



DEMİR TOKSİSİTESİNDE ALFA TOKOFEROLÜN ETKİSİ

Neslihan TORTOP

**Haziran-2007
DENİZLİ**

DEMİR TOKSİSİTESİNDE ALFA TOKOFEROLÜN ETKİSİ

**Pamukkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Biyokimya Anabilim Dalı**

Neslihan TORTOP

Danışman: Doç. Dr. Süleyman DEMİR

**Haziran, 2007
DENİZLİ**

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza

:

Öđrencinin Adı

: Neslihan TORTOP

Bu tez, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimi tarafından desteklenen, 2006-SBE-005 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Bu tezin yapılmasına Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu tarafından onay verilmiştir (2006/41).

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, bu çalışmanın gerçekleşmesi sürecinde desteğini esirgemeyen tez danışmanım **Doç. Dr. Süleyman DEMİR**'e, Biyokimya ABD tüm öğretim görevlileri ve araştırma görevlilerine, yardımlarından ötürü **Veteriner Barbaros ŞAHİN** ve **Biyolog Kadriye HEKİM**'e, eğitimim boyunca manevi desteklerini esirgemeyen Pamukkale Üniversitesi Hastanesi eczacılarına, eğitimimin her aşamasında birlikte olmaktan onur duyduğum yüksek lisans arkadaşım **Dicle Durak DEMİRAYAK**'a, hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen aileme ve dayım **Ayhan ÇİZMECİ**'ye sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

DEMİR TOKSİSİTESİNDE ALFA TOKOFEROLÜN ETKİSİ

Tortop, Neslihan
Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya ABD
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Süleyman DEMİR

Haziran 2007, 52 sayfa

Biyolojik sistemlerdeki serbest radikallerin oluşum ve metabolizmasında demir önemli bileşendir. Demir yüklemesi metale bağlı en yaygın toksisitelerden biridir. Karaciğerde demir birikimi lipit peroksidasyonuna yol açar. Membran fosfolipitleri peroksidatif bozunmaya uğradıklarında malondialdehit meydana gelir. E vitamini demire bağlı hasarın çoğunu önleyebilir. Bu çalışmada demir yüklemesinin karaciğerde yarattığı oksidatif stres ve E vitamininin oksidatif strese etkisi araştırılmıştır. Elli adet Wistar rat rasgele beş gruba ayrılmıştır. Gruplardan ikisi haftada 3 doz olacak şekilde, 6 doz 100 mg /kg demir dekstran (i.p.) almıştır. Bu iki gruptan biri altı hafta süreyle her gün 200 mg/kg alfa tokoferol asetat (i.p.) almıştır. Diğer iki grup 6 hafta süreyle karbonil demir (%2,5 w/w) ilaveli diyet ile beslenmiştir. Bu iki gruptan biri altı hafta süreyle her gün 200 mg/kg alfa tokoferol asetat (i.p.) almıştır. Kontrol gurubu 6 hafta süreyle normal diyet almıştır. Her iki yolla demir yüklemesi kontrole göre karaciğer MDA düzeylerinde artışa ($p<0.05$), GSH düzeylerinde azalmaya ($p<0.05$) neden oldu. Demir dekstran alan ratlarda karbonil demir alan ratlara kıyasla daha yüksek MDA düzeyleri gözlemlendi ($p<0.05$). Sonuç olarak, demir yüklemesinin lipit peroksidasyonunu arttırdığına ve vitamin E'nin demirin neden olduğu oksidatif streste koruyucu olabileceğine karar verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Serbest radikal, demir toksisitesi, oksidatif stres, alfa tokoferol, malondialdehit, karaciğer

ABSTRACT**EFFECT OF ALPHA TOCOPHEROL IN IRON RELATED TOXICITY**

Tortop, Neslihan
M. Sc. Thesis in Biochemistry
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Süleyman DEMİR

July 2007, 52 pages

Iron is a major component in the production and metabolism of free radicals in biological systems. Iron overload is one of the most common metal related toxicity. Iron deposition in liver leads to peroxidation of lipids. Malondialdehyde is formed when membrane phospholipids undergo peroxidative decomposition. Vitamin E can prevent the majority of iron related damage. In this study oxidative stress which is caused by iron overload in liver and the effect of alpha tocopherol on oxidative stress have been evaluated in rats. 50 Wistar rats were distributed in five groups randomly. Two groups received 6 doses (three doses per week) 100 mg/kg each iron-dextran (i.p.). One of these groups received daily 200 mg/kg each alpha tocopherol acetate (i.p.) for six weeks. The other two groups were fed diets supplemented carbonyl iron (2,5% w/w) for six weeks. One of these groups received daily 200 mg/kg each alpha tocopherol acetate (i.p.) for six weeks. Control group was fed normal diet for six weeks. In the both way, iron overload led to increase MDA levels ($p<0.05$) and decrease GSH levels ($p<0.05$) in liver compared with control rats. Higher MDA level was observed in iron-dextran-treated rats compared to carbonyl iron treated rats ($p<0.05$). In conclusion, it was decided that iron overload leads to increase in lipid peroxidation and vitamin E can give protection against oxidative stress caused by iron.

Keywords: Free radical, iron toxicity, oxidative stress, alpha tocopherol, malondialdehyde, liver

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<i>Teşekkür</i>	i
<i>Özet</i>	ii
<i>Abstract</i>	iii
<i>İçindekiler Dizini</i>	iv
<i>Şekiller Dizini</i>	vi
<i>Tablolar Dizini</i>	vii
<i>Simge ve Kısaltmalar Dizini</i>	viii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR BİLGİSİ	3
2.1.Serbest Radikaller.....	3
2.2. Reaktif Oksijen Türleri.....	4
2.2.1. Süperoksit Radikali.....	5
2.2.2. Hidrojen Peroksit.....	6
2.2.3. Hidroksil Radikali.....	7
2.2.4. Singlet Oksijen.....	7
2.3. Serbest Radikal Kaynakları.....	8
2.3.1. Endojen Serbest Radikal Kaynakları.....	8
2.3.1.1. Mitokondrial Elektron Transport Zinciri.....	8
2.3.1.2. Karma Fonksiyonlu Oksidazlar.....	9
2.3.1.3. Solunum Patlaması.....	9
2.3.1.4. Prostaglandinlerin Sentezi.....	9
2.3.2. Ekzojen Serbest Radikal Kaynakları.....	10
2.3.2.1. Radyasyon.....	10
2.3.2.2. Metal İyonları ve Diğerleri.....	10
2.4. Serbest Radikallerin Etkileri.....	11
2.4.1. Lipit Peroksidasyonu.....	11
2.4.2. Protein Oksidasyonu.....	13
2.4.3. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri.....	14
2.4.4. DNA ve Nükleik Asitler Üzerine Etkileri.....	15
2.5. Antioksidan Savunma Mekanizmaları.....	16
2.5.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	17
2.5.1.1. Süperoksit Dismutaz.....	17
2.5.1.2. Katalaz.....	18
2.5.1.3. Glutasyon Peroksidaz.....	18
2.5.1.4. Glutasyon S-transferaz.....	19
2.5.1.5. Glutasyon Redüktaz.....	19

2.5.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	20
2.5.2.1. Glutasyon.....	20
2.5.2.2. Sistein.....	21
2.5.2.3. Karotenoidler.....	21
2.5.2.4. Flavonoidler.....	21
2.5.2.5. Bilirubin.....	22
2.5.2.6. Albümin.....	22
2.5.2.7. Seruloplazmin.....	22
2.5.2.8. Transferrin.....	23
2.5.2.9. Melatonin.....	23
2.5.2.10. Askorbik Asit.....	23
2.5.2.11. E Vitamini.....	24
2.6. Demir.....	27
2.6.1. Demir Emilimi ve Metabolizması.....	28
2.6.2. Demir Toksisitesi.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler.....	31
3.2. Deney Hayvanları ve Deney Protokolü.....	32
3.3. Homojenizasyon.....	33
3.4. Protein Tayini (Lowry Yöntemi)	33
3.5. Malondialdehit Tayini.....	34
3.6. Doku Redükte Glutasyon (GSH) Tayini.....	35
3.7. Serum Demir Tayini.....	36
3.8. İstatistiksel Yöntem.....	37
4. BULGULAR	38
4.1. Karaciğer MDA Düzeyleri.....	38
4.2. Karaciğer GSH Düzeyleri.....	39
4.3. Serum Demir Düzeyleri.....	40
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ.....	46
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Lipit peroksidasyonunun kimyasal yolu.....	13
Şekil 2.2. Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik antioksidanlar.....	17
Şekil 2.3. Tokoferolün kimyasal yapısı.....	24
Şekil 4.1. Gruplarda karaciğer doku MDA düzeyleri.....	39
Şekil 4.2. Gruplarda karaciğer doku GSH düzeyleri.....	40
Şekil 4.3. Gruplarda serum demir düzeyleri.....	41

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. O ₂ 'nin farklı formlarının 2p orbital elektronlarının konfigürasyonu.....	5
Tablo 2.2. Tokoferol Türevleri.....	25
Tablo 4.1. Ölçülen parametrelere ait bulunan değerler.....	42

SİMGE VE KISALTMALAR

ADP	Adenozindifosfat
ATP	Adenozintrifosfat
CO ₂	Karbondioksit
CH ₃	Metil
DNA	Deoksiribonükleikasit
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
FAD	Flavinadenindinükleotit
Fe ⁺²	Ferröz demir
Fe ⁺³	Ferrik demir
GPX	Glutasyon peroksidaz
GSH	Redükte glutasyon
GSSG-R	Glutasyon redüktaz
GST	Glutasyon S-transferaz
G6PD	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
H ₂ O ₂	Hidrojenperoksit
HOCl	Hipokloröz asit
KAT	Katalaz
LOOH	Lipit hidroperoksit
MDA	Malondialdehit
RNA	Ribonükleikasit
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinükleotit
NADPH	Nikotinamidadenindinükleotit fosfat
NO	Nitrik oksit
O ₂	Oksijen molekülü
¹ O ₂	Singlet oksijen
O ₂ ^{•-}	Süperoksit radikali
[•] OH	Hidroksil radikali
PUFA	Çoklu doymamış yağ asidi
RO [•]	Alkoksi radikali
ROO [•]	Peroksil radikali
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
SH	Tiyol
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri

1.GİRİŞ

Serbest radikaller, dış orbitalinde eşleşmemiş elektron bulunduran yapılardır. Dış orbitalerde eşleşmemiş elektron bulunması söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir. (Halliwell ve Gutteridge 2001).

Demir tüm hücreler için gerekli olan esansiyel bir elementtir. En önemli görevi hemoglobin aracılığı ile oksijen taşımaktır. Demir; ferröz (Fe^{+2}) ve ferrik (Fe^{+3}) durumlar arasında birbirine dönüşme özelliği nedeni ile oksijenasyon, hidroksilasyon ve benzeri birçok metabolik olayı katabolize eder. Yüksek doz demir alımı, genellikle parankimal dokularda, retikülo-endotelyal sistemin makrofajlarında ve en belirgin olarak da karaciğerde demir birikimine neden olur. Yüksek doz demir, retikülositler ve eritrosit öncül hücreleri gibi hücreleri de etkileyebilir. Yüksek doz demirin zararlı etkileri, öncelikle oksijen radikallerinin üretiminde başlıca kaynak ürün olmasıyla ilgili olabilir (Lipschitz vd 1974).

Oksijen radikallerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar 'antioksidan savunma sistemleri' olarak bilinirler. Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler. Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. 'Oksidatif stres' olarak

adlandırılan bu durum, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (Halliwell 1995).

Alfa tokoferol, aktif radikallerle reaksiyona girerek oksidasyona duyarlı moleküler yapıların istenmeyen oksidasyonlarının önlenmesi ya da azaltılmasında etkili olur ve böylece antioksidan özellik gösterir (Chow 1991).

Bu çalışmada dişi ratlara enteral ve parenteral yollarla demir verilmesinin karaciğer doku MDA ve GSH düzeylerine etkisi ve bunun üzerine antioksidan olan α -tokoferol'ün etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

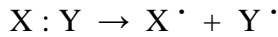
2. GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1. Serbest Radikaller

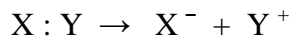
Serbest radikaller, dış orbitalinde eşleşmemiş elektron bulunduran yapılardır.

Bir serbest radikal 3 yolla ortaya çıkabilir:

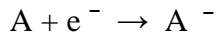
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün bölünme sonrasında her bir parçada ortak elektronlardan birinin kaldığı homolitik yıkımı sonucu oluşurlar.



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesiyle oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağ oluşturduğu her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesiyle oluşurlar.



Serbest radikaller biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi sonucu oluşurlar. Pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral olabilirler. Serbest radikallerdeki tek elektron, çiftlenmek eğiliminde olduğu için serbest radikaller ileri derecede reaktiftir. Hücrelerde DNA, protein, lipit, karbonhidrat gibi yapıtaşlarına etki ederek yapılarının bozulmasına

neden olurlar. Biyolojik sistemlerde süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali ($HO\cdot$), nitrik oksit ($NO\cdot$), peroksil radikali ($ROO\cdot$) ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikal türleri bulunmaktadır. (Halliwell ve Gutteridge 2001).

