral ve asidik koşullarda net yük taşımaz, biyolojik zarları kolayca geçebilir. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir.

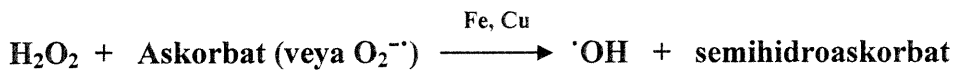
Hidrojen peroksitin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni; Cu, Fe gibi metal iyonları varlığında hidroksil radikalının öncülü olarak davranmasıdır (Eltner, 1991).

Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki ferril [Fe (IV)] ve perferril [Fe(V)] oluşumuna neden olur. Bu formdaki reaktif demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatılabilir. Belirtilen potansiyel oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H₂O₂'in derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi, hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirirler.

1.5.3. Hidroksil Radikali

Hidrojen peroksitin eksik indirgenmesi ile $\cdot\text{OH}$ yapımı, vücutta bu radikalın en önemli kaynağıdır. H₂O₂'in iki elektron ile indirgenmesi sonucu su oluşurken, tek elektronla indirgenmesi $\cdot\text{OH}$ yapımına neden olur. Bu tür indirgenme Fe, Cu gibi metal iyonları tarafından katalizlenir.

Askorbik asit, süperoksit gibi indirgeyici bileşiklerin de bulunduğu ortamda, oksitlenen metal iyonu tekrar indirgendiğinden, H₂O₂'ten $\cdot\text{OH}$ yapımı sürekli bir duruma gelir.



Haber-Weiss tepkimesi ya da Fenton tepkimesi olarak adlandırılan bu tepkime ile ne kadar $\cdot\text{OH}$ oluşacağı, vücutta üretilen H_2O_2 derişimi ve serbest metal iyonunun varlığına bağlıdır. Süperoksit hem H_2O_2 'in öncülü hem de metalleri indirgeyici bir tür olduğundan; ayrıca proteinlere bağlı metallerin indirgenip serbest kalmasına neden olabildiğinden, biyolojik koşullarda süperoksit yapımının arttığı ortamda $\cdot\text{OH}$ üretimi kaçınılmazdır.

Fenton Tepkimesini katalizleyen en aktif metal iyonları demir ve bakırdır. Mangan ve kobalt da bu bakımdan aktif olsalar da, vücuttaki derişimlerinin düşüklüğü nedeniyle demir ile kıyaslandıklarında daha az etkindirler. Serbest metal iyonlarının vücut sıvılarındaki derişimi pratik olarak sıfır kabul edilir, ölçülemeyecek kadar azdır. Demir; metabolizmasının her aşamasında mutlaka ya bir proteine bağlı durumda ya da küçük organik moleküllerle (sitrata, ADP, ATP gibi) kompleks oluşturmuş formda bulunur. Metal iyonlarının proteinlere bağlı formda tutulmaları, $\cdot\text{OH}$ yapımını önlemenin en kuvvetli yoludur (Kenneth, 1998).

Hidroksil radikali biyolojik sistemlerin tanıdığı en aktif türdür ve su dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle tepkimeye girer. Bu nedenle 10^{-9} saniyeden daha kısa bir ömre sahiptir. Hidroksil radikalının tepkimeleri başlıca:

- ❖ Elektron transfer tepkimeleri
- ❖ Hidrojen çıkarma tepkimeleri
- ❖ Katılma tepkimeleri şeklinde gerçekleşir.

Bütün bu tepkimeler, $\cdot\text{OH}$ 'in paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır.

Katılma tepkimeleri özellikle elektronca zengin moleküllerle (pürin ve primidin bazları, aromatik aminoasitler gibi) gerçekleşir.

Hidroksil radikalının organik moleküllerden hidrojen (bir proton ve bir elektron) atomu olarak suya indirgendiği tepkime "hidrojen çıkarma tepkimesi" olarak bilinir. Hidrojen çıkarma tepkimesi ile başlayan $\cdot\text{OH}$ 'in etkisi, zincirleme tepkimeler şeklinde devam eder. Şöyleki: Organik bir molekülden (R) hidrojen çıkarılması ile karbon merkezli radikaller derhal ortamdaki oksijen molekülü ile tepkimeye girerek peroksil radikalini ($\text{ROO}\cdot$); peroksil radikali ise $\cdot\text{OH}$ gibi

davranarak bir diğer organik molekülden (R) hidrojen çıkararak yeni bir karbon merkezli radikal (R[•]) oluşumuna neden olurken, kendisi hidroperoksit (ROOH) formuna indirgenir.

Organik hidroperoksit radikal özelliği taşımadığından oldukça stabildir. Oluşan yeni karbon merkezli radikal (R[•]) ise yukarıdaki gibi yeni bir tepkime dizisini başlatır.

Organik hidroperoksitler her ne kadar stabil bileşikler ise de Fe ve Cu gibi metal iyonları varlığında radikalik tepkimelerle parçalanırlar ve bu tepkimeler sırasında yeni karbon merkezli radikaller, oksijen radikalleri, karboniller ile aldehit oluşur:



Görüldüğü gibi radikalik tepkimeler stokiyometrik değil, fakat zincirleme tepkimelerdir. Bir tek [•]OH ile başlatılan tepkime, her seferinde katlanarak yayılma yeteneğine sahiptir. Hücre zarında gerçekleşebilen bu tür tepkimelere lipid peroksidasyonu denir. Bir noktada başlatılan tepkime, ortamda uygun bileşikler varsa yayılmaya devam eder.

Radikalik tepkimeler; oluşan radikallerin antioksidanlar ile indirgenmesi, radikallerin birbirleri ile tepkimeleri, ya da ortamda tepkimeye girebilecek bileşik kalmaması durumunda sona ererler.

Buna göre hücresel koşullarda, oluşan radikalın çok erken safhada indirgenmesi, biyomoleküllerin korunması bakımından hayati öneme sahiptir.

Her tür biyolojik molekül [•]OH'in bir hedefi ise de, özellikle elektronca zengin bileşikler seçilen tercihli hedeflerdir. Nükleik asitler, proteinler ve lipidlerde başlatılan radikalik tepkimelerde binlerce farklı ara ürünler oluşabilir.

DNA tepkimesi sonucu baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilir; ileri derecedeki DNA hasarları tamir edilemediğinden hücre ölümüne sebep olur.

Proteinler üzerinde oluşan oksidasyonlar yapı değişimine neden olacağından, proteinler proteolitik yıkıma götürülür. Hücre zarı su içermediğinden [•]OH'in başlıca

hedefi yağ asitleridir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp yine hücre ölümüne neden olabilir. Bütün bu etkiler ne kadar $\cdot\text{OH}$ üretildiğine bağlıdır ve gerek H_2O_2 'ten gerekse de organik peroksitlerden (ROOH) $\cdot\text{OH}$ yapımı ortamdaki serbest metal iyonları tarafından katalizlenir.

Metal iyonları varlığında GSH ve askorbik asit gibi önemli antioksidanlar da prooksidan gibi davranmaya başlarlar:



Özellikle $\cdot\text{OH}$ yapımını katalizlemelerindeki etkileri nedeniyle canlılarda metal iyonları radikal hasarlarından birinci derecede sorumludurlar ve bu etkiye neden olamayacakları şekillerde (esas olarak proteine bağlı) tutulmalıdırlar.

1.5.4. Nitrik Oksit

Nitrik oksit, yüksek yapılı canlılarda çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen azot merkezli bir radikaldir. Paylaşılmamış elektron aslında azot atomuna ait ise de, bu elektronun hem azot hem de oksijen atomu üzerinde delokalize olması nedeniyle tam radikal özelliği taşımaz. Bunun sonucu, bilinen diğer radikallere göre reaktivitesi baskılandığından daha uzun ömürlüdür.

Yukarıda özetlendiği gibi, oksijen radikalleri çok sayıdaki enzimatik ve enzimatik olmayan yollar ile fiziksel/kimyasal mekanizmalarla oluşturulurlar. Oysa vücudumuzda NO sentezini sağlayan mekanizmalar oldukça kısıtlıdır.

Vücuda giren nitro bileşiklerinin metabolize edilmesi sırasında oluşan NO dışında, endojen NO oluşturan tek kaynak nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimleridir. Nitrik oksit NOS enzimi yardımı ile yarı esansiyel amino asit olan L-argininden oksidatif deaminasyon sonucunda sentezlenir (Richard, 1994).

Nitrik oksit sentetaz enziminin nöronal (nNOS), endotel (eNOS) ve indüklenbilir (iNOS) olmak üzere üç formu vardır. eNOS ve nNOS enzimleri tarafından üretilen çok düşük derişimdeki NO sinir sistemi ve düz kaslarda hücre içi

ve hücreler arası haberci (messenger) molekül olarak kullanılır. Haberci molekül olarak sitoplazmik guanilat siklazı aktive ederek hücrelerde cGMP derişimini arttırır. cGMP ise çeşitli enzimler yardımıyla hücre içi kalsiyum derişiminin düzenlenmesini sağlar.

Nitrik oksit sentetazın indüklenebilir (iNOS) formu ise başta fagositik lökositler olmak üzere çeşitli hücrelerde bulunur ve sentezi sitokinler ile bakteriyel toksinler tarafından indüklenir (Liew ve ark., 1990). iNOS enzimin aktivitesi kalsiyumdan bağımsız olup kontrol edilemediğinden ortamda arjinin bulunduğu sürece aktif olup uzun süreli ve yüksek derişimde NO sentezini katalizler. Radikal olarak aktivitesini düşük olan NO, metal içeren merkezler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girer. Özellikle lipid radikallerle (örneğin hücre zarında) tepkimeye girmesi NO'e antioksidan bir etki kazandırır. Süperoksit ile NO arasındaki tepkime ile oluşan peroksinitrit (ONOO^-), hidroksil radikali benzeri aktiviteye sahip olup radikalik tepkimeleri başlatmaya ilave olarak biyomoleküllerin nitrasyonuna neden olur. Fizyolojik (düşük) derişimde üretilen NO esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO_3^-) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır (Butler ve ark., 1995). Oksijen radikalindeki durumun aksine, nitrik oksiti ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. Aerobik ortamda NO stabil değildir; derişimin artması ile oksidasyon hızlanır. Bu nedenle ortamdaki derişimi ile kendi ömrü arasında ters bir orantı vardır. Özellikle iNOS enziminin indüksiyonu sırasında NO derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli reaktif azot oksit türleri oluşur (Çizelge 1.1).

Bu reaktif türler NO'in dolaylı etkilerinden sorumlu olup; hücrel proteinlerin, enzimlerin inaktivasyonuna neden olabilirler (Murph,1999).

1.6. Serbest Radikallerin Etkileri

1.6.1. Lipidlere Etkileri

Serbest radikallerin biyolojik dokulardaki doymamış yağ asitlerine etkisi olan lipid peroksidasyonunun toksik olduğu bilinir. Reaksiyonlar zincirleme gerçekleşir

ve dönüşümsüzdür. Toksik etki lipid peroksidlerinin düzeyi ölçülerek belirlenir. Doymamış yağ asitlerindeki bir hidrojen atomunun çıkması peroksidasyonun başlamasına neden olur; böylece yağ asiti zinciri lipid radikali niteliği kazanır. Radikal dayanıksız olup, çift bağların yerini değiştirir ve oksijenle reaksiyonu sonucu lipid peroksil radikaline dönüşür.

Lipid peroksil radikalleri diğer doymamış yağ asitlerine etki ederek yeni radikalleri oluşturur, bir yandan da hidrojen atomları alarak hidroperoksidlere dönüşürler (Halliwell, 1996).

Hidroperoksidlerin parçalanmasıyla lipid alkoksi radikalleri açığa çıkar. Lipid peroksidasyonu antioksidan reaksiyonlarla sonlandırılır ya da devam ederek daha ileriye gider. Lipid peroksidasyonu Fe ve Cu gibi redoks yapan metaller varlığında artar.

Lipid peroksidasyon ürünleri olarak açığa çıkan lipid peroksidleri, hidroperoksidleri membran yapısına direkt olarak, diğer hücre bileşenlerine ise aldehit üreterek dolaylı olarak zarar verir. Bu da pek çok hastalığın ve doku hasarının oluşmasına neden olur. Membran yapısının bozulması sonucu malondialdehit oluşur (Ansari ve ark., 1989).

1.6.2. Proteinlere Etkileri

Proteinler, radikallerin etkilerine lipidlere oranla daha az hassastır ve amino asit dizilişlerine bağlı olarak etkilenirler. Özellikle doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle etkileşimi yüksektir. Bu nedenle triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitleri içeren proteinler serbest radikallerden daha kolay etkilenirler. Albumin gibi disülfid bağı fazla olan proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur (Gutteridge, 1995).

1.6.3. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

Radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek mutasyona neden olur ve hücre ölümüne yol açarlar. Bu zararlı etki kromozom değişikliklerine sebep olur..

Hidroksil radikali bazlarla kolayca reaksiyona girer. Hidrojen peroksit ise membranlardan kolayca geçip hücre çekirdeğindeki DNA'ya ulaşır ve hücre fonksiyonlarının bozulmasına hatta ölümüne yol açar. Bu nedenle DNA daha kolay zarar görebilen bir moleküldür (Agrawal ve Kale, 2001).

1.6.4. Karbohidratlara Etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Açığa çıkan okzoaldehitler proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki göstererek etki ederler. Bu olaylar kanser ve yaşlanmaya neden olabilir. (Ceballos ve ark., 1992)

1.7. Radikal Kaynakları

Yaşamamız için mutlaka gerekli bir element olan oksijen, canlıların yaşamının sona erdirilmesinde de etkili olan faktörlerin başında gelir.

Canlıların yaşlanması, radikallerin neden olduğu kalıcı hasarların bir birikimi olarak değerlendirilmektedir. Bu açıdan bakıldığında oksijen “iki yüzü keskin bir bıçak olarak” tanımlanabilecek bir moleküldür. Vücudumuzda üretilen radikaller her zaman tehlikeli ve kötü kimyasal türler olarak değerlendirilmemelidir.

Oksijenin biyokimyasal tepkimelerde kullanılması için, reaktif formlarına çevrilmesi zorunludur. Örneğin steroid yapıdaki çok sayıda bileşikler, eikosanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi; ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, çok sayıda oksidaz ve hidrolaz enzimlerinin etkileri için ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için radikal yapımı “olmazsa olmaz” bir koşuldur. Oksijen radikalleri gibi, nitrik oksit radikalının yapımında vazgeçilmez bir biyolojik olaydır. Bu radikallerin ne kadar “iyi” ya da ne kadar “kötü” olduklarını belirleyen faktör, “nerede ve ne kadar” üretildiklerine bağlıdır.

Biyolojik ihtiyacın üzerinde üretilen radikaller gözlenen toksik etkilerden sorumludurlar. Çevresel faktörler (örneğin iyonlaştırıcı radyasyon), vücuda alınan

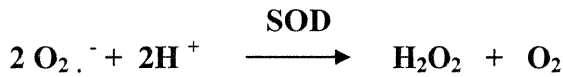
çeşitli kimyasal bileşikler, çeşitli enfeksiyonlar, doku travmaları ve sayılabilecek diğer çok sayıdaki patolojik durumlar vücutta radikal yapımında artışa neden olurlar.

Düşük derişimdeki radikal yapımının etkileri çok uzun bir süreç sonunda, örneğin yaşlanma şeklinde görülürken; yüksek derişimde ciddi bir patolojik durum olarak karşımıza çıkar. (Cheeseman ve Slater, 1993)

1.8. Enzimatik Antioksidanlar

1.8.1. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz 1968 yılında oksijenli solunum yapan canlılarda belirlenmiştir. Bu enzim; süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Hidrojen peroksit daha sonra glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimi aracılığı ile etkisiz hale getirilmektedir. Hücre bölünmelerindeki süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli bir rol oynar. (Fridovich, 1983)



İnsanda SOD'nin iki tipi bulunmaktadır. Bunlar, sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn ihtiva eden izomer (Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik Mn ihtiva eden izomerlerdir (Mn SOD). Genel olarak hücrede bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD' dir. (Helle ve ark., 1997)

Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder.

SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO₂ artışı ile artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde hücre içi süperoksit düzeyi düşük tutulur. SOD'nin hücre dışı aktivitesi çok düşüktür.

Süperoksit dismutazın, süperoksit anyonuna olan etkisi şu şekildedir. Süperoksit anyonu, Cu^{+2} ve bir arginin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır. Bu bağlanma sonucunda süperoksitten bir elektron Cu^{+2} ye transfer olurken Cu^{+} ve moleküler oksijen meydana gelir. İkinci bir süperoksit anyonu Cu^{+} dan bir elektron, bağlanma ortağından ise iki proton alarak hidrojen peroksiti oluştururken, enzim tekrar Cu^{+2} formuna dönmüş olur.



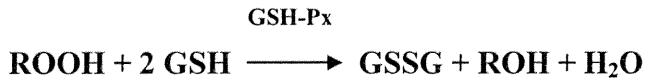
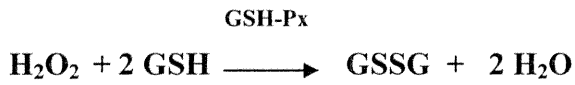
SOD fagosite edilmiş bakterilerin hücre içinde etkisiz hale getirilmesinde de rol oynar. Bu yüzden SOD, granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de granülositlerden daha fazla miktarda SOD bulunmaktadır. SOD enziminin yüksek katalitik aktivitesi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez. Ancak çeşitli patolojik durumlarda süperoksit yapımının artması durumunda, süperoksite özgü tepkimeler görülmeye başlar.

Süperoksit metal iyonlarını indirgeyerek bağlı oldukları proteinlerden salınımına neden olur, kofaktörlerin oksidasyon düzeylerini bozar, metal iyonlarının katıldığı hidroksil radikali yapım tepkimelerini hızlandırır. Diğer radikallere göre daha az reaktif olsa da, süperoksit, indirgenmiş nükleotidleri, bazı amino asitleri ve antioksidan bileşikleri (glutatyon, askorbik asit, tokoferol) oksitler.

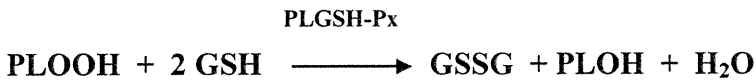
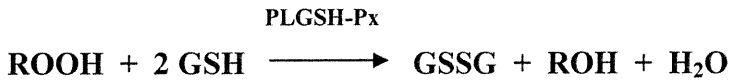
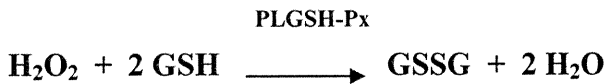
Süperoksit, hücre zarlarının hidrofobik ortamlarında daha uzun ömürlü ve çözünürlüğü daha fazladır. Zar fosfolipidleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri daha asidiktir ve süperoksit burada daha kolayca bir proton alarak hidroperoksit radikalini (HO_2^{\cdot}) oluşturur. Bu radikal de çok reaktif olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilir ve tokoferol gibi antioksidanları oksitleyebilir.

1.8.2. Glutasyon Peroksidaz

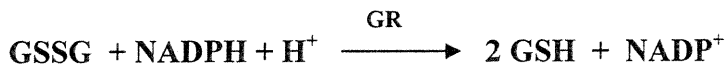
Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Tetramerik yapıda, 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizler. (Helle ve ark., 1997)



Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz da (PLGSH-Px) monomerik, selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksitlerini, alkollere indirger.



Membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğu zaman PLGSH-Px membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlar. Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH' a dönüşür.

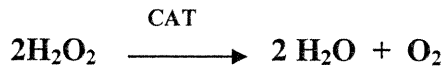


Glutasyon peroksidaz enziminin substrat olarak kullanıldığı molekül bir tiyol bileşiği olan redükte glutasyon (GSH) dur. Glutasyon; glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerini içeren bir tripeptittir. Serbest oksijen radikallerini direk veya enzim aracılığıyla yakalar. Glutasyon hücrelerin çoğunda yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Hidrojen peroksit birikimi hemoglobinin methemoglobine oksidasyon hızını artırır ve eritrosit ömrünü azaltabilir. Şayet canlıda yüksek miktarlarda peroksit açığa çıkarsa o zaman da katalaz enzimi devreye girer. (Mayers, 1993)

Glutasyon peroksidaz hidrojen peroksitin dışında peroksitlerinde etkisini ortadan kaldırarak zar lipidlerini ve hemoglobini peroksitlerin yükseltgemelerine karşı koruyabilmektedir.

1.8.3. Katalaz

Katalaz 4 tane hem grubu bulunduran hemoproteindir. Her alt birim ayrıca bir molekül NADPH içerir. Bu molekül enzimin kararlılığında rol oynamaktadır. Enzim sitokrom sistemi içeren tüm oksijenli solunum yapan hücrelerde mevcuttur. Katalaz esas olarak peroksizomlarda olmak üzere endoplazmik retikulum ve sitozolde yoğunudur. Aktivitesi; karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde yüksektir. Görevi, hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktır. Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak; bu enzim bir molekül hidrojen peroksiti elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. (Akkuş, 1995)



Katalazın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmez. (Jenkins ve Teng, 1981)

1.9. Hepatit

Hepatit; karaciğer enfeksiyonudur; alkol, uyuşturucu, ilaçlar, kimyevi maddeler, virüsler (Hepatit A, B, C, D ve E virüsleri) gibi etkenlerle oluşabilmektedir. Enfeksiyon süresinin 6 aydan daha fazla sürmesi durumu kronik hepatit; daha kısa süren durumu ise akut hepatit olarak adlandırılır.

1.9.1. Viral Hepatitler

1.9.1.1. Hepatit A Virüsü (HAV)

HAV 27–28 nm çapında tek sarmallı RNA içeren, kılıfsız bir virüstür. Hepatit A virüsü nadiren ölüme neden olan karaciğerin akut bir enfeksiyonuna sebep olur. Genellikle diğer viral hepatit etkenlerine göre daha az zarar vericidir.

Kronik hale dönüşmez. Ilıman bölgelerde sonbahar ve kış aylarında hepatit A daha sık gözlenmektedir.

Dışkı ve ağız (fekal-oral) yoluyla bulaşmaktadır. HAV midenin asidine karşı dayanıklı olduğundan gastrointestinal mukozadan geçip karaciğere ulaşır. Karaciğer hücreleri içerisinde reseptöre bağlı endositoz mekanizmasıyla alınır. Virüsün dışkı ile çıkarılması hepatitin başlamasından önceki ve sonraki birer hafta içinde olmaktadır. Hasta bu dönemde bulaştırıcıdır.

İştahsızlık, bulantı, 38 °C civarında ateş, halsizlik, baş ağrısı, öksürük, nezle gibi belirtiler ortaya çıkmaktadır. İyileşme 1–8 hafta arasında olmaktadır.

Hepatit A da henüz spesifik bir tedavi yoktur. Tedavi genellikle hastanın dinlenmesinin sağlanması ve uygun diyetin (uygun protein ve kalori) verilmesi şeklinde düzenlenir. Hastalığın iyileşmesi sonrası virüse karşı bağışıklık gelişir.

Virüse karşı korunma 0,1 ve 12. aylar olmak üzere üç doz olarak aşılama ile sağlanabilmektedir. 2 yaşın üzerindeki kişilere uygulanmaktadır.

1.9.1.2. Hepatit B Virüsü (HBV)

42 nm çapında DNA içeren bir virüstür. Enfeksiyonda görülen karaciğer hasarı enfekte karaciğer hücrelerinin bağışıklık sistemi aracılığıyla tahrip edilmesinden oluşur. Bağışıklık sistemi zayıf olan hastalar, hemodiyaliz hastaları, hemofili hastaları, Down sendromlu hastalarda kronikleşme oranı daha yüksektir.