2.2. Reaktif Oksijen Türleri

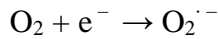
Moleküler oksijen (atmosferik oksijen) dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu elektronlar, spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken minimum enerji seviyesindedirler. Radikal tanımına göre oksijen “**diradikal**” yapıya sahip bir moleküldür. Oysa oksijenin reaktivitesi beklenenin 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, başka atom ve moleküller orbitallerinde elektronları antiparalel ve eşleşmiş olarak içerirler veya paylaşılmamış elektronlar kovalent bağlara katılmışlardır. Bunun sonucu oksijenin diğer moleküllere olan reaktivitesi son derece kısıtlanmıştır. Bu kısıtlama “**spin kısıtlaması**” (spin restriction) olarak adlandırılır. Canlıların oksijeni kullanabilmesi için, oksijene elektron transferi yaparak spin kısıtlamasını aşmaları gerekir. Spin kısıtlaması iki yolla aşılabilir: Metal iyonları aracılığı ile oksijene bir veya iki elektron aktarım yoluyla ve enerji absorpsiyonu yoluyla katalizlenebilir (Stahl ve Sies 2002, Halliwell ve Aruoma 1991). Reaktif oksijen türleri Tablo 2.1’ de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Moleküler oksijenin farklı formlarının 2p orbital elektronlarının konfigürasyonu

$\sigma^* 2p$	—	—	—	—	—
$\pi^* 2p$	$\uparrow \uparrow$	$\uparrow\downarrow \uparrow$	$\uparrow\downarrow \uparrow\downarrow$	$\uparrow \downarrow$	$\uparrow\downarrow$ —
$\pi 2p$	$\uparrow\downarrow \uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow \uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow \uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow \uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow \uparrow\downarrow$
	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$
	O ₂ Moleküler Oksijen	O ₂ ^{-•} Süperoksit Anyonu	O ₂ ⁻ Peroksi Anyonu	¹ O ₂ Singlet Oksijen	¹ O ₂ Singlet Oksijen

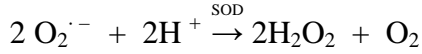
2.2.1. Süperoksit Radikali (O₂^{•-})

Süperoksit radikali moleküler oksijenin indirgenmesinde ara basamaktır ve oluştuğu yerden fazla uzağa diffüze olamaz. Bu radikalın moleküler düzeyde önemli özelliği, sekonder olarak ürettiği radikallerdir. Doğal oksijen molekülünün başka bir molekülden tek elektron almış hali olan O₂^{•-} mitokondriyal elektron transfer zincirinde redükte nikotinamid adenin dinükleotid (NADH)'ın NAD⁺'a okside olması ile üretilir. Ayrıca pek çok oksidaz tarafından da üretilir.



O₂^{•-} genel olarak anyon şeklinde tarif edildiği halde, ortamın pH'sına bağlı olarak protonlanarak katyon haline dönüşebilir. Bu durumda perhidroksi radikali (HO₂[•]) ismini alır. Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte, kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemli olan, H₂O₂ kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit, nötrofillerin bakterisidal aktivitesi, apoptozis, inflamasyon ve vasküler fonksiyonların düzenlenmesi gibi yararlı etkilere sahiptir. Azalmış süperoksit düzeyleri, bakteriyel enfeksiyonlara artmış bir yatkınlığa yol açabilir. Artmış süperoksit

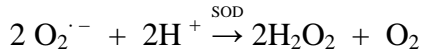
düzeyleleri ise süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene dönüştürülerek azaltılır. Böylece hücresele süperoksit düzeyleleri sıkı kontrol altındadır.



SOD tarafından katalizlenen bu tepkime “dismutasyon tepkimesi” diye adlandırılır. Süperoksit indirgenmiş nükleotidleri, bazı amino asitleri ve antioksidan bileşikleri (glutatyon, askorbik asit, tokoferol) oksitler (Sözmen 2002, Stahl ve Sies 2002)

2.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

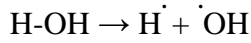
Doğal oksijen molekülü başka bir molekülden iki elektron almışsa peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki H molekülü ile birleşirse H_2O_2 oluşur.



H_2O_2 süperoksitin SOD ile dismutasyonu sonucu veya spontan olarak da üretilebilmektedir. H_2O_2 aslında radikal değildir. Ancak, üretildiği bölgede kalan süperoksitin aksine, membranları geçen, sitozole diffüze olan ve uzun ömürlü bir oksidan olarak bilinir. Bu nedenle süperoksitin ulaşamadığı membranla korunan yapılara kolaylıkla ulaşabilir. Burada süperoksitle reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir. Hidrojen peroksit başka bir şekilde de serbest Fe^{+2} ile reaksiyona girerse demir okside olurken hidroksil radikali oluşur. (Sözmen 2002, Stahl ve Sies 2002).

2.2.3. Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali, bilinen en reaktif radikaldır. Amino asitler, nükleik asitler, organik asitler, fosfolipitler ve şekerler gibi biyokimyasal maddelerin bir çoğuyla reaksiyona girebilir. Tek atom halinde ve bir elektronu eksik olan oksijen ile H^+ 'in birleşmesinden oluşur. Gamma radyasyona maruz kalan dokularda da hidroksil radikali oluşabilir. Alınan enerji hücre suyu tarafından absorbe edilir ve sudaki oksijen-hidrojen kovalent bağının parçalanmasına neden olur. Böylece hidrojen ve oksijen üzerinde dış orbitalde tek elektron kalır ve 2 radikal oluşur.



Hidroksilin yarılanma ömrü çok kısadır ve pek çok molekülden H atomu çıkarılmasını sağlar.

Hidrojen peroksitin eksik indirgenmesi ile $\cdot OH$ yapımı, vücutta bu radikalin en önemli kaynağıdır. H_2O_2 'in iki elektron ile indirgenmesi ile su oluşurken, tek elektronla indirgenmesi $\cdot OH$ 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, H_2O_2 'ten $\cdot OH$ yapımı sürekli bir duruma gelir (Stahl ve Sies 2002).

2.2.4. Singlet Oksijen

Enerji verilmek suretiyle meydana gelebilen oksijenin oldukça reaktif şekli singlet oksijen (1O_2) olarak bilinmektedir. Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmaması nedeniyle serbest radikal olmadığı halde ROS'ları arasında yer alan (1O_2) serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olması açısından önem taşımaktadır (Stahl ve Sies 2002).

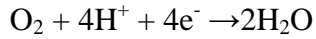
2.3. Serbest Radikal Kaynakları

2.3.1. Endojen Serbest Radikal Kaynakları

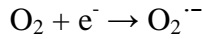
Normal metabolizma sırasında çeşitli basamaklarda serbest radikal yapısına sahip ara ürünler meydana gelmektedir.

2.3.1.1. Mitokondrial Elektron Transport Zinciri

Makromoleküllerin yıkılmasıyla açığa çıkan elektronlar mitokondri iç membranında bulunan elektron taşıyıcıları aracılığıyla moleküler oksijene aktarılıp su oluşturulur.



Elektronların elektron transport zincirinden kaçıp moleküler oksijenle direkt olarak reaksiyona girmesi süperoksit radikalini oluşturur.

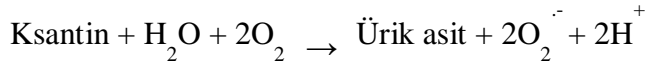
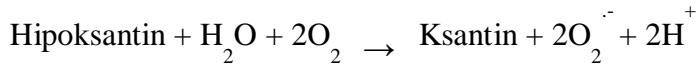


Mitokondriyal solunum zincirinde akan elektronların yaklaşık olarak %1-2'si bu şekilde toksik bir ürünü oluşturmak üzere sızıntıya uğrar. Süperoksit radikallerinin üretimi ve salınımı iç mitokondri membranından sitozolik tarafa doğru olur (Kehrer ve Smith 1994).

2.3.1.2. Karma Fonksiyonlu Oksidazlar

Amino asit oksidaz, sitokrom oksidaz, monoamin oksidazlar, ksantin oksidaz en önemlileridir. Bunlardan özellikle ksantin oksidaz pürin katabolizmasının en son iki reaksiyonunu katalizleyen enzim olarak iskemik koşullarda fazla miktarda $O_2^{\cdot-}$ üretir.

Ksantin oksidaz enzimi oksijen varlığında hipoksantini ksantine veya ksantini ürik aside oksitler. Bu reaksiyonda elektron alıcısı moleküler oksijendir (Southorn ve Powis 1988).



2.3.1.3. Solunum Patlaması

Nötrofiller fagositoz esnasında, membran ve sitoplazmalarında bulundurdukları NADPH oksidaz ve miyeloperoksidaz enzimleri ile hem serbest oksijen radikalleri hem de aşırı okside edici HOCl gibi ajanları üreterek karşılaştıkları virus, bakteri, mantar gibi ajan patojenleri yok ederler. Bu işlemler esnasında hem ana hem de ara ürün olarak çok fazla miktarda ROS oluşur (Babior 2000).

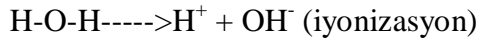
2.3.1.4. Prostaglandinlerin Sentezi

Prostaglandinlerin sentez edildiği lipooksijenaz ve siklooksijenaz ana metabolik yollarında farklı basamaklarda ROS üretilir. Bunların dışında ayrıca bazı küçük moleküllerin otooksidasyonu (tiyoller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, antibiyotikler gibi) ROS oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Kehrer and Smith 1994).

2.3.2. Ekzojen Serbest Radikal Kaynakları

2.3.2.1. Radyasyon

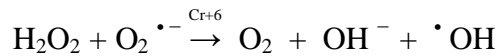
Radyasyonun indirek etkisi atoma enerji transferi sonucu, serbest radikaller oluşturarak molekülün parçalanmasını kapsar. Biyolojik sistemlerdeki temel molekül su olduğu için, su genellikle radikal formasyonu ve çoğalması için ortam oluşturur. Su molekülü enerjiyi absorblayınca değerlik kabuğunda paylaşılmamış elektron olan iki serbest radikale ayrışır. Bunlar H[·] ve [·]OH sembolleri ile gösterilir.



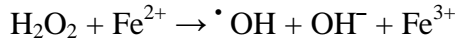
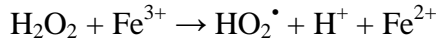
2.3.2.2 Metal İyonları ve Diğerleri

Demir, bakır, kadmiyum, nikel, krom, civa iyonları serbest radikal oluşumuna neden olur.

Cr⁺⁶'nın biyolojik sistemlerde Cr⁺⁵ ve Cr⁺⁴'e indirgenmesi sırasında, moleküler oksijenin süperoksit anyonu meydana getirdiği; dismutasyon reaksiyonu sonucu oluşan H₂O₂'in Haber-Weiss reaksiyonuyla hidroksil radikali oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (Shi ve Dalal 1992).



Demir, Fenton Reaksiyonu yoluyla en güçlü serbest radikal olan hidroksil radikallerinin ([·]OH) oluşmasını sağlarken, stabil lipid hidroperoksitlerinin peroksi ve alkoksi radikallerine dönüşümünü hızlandırır (Halliwell 1994, Suzer vd 2000).



Katran ve gaz olmak üzere iki fazda tanımlanan sigara dumanı, akciğerlere alınan yanmış organik materyallerin en önemlisidir. Sigara dumanı gaz fazı okside edici bir karışım olmasına karşın, bu fazdan izole edilen katran indirgeyici (antioksidan) karakterdedir (Demir vd 2001).

Yüksek araç trafiği ile birlikteki kentsel alanlardaki en önemli hava kirleticileri aerodinamik çapı 10 µm'den küçük solunabilir partiküller, nitrojen dioksit (NO₂) ve ozondur (O₃). Ozon hücre içi reaktif oksijen türlerinde (ROS) acil ve doza bağlı bir artışa yol açar (Mudway vd 1999).

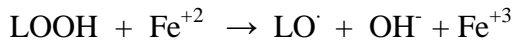
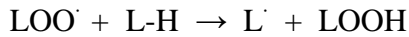
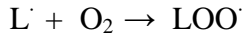
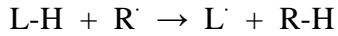
2.4. Serbest Radikallerin Etkileri

2.4.1. Lipit Peroksidasyonu

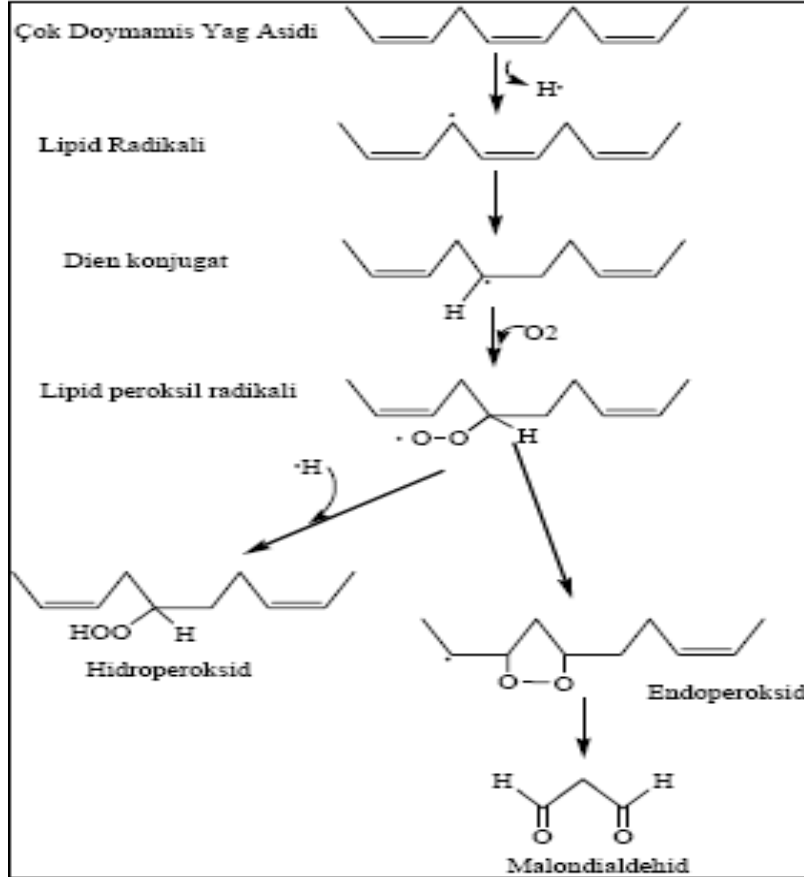
Lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli oksitleyici bir radikalın membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki metilen gruplarından bir hidrojen atomu uzaklaştırması ile başlamaktadır. Lipit peroksidasyonunu başlatan başlıca radikal, hidroksil radikalidir. Lipit peroksidasyonu membran yapı ve bütünlüğünün bozulması, oluşan serbest radikallerin, çeşitli hücre bileşenleri üzerine etkisi ve son ürünlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden olmaktadır (Halliwell ve Chirico 1993).