Cinsel yolla, kan, semen, vajinal salgılar, tükürük, ter gözyaşı gibi sıvılarıyla, anneden doğum sırasında ya da doğum sonrası anne ile beslenmesi sırasında bulaşabilmektedir. Yeni doğanlarda bağışıklık sistemi yeterince gelişmediğinden kronikleşme ile sonuçlanır. Ortak kullanılan malzemelerle hasar görmüş cilt bölgesinden kolaylıkla geçebilir.

Korunma amaçlı olarak aşı yapılabilmektedir.0, 1 ve 6 ay şeklinde üç doz olarak uygulanmaktadır.

1.9.1.3 Hepatit C Virüsü (HCV)

Yaklaşık 50 nm çapında kılıflı tek iplikçikli bir RNA virüsüdür. Kan yoluyla karaciğere ulaşan virüs reseptörler aracılığıyla karaciğer hücrelerine girer. Hücre içinde kılıfından ayrılan viral RNA replikasyona uğrar. Replikasyon sırasında sıkça mutasyonlar gerçekleşir; çok farklı genotiplerde virüsler oluşur. Bundan dolayı hastalığın kronik hale gelmesi kolaylaşmaktadır.

Tükürük, idrar ve semen gibi vücut sıvılarında virüsün bulunması, yakın temas ve cinsel ilişki gibi yollarla bulaşabilmektedir. Risk faktörleri ise ortak kullanılan yada yeterince steril olmayan hastane malzemeleri gibi çeşitli araçlarla hastalık bulaşabilmektedir.

Henüz kullanılan bir aşısı yoktur.

1.9.1.4 Hepatit D Virüsü (HDV)

Tek sarmallı RNA virüsüdür ve yapısal olarak eksik bir virüstür. Yapılan çalışmalarda HDV' nin yeni bir virüs olup, enfeksiyon yapabilmesi için HBV' nin tamamlayıcı fonksiyonuna gereksinim duymaktadır. HBV taşıyan kişilerin HDV almasıyla oluşan ve süper enfeksiyon olarak adlandırılan durum sonucunda hızla ilerleyen bir kronik karaciğer hastalığı oluşmaktadır.

Bulaşma yolları HBV ile aynıdır. Vücut sıvılarında bulunmaktadır. Cinsel ilişki , yakın temas, ortak kullanılan malzemeler ile bulaşmaktadır.

HBV için yapılan tedavi ve korunma dolaylı HDV tedavisini de sağlamaktadır.

1.9.1.5 Hepatit E Virüsü (HEV)

Yaklaşık olarak 30 nm çapında yuvarlak kılıfsız bir RNA virüsüdür. Dışkıda bol miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. Daha çok kullanılan sularla ilgili problemleri olan ülkelerde görülen bir hastalıktır.

Özellikle az gelişmiş ülkelerde görülmektedir. HEV hepatit A daki gibi kronik hastalığa yol açmaz Dışkı ve ağız yoluyla bulaşma özelliğinden dolayı kirli sularla geniş kitleleri etkileyebilmektedir.

HEV için kullanılan bir aşı yoktur. Ancak aşı çalışmaları sürmektedir.(Dolar, 2002)

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Cuzzocrea S. ve ark. (1998), Kronik aktif hepatit, siroz gibi hastaların karaciğer hücrelerinden alınan örneklerde inceleme yapmışlardır. Hasar görmüş karaciğer hücreleri ve bunları çevreleyen kupfer hücrelerinde nitrotrozin artıkları bulunmuştur. Nitrotrozinin bulunması ile peroksinitrit gibi nitrik oksitten türemiş oksidanların hepatit sırasında üretildiğini ve hastalık etkeni olabileceğini göstermişlerdir.

Larrea E. ve ark. (1998), Hepatit C virüs enfeksiyonunda oksidatif strese karşı hücre savunmasını artırmak için yaptıkları çalışmada Hepatit C'li hastalardaki tek çekirdekli çevresel kan hücrelerinde (PBMC) ve karaciğer hücrelerinde süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini önemli ölçüde yüksek olduğunu saptamışlardır.

Boya P. ve ark. (1999), Kronik hepatit C'li hastalarda, tek çekirdekli çevresel kan hücrelerindeki oksidan ve antioksidan durumunu kontrol gruplarına karşı araştırmışlardır. Glutasyon S-Transferaz ve GSH-Px enziminde aktivite azalması saptanırken SOD, CAT ve GR enzimlerinde aktivite artışı saptamışlardır. Ayrıca MDA seviyesinin kontrol grubuna göre oldukça yüksek olduğu da saptamışlardır.

Irshad M. ve ark. (2002), Farklı türdeki hepatit hastalarının eritrositlerinde SOD seviyesinin kontrol gruplarına karşı daha düşük olduğunu saptamışlardır.

Jain S.K. ve ark. (2002), Kronik hepatit C'li hastalarda lipid peroksidasyon göstergesi 8-isoprostane ve redükte glutatyona karşı yükseltgenmiş glutasyonun oranını önemli derecede yüksek bulmuşlardır. Ayrıca antioksidan glutasyon, selenyum, vitamin A,C,E nin yaşa ve cinsiyete göre eşleşmiş olan kontrol gruplarına karşı yaptıkları kıyaslamada oldukça azalmış olduğunu saptamışlardır.

Karabulut A.B. ve ark. (2002), Hepatit C enfeksiyonlu hastalarda eritrosit SOD ve CAT enzim aktivitesi araştırılmış, eritrosit SOD aktivitesi akut hepatit C'li hastalarda yükselirken, kronik hepatit C'li hastalarda düşmüştür. CAT aktivitesinde ise önemli bir değişme olmamıştır.

Czuczejko J. Ark. (2003), Hepatit B ve C 'li hastalarda selenyum, glutatyon konsantrasyonları ve GSH-Px enzim aktiviteleri kontrol grupları ile kıyaslanmış ve selenyum, glutatyon konsantrasyonları azalırken, GSH-Px aktivitesinin bir miktar yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Ko ve ark. (2005), Hepatit C'li hastalarda eritrositlerde MDA, SOD, GR, GSH-Px enzim aktiviteleri kontrol grubu ile kıyaslanmış ve hastalarda MDA, SOD, GR enzim aktiviteleri kontrol grubuna göre artarken GSH-Px enzim aktivitesinde düşüş gözlemlenmiştir.

Czeczot H. ve ark. (2006), sirozlu ve karaciğer kanserli hastalarda glutatyon ve glutatyon bağlı enzimleri kontrol grupları ile kıyaslayarak araştırmışlardır. Glutatyon seviyesi kötü huylu dokularda kontrol gruplarına göre azalırken kanserli dokularda sirozlu dokulara göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Selenyum bağlı olmayan GSH-Px ile selenyum bağlı GSH-Px enzim aktivite seviyeleri kontrol gruplarına göre düşük bulunmuştur.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Sigma firması tarafından sağlanmıştır. Kan örnekleri Ç.Ü. Tıp Fakültesi merkez laboratuvarından temin edilmiştir.

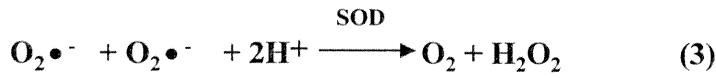
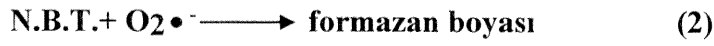
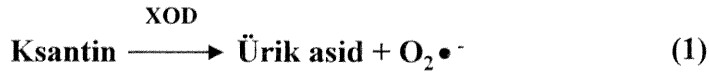
3.2. Kullanılan Cihazlar

- ❖ UV-Vis spektrofotometre (ATI UNICAM)
- ❖ pH metre (HANNA 8417)
- ❖ Magnetik karıştırıcı
- ❖ İnkübatör (ES 500)
- ❖ Santrifüj
- ❖ Girdap karıştırıcı

3.3. Metod

3.3.1. Süperoksit Dismutaz Tayini

SOD, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin ($O_2 \bullet^-$) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz (XOD) kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin (1), nitro blue tetrazolium (N.B.T) ile meydana getirdiği mavi renkli formazan boyasının 560 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin (OD) okunması esasına dayanmaktadır. Örnekte bulunan SOD, süperoksit radikallerini ortamdan uzaklaştırarak 2 numaralı formazan reaksiyonunu inhibe eder. SOD'nin bir ünitesi deneme koşulları altında N.B.T indirgenme hızının % 50 inhibisyonudur (Sun ve ark, 1988).



Aktivite Ölçümü

Reaktif:

1. Ksantin* (0,3 mM) 9,13mg \longrightarrow 200 ml saf suda çözülür.
2. EDTA (0,6 mM) 22,3 mg \longrightarrow 100 ml saf suda çözülür.
3. N.B.T. (150 $\mu\text{g/L}$) 12,3 mg \longrightarrow 100 ml saf suda çözülür.
4. Na_2CO_3 (400 mM) 2,544g \longrightarrow 60 ml saf suda çözülür.
5. Sığır serum (1g/L) 30 mg \longrightarrow 30ml saf suda çözülür.

- Ksantin oksidaz (167 u/L) enziminden 18 μl alınıp, 3 ml 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ da çözülür; buz içinde bekletilmelidir.

- 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,643 g \longrightarrow 10 ml'ye saf su ile tamamlanır.

- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,8 mM) 13,6 mg \longrightarrow 100 ml'ye saf su ile tamamlanır.

	<u>Kör</u>	<u>Numune</u>
Reaktif	2,85 ml (1425 μL)	2,85 ml (1425 μL)
Numune	-----	0,1 ml (50 μL)
Ksantin oksidaz (XOD)	50 μL (25 μL)	50 μL (25 μL)

25°C de oda sıcaklığında 20 dakika bekletilir.

CuCl_2	0,1 ml (50 μL)	0,1 ml (50 μL)
Numune	0,1 ml (50 μL)	-----

560 nm de destile suya karşı okunur.

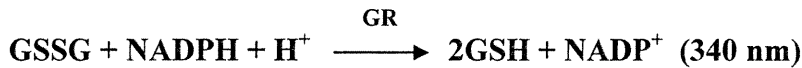
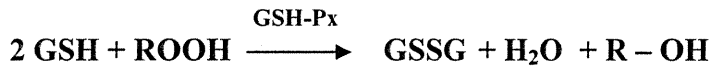
$$\text{Aktivite(Ü/mg Prot)} = \frac{\text{Kör OD} - \text{Numune OD}}{\text{Kör OD}} \times \frac{20 \text{ u/ml SOD}}{\text{mg Prot}} \times \text{Seyreltme Faktör}$$

*Önce birkaç damla 1N NaOH de çözülür.

Ksantin oksidaz iyice karıştırılmalıdır.

3.3.2. Glutasyon Peroksidaz(GSH-Px) Enzim Tayini

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) hidrojen peroksit (R-O-O-H) tarafından redükte glutasyonun (GSH) okside glutayona (GSSG) yükseltgenmesini katalize eder. Hidrojen peroksit olarak t-butil hidroperoksin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz (GR) ve NADPH yardımıyla GSH'ye indirgenir. GSH-Px aktivitesi, NADPH'nin NADP' nin NADP⁺ ' ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkınının 240 nm'de okunmasıyla ölçülür.(Paglia ve Valentine, 1967)



Çözeltiler 1 mL'lik küvetlere aşağıda belirtilen hacimlerde pipetlendi.

	Kör	Örnek
Tris HCl pH = 8,0	100 µL	100 µL
GSH 0,1 M	20 µL	20 µL
Glutasyon Redüktaz 10 U / mL	100 µL	100 µL
NADPH , 2 mM	100 µL	100 µL

1:20 Hemolizat (GSHPx)	10 µL	10 µL
Su	670 µL	660 µL
37° C'de preinkübasyon (10 dakika)		
t-butül hidroperoksit (ROOH) 7mM	-----	10 µL
Tampon Tris pH = 8,0	9000 µL	9000 µL

$$E(\dot{U}/gHb) = \frac{\frac{\Delta A}{t \times 6,22} \times V_{\text{toplam}}}{V_{\text{hemolizat}}} \text{ Hb(g/dL)} \text{ olarak hesaplandı.}$$

3.3.3.Katalaz Enzim Tayini

Katalaz Aktivitesi Bergmeyer (1974) tarafından tanımlanan metodun Lartillot ve ark., (1988) tarafından geliştirilen metoda göre ölçüldü.

50 mmol / L fosfat tamponu pH= 6,8 içinde 10 mmol / L hidrojen peroksit olacak şekilde substrat çözeltisi hazırlandı.

20 µL test edilecek enzim içeren çözelti (tam kanın 1/2000 tampon ile seyreltilmesiyle hazırlandı) üzerine 2,5 mL substrat çözeltisi eklendi ve 37 °C de 2 dk bekletildi ve reaksiyonu durdurmak için ortama 0,5 mL 1N hidroklorik asit ilave edildi. 240 nm'de absorban ölçüldü. (Ar)

Kör olarak 2,5 mL tampon (pH'sı 6,8 olan 50 mmol / L fosfat tamponu) ve 0,5 mL 1 N hidroklorik asit kullanıldı.

Sıfır zamanda reaksiyon karışımının absorbanı (As) 2,5 mL substrat ve 0,5 mL 1 N hidroklorik asit karışımıyla ölçüldü.

Proteinin neden olacağı absorban (At) için, 20 µL test edilecek çözelti, 2,5mL tampon ve 0,5 mL 1 N hidroklorik asit karışımının absorbanı ölçüldü.

Enzimatik aktiviteden dolayı absorban değişimi $[A = (As + At) - Ar]$ formülüyle hesaplandı.

A_s = ilk absorban (sıfır zamanda reaksiyon karışımının absorbanı)

A_t = karışımının absorbanı(enzim varlığında ve substrat eksikliğinde)

A_r = enzim ve substrat varlığında absorbands

Aktivite (IU / mL) = $\frac{A \cdot V_{\text{toplam}}}{\epsilon \cdot t \cdot \text{Vörnek}}$ olarak hesaplandı

ϵ = Hidrojen peroksitin spesifik absorbands katsayısı yaklaşık $0,0396 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$, tersiyer hidrojen peroksit için ise değer $0,068 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$ dür.
 t = Reaksiyon zamanıdır.

3.3.4 Hemoglobin Tayini

Drabkin çözeltisinde bulunan ferrisiyanür hemoglobindeki +2 değerlikli demiri +3 değere yükseltgeyerek hemoglobini methemoglobine dönüştürür. Bu ise potasyum siyanür ile birleşerek stabil olan siyanürmethemoglobini oluşturur. Siyanomethemoglobinin 540 nm dalga boyunda verdiği absorbands ölçülerek hemoglobin (Hb) miktarı saptanır. (White ve ark., 1976)

Drabkin çözeltisi

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 198 mg
 KCN 52 mg
 NaHCO_3 1 g.
 Saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Çözeltiler tüplere aşağıdaki gibi pipetlendi.

	Kör	Örnek
Hemolizat (μL)	--	20
Drabkin Çözeltisi (mL)	5	5

15 dakika oda ısısında bekletildi. Spektrofotometrede 540 nm dalgaboyunda absorbands okunarak çizelgeden değerdendirmesi yapıldı. Hemolizat yerine tam kan alındı.