Lipit peroksidasyonu bir zincir tepkimesi şeklinde başlayıp, daha ileri peroksidasyonu başlatacak serbest radikaller için kesintisiz bir kaynak oluşturur. Kendi kendini devam ettiren bu zincir reaksiyonların hücre membranına hasarı geri dönüşümsüzdür. Kimyasal yolu Şekil 2.1.' de gösterilmiştir.

Hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile oluşan lipit radikali (L^{\cdot}) dayanıksızdır ve bir dizi spontan değişikliğe uğrayarak oluşan konjuge dienler daha stabildir. Lipit radikalının moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu lipit peroksit radikali (LOO^{\cdot}) meydana gelmektedir. Bu radikaller de membran yapısındaki diğer çok doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumunu sağlamakta, kendileri de açığa çıkan Hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine ($LOOH$) dönüşmektedir. Lipit hidroperoksitlerden, Fenton tipi bir reaksiyonla aldehit ve alkanlar oluşur.



Lipit peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan çeşitli aldehitlerden en iyi bilinenleri Malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (HNE)' dir. Bu bileşikler ya hücrel olarak metabolize olurlar ya da başlangıçta etkili oldukları bölgeden diffüze olup hasarı hücrenin diğer bölümlerine yayarlar (Halliwell ve Chirico 2003, Nair vd 1986). MDA ölçümü ile lipit peroksidasyonunun değerlendirilmesi yapılabilmektedir.



Şekil 2.1. Lipit peroksidasyonunun kimyasal yolu

2.4.2. Protein Oksidasyonu

Protein oksidasyonu, reaktif oksijen türleri ($\cdot\text{OH}$, H_2O_2 gibi) ile direkt olarak veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu indirek olarak indüklenen, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır (Shacter 2000).

Protein ana yapısının reaksiyonu, amino asit α karbonundan bir H atomunun $\cdot\text{OH}$ 'e bağlanarak ayrılması ve H_2O oluşturması ile başlar. Her ne kadar $\cdot\text{OH}$ 'in majör kaynağı fizyolojik şartlar altında H_2O_2 'nin Fe veya Cu aracılığı ile ayrılması olsa da aynı reaksiyonlar iyonize radyasyon sonucu oluşan $\cdot\text{OH}$ ve $\text{HO}_2\cdot$ ile de gerçekleşmektedir. H atomunun $\cdot\text{OH}$ radikaline bağlanarak ayrılması karbon merkezli radikalın oluşumuna

neden olur. Oluşan bu radikal, oksijen varlığında hızlıca peroksil radikaline dönüşür. Peroksil radikali de kolaylıkla, süperoksit radikalinin protonlanmış formu veya başka bir molekülden H atomu alarak alkil peroksite dönüşür. Alkil peroksit ise $\text{HO}_2\cdot$ ile daha ileri bir reaksiyonla alkoksil radikaline ve daha sonra da alkoksil radikali yine $\text{HO}_2\cdot$ ile hidroksi türevine dönüşür. Serbest radikallerin meydana getirdiği hasar sonucunda proteinlerde fragmentasyon, çapraz bağlanmalar ve proteinlerin agregasyonu meydana gelir. Yapıları bozulan proteinler normal fonksiyonlarını meydana getiremezler. Proteinlerin oksidatif hasarı reseptörleri, sinyal ileti mekanizmalarını, yapısal proteinleri, transport sistemlerini ve enzimlerin rol oynadığı hücresele olayları etkiler (Stadtman ve Levine 2003).

2.4.3. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

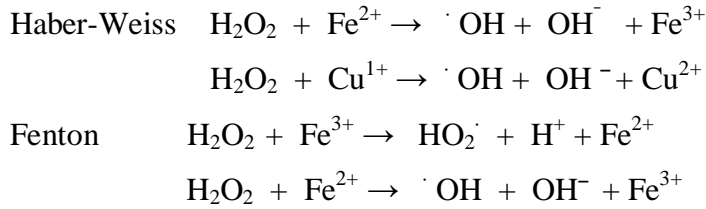
Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu, hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehidler meydana gelir. Bağ dokunun önemli bir mukopolisakkariti olan hiyaluronik asidin, inflamatuvar eklem hastalıklarında sinovial sıvıda artmış olan H_2O_2 ve O_2^- ile parçalandığı gösterilmiştir. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı çeşitli hastalıkların patolojisinde önemli rol oynarlar (Kehrer ve Smith 1994).

Bir geçiş elementinin varlığında glukoz, reaktif ketoaldehitlere ve süperoksit anyonuna çevrilir. Reaksiyonlar zinciri, süperoksit radikalinin hidrojen peroksit üzerinden son derece reaktif olan hidroksil radikali oluşturması ile sonuçlanır. Hücre içi glukoz oksidasyonu NADH'nin açığa çıkmasına yol açar. NADH solunum zincirinde oksidatif fosforilasyon yolu ile ATP üretimi için gerekli enerjiyi sağlamak üzere kullanılır. Solunum zincirindeki bu reaksiyon sırasında süperoksit radikali açığa çıkar. Yüksek glukoz konsantrasyonu varlığında bu yolla süperoksit radikal üretimi artar (Brownlee 2001, Green vd 2004).

2.4.4. DNA ve Nükleik Asitler Üzerine Etkileri

Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir. Oksidatif modifikasyon sonucunda DNA antijenik karakter kazanmakta ve anti DNA antikoru oluşmaktadır (Cooke vd 2003).

$\cdot\text{OH}$ radikalinin DNA üzerine etkili olabilmesi için DNA'da veya çok yakınında oluşması gerekmektedir. Reaktivitesi çok yüksek olan $\cdot\text{OH}$ radikalinin hücre içinde diffüze olarak nükleusa geçme olasılığı azdır. Olası mekanizma membranı kolayca geçebilen H_2O_2 'in nükleusta Fe-Cu iyonları ile reaksiyonlaşarak (Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları) hidroksil radikallerini oluşturmasıdır.



DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur. $\text{Fe}^{2+/3+}$ ve $\text{Cu}^{1+/2+}$ iyonları negatif yüklü DNA'ya sürekli bağlı bulunabildikleri gibi oksidatif stres altında hücre içinde bulunan demirli ve bakırlı proteinlerden serbestleşerek de DNA'ya bağlanabilmektedirler. Redoks aktif transiyon metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü H_2O_2 'in hedefi haline getirmektedir (Halliwell ve Aruoma 1991).

$\cdot\text{OH}$ radikali dört DNA bazına da saldırı yapabilirken singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) çok daha seçicidir. $^1\text{O}_2$ dal kırığından daha çok guanin türevli ürünler oluşturmaktadır. (Cadet vd 2003).

2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri

Oksidanları inaktif hale getiren maddelere antioksidanlar denir. Normal sağlıklı kişilerde serbest radikaller ile antioksidanlar denge halindedir.

Antioksidanlar 4 farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler:

1. Scavenging (temizleme) etkisi: Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan bu etki enzimler tarafından yapılır.

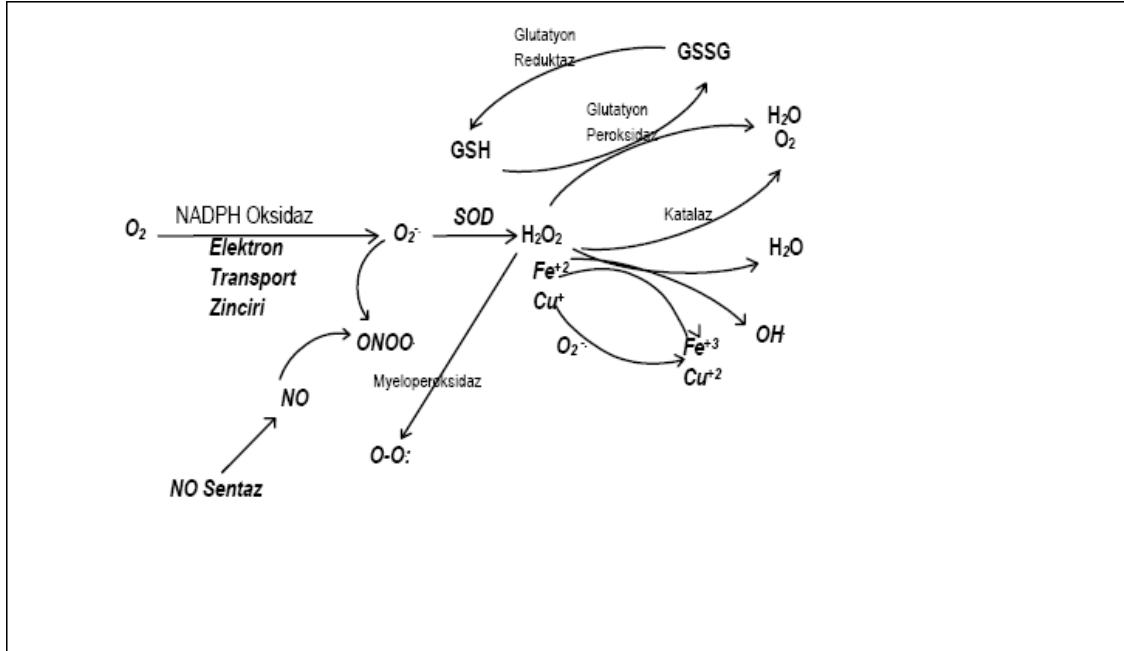
2. Quencher (baskılama) etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.

3. Onarma etkisi: Radikallerin oluşturduğu hasarı onarırlar.

4. Zincir koparma etkisi: Oksidanları bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olan bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır. (Young ve Woodside 2001).

2.5.1. Enzimatik Antioksidanlar

Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik antioksidanlar Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.

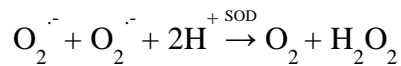


Şekil 2.2. Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik antioksidanlar

2.5.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1)

Mc Cord ve Fridovich tarafından 1968'de keşfedilmiştir. 3 tür SOD vardır. Birincisi mitokondride lokalize Mn-SOD, ikincisi sitozolde lokalize Cu-Zn SOD ve üçüncüsü de Cu içeren ve plazmadaki süperoksit radikallerini metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD'dir.

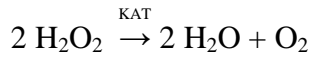
Metalloprotein olan SOD bir süperoksit molekülünü O_2 molekülüne yükseltgeyip, diğer süperoksit molekülünü H_2O_2 'e indirger.



SOD enziminin canlılardaki dağılımı katalaz ile birlikte incelenmelidir. Çünkü SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan ürün, oksijenin toksik türlerinden biridir ve katalaz tarafından birikimi önlenmektedir (McCord 1985).

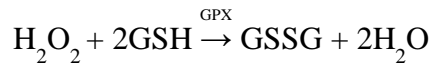
2.5.1.2. Katalaz (KAT) (EC 1.11.1.6)

Her biri bir prostetik grup olan ve yapısında Fe^{+3} bulunduran 4 hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir. Peroksizomlarda lokalizedir. Peroksidazlarla beraber SOD'ın oluşturduğu H_2O_2 'i oksijen ve suya parçalar. Glutasyon peroksidazın H_2O_2 'e karşı K_m 'i katalaza göre daha düşüktür. Yani düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 'i glutasyon peroksidaz parçalar, yüksek H_2O_2 konsantrasyonlarında ise katalaz aktivite kazanır. Katalaz aktivitesi eritrosit, karaciğer ve böbrekte yoğundur. (Young ve Woodside 2001).



2.5.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPX) (EC 1.11.1.9)

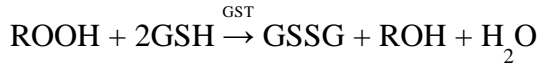
Her birinde selenosistein içeren 4 alt birimden oluşur. Redükte glutasyonu yükseltgerken H_2O_2 'i de suya çevirir ve böylece membran lipitlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı korur.



GPX, intrasellüler mesafede lipitleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Bu nedenle hücrenin özellikle sitozolik kompartmanında yer alan bu enzim hücrenin yapısını ve fonksiyonunu korur (Nechales vd 1968).

2.5.1.4. Glutasyon S-Transferaz (GST) (EC 2.5.1.18)

Toksik metabolitlerle glutasyonun konjugasyonunu katalizleyen GST enzimi de toksik metabolitlerin detoksifikasyonuna yol açan başka bir antioksidan enzimdir. “Selenyuma bağlı olmayan GSH-Px” olarak adlandırılır. Membran lipit peroksidasyonunu yalnızca fosfolipaz A2'nin varlığında inhibe eder. Öncelikle araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipit peroksitlerine karşı Se bağımsız GSH peroksidaz gibi aktivite göstererek antioksidan etki gösterir. (Mannervik 1985, Van Haaften vd 2001).



2.5.1.5. Glutasyon Redüktaz (GSSG-R) (EC 1.8.1.7)

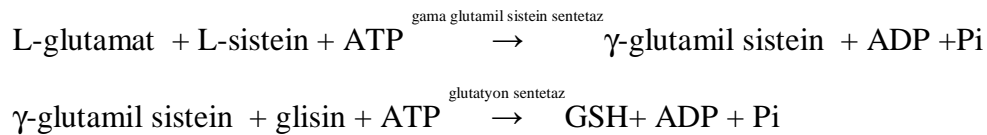
Yükseltgenmiş glutasyonu indirgenmiş hale çeviren 2 alt ünitiden oluşmuş bir dimerdir. Her bir alt birim NADPH bağlayan alan, FAD bağlayan alan ve ara yüz alan olmak üzere 3 tane yapısal alan içerir. Okside glutasyon bir subünitin FAD alanı ve diğer subünitin arayüz alanından oluşan bir bağlanma bölgesi vardır. Glutasyonun indirgenme reaksiyonu sırasında sıklıkla elektronlar NADPH'dan FAD'ye transfer edilir. Daha sonra subünitlerdeki iki sistein arasında bulunan disülfid köprüsüne transfer edilmek suretiyle okside glutatyon aktarılmış olur (Sies 1999).



2.5.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

2.5.2.1. Glutasyon

Glutasyon glutamik asit, sistein ve glisin içeren bir tripeptit olup, aktif bir sülfidril (-SH) grubuna sahiptir. İn vivo sentezlenebilen ve ince bağırsaktan kısmen emilebilen GSH endojen ve eksojen bir antioksidandır. Glutasyonun oksidasyonu ile GSH-radikali (GS^-) oluşur. GS^- diğer bir GS^- ile birleşir ve okside glutasyon (GSSG) oluşur, bu da NADPH bağımlı GSH-redüktazla GSH'ye indirgenir (Fang vd 2002). Vücuttaki GSH'nun büyük bölümü karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç duyulmadan iki aşamada sentezlenebilen bir tripeptittir. GSH sentezi, L-glutamat ve L-sisteinin gama-glutamilsistein sentetaz enzimi ile katalizlenen reaksiyonla başlar. Oluşan gama-glutamilsistein ve L-glisin ürünü GSH sentetaz enziminin katalizörlüğünde GSH'ye dönüştürülür. Bu reaksiyonlar esnasında iki ATP harcanır. İlk reaksiyon geri bildirimli düzenleme ile inhibe edilebildiğinden hızı belirleyen basamaktır (Sies 1999, Beutler vd 1963).



Glutasyon, hücrelerde en çok bulunan protein dışı endojen tiyoldür. Doku GSH düzeyi sadece senteze katılan enzimler tarafından düzenlenmez, tiyol içeren aminoasitlerin yeterince olması da oldukça önemlidir. Glutasyon, GSH-transferaz ve peroksidazlar için bir substrat olup ksenobiyotik ve reaktif oksijen türevlerinin detoksifikasyonuna katılır. Ayrıca, antioksidan etkili C ve E vitaminleri üzerinde orta düzeyde koruyucu etkiye sahiptir. GSH, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve organik peroksitlerin glutasyon peroksidaz etkisi ile indirgenmesinde ve ksenobiyotiklerin merkaptürat yolu ile detoksifikasyonunda yer almaktadır. Ayrıca, GSH direkt olarak serbest sülfidril grubu aracılığıyla H_2O_2 , süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($\cdot OH$) ve alkoksil radikalleri ($RO\cdot$) ile

etkileşime girebilmekte, böylece hücreyi oksidanların, elektrofilik maddelerin, serbest radikallerin hasarına karşı korumada önemli bir rol üstlenmektedir (Meister ve Anderson 1983, Sies 1999).

2.5.2.2. Sistein

Tiyol içeren aminoasitlerden biri olan sistein, GSH sentezinde temel rol oynar. Sülfür içeren aminoasitler sistein katabolizması ve GSH sentezi arasında sisteinin akış yönünü belirlemede önemli rol oynar. Sistein, GSH sentezi için hız belirleyici bir enzim olan γ -glutamat sistein ligaz enzimini onarır. Dolayısıyla sistein, GSH sentezi için hız belirleyici bir aminoasit olarak kabul edilebilir. Hücre dışı indirgeyici ajan olarak önemli rol oynar (Parcell 2002, Kim vd 2003).

2.5.2.3. Karotenoidler

Konjuge çift bağ açısından oldukça zengindirler ve teorik olarak düzenli mono ve poli cis izomerleri oluşturabilmektedirler. Karotenoidlerin antioksidan özellikleri, onların kimyasal yapılarının tekli ve konjuge çift bağlı bir sistemle ile şekillenen tetraterpen yapısında uzamalarının bir sonucudur (Khachik vd 2002).

Ortamda bulunan moleküler oksijeni ve peroksil radikalini temizler. İnsan ve hayvanlarda, özellikle likopen ve β -karoten olmak üzere karotenoidler, diğer antioksidanlarla beraber veya onları tetikleyerek peroksil ve singlet oksijen radikallerinin etkisi ile oluşan fotooksidatif sürece karşı koruyucu rol oynarlar (Van Poppel 1993).

2.5.2.4. Flavonoidler

Flavonoidler, 3'-4' dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahiptir. Fenolik antioksidan, lipit radikallere hızla H^{\cdot} vermesi şeklinde lipit oksidasyonu ile etkileşir. Görevi ROO^{\cdot} ve RO^{\cdot} radikalini parçalamak ve böylece lipit peroksidasyon zincir

reaksiyonunu sonlandırmaktadır. Ayrıca bakır iyonlarıyla kompleks oluşturmaları antioksidan etkilerine katkıda bulunur (Feredioon vd 1992).

2.5.2.5. Bilirubin

Bilirubin, hem katabolizmasının son ürünüdür. Hem serbest hem de proteine bağlı bilirubin antioksidan etkisi vardır. Bilirubin mikromolar konsantrasyonlarda dahi peroksil radikalini yakaladığı ve zincir kıran antioksidan olarak davrandığı gösterilmiştir (Gutteridge 1995).

2.5.2.6. Albümin

Albümin vücutta birçok fonksiyonuna ek olarak bakır iyonunu bağlama yeteneğine de sahiptir ve böylece bakır iyonuna bağlı lipit peroksidasyonunu ve hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder. Diyetle alınan bakır duodenumdan amino asitler ya da küçük peptidlerle birleşerek absorbe olur; mukoza hücrelerinden kana geçerek albumine bağlanır. Bakır albümin kompleksi karaciğere taşınır ve karaciğerden seruloplazmin olarak plazmaya verilir Albümin kandaki yağ asitlerini de taşır, ayrıca bilirubin de albümine bağlanır. Muhtemelen in vivo ortamda bilirubin, albümine bağlı yağ asitlerinin peroksidasyonunu önleyebilmektedir (Marceau ve Aspin 1973).

2.5.2.7. Seruloplazmin

Plazmada bakırı bağlayan seruloplazmin, redoks aktif metallere bağlanıp metal-katalize serbest radikallerin oluşumunu önler (Halliwell ve Gutteridge1990). Seruloplazmin, vücutta bakır depolanımının temel şeklidir, plazma bakırının yaklaşık %95'ini bağlar, bakırın geri kalan kısmı ise albümine bağlanmaktadır. Seruloplazmin iki yolla antioksidan faaliyet gösterir. Bakırı bağlayarak, serbest bakır iyonlarının oksidatif hasara yol açmasını önler. Seruloplazminin ferooksidaz aktivitesi (ferröz demirin oksidasyonu), demirin transport proteini olan transferrine yüklenmesine yardımcı olur ve

böylelikle serbest ferröz demirden zararlı serbest radikal oluşum reaksiyonları önlenmiş olur (Gutteridge vd 1992).

2.5.2.8. Transferrin

Serbest demiri bağlamaktadır. Transferrine bağlanan demir, hemoglobin sentezi ve eritropoezis amacıyla kemik iliğine ilerler. H_2O_2 'den demir iyonu bağımlı hidroksil oluşumunu inhibe eder (Halliwell 1991).

2.5.2.9. Melatonin

Karanlıkta pineal bezden salgılanan, uyku, üreme, sirkadiyen ritim ve immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur. Melatoninin antioksidan özelliği, yapısında bulunan pirol halkasından kaynaklanmaktadır. $\cdot OH$, H_2O_2 , 1O_2 , $HOCl$, $NO\cdot$, $ONOO^-$ gibi oksidatif strese yolaçabilen serbest radikalleri detoksifiye ettiği ve böylece onların biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini önleyebildiği bildirilmektedir. Bu direkt antioksidan etkidir. Farmakolojik ve muhtemelen fizyolojik düzeylerdeki melatoninin; SOD, GPX, GSSG-R, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve γ -glutamilsistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını ya da aktivitelerini artırdığı ve bu yolla oksidatif stresi baskıladığı bildirilmektedir. Bu antioksidan enzim aracılı etkidir. Bazı prooksidan enzimleri inhibe ederek, serbest radikal oluşumunu azalttığı ve bu yolla da antioksidan sistemi desteklediği öne sürülmektedir. Bu da prooksidan enzim aracılı etkidir (Beyer vd 1998, Reiter vd 2000).

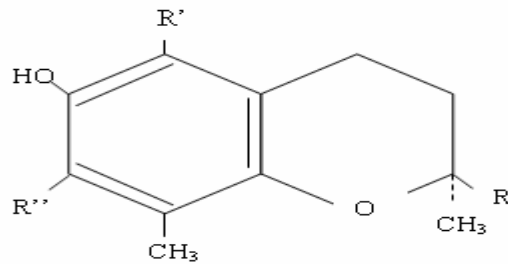
2.5.2.10. Askorbik Asit (C Vitamini)

Askorbik asit moleküler oksijen, nitrat, sitokrom a ve c gibi bileşiklerin indirgenmesine neden olan ve sulu ortamlarda serbest radikallerle reaksiyona girebilme kabiliyetinde olan suda çözünen bir vitamindir. Plazmada oksidan ajanlara karşı ilk antioksidan defansı oluşturur. Süperoksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girip onları temizleyen bir antioksidan olmasının yanı sıra tokoferoksil radikalinin tekrar tokoferole dönüşmesini sağlar. Bu esnada kendisi de dehidroaskorbata okside olur. C

vitamini yetersizliği durumlarında oluşan tokoferoksil radikalleri tokoferole dönüşmesi için GSH ile reaksiyona girecek ve böylece hücredeki GSH miktarını azaltacaktır (Chao vd 2002).

2.5.2.11. E Vitamini (alfa – tokoferol)

Evans ve Bishop 1922 yılında ratların diyetine ekşimiş yağ katılarak beslenmeleri sonucu görülen fetal reabsorbsiyonu sebzeledeki herhangi bir maddenin önlediğini bildirmişlerdir. Bu bilinmeyen madde 1924'de Sure tarafından "Vitamin E" olarak isimlendirilmiştir. Ratlar bu bileşiği alarak bir nesil sahibi olduklarından Evans bu bileşiğe (tokos= doğurmak, phero= taşımak ve bileşiğin bir alkol "ol" olması nedeniyle) "tokoferol" adını vermiştir (Horwitt 1979). E vitamininin eksikliği birçok organ ve organ sistemlerinin yapısal ve fonksiyonel anormalliklerine neden olur. Tokoferol alımı kanda E vitamininin artmasına neden olur. E vitamini 1936 yılında Evans tarafından buğday tohumundan izole edilmiştir. E vitamini aktivitesi gösteren 6 doğal tokoferol bulunmaktadır. Tokoferol, kimyaca izoprenoid zinciri ile süstitüe edilmiş 6-hidroksi-tokol türevleridir (Valk ve Hornstra 2000). Tokoferolün kimyasal yapısı Şekil 2.3.'deki gibidir. Tokoferol türevleri Tablo 2.2.'de verilmiştir.



Şekil 2.3. Tokoferolün kimyasal yapısı

Tablo 2.2. Tokoferol türevleri

	<u>R</u>	<u>R''</u>
α	CH ₃	CH ₃ (5,7,8-Trimetil tokol)
β	CH ₃	H (5,8-Dimetil tokol)
γ	H	CH ₃ (7,8-Dimetil tokol)
δ	H	H (8-Metil tokol)

Tokoferoller kroman halkasındaki metil gruplarının sayısı ve yerlerinin farklı olmasıyla birbirlerinden ayrılırlar (Hawk 1965).

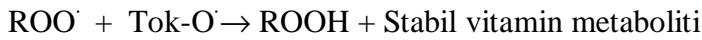
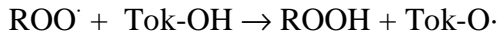
Hayvan ve insan dokularında en az etkili olan tokoferol γ -tokoferoldür. α -tokoferol (5,7,8-trimetil tokol) ise, hayvan dokularında tokoferollerin yaklaşık %90'nını oluşturduğu ve biyolojik aktivitede en fazla rol oynadığı için en önemli tokoferol sayılmaktadır. Erhard Fernholz 1937 ve 1938'de alfa tokoferolün yapısal formülünü ilk olarak ortaya koymuştur. Karrer ve ark. 1938'de ilk olarak alfa tokoferolü sentezlemişlerdir Bu madde doğal olarak d izomeri halinde bulunur ve bu şekli ilaç olarak kullanılır (Evans 1976, Valk ve Hornstra 2000, Wang ve Quinn 1999, Kayaalp 2000).

Tokoferoller açık sarı renkte ve yapışkan kıvamda maddelerdir. Bunlar lipitlerde ve birçok organik çözücüde çözünürler, suda çözünmezler; bununla beraber alfa tokoferolün sodyum fosfat esterini suda çözünürler. Vitamin E ısıya, alkalilere, asitlere ve ışığa karşı dayanıklıdır, fakat ultraviyole ışınlar karşısında kolayca bozulur (Aras 1976, Peter 1993).