3.3.5. Protein Tayini

Protein tayini metodu Lowry ve ark., (1951) tarafından önerilen yöntemeye göre yapılmıştır. Protein tayini için aşağıda içerikleri bildirilen A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

- 1)Çözelti A: Bu çözelti 2 g. Na_2CO_3 , 0,1 M NaOH çözeltilisinde çözülecek ve aynı çözelti ile son hacim 100 ml'ye seyreltilerek hazırlanmıştır.
- 2)Çözelti B: 0,5 g. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, % 1'lik trisodyumsitrat $2\text{H}_2\text{O}$ çözeltilisinde çözülecek son hacim aynı çözelti ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 3)Çözelti C: 50 ml A çözeltisi ile 1 ml B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır. (Kullanılacağı an hazırlanmasına dikkat edilmiştir.)
- 4)Folin-Ciocalteu Çözeltisi: Folin-Ciocalteu saf su ile 1:1 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.
- 5)Standart protein çözeltisi: 1 ml'sinde 0,25 mg. sığır albümini olacak şekilde % 0,9'luk NaCl (serum fizyolojik) çözeltisiyle hazırlanmıştır.
- 6) Standart protein eğrisinin çizimi; 6 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla standart protein çözeltilisinden (0,25 mg./ml) 0; 50; 100; 125; 250; 500; 750; 1000 μl eklenip serum fizyolojik ile 1 ml'ye tamamlanmıştır. Bu tüplerin protein derişimleri sırasıyla 0; 0,0125; 0,025; 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,1875; 0,25 mg/ml'ye karşılık gelir. Her tüpe 5 ml C çözeltisi ilave edilip, 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 1:1 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltilisinden 0,5 ml eklenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında bekletilip tüp içeriklerinin absorbandsları köre karşı 750 nm'de okunmuştur. Okunan bu absorbandslar standart protein derişimlerine karşı grafiğe geçirilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

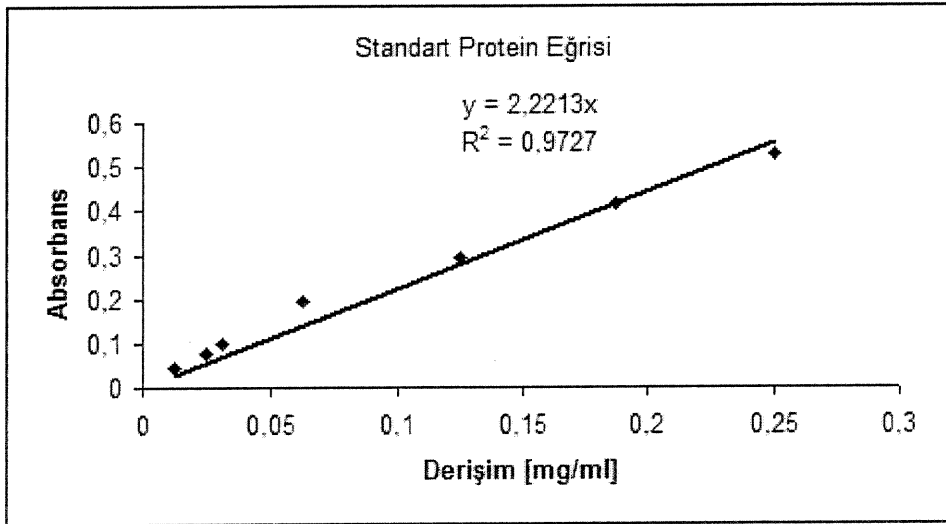
4.1. Bulgular

4.1.1. Protein Tayinine Ait Bulgular

Lowry yöntemiyle standart eğri oluşturmak için hazırlanan protein standartlarına ait 750 nm'de alınan absorbans ölçümleri Çizelge 4.1.'de verilmiş, çizilen standart eğri ise Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Protein standartlarının 750 nm'de alınan absorbans değerleri

mg protein/mL	A ₇₅₀
0,0125	0,046
0,0250	0,078
0,0313	0,100
0,0630	0,193
0,1250	0,291
0,1880	0,414
0,2500	0,530



Şekil 4.1. Standart Protein Eğrisi

4.1.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayinine Ait Bulgular

Süperoksit dismutaz enziminin aktivitesi, hepatit C'li 18 (9 Erkek, 9 Kadın) hastaya ve aynı sayıda kontrol grubuna (9 Erkek, 9 Kadın) ait % 40 hemotokrite getirilmiş eritrosit hücrelerinde ölçülmüştür. Her örnekten üçer paralel çalışılmış ve sonuçta ortalamaları alınmıştır. Bu ölçümlere ait değerler Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Değerler, ortalama \pm standart sapma şeklinde, Ünite/mg protein cinsinden ifade edilmiştir. İstatiksel analizler SigmaPlot 9.0 programı ile yapılmıştır. $p < 0,05$ olarak bulunmuştur. Çizelgede erkek:E, kadın:K şeklinde verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kontrol grubu ve hepatit C'li hastalara ait SOD aktivite değerleri

Örnek No	Kontrol			Hasta		
	Yaş	Cinsiyet	Aktivite (Ü/mg Prot)	Yaş	Cinsiyet	Aktivite (Ü/mg Prot)
1	56	E	3,70	41	E	1,98
2	55	E	4,90	51	E	4,16
3	46	E	4,33	52	E	3,26
4	45	E	3,84	47	E	3,48
5	52	E	4,35	49	E	3,90
6	43	E	3,80	50	E	3,05
7	48	E	5,80	55	E	2,59
8	41	E	5,76	43	E	1,64
9	43	E	5,57	42	E	3,12
10	44	K	2,57	47	K	2,08
11	48	K	4,33	47	K	3,01
12	42	K	3,10	46	K	2,51
13	45	K	2,76	54	K	3,48
14	42	K	2,90	45	K	2,76
15	53	K	6,09	45	K	2,79
16	51	K	6,15	50	K	2,36
17	54	K	6,14	46	K	1,87
18	47	K	4,89	50	K	1,54
x\pmSD	47,5 \pm 4,9		3,76 \pm 1,53	47,8 \pm 3,9		2,75 \pm 0,75

4.1.3. Katalaz Aktivitesi Tayininine Ait Bulgular

Katalaz enziminin aktivitesi, hepatit C'li 18 hastaya (9 Erkek, 9 Kadın) ve 18 kontrol grubuna (9 Erkek, 9 Kadın) ait % 40 hemotokrite getirilmiş eritrosit hücrelerinde ölçülmüştür. Her örnekten üçer paralel çalışılmış ve sonuçta ortalamaları alınmıştır. Bu ölçümlere ait değerler Çizelge 4.3.'de verilmiştir. Değerler, ortalama \pm standart sapma şeklinde, (Ünite/g Hb) $\times 10^4$ cinsinden ifade edilmiştir. İstatiksel analizler SigmaPlot 9.0 programı ile yapılmıştır. $p < 0,0001$ olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Kontrol grubu ve hepatit C'li hastalara ait CAT aktivite değerleri

Örnek No	Kontrol			Hasta		
	Yaş	Cinsiyet	Aktivite (Ünite/g Hb) $\times 10^4$	Yaş	Cinsiyet	Aktivite (Ünite/g Hb) $\times 10^4$
1	56	E	11,11	41	E	23,96
2	55	E	15,67	51	E	18,67
3	46	E	12,61	52	E	16,49
4	45	E	14,82	47	E	22,70
5	52	E	13,46	49	E	15,02
6	43	E	13,36	50	E	20,65
7	48	E	10,70	55	E	16,71
8	41	E	12,22	43	E	10,98
9	43	E	15,55	42	E	25,52
10	44	K	15,25	47	K	19,02
11	48	K	15,57	47	K	20,87
12	42	K	13,31	46	K	15,80
13	45	K	15,15	54	K	16,23
14	42	K	12,07	45	K	16,34
15	53	K	12,52	45	K	21,86
16	51	K	14,80	50	K	20,44
17	54	K	14,85	46	K	26,59
18	47	K	13,68	50	K	18,67
x\pmSD	47,5 \pm 4,9		13,71 \pm 1,6	47,8 \pm 3,9		19,25 \pm 3,4

4.1.4. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Tayininine Ait Bulgular