E vitamini ince barsaktan, safra varlığında absorbe olur. Tokoferolün büyük kısmı kan dolaşımına lenf yoluyla girer. E vitamini özellikle adipoz dokularda depolanır. Hepatik sitozolde tokoferol bağlayıcı proteinler vardır. Tokoferolün hızlı değişimi plazma lipoproteinleri ve eritrosit membranları arasında oluşur. Hücre içerisinde ise tokoferol mitokondri, mikrozom ve lizozomlarda konsantre olur (Donald ve Harry 1999, Aras 1976).

E vitamininin bilinen en önemli özelliği doğal bir antioksidan olması, peroksitleri ve serbest oksijen radikallerini nötralize edebilmesidir. Hücrelerde membran fosfolipitlerinin doymamış uzun zincirli yağ asitleri (linoleik asit ve araşidonik asit gibi), spontan olarak veya oksidan metabolitlerin sataşması sonucu kolayca oksitlenebilir ve peroksit türevlerine dönüşebilirler. Işığın ve havanın etkisiyle gelişen bu olaya lipid peroksidasyonu veya otooksidasyonu olayı adı verilir. Serbest oksijen radikalleri oluşmasının eşlik ettiği bu olay zincirini membranda önleyen ve oluştuğunda nötralize eden en güçlü antioksidan faktör E vitamini'dir. Bir molekül α -tokoferol 100 molekül doymamış yağ asidinin peroksidasyonunu engelleyebilir. E vitamini, hücre ve subsellüler yapıların membran lipitleri üzerindeki bu etkisi nedeniyle bu membranları oksidatif zedelenmeye karşı korur. Böylece eritrosit membranının stabilitesini artırır; aynı etkiyi diğer hücrelerde de gösterir. Tokoferolün antioksidan etkisi yüksek oksijen konsantrasyonlarında etkilidir (İbrahim 1997, Wang ve Quinn 1999).

E vitamini (Tok-OH), peroksitler üzerindeki nötralize edici etkisini, kendinin bir fenolik hidrojen atomunu peroksil radikaline (ROO \cdot) transfer etmek suretiyle aşağıdaki şekilde iki basamakta yapar:



Birinci basamakta oluşan tokoferoksi radikali yeni bir serbest peroksil radikali ile reaksiyona girer. Sonuçta α -tokoferol serbest olmayan radikal ürününe okside olur. Bu oksidasyon ürünü, glukronik asit ile konjugasyona uğrayarak safra yolu ile atılır. İnsan eritrositlerinin hidrojen peroksit ile in vitro ortamda hemolizi, E vitamini tarafından önlenir. Eritrositlerin hidrojen peroksite duyarlılığının ölçülmesi esasına dayanan in vitro testler, insanda E vitamini eksikliği olup olmadığını ortaya koymak için kullanılırlar. E vitamini membran fosfolipitlerinin peroksidasyonunu engelleyen birinci sıra savunma hattını oluşturur. Selenyum vücutta E vitamini gereksinimini düşürür. Bunun başlıca nedenleri şunlardır: Selenyum, glutatyon peroksidazın fonksiyonel bir ögesi olarak bu enzimi aktif durumda tutar ve peroksidasyona karşı savaşta E vitamininin yükünü azaltır.

Pankreasın ekzokrin fonksiyonunu destekleyerek yağların ve onlarla birlikte E vitamininin sindirimini ve absorpsiyonunu artırır. Selenyum, bilinmeyen bir mekanizma ile E vitamininin plazma lipoproteinleri içinde tutulmasını destekler. Aynı şekilde kükürtlü amino asitler de antioksidan etkinlik gösterirler ve E vitamini gereksinimini azaltırlar (Kayaalp 2000, Peter 1993).

E vitamini besinlerde yaygın olarak bulunduğu ve özellikle, günlük besinin önemli bir miktarını oluşturan hububat türleri (buğday ve ondan hazırlanan besin maddeleri gibi) bu vitamini içerdiklerinden, erişkinlerde dengesiz bir diyet bile günlük gereksinimi karşılayabilir. Düşük E vitamini diyeti beyin ve periferal dokularda α -tokoferol seviyelerinin daha da düşmesi ile sonuçlanırken E vitaminin'den zengin diyetle önemli ölçüde yükselme görülmüştür. Bulgular sebze ve meyvelerle beslenmelerin iyi bilinen antioksidanlara ilave olarak beyin fonksiyonları için önemli olduğunu doğrulamaktadır. Kusurlu yağ emilimi E vitamini yetmezliğine yol açar. Çünkü tokoferol diyetle yağda çözülmüş olarak bulunmakta, yağ sindirimi esnasında açığa çıkmakta ve emilime uğramaktadır. Son yıllarda kullanımı artmış olan balık yağı ve demir destekli diyetlerin vitamin E ile birleştirilmediği zaman oksidasyonu artırdığı ortaya çıkmıştır (Kayaalp 2000, Martin vd 2000).

2.6. Demir

Demir tüm hücreler için gerekli olan esansiyel bir elementtir. En önemli görevi hemoglobin aracılığı ile oksijen taşımaktır. Demir, ferröz (Fe^{+2}) ve ferrik (Fe^{+3}) durumlar arasında birbirine dönüşme özelliği nedeni ile oksijenasyon, hidroksilasyon ve benzeri birçok metabolik olayı katabolize eder. Hemoglobindeki demirin fonksiyonu dokulara oksijen taşımaktır. Hemoglobin dört globin zincirinden oluşan tetramerdir. Her globin zinciri bir demir atomu içeren hem grubuna bağlıdır. Hemoglobinin molekül ağırlığı 66000 daltondur. Eritrosit proteininin %95'ini hemoglobin oluşturur. Miyoglobindeki demir kas kontraksiyonu sırasında oksijenizasyonu sağlar. Normal erişkin bir insanda toplam vücut demiri yaklaşık olarak 4gr (3-5gr) civarındadır. Bunun %60-70 kadarı, yani

2,5 gramı hemoglobinde, 1–1,5 gramı ferritin ve hemosiderin halinde depo demiri olarak başlıca kemik iliği, karaciğer ve dalak olmak üzere retiküloendotelyal sistem organlarında, 0,3–0,5 gramı myoglobin ve hücre solunumu ile ilgili enzimlerde doku demiri halinde ve 3–4 mg kadarı da plazma transport demiri şeklinde plazmada bulunur. Erişkin kadınlarda hemoglobin demiri ile depo demiri miktarı erkeklerden %15–30 kadar daha azdır. Demirin fizyolojik olaylarda kullanılması için hergün belli miktarlarda alınması zorunludur. Normal günlük bir diyetle 10–20 mg demir bulunur. Diyetle alınan bu demirin ancak %5–10 barsaklardan emilir. Hemoglobin ve diğer demir içeren proteinlerin üretiminde kullanılan demir, ya gıdalar ile ya da demirin yeniden kullanıma sunulması ile sağlanmaktadır. Gıdanın içeriğine göre demir içeriği de değişmektedir. Gıdalar içerisinde demir “hem” ve/veya “hem olmayan demir” (nonhem-inorganik) olarak bulunmaktadır. Hem; gastrik asiditeden ve gıdalardaki kompozisyonundan etkilenmeden emilir. Mukozada demir hemden ayrılır ve mukoza hücrelerinden doğrudan plazmaya geçer. (Beşışık 2003).

2.6.1. Demir Emilimi ve Metabolizması

Vücuttaki demir dengesinin regülasyonunda emilimin atılımdan daha büyük bir rolü vardır. Gastrointestinal yolun tamamı demir absorbe etme yeteneğine sahiptir. Fakat en fazla emilim duodenumda ve jejunumun proksimal kısımlarında olur. Demir ferro (Fe^{+2}) halinde kolaylıkla emilir. Ancak besinlerle alınan demirin çoğu (%90) ferri (Fe^{+3}) şeklindedir. Fe^{+3} pH>2 olan ortamlarda çözünemez ve biyoyararlanımı söz konusu olmaz. Mideden demir emilimi çok az düzeydedir. Ancak mide sekresyonları demiri çözündürür ve Fe^{+2} şekline indirgenmesini sağlayan askorbik asit ve diğer maddelerle çözülebilen kompleksler haline gelmesini sağlar. Demirin büyük kısmı ince barsağın üst kısmından emilir. Diğer mukoza hücreleri de demir taşıyabilirler ancak emilime uygun hücrelerin büyük bölümü duodenum ve jejunumun proksimal kısmındadır. Mukoza hücreleri bir hücre içi demir taşıyıcısı içerir. Demirin bir kısmı taşıyıcıdan mitokondrilere verilirken kalan kısım mukoza hücrelerindeki apoferritin ile plazmadaki demir taşıyan bir polipeptit olan transferine paylaşılır (Beşışık 2003, Finch 1994, Ganong 1991).

Diğer birçok dokuda bulunan apoferritin demir ile birleşerek ferritini yapar. İnce bağırsak hücrelerinde ferritine bağlı demir bu hücrelerin yaşamları sona erdiğinde bağırsağa dökülmesi ile kaybedilir ve dışkı ile atılır. Apotransferrin; iki demir atomu bağlayarak transferrine dönüşür. Transferrinin demir bağlama kapasitesi %22-33'tür. Vücut demir depoları boşaldığında veya eritropoez arttığında demir Emilimi artar. Ters durumlarda demir Emilimi azalır. Demir eksikliğinde plazma transferrin miktarı artar ve bunun demirle % saturasyonu azalır. Böylece hücre içi demir taşıyıcısından transferrine daha fazla demir geçer ve daha az demir apoferritine bağlanmış olur. Mukozadaki ferritin depoları azalır ve böylece mukoza hücreleri barsak lümenine döküldüklerinde daha az miktarda demir kaybedilmiş olur. Bunun tersine demir yüklendiği zaman dolaşımdaki transferrin miktarı artar, böylece daha fazla demir apoferritine yönelir. Ferritin depoları artar ve mukoza hücreleri bağırsak lümenine döküldüklerinde daha fazla demir kaybedilmiş olur (Ganong 1991). Ferritin, demiri depolama ve işlev dışı demiri toksik olmayan halde tutma görevi olan bir proteindir. Ferritin vücuttaki bütün hücrelerde bulunabilir. Özellikle karaciğer, dalak ve kemik iliğinde bol miktarda bulunur. Bir ferritin molekülü 4500 demir atomu içeren ferik hidroksifosfat yapısında bir çekirdek ve onun etrafını saran apoprotein kabuktan oluşur, suda çözünebilir (Ganong 1991 ,Worwood 1980).

Ferritin demir depo proteini olmak için bütün özelliklere sahiptir. Öncelikle apoferritin Fe^{+2} 'yi alır ve oksitler. Böylece Fe^{+3} çekirdekte depolanır. İkinci olarak Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye indirgenmesi ile demir salınır. Üçüncü olarak demir apoferritin sentezini stimüle eder. Ferritin tüm hücrelerde ve ayrıca tüm doku sıvılarında bulunur. En fazla bulunduğu yer demir içeren bileşiklerin sentezinin olduğu eritroid ana hücreler ile demir metabolizması ve depolanmasında rol oynayan makrofaj ve hepatositlerdir. İntrasellüler ferritin, düz endoplazmik retikulumda intrasellüler demir azlığı veya yüksekliği durumlarına göre sentez edilir. Normalde plazmadaki ferritin düzeyi hücrel ferritin miktarı ile orantılıdır. Yani plazma ferritin konsantrasyonu vücut demir depolarını yansıtmaktadır. Ferritin suda çözünür. Ferritin düzeyleri toplam vücut demir depolarını yansıtır (Foirbanks ve Beutler 1995, Lipschitz 1974, Ülkü 2001, Worwood 1980).

Total demir bağlama kapasitesi kandaki transferrin miktarının ölçümüyle hesaplanır. Serumda 100 µg/dl demir bulunmaktadır. Bunu bağlamak üzere hazır 250-450 µg/dl transferrin bulunmaktadır. Transferrinin 1/3 kısmı demir ile bağlı olabilmektedir. Demir ile bağlı olmayan kısmı ile serum demiri toplamı, total serum demir bağlama kapasitesini oluşturmaktadır (Foirbanks ve Beutler 1995, Fielding 1980).

2.6.2. Demir Toksisitesi

Demir, Fenton reaksiyonu yoluyla hidroksil radikallerinin oluşmasını sağlarken stabil lipid hidroperoksitlerinin peroksi ve alkoksi radikallerine dönüşümünü hızlandırır. Membran lipitleri ve proteinleri demire bağlı peroksitatif hasara aşırı duyarlılık gösterir. Yüksek doz demir verilen sıçan hepatositlerinde demirin mitokondrilerde intrakristal depolandığı, matriks boşluğunda amorf yoğunluklu yapıların biriktiği ve mitokondriyumlarda şişme olduğu bildirilmiştir. Kronik demir yüklenmesinde dokularda büyük miktarda hemosiderin depolanır. Çoğu hücrelerin hemosiderini lizozomlarda bulunur. Lizozomal membranların haraplanması hidrolitik enzimlerin hücre içine salınmasına neden olur ve sonuç olarak hücre ölür. Lizozomal hemosiderin, demir toksisitesinden doğrudan sorumlu değildir. Ağır kronik demir yüklenmiş hastaların plazmalarında düşük moleküler ağırlıklı demir kompleksleri bulunmuştur. Bu nedenle fare miyokard hücrelerinde sarkolemma membranlarında kırılmaların, demire ve çevresel oksijen konsantrasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir. Akut demir zehirlenmesinde toksik konsantrasyonlardaki demir, mitokondriler ve sitoplazma membranını doğrudan etkiler. Hipotansiyon ve metabolik asidoz gibi birçok klinik görünüm bu organellerin hasarı ile bağlantılıdır (Agil vd 1995, Halliwell 1994, Hershko 1989).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

Cihazlar:

Ayarlanabilir otomatik pipet (Biohit Proline 100 mikrolitre,

Eppendorf Research 1000 mikrolitre),

Dondurucu (-20°C) ve Soğutucu (+4°C),

Elektronik hassas tartı (Sartorius),

Homojenizatör (Art-micra D-8) ,

pH metre (pH Meter WTW),

Santrifüj (Nüve NF 1215),

Sıcaklığı ayarlanabilir su banyosu (BM402 Nüve),

Soğutmalı santrifüj (Hettich Micro22-R),

Vorteks (Combi-Spin Biosan),

Spektrofotometre (Shimadzu UV-visible Spectrophotometer UV-1601),

Otoanalizör (Roche- Hitachi Modular PE)

Kimyasal Maddeler:

Metafosforik asit (Merck),

EDTA (Sigma),

NaCl (Merck),

Sodyum hidrojenfosfat (Sigma),

Sodyum sitrat (Merck),

DTNB [5,5'-dithiobis (2- nitrobenzoik asit)] (Merck),

Sodyum dodesil sülfat (Merck),

Glasiyel asetik asit (Sigma),

Tiyobarbitürik asit (Merck),

KCl (Merck), Na₂CO₃ (Merck),

Na-K Tartarat (Merck),

NaOH (Merck),

CuSO₄-5H₂O (Merck),

Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi (Merck),

α -tocopherol acetate semisentetik (Sigma),

Iron-dextran (Sigma),

Carbonyl-iron (Merck)

3.2. Deney Hayvanları ve Deney Protokolü

Çalışmamızda Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları merkezinden sağlanan, 50 adet 10 aylık erişkin, ortalama 200 gram ağırlığında dişi Wistar albino sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar 23±2°C sabit sıcaklıkta bir odada tutuldular.

50 adet dişi sıçan rasgele beş eşit gruba ayrıldı. Kontrol grubuna 6 hafta süreyle normal diyet uygulandı. İkinci gruba demir dekstran haftada 3 doz olmak üzere iki hafta süreyle toplam 6 doz şeklinde 100 mg/kg intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı (Zhao vd 2004). Üçüncü gruba ikinci gruptaki gibi i.p. demir dekstran yanında 6 hafta süreyle her gün 200 mg/kg i.p. α -tokoferol asetat verildi (Yanardag vd 2001). Dördüncü gruba 6 hafta süreyle %2.5 (w/w) oranında karbonil demir ilaveli diyet uygulandı. Beşinci gruba karbonil demir ilaveli diyet yanında 6 hafta süreyle her gün 200 mg/kg i.p. α -tokoferol asetat verildi (Galleano vd 2002)

6 haftanın sonunda Ketamin (90mg/kg)/Xylazin (10mg/kg) anestezisi altında her sıçanın karaciğer dokusu alındı, dokular GSH ve MDA ölçümleri için kullanılmak üzere analiz gününe kadar -20 °C'de saklandı. Sıçanların kalbinden alınan kan demir analizinde kullanılmak üzere analiz gününe kadar -20°C'de saklandı.

3.3. Homojenizasyon

0.15 N KCl tamponu ile 1:10 dilüe edilen karaciğer dokuları buz içerisinde homojenize edilmiştir.

3.4. Protein Tayini (Lowry Yöntemi):

Yöntemin esası fosfotungstik asit-fosfomolibdik asit reaktifinin fenolik grup içeren çeşitli kimyasal maddelerle reaksiyonunun mavi renk vermesidir. Proteinlerin alkali ortamda bakırla inkübasyonu bu reaksiyonu 3-15 kat artırır. Mavi renk fosfotungstik asit ve fosfomolibdik asitin, bakır-protein kompleksi ile proteinlerin triptofan ve tirozin içeren rezidüleri tarafından, molibden mavisi ve tungsten mavisine dönmesiyle oluşmaktadır (Daughaday vd 1952).

Kullanılan Reaktifler

Alkali Tartarat Reaktifi: 20 gr Na₂CO₃ ve 0.5 gr Na-K Tartarat 1 litre 0.1 N NaOH çözeltisinde çözüldü.

Alkali Tartarat-Bakır Reaktifi: % 0.1 (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi hazırlanır. Her deneyden önce bu çözeltiden 5 ml alınıp 45 ml alkali tartarat çözeltisi ile karıştırıldı.

Folin-Ciocalteu Reaktifinin Dilüsyonu: 1ml reaktif distile suyla 50 ml'ye tamamlandı.

	Kör	Örnek
Distile su	25 µl	–
Alkali bakır tartarat	4.5 ml	4.5 ml
Örnek	–	25 µl
Tüpler karıştırıldı ve 15 dakika bekletildi		
Folin ciocalteu reaktifi	0.5 ml	0.5 ml
30 dk bekletildi ve 700 nm'de okundu		

Protein Standart Eğrisinin Hazırlanması:

BSA (sığır serum albümini) stoğundan konsantrasyonları 2-50 µg aralığında olan standartlar hazırlanıp deney protokolüne uygulandı. Elde edilen optik dansitelerin konsantrasyona karşı grafiği çizildi ve grafiğin eğimi protein hesaplamalarında kullanıldı.

3.5. Malondialdehit Tayini

Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan MDA'nın TBA (2-thiobarbitürik asit) ile sıcak asidik ortamda reaksiyonu sonucu oluşan rengin spektrofotometrik olarak 532 nm'de köre karşı absorbansının ölçülmesi ile MDA düzeyleri saptandı (Ohkawa vd 1979).

Kullanılan Reaktifler

Sodyum Dodesil Sülfat: 8.1 gram madde 100 ml distile suda çözüldü.

Asetat Tamponu: 20 ml asetik asit toplam 100 ml olacak şekilde distile su ile karıştırıldı. Sonra 2.5 N NaOH ile pH 3.5 olana kadar pH Metre ile ayarlanarak hazırlandı.

Tiyobarbitürik asit solüsyonu: 0.8 gram madde toplam 100 ml olacak şekilde distile suda çözülerek hazırlandı.

	Standart	Örnek	Kör
Homojenat	–	0.2 ml	–
Standart	0.2 ml	–	–
Distile su	0.8 ml	0.8 ml	1 ml
TBA	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
Asetik asit	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
Sodyumdodesil sülfat	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml

Tabloya göre hazırlanan içerikteki tüpler vorteksledi. 95° C su banyosunda 1 saat boyunca kaynamaya bırakıldı. Süre bitiminde tüpler soğutulup içerikleri santrifüj tüpüne aktarıldı. 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Üzerlerindeki berrak sıvı alınıp örnek ve standartların absorbansları 532 nm’de köre karşı okutuldu. Doku MDA düzeyleri nmol MDA/mg protein olarak hesaplandı.

MDA Standart Eğrisinin Hazırlanması:

Standart eğri MDA stoğundan hazırlanan 4-64 nmol/ml aralığındaki 5 standardın deney protokolüne göre okutulmasıyla elde edildi. Grafikten eğrinin eğimi bulunarak bu değer ölçümlerde MDA konsantrasyonunun hesaplanmasında kullanıldı.

3.6. Doku Redükte Glutatyon (GSH) Tayini

Yöntemin esası doku homojenatlarındaki GSH’nın DTNB ile renklendirilmesine dayanmaktadır. 1 mol sülfidriyle karşılık 1 mol 2-nitro-5-merkaptobenzoik asit oluşmaktadır. Oluşan renkli kompleks 412 nm’de spektrofotometre ile ölçülür (Sedlak ve Lindsay 1968).

Kullanılan Reaktifler

Protein çöktürme solüsyonu: 1.67 gram metafosforik asit, 0.2 gram EDTA, 30 gram NaCl toplam 100 ml olacak şekilde distile suda çözüldü.

DTNB solüsyonu: 1 gram sodyum sitrat ve 40 mg DTNB toplam 100 ml olacak şekilde distile suda çözüldü.

0.3 M Fosfat solüsyonu: 10.65 gram sodyumhidrojen fosfat toplam 250 ml olacak şekilde distile suda çözüldü.

0.5 ml homojenata 1.5 ml KCl ve 3 ml protein çöktürme solüsyonu eklendikten sonra 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatan ayrıldı.

	Kör	Örnek	Standart
Protein çöktürme sol.	0,5 ml	–	–
Supernatan	–	0,5 ml	–
Standart	–	–	0,5 ml
Fosfat solüsyonu	2 ml	2 ml	2 ml
DTNB sol.	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml

Tabloya göre hazırlanan içerikteki tüplerde örnek ve standart absorbansları köre karşı 412 nm'de okundu. Doku GSH düzeyleri $\mu\text{mol/g}$ protein olarak hesaplandı.

GSH Standart Eğrisinin Hazırlanması:

GSH stoğundan 6.25 mg tartılıp toplam 100 ml olacak şekilde distile suda çözülerek standartlar hazırlanıp deney protokolü uygulandı. Elde edilen optik dansitelerin konsantrasyona karşı grafiği çizildi ve grafiğin eğimi GSH hesaplamalarında kullanıldı.

3.7. Serum Demir Tayini

Transferin- demir kompleksi, düşük pH'da ($\text{pH} < 2$) apotransferin ve ferrik demire dönüşür. Askorbat varlığında ferrik demir ferröz demire indirgenir. Ferröz demirin kromojen FerroZine ile reaksiyonu sonucunda renkli bir kompleks meydana gelir. Renk yoğunluğu demir konsantrasyonu ile doğrudan orantılıdır. Fotometrik olarak ölçülür.

Ölçümler Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında otoanalizörle (Roche-Hitachi Modular PE) yapılmıştır. Sonuçlar $\mu\text{g/dl}$ olarak verilmiştir.

3.8. İstatistiksel Yöntem

İstatistiksel değerlendirme SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 10.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Bütün değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. Bütün parametreler için, grupların karşılaştırılması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizini (ANOVA) takiben Bonferroni testiyle değerlendirilmiştir. $p<0.05$ 'den küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

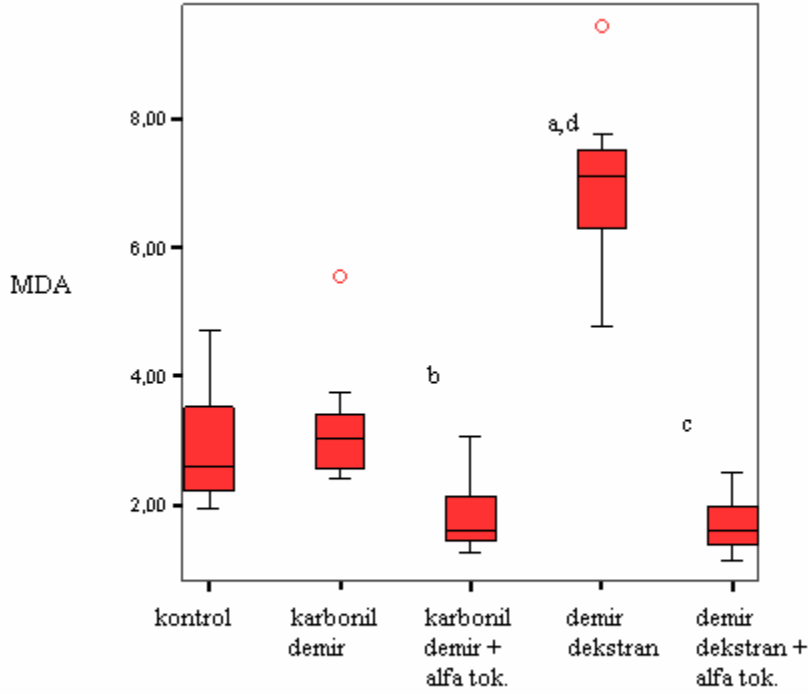
4. BULGULAR

4.1. Karaciğer MDA Düzeyleri

Kontrol grubunda karaciğer MDA düzeyi 2.85 ± 0.9 nmol/mg protein iken oral karbonil demir verilen grupta 3.23 ± 0.93 nmol/mg protein, i.p. demir dekstran verilen grupta 6.97 ± 1.26 nmol/mg protein bulunmuştur ($p < 0.001$).

Demir dekstran verilen grupta MDA artışının oral karbonil demir verilen gruba göre daha fazla olduğu görülmüştür ($p < 0.05$).