Glutasyon peroksidaz enziminin aktivitesi, hepatit C'li 18 hasta (9 Erkek, 9 Kadın) ve 18 kontrol grubuna (9 Erkek, 9 Kadın) ait % 40 hemotokrite getirilmiş eritrosit hücrelerinde ölçülmüştür. Her örnekten üçer paralel çalışılmış ve sonuçta ortalamaları alınmıştır. Bu ölçümlere ait değerler Çizelge 4.4.'de verilmiştir. Değerler, ortalama \pm standart sapma şeklinde, Ünite/g Hb cinsinden ifade edilmiştir. İstatiksel analizler SigmaPlot 9.0 programı ile yapılmıştır. $p < 0,05$ olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.4. Kontrol grubu ve hepatit C'li hastalara ait GSH-Px aktivite değerleri

Örnek No	Kontrol			Hasta		
	Yaş	Cinsiyet	Aktivite (Ünite/g Hb)	Yaş	Cinsiyet	Aktivite (Ünite/g Hb)
1	39	E	79,00	41	E	61,14
2	50	E	59,04	51	E	85,30
3	35	E	59,44	52	E	68,00
4	29	E	58,60	47	E	65,78
5	37	E	60,28	49	E	48,64
6	51	E	62,94	50	E	63,02
7	30	E	62,02	55	E	107,0
8	40	E	62,02	33	E	96,69
9	37	E	71,40	42	E	112,8
10	54	K	57,00	35	K	64,20
11	29	K	60,28	48	K	124,0
12	53	K	76,50	46	K	76,61
13	30	K	55,00	50	K	96,69
14	36	K	68,00	50	K	103,88
15	35	K	70,00	47	K	71,30
16	33	K	63,00	37	K	59,80
17	42	K	58,00	46	K	47,80
18	53	K	56,20	54	K	55,90
$\bar{x} \pm SD$	47,5 \pm 4,9		63,26 \pm 6,9	47,8 \pm 3,9		78,25 \pm 23,23

4.2. Tartışma

Reaktif oksijen türleri, hücrenin büyümesin, farklılaşmasın, yaşlanması ve ölümünden sorumludur. Oksidatif stres ve patolojik durumlarda reaktif oksijen türleri değişiklik gösterebilmektedir. Literatürde patolojik durumlarda değiştiğine dair birçok çalışma mevcuttur. Alerjide Buchanan ve ark. (1997); kanser türlerindeki değişiklikleri göğüs kanserinde Lee ve ark (1998), böbrek kanserinde Durak ve ark (1997), karaciğer kanserinde Wiseman ve ark. (1996) belirtmişlerdir. Ateroskleroziste Cantwell ve ark. (1998) ve Casper-Bauguil ve ark. (1998), diabette Hannon ve ark. (1998), Romatoid artiritte Aaseth ve ark. (1998) rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada, kronik Hepatit C'li 18 hastada SOD aktivite değerlerinin ortalama±SD 2,75±0,75 Ü/mg protein iken kontrol grubunda 3,76±1,53 Ü/mg protein olarak bulunmuştur (p<0,05). Irshad ve ark. (2002) ile Karabulut ve ark. (2002) kronik Hepatit C'li hastalarda SOD aktivitelerini kontrol grubuna göre düşük bulurken, Boya ve ark. (1999) p<0,05 anlamlılık derecesinde yüksek bulmuşlardır. Ayrıca Ko ve ark. (2005) viral hepatitte SOD aktivite seviyesini kontrole göre yüksek bulmuşlardır. Bizim bulgularımız, SOD aktivite değerleri için Irshad ve ark. (2002) ve Karabulut ve ark. (2002) ile uyumludur.

Katalaz enziminin aktivitesi 18 hepatit C'li hastada ve aynı sayıdaki kontrol grubunda ölçülmüş, hasta grubunda 19,25±3,99 (Ü/g Hb)x10⁴ iken kontrol grubunda 13,71±1,58 (Ü/g Hb)x10⁴ bulunmuştur (p<0,0001). Boya ve ark. (1999) kronik hepatit C'li hastalarda ve kontrol grubunda anlamlı bir fark bildirmemişken, Karabulut ve ark. (2002) yüksek bulmuşlardır. Sonuçlarımız, Karabulut ve ark. (2002)'nin çalışmalarını destekler niteliktedir.

GSH-Px enziminin aktivitesi kronik hepatit C'li 18 hastada ve aynı sayıdaki kontrol grubunda tayin edilmiş; hastalarda 78,25±23,23 Ü/g Hb kontrollerde ise 63,26±6,93 Ü/g Hb olarak bulunmuştur (p<0,05). Czczot ve ark. (2006) sirozlu hastalarda GSH-Px aktivite değerlerini kontrollere göre yüksek bulurken, Ko ve ark. (2005) viral hepatitte düşük bulmuştur. Bununla birlikte, Czuczejko ve ark. (2003)

ise Hepatit C'li hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlememişlerdir. Sonuçlarımız Czeozot ve ark. (2006) 'nın çalışmalarını destekler niteliktedir.

Bu sonuçlar, kronik hepatit C'li hastalarda SOD aktivitesinin kontrollere göre düşük, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesinin ise yüksek çıkması kronik hepatit C'li hastalarda oksidatif strese bağlı olarak doku hasarının fazlalaştığını bununda süperoksit radikallerini arttırdığını göstermektedir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. Kronik hepatit C'li hastalarda ve kontrol grubunda SOD aktivite düzeyleri sırasıyla $2,75 \pm 0,75$ Ü/mg ve $3,76 \pm 1,53$ Ü/mg olarak bulunmuştur.

2. Kronik hepatit C'li hastalarda ve kontrol grubunda CAT aktivite düzeyleri sırasıyla $19,25 \pm 3,99$ (Ü/g Hb) $\times 10^4$ $13,71 \pm 1,58$ (Ü/g Hb) $\times 10^4$ olarak bulunmuştur.

3. Kronik hepatit C'li hastalarda ve kontrol grubunda GSH-Px aktivite düzeyleri sırasıyla $78,25 \pm 23,23$ Ü/g Hb ve $63,26 \pm 6,93$ Ü/g Hb olarak bulunmuştur.

5.2. Öneriler

1. Vitamin A, B, C, α - tokoferol (E vitamini), Sistein, Miyoglobin, Hemoglobin, Metionin, Albumin, Bilirubin gibi enzimatik olmayan antioksidan parametreleri de incelenebilir.

2. Nitrik oksit, glutatyon redüktaz, redükte glutatyon ve malondialdehit düzeyleri tayin edilebilir.

3. Farklı hepatit türlerinde çalışmalar yapılabilir.

4. Farklı yaş gruplarında çalışmalar yapılabilir.

KAYNAKLAR

- AASETH J., HAUGEN M., FORRE O., (1998). Rheumatoid Arthritis And Metal Compounds: Perspectives On The Role Of Oxygen Radical Detoxification. *Analyst*. 123:3-6
- AGRAWAL A., KALE RK., (2001). Radiation Induced Peroxidative Damage Mechanism And Significance. *Indian Journal Experimental Biology* Apr; 39:291
- AKKUŞ İ., (1995). Serbest Radikaller Ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya 1. Baskı Mimoza Yayınları; 17.
- ANSARI K.A., KAPLAN E., SHOEMAN D., (1989). Age Related Changes In Lipid Peroxidation And Protective Enzymes In The Central Nervous System. *Growth Develop Aging*; 53:117.
- AUST S.D., MOREHAUSE L.A., THOMAS C., (1985). Role Of Metals In Oxygen Radical Reactions. *Free Rad. Biol. Med.* 1:3-25.
- BOYA P., BELOQUI O., (1999). Antioxidant Status And Glutathione Metabolism In Peripheral Blood Mononuclear Cells From Patients With Chronic Hepatitis C. *Journal Of Hepatology*; 31: 808-814
- BUCHANAN B.B., ADAMIDI C., LOZANO R.M., (1997). Thioredoxin-Linked Mitigation Of Allergic Responses To Wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 5372-7
- BUTLER A.R., FLITNEY F.W., WILLIAMS D.L.H., (1995). Nitrosonium Ions, Nitroxide Ions, Nitrosothiols And Iron-Nitrosols In Biology. A Chemist's Perspective; 16:18-22
- CANTWELL H, DEVERY R, STANTON C, LAWLESS F., (1998). The Effects Congugated Linoleic Acid On A Superoxide Dismutase, Catalase And Glutathione Peroxidase In Oxidatively-Challenged Liver Cells. *Biochem Soc. Trans* 26:62