Alfa tokoferol verilmesiyle oral karbonil demir verilen grupta MDA düzeyi 1.79 ± 0.55 nmol/mg protein, i.p. demir dekstran verilen grupta 1.71 ± 0.46 nmol/mg protein olarak saptanmıştır (sırasıyla $p < 0.05$; $p < 0.001$). Gruplara ait karaciğer doku MDA düzeyleri Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

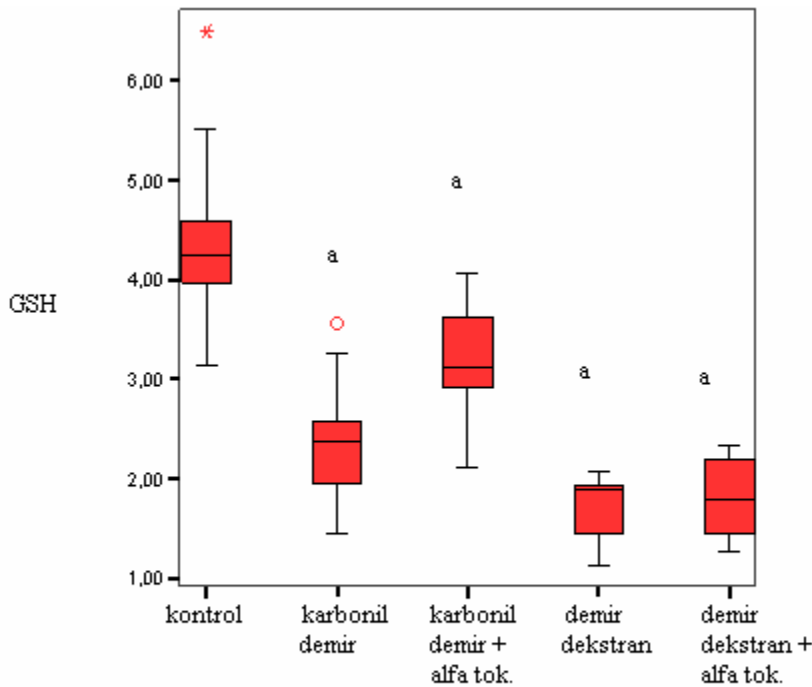


Şekil 4.1. Gruplarda karaciğer doku MDA düzeyleri (nmol / mg protein)

(Ort \pm std sapma, n=10, a: $p < 0,001$ kontrole göre, b: $p < 0,05$ karbonil demir grubuna göre, c: $p < 0,001$ demir dekstran grubuna göre, d: $p < 0,05$ karbonil demir grubuna göre)

4.2. Karaciğer GSH Düzeyleri

GSH düzeyleri kontrol grubunda (Grup 1) 4.4 ± 0.99 , oral karbonil demir verilen grupta (Grup 2) 2.35 ± 0.69 , oral karbonil demir ile birlikte i.p. α -tokoferol asetat verilen grupta (Grup 3) 3.19 ± 0.61 , i.p. demir dekstran alan grupta (Grup 4) 1.74 ± 0.31 , i.p. demir dekstran ile birlikte i.p. α -tokoferol asetat verilen grupta (Grup 5) 1.82 ± 0.37 'dir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında diğer tüm gruplarda karaciğer GSH düzeyi anlamlı olarak düşüktür ($p < 0.05$). Gruplara ait karaciğer doku GSH düzeyleri Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Gruplarda karaciğer doku GSH düzeyleri ($\mu\text{mol/g}$ protein)

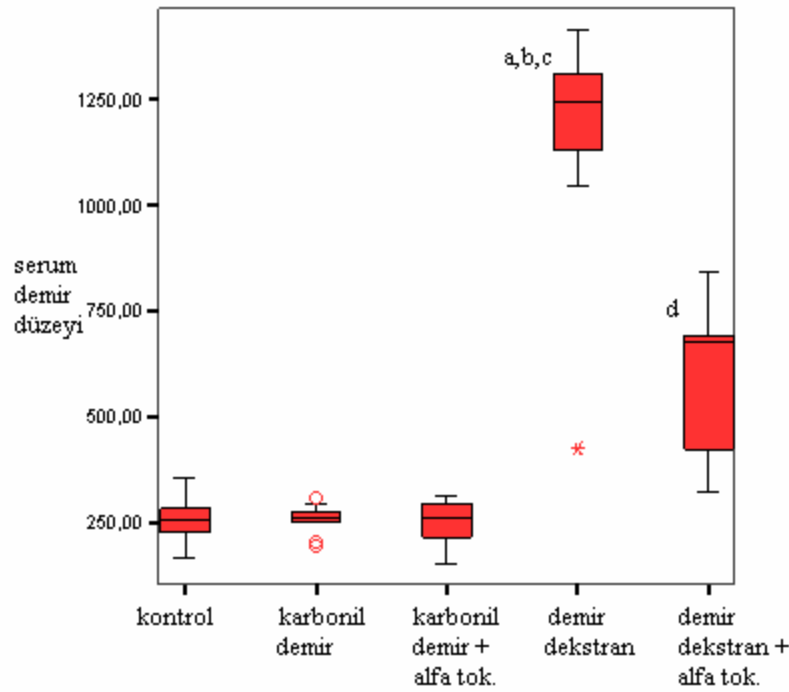
(Ort \pm std sapma, n=10, a: $p<0,05$ kontrole göre)

4.3. Serum Demir Düzeyleri

Deney gruplarındaki değerler sırası ile kontrol grubu (Grup 1) için 255.3 ± 51.49 , oral karbonil demir verilen grup (Grup 2) için 254.6 ± 35.37 , oral karbonil demir ile birlikte ip α -tokoferol asetat alan grup (Grup 3) için 249 ± 52.49 , i.p. demir dekstran alan grup (Grup 4) için 1168.4 ± 281.08 , i.p. demir dekstran ile birlikte i.p. α -tokoferol asetat alan grup (Grup 5) için 611.4 ± 168.45 'tir.

Demir düzeyinin, i.p. demir dekstran verilen grupta (Grup 4); kontrol grubuna (grup1), oral karbonil demir verilen gruba (Grup 2) ve i.p. demir dekstran ile i.p. α -tokoferol asetat verilen gruba (Grup 5) göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0.05$).

Demir düzeyinin, i.p. demir dekstran ile birlikte α -tokoferol asetat verilen grupta (Grup 5) oral karbonil demir ile birlikte i.p. α -tokoferol asetat verilen gruba (Grup 3) göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Gruplara ait serum demir düzeyleri Şekil 4.3.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Gruplarda serum demir düzeyleri ($\mu\text{g} / \text{dl}$)

(Ort \pm std sapma, n=10, a: $p<0,05$ kontrole göre, b: $p<0,05$ karbonil demire göre, c: $p<0,05$ demir dekstran + alfa tok.'e göre, d: $p<0,05$ karbonil demir + alfa tok.'e göre)

Ölçülen parametrelere ait bulunan değerler ort \pm std sapma olarak Tablo 4.1.' de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Ölçülen parametrelere ait bulunan değerler

Grup	N	Ölçülen parametrelerin bulunan değerleri		
		KC MDA düzeyi (nmol/mg protein) ort \pm std sapma	KC GSH düzeyi (μ mol/g protein) ort \pm std sapma	Serum Fe düzeyi (μ g/dl) ort \pm std sapma
Kontrol	10	2.85 \pm 0.90	4.40 \pm 0.99	255.30 \pm 51.49
Oral karbonil demir	10	3.23 \pm 0.93	2.35 \pm 0.69	254.60 \pm 35.37
I.p. demir dekstran	10	6.97 \pm 1.26	1.74 \pm 0.31	1168.40 \pm 281.08
Oral kar. demir + α -tok.	10	1.79 \pm 0.55	3.19 \pm 0.61	249 \pm 52.49
I.p. demir deks. + α -tok.	10	1.71 \pm 0.46	1.82 \pm 0.37	611.40 \pm 168.45

5. TARTIŞMA

Fizyolojik pH'da Fe^{+3} oksihidroksit polimerleri şeklinde çöker. Fe^{+2} çözülmüş haldedir fakat stabil değildir. Fe^{+2} moleküler oksijen ile reaksiyona girerek Fe^{+3} ve süperoksit oluşturma eğilimindedir. Bununla birlikte akut demir toksisitesi nadirdir ve genellikle karaciğer üzerine etkilidir. Yüksek demir konsantrasyonu birçok patolojik olaya sebep olur (Tenenbein 2001).

Diyete karbonil demir ilavesiyle yapılan demir yüklemesi iyi bir modeldir. Birikim na olarak hepatositlerde gözlenir (Powell vd 1980). Demir yüklemesi için ikinci bir yol intraperitoneal olarak demir dekstran verilmesidir (Dillard vd 1984, Galleano ve Puntarulo 1992, Suzer 2000). Zhao ve arkadaşları (2004) farelere i.p. demir dekstran yükleyerek yaptıkları çalışmada kontrole göre karaciğer ve serum düzeyinde anlamlı artış buldular. Hepatik antioksidan düzeyi normalin sadece %60'idi.

Çalışmamızda intraperitoneal demir uygulanan gruplarda serum demir konsantrasyonu oral demir uygulanan gruba göre daha yüksek bulunmuştur. Bu da oral demirin emiliminin az olmasından kaynaklanmaktadır. Çünkü diyetle alınan demirin %5-10'u emilebilmektedir. Plazma demir miktarının az olduğu durumlarda demir emiliminin artması, fazla olduğu durumlarda azalması oral yolla demir toksisitesi olasılığını azaltmaktadır.

Demir, Fenton veya Haber-Weiss reaksiyonlarının katalizörü olarak reaktif oksijen türlerinin üretiminde önemli rol oynar (Ryan ve Aust 1992). Oksijen türevli bu radikaller oksidatif stres yaratabilirler. Hücresel proteinlere ve nükleik asitlere zarar verebilirler. Lipit peroksidasyonunu başlatarak hücre zarlarına da zarar verebilirler. Farklı deneysel sistemlerde demirin hepatic lipit peroksidasyonunu başlattığı gösterilmiştir (Valerio ve Petersen 1998, Knutson vd 2000). Haber –Weiss reaksiyonu sonucu hidroksil radikali

meydana gelir. Oral karbonil demir alan ratlarda mitokondrial lipit peroksidasyonu meydana geldiği gözlemlenmiştir (Bacon vd 1983). Diyetel demir kısıtlamasının karaciğerdeki lipit peroksidasyonunu azalttığı ortaya konmuştur (Rao ve Jagadeesan 1996). Lipit peroksidasyonu sonucu malondialdehit gibi sitotoksik ürünler meydana gelmektedir (Esterbauer vd 1991). Levine ve arkadaşları (1990) diyetel demir yüklenen ratların karaciğer homojenatlarında TBARS (thiobarbituric acid reactive species) içeriğinde kontrole göre %28 artış saptamışlardır. Alfa tokoferol desteği ile TBARS içeriğinde %35 azalma meydana gelmiştir. Zhao ve arkadaşları (2004) farelere i.p. demir dekstran yükleyerek yaptıkları çalışmada kontrole göre karaciğer TBARS düzeyini iki kat fazla buldular.

Çalışmamızda ratlara oral ve intraperitoneal yolla demir yüklemesi yapılmıştır. Çalışma süresi sonunda karaciğer dokusu malondialdehit (MDA) düzeylerine bakıldığında; MDA düzeyinin, ip demir dekstran alan grupta; kontrol grubuna, oral karbonil demir alan gruba ve ip demir dekstranla birlikte ip α -tokoferol asetat alan gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.05$, $p<0.05$). Demirin oral yolla verilmesinin karaciğerde oluşturduğu oksidatif stresin göstergesi olan MDA düzeylerinin düşük olması, bu yolla demir emiliminin az olmasından kaynaklanabilir.

E vitamini (alfa tokoferol), lipit peroksidasyonuna ait biyokimyasal reaksiyonların akışını durdurur. Birçok çalışmada demir kaynaklı lipit peroksidasyonunu etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (Sharma vd 1990, Wagner vd 1996). Peroksil radikallerini yakalayabilir (Tappel 1980). Diyetle aşırı dozda demir alan ratlarda plazma ve karaciğer alfa tokoferol düzeyi düşmüştür (Dabbagh 1994). E vitamininden yoksun diyet alan hayvanlarda demir yüklemesi sonucu lipit oksidasyon ürünleri oluşumu artmıştır (Chow 1991). E vitamini demir yüklemesi sonucu oluşan aldehit yapılı peroksidasyon ürünlerinin düzeyini azaltmıştır (Parkkila vd 1996).

Çalışmamızda; i.p. demir dekstran verilen grup ile karşılaştırıldığında demir dekstran ile birlikte alfa tokoferol verilen grupta karaciğer MDA düzeyinin anlamlı olarak düşük

olması ($p<0.05$) E vitaminin ROS oluşumunun eşlik ettiği peroksidasyonun membranda oluşumunu önlediğini veya oluştuğunda nötralize ettiğini akla getirir.

Glutasyon vücut için önemli bileşiklerden biridir. Önemi, indirgeyici özelliğinden dolayı hücresel bütünlüğü sağlamasından ileri gelir (Meister ve Anderson 1983). İndirgeyici özelliği nedeniyle redoks ajanları veya geçiş metalleri ile kombinasyonunda metal iyonlarının ve diğer ajanların redoks hallerini ayarlayabilir ve böylece ROS oluşum oranını etkiler (Sakurai vd 1992, Shi vd 1993). Membran lipid peroksidasyonu sonucu oluşan reaktif α,β -ansatüre aldehitleri detoksifiye etmenin en önemli yollarından biri onları GSH ile konjuge hale getirmektir (Hartley vd 1995). Demir dekstran verilen ratlarda karaciğerin GSH düzeyinde %26-33 oranında bir azalma meydana gelmiştir (Valenzuela vd 1983).

Çalışmamızda GSH düzeyinin tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır. Bu da GSH'nin, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve organik peroksitlerin glutasyon peroksidaz etkisi ile indirgenmesinde ve ksenobiyotiklerin merkaptürat yolu ile detoksifikasyonunda yer alması ile ilişkilidir. Böylece redükte glutasyon meydana gelmekte ve doku GSH düzeyi azalmaktadır. E vitaminine bağlı peroksidasyon zincirinin kırılması sonucu E vitamini verilen gruplarda GSH oranı daha fazla bulunmuştur.

E vitaminin tamamen okside olmuş hali inaktiftir. GSH'nin E vitaminin indirgenmesi ve rejenerasyonunda rolü olduğu çalışmalarda ileri sürülmüştür (Graham vd 1989, Leedle ve Aust 1990). Karbonil demir yüklenen ratlarda karaciğer GSH içeriğinde ve GSH/GSSG oranında azalma meydana gelmiştir (Pietrangelo 2003). Deferoksamin gibi demir şelatörleri demir takviyeli diyetle beslenen ve normal diyet alan farelerde karaciğerdeki MDA oluşumu azaltmaktadır ve GSH düzeyini arttırmaktadır (Eybl 2002).