- CASPER-BAUGULI S., SAADAWI M., NEGRE-SALVAYRE A., THOMSEN M., SALVAYRE R., BENOIST H., (1998). Midly Oxidized Low-Density Lipoproteins Suppress The Proliferation Of Activated CD4+ T-Lymphocytes And Their Interleukin 2 Receptor Expression In Vitro. *Biochem J* 330:659-66
- CEBALLOS P.I., TRIVIER J.M., NICOLE A.. (1992). Age- Correlated Modifications Of Copper –Zinc Superoxide Dismutase And Glutathionic Related Enzyme Activities In Human Erythrocytes. *Clin Chem*; 38-66
- CHEESEMAN K.H., SLATER T.F., (1993). An Introduction To Free Radical Biochemistry. *Br Med Bull*; 49:481- 493
- CORMICK D.B., GREENE H.L., (1999). Vitamins In Burtis CA, Aswood ER. *Tietz Textbook Of Cinical Chemistry*. Saunders Company. Chapter 29:1000
- CUZZUCREA S., ZINGARELLI B., VILLARI D., CAPUTI A., LONGO G., (1998). Evidence For In Vivo Peroxynitrite Production In Human Chronic Hepatitis. *Life Sciences*, Vol. 63 No. 2, Pp. PL 25-30
- CZECZOT H., SCIBIOR D., SKRZYCKI M., PODSIAD M., (2006). Glutathione and GSH- Dependent Enzymes In Patients With Liver Cirrosis And Hepatocellular Carnicoma. *Acta Biochimica Polonica* Vol.53 No. 1/2006,237-241
- CZUCJEZKO J., ZOCHARA B., TOPCZEWSKA E., HALOTA W., KEDZIORA J., (2003). Selenium, Glutathione And Glutathione Peroxidase In Blood Of Patients With Chronic Liver Diseases. *Apta Biochimica Polonica* Vol. 50 No. 4/2003
- DOLAR M.E., (2002). *Klinik karaciğer hastalıkları Nobel& Güneş kitapevi*
- DURAK I., BEDUK Y., KAVUTCU M., OZTURK S., CANBOLAT O., ULUTEPE S., (1997). Activities Of Superoxide Dismutase And Glutathione Peroxidase Enzymes In Cancerous And Non-Cancerous Human Kidney Tissues. *Int. Urol. Nephrol.* 29:5-11

- ELSTNER E.F., (1991). Oxygen Radicals: Biochemical Basis For Their Efficacy. *Klin Wochenschr*; 69: 949-956
- FRIDOVICH I. (1983). Superoksit Radical: An Endogenous Toxicant. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*; 23: 239-257
- GUTTERIDGE J.M.C., (1995). Lipid Peroxidation And Antioxidants As Biomarkers Of Tissue Damage. *Clin Chem*; 42: 819
- HALLIWELL B., (1996). Antioxidants In Human Health And Disease. *Annu Rev Nutr*; 16:33
- HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., (1989). *Free Radicals In Biology And Medicine*; UK Clarendon Pres
- HANNON M.P.A., HUGHES C., OKANE M.J., MOLES K.W., BURNETT C.R., BURNETT Y.A., (1998). Antioxidant Status And DNA Damage In Patients With Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Biochem. Soc. Trans.* 26:57
- HELLE R.A., JESPER B.N., FLEMING N., (1997). Antioxidative Enzyme Activities In Human Erythrocytes. *Clin Chem*; 43 (4): 562-68.
- IRSHAD M., CHAUDHURI P.S., (2002). Superoxide Dismutase And Total Antioxidant Levels Invarious Forms Of Liver Diseases. *Hepatology Research* 23;178-184
- JAIN K., PEMBERTON W., SMITH A., (2002). Oxidative Stress In Chronic Hepatitis C Not Just A Feature Of Late Stage. *Journal Of Hepatology*; 36: 805-811
- JENKINS R.R., TENGI J., (1981). Catalase Activity In Sceletal Muscle Of Varying Fiber Types. *Experimentia*; 37:67-68.
- KENNETH B.B., BRUCE N.A., (1998). The Free Radical Theory Of Aging Matures. *Physiol Reviews*; 78 (2): 547-581
- KARABULUT A.B., SÖNMEZ E., BAYINDIR Y., GÖZÜKARA E., (2002). A Comparison Of Erythrocyte Superoxide Dismutase And Catalase Activity In

- Patients With Hepatitis C Infection Turkish Journal Of Medical Sciences. 32: 313-316
- KO W.K., GUO C.H., YEH M.S., LIN L.Y., HSU G.S.W., CHEN P.C., LUO M.C., LIN C. Y., (2005). Blood Micronutrient, Oxidative Stress, And Viral Load In Patients With Chronic Hepatitis C World Journal Gastroenterology 11(30) :4697-4702
- LARREA E., BELOQUI O., (1998). Superoxide Dismutase In Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection. Free Radical Biology & Medicine, Vol.24 Nos.7/8. pp. 1235-1241
- LARTILLOT S., KEDZIORA R., ATHIAS A., (1988). Purification And Characterization Of A New Fungal Catalase, Preperative Biochemistry.
- LEE Y.J., GALOFORO S.S., BERNS C.M ., (1998). Glucose Deprivation-Induced Cytotoxicity And Alterations In Mitogen-Activated Protein Kinase Activation Are Mediated By Oxidative Stres In Multidrug-Resistant Human Breast Carcinoma Cells. 273 :5294-9
- LIEW F.Y., LI Y., MILLOT S., (1990). TFN-Alpha Induced Macrophage Leismaneicidal Activity is Mediated By Nitric Oxide From L-Arginine Immunology; 71: 556-59.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J., (1951). J. Biol. Chem. 193: 265-275
- MAYERS PA., (1993). Pentoz Fosfat Yolu Ve Heksoz Metabolizmasının Diğer Yolları. Menteş G., Ersöz B. (Eds) : Harper'ın Biyokimyası. Barış Kitapevi. İstanbul. 237-248
- MURPH M. P., (1999). Nitric Oxide And Cell Death. Biochim Bioph Acta 1411: 401-414
- PAGLIA B.E., VALENTINE W.N., (1967). Studies On The Quantative And Qualitative Characterization Of Erythrocyte Glutathione Peroxidase, J. Lab. Clin Med. 1: 952-958

- RICHARD K., (1994). Nitric Oxide Synthases. *The Biochemist*; 16 (5): 3-6
- SIES H., (1991). Role Of Reactive Oxygen Species In Biological Processes. *Klin Wochenscht*; 69 :965-968
- STEINMAN H.M., (1982). Superoxide Dismutases: Protein Chemistry Relationship. *In* LW Oberley, ed, *Superoxide Dismutase*, Vol 1. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 11-68
- SUN Y., OBERLEY L.W., LI Y., (1988). A Simple Method For Clinical Assay Of Superoxide Dismutase. *Clin Chem* 34:497-500
- WHITE W.L., ERICKSON M., STEWENS S.C., (1976). Determination Of Total Protein And Albumin Chemistry For Clinical Laboratory. 4th.Ed. P. 183 The C.V. Mosby Company, St Louis, Mo
- WISEMAN H, HALLIWELL B., (1996). Damage To DNA By Reactive Oxygen And Nitrogen Species Role In Inflammatory Disease And Progression To Cancer. *Biochem J.* 313:17-29

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Mersin ilinin Mut ilçesinde doğdum. İlköğrenimimi Gazi İlkokulunda orta öğrenimimi Mareşal Fevzi Çakmak İlköğretim Okulunda ve Mut Çok Programlı Lisesinde tamamladım.

2001 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldum. 2004 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde yüksek lisans eğitimime başladım.