6. SONUÇ

Demir yüklemesi yapılan ratlarda serbest radikal kaynaklı lipit peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit düzeylerinde anlamlı artış gözlenmiştir. Ancak yapılan alfa tokoferol takviyesi sonucu E vitamininin antioksidan özelliği dolayısıyla MDA düzeylerinde azalma saptanmıştır. Kontrol grubuna göre diğer tüm gruplarda karaciğer redükte glutatyon düzeyinde azalma gözlemlenmiştir. Bu azalma serbest radikallerin detoksifikasyonu sırasında GSH'ın GSSG'ye yükseltgenmesinin sonucu olabilmektedir. Demir toksisitesinde alfa tokoferolün koruyucu etkisi olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Agil, A., Fuller, C. J., Jialal, I. (1995). Susceptibility of plasma to ferrous iron/hydrogen peroxide-mediate oxidation: demonstration of a possible Fenton reaction. *Clin. Chem.*, 41: 220-225.
- Aras, K., Ersen, G., Karahan, S. (1976). Tibbi Biyokimya-Vitaminler. Ankara Üniv Basimevi Ankara.
- Babior, BM. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *The Amer. J. Med.*, 109(1): 33-44.
- Bacon, B.R., Tavill, A.S., Brittenham, G.M., Park, C.H., Recknagel, R.O. (1983). Hepatic lipid peroxidation in vivo in rats with chronic iron overload. *J. Clin. Invest.*, 71: 429-439.
- Beşışık, SK. (2003). Demir eksikliği anemisi, Klinik Hematoloji Nobel Tıp Kitabevleri. 4: 47-62.
- Beutler, E., Duron, O., Kelly, BM. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.*, 61:882-888.
- Beyer, CE., Steketee, JD., Saphier, D. (1998). Antioxidant properties of melatonin-an emerging mystery. *Biochem. Pharmacol.*, 56: 1265-1272.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414: 813-820.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., Ravanat, J-L. (2003). Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res.*, 531: 5-23.
- Chao, JC., Huang, CH., Wu, SJ., Yang, SC., Chang, NC., Shieh, MJ., Lo, PN. (2002). Effects of beta-carotene, vitamin C and E on antioxidant status in hyperlipipemic smokers. *J. Nutr. Biochem.*, 13:427-434.
- Chow, C.K. (1991) Vitamin E and oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.*, 11: 215-232.
- Cooke, MS., Evans, MD., Dizdaroglu, M., Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage mechanisms, mutation, and disease. *Faseb J.*, 17(10): 1195-214, Review.
- Dabbagh, A.J., Mannion, T., Lynch, S.M., Frei, B. (1994). The effect of iron overload on rat plasma and liver oxidant status in vivo. *Biochem. J.*, 300: 799-803.
- Daughaday, W.H., Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fields, W.S. (1952). Determination of cerebrospinal fluid protein with Folin phenol reagent. *J. Lab. Clin. Med.*, 39: 663-665.
- Demir, S., Özkurt, S., Köseoğlu, MH., Enli, Y., Aslan, D. (2001). Sigara içiminin plazma lipid peroksidasyonuna etkisi. *Solunum* 3(2): 54-56
- Dillard, C.J., Downey, J.E., Tappel, A.L. (1984). Effect of antioxidants on lipid peroxidation in iron-loaded rats. *Lipids*, 19: 127-133.
- Donald, B., Harry, LG. (1999). Vitamins. In: Carl AB, Edward RA,ed., Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Saunders Company, London, 1005-1007.
- Esterbauer, H., Schus, R.J., Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.*, 11: 81-128.

- Evans, HM. (1976). The pioneer history of vitamin E. *Vitamins and Hormons* 20: 379.
- Eybl, V., Kotyzova, D., Kolek, M., Koutensky, J., Nielsen, P. (2002). The influence of deferiprone (L1) and deferoxamine on iron and essential element tissue level and parameters of oxidative status in dietary iron-loaded mice. *Toxicol. Letters* 128: 169-175.
- Fang, YZ., Yang, S., Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18: 872-879.
- Feredioon, S., Janitha, PK., Wanasundara, PD. (1992). Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32(1): 67-103.
- Fielding, J. (1980). Serum Iron and Iron Binding Capacity. Iron Newyork. *Churchill Livingstone*, 2: 15-37.
- Finch, C. (1994). Regulators of iron balance in humans. *Blood*, vol 84, no 6: 1697-1702.
- Fairbanks, VF., Beutler, E. (1995). Iron Deficiency. Williams Hematology 5th edition USA Mc Grow-Hill. 46:490-506.
- Galleano, M., Aimo, Lucila., Puntarulo, S. (2002). Ascorbylradical/ascorbate ratio in plasma from iron overload rats as oxidative stress indicator. *Toxicol. Letters*, 133: 193-201.
- Galleano, M., Puntarulo S. (1992). Hepatic chemiluminescence and lipid peroxidation in mild iron overload. *Toxicol.*, 76: 27-38.
- Ganong, WF. (1991). Digestion and Absorption. Review of Medical Physiology. 15th Edition. *Appleton And Lange*, 25: 437-447.
- Graham, K.S., Channa Reddy, C., Scholz, R.W. (1989). Reduced glutathione effects on α -tocopherol concentration of rat liver microsomes undergoing NADPH-dependent lipid peroxidation. *Lipids*, 24: 909-914.
- Green, K., Brand, MD., Murphy, MP. (2004). Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 53 (Supplement 1), 110-118.
- Gutteridge, JM. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.*, 41(12 Pt 2): 1819-1828.
- Gutteridge, JMC. (1992). Iron and oxygen radicals in brain. *Ann. Neurol.*, 32: 16-21.
- Halliwell, B. (1991). Drug antioxidant effects. *Drugs*, 42(4) : 569 - 605.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence. *Lancet*; 334: 721-724.
- Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.*, 49(10): 1341-1348.
- Halliwell, B., Aruoma, OI. (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*, 281: 9-19.
- Halliwell, B, Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57 (Suppl.): 715-725.
- Halliwell, B, Gutteridge, JMC. (1990). *Arch. Biochem. Biophys.*, 280: 1-8.
- Halliwell, B, Gutteridge, JMC. (2001). Free Radicals in Biology and Medicine, Third Edition, Oxford Science Publications, 22-24.
- Hartley, DP., Ruth, J.A., Petersen, D.R. (1995). The hepatocellular metabolism of 4-hydroxynonenal by alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and glutathione-S-transferase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 10:197-205.
- Hawk, PB. (1965). Hawk's Physiological Chemistry. 14th edition: New York: McGraw-Hill.

- Hershko, C. (1989). Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Sem. Hematol.*, 26: 277-285.
- Horwitt, MK. (1979). Vitamin E: A reexamination. *The Amer. J. Clin. Nutr.*, 29: 568.
- Ibrahim, W., Lee, US., Yeh, CC., Szabo, J., Bruckner, G., Chow, CK. (1997). Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver: effects of dietary lipit, vitamin E and iron. *J. Nutr.*, 127(7): 1401-1406.
- Kayaalp, O. (2000). Tıbbi Farmakoloji, 2.cilt, 9.Baskı, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti. s 1559-1562.
- Kehrer, J.P., Smith, C.V.(1994). Free radicals in biology: sources, reactives and roles in etiology of human diseases. Ed: Frei B., Natural Antioxidants in human health and disease, *Academic Pres.*, San Diego s: 25-62.
- Khachik, F., Carvalho, L., Bernstein, PS., Muir, GJ., Zhao, DY., Katz, NB. (2002) Chemistry, distribution and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. *Exp. Biol. Med.*, 227(10): 845-851, Review.
- Kim, YG., Kim, SK., Kwon, JW., Park, OJ., Kim, SG., Kim, YC., et al. (2003). Effects of cysteine on amino acid concentrations and transsulfuration enzyme activities in rat liver with protein-calorie malnutrition. *Life Sci.*, 72: 1171-81.
- Knutson, M.D., Walter, P.B., Ames, B.N., Viteri, F.E. (2000). Both iron deficiency and daily iron supplementes increase lipit peroxidation in rats. *Toxicol.*, 130: 621-628.
- Leedle, A., Aust, S.D. (1990). The effect of glutathione on the vitamin E requirement for inhibition of liver microsomal lipit peroxidation. *Lipits*, 25: 241-245.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver C.N., Amici, A., Climent, I., Ahn, G., Shaltiel, S., Stadtman, E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, 186: 464-478.
- Lipschitz, DA., Cook, JD., Finch. CA. (1974). A clinical evaluation of serum ferritin an index of iron stores. *New Eng. J. Med.*, 30: 1213-1216.
- Mannervik, B. (1985). Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, 113: 490-495.
- Marceau, N., Aspin, N. (1973). The intracellular distribution of radio-copper derived from ceruloplasmin and from albumin, *Biochem. Biophys. Acta.*, 328: 338-350.
- Martin, A., Prior, R., Shukitt- Hale, B. et al. (2000). Effect of fruits, vegetables, or E vitamin-rich diet on vitamins and C distribution in peripheral and brain tissues : implications for brain function. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 55: 144-151
- McCord, JM. (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.*, 312: 159-163.
- Meister, A., Anderson, M.E. (1983). Glutathione, *Ann. Rev. Biochem.*, 52 : 711-760.
- Mudway, IS., Blomberg, A., Frew, AJ., Holgate, ST., Sandstrom, T., Kelly, FJ. (1999). Antioxidant consumption and repletion kinetics in nasal lavage fluid following exposure of healthy human volunteers to ozone. *Eur. Respir. J.*, 13: 1429-1438.
- Nair, V., Cooper, CS., Vietti, DE., Turner, GA. (1986). The chemistry of lipit peroxidation metabolites: crosslinking reactions of malondialdehyde. *Lipits*, 21(1): 6-10.
- Necheles, T.F., Boles, T.A., Allen, D.M. (1968). Erythrocyte glutathione peroxidase deficiency and hemolytic disease of the newborn infant. *The J. Ped.*, 72(3): 319-324.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for Lipit Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Ann. Biochem.*, 95: 351-358.

- Parcell S. (2002). Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern. Med. Rev.*, 7: 22-44.
- Parkkila, S., Niemela, O., Britton, R.S., Brown, K.E., Yla-Herttuala, S., O'Neill, R., Bacon, B.R. (1996). Vitamin E decreases hepatic levels of aldehyde-derived peroxidation products in rats with iron overload. *Am. J. Physiol.*, 270: G376-G384.
- Peter, AM. (1993). Yağda Çözünen Vitaminlerin Yapı ve Fonksiyonu. In: Murray RK, Darly KG, Peter AM, Victor WR, ed., Harper'ın Biyokimyası, Barış Kitabevi, İstanbul, 704-714.
- Pietrangelo, A., (2003). Iron-induced oxidant stress in alcoholic liver fibrogenesis. *Alcohol*, 30: 121-129
- Powell, L.W., Bassett, M.L., Halliday, J.W. (1980). Hemochromatosis. *Gastroenterology*, 78: 374-381.
- Rao, J., Jagadeesan, V. (1996). Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in iron deficiency and effect of carcinogen feeding. *Free Radic. Biol. Med.*, 21 pp. 103-108.
- Reiter, RJ., Tan, DX., Osuna, C., Gitto, E. (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J. Biomed. Sci.*, 7: 444- 458.
- Ryan, T.P., Aust, S.D. (1992). The role of iron in oxygen-mediated toxicities, *Crit. Rev. Toxicol.*, 22 (1): 119-141.
- Sakurai, K., Haga, K., Ogiso, T. (1992). Effect of glutathion on lambda deoxyribonucleic acid strand breaks in the reaction system of glutathion-alloxan in the presence of Fe⁺³-ethylenediaminetetraacetic acid, *Chem. Pharm. Bull.*, 40: 2147-2150.
- Sedlak, J., Lindsay, RH. (1968). Estimation of total protein-bound and non-protein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, 25:192-205.
- Shacter, E. (2000). Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab. Rev.*, 32: 307-326.
- Sharma, B.K., Bacon, B.R., Britton, R.S., Park, C.H., Magiera, C.J., O'Neil, R., Dalton, N., Smanik, P., Speroff, T. (1990). Prevention of hepatocyte injury and lipid peroxidation by iron chelators and α -tocopherol in isolated iron loaded hepatocytes. *Hepatology*, 12: 31-39.
- Shi, X., Dalal, NS. (1992). The role of superoxide radical in chromium(VI)-generated hydroxyl radical: The Cr(VI) Haber-Weiss cycle. *Arch. Biochem. Biophys.*, 292 (1): 323-327.
- Shi, X.L., Dalal, N.S., Kasprazk, K.S. (1993). Generation of free radicals from model lipid hydroperoxides and H₂O₂ by Co(II) in the presence of cysteinyl and histidyl chelators, *Chem. Res. Toxicol.*, 6: 277-283.
- Sies H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.*, 27(9-10): 916-921.
- Southorn, PA., Powis, G. (1988). Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin. Proc.*, 63: 390-408.
- Sözmen, EY. (2002). Yaşlanma Biyokimyası. In Onat T, Emerk K, Sözmen EY (Eds) İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara pp: 665-674.
- Stadtman, ER., Levine, RL. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25: 207-218.
- Stahl, W., Sies, H. (2002). Introduction: Reactive oxygen species. *Res. Monographs*, 1-2.

- Suzer, T., Coskun, E., Demir, S., Tahta, K. (2000). Lipid peroxidation and glutathione levels after cortical injection of ferric chloride in rats: effect of trimetazidine and deferoxamine. *Res. Exp. Med.*, 199: 223-229.
- Tappel, A.L. (1980). Vitamin E and selenium protection from in vivo lipid peroxidation. *Ann. New York Acad. Sci.*, 355: 18-31.
- Tenenbein, M. (2001). Hepatotoxicity in acute iron poisoning. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 39(7): 721-726.
- Tunalı, A. (1999). Kan Hastalıkları. İç Hastalıkları, Bursa: Güneş Kitabevi. 7:699-716.
- Ülkü, B., (2001). Anemiler. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri; Anemiler Sempozyumu. 25:23-32.
- Valenzula, A., Fernandez, V., Videla, L.A. (1983) Hepatic and biliary levels of glutathione and lipid peroxides following iron overload in the rat: effect of simultaneous ethanol administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 70(1): 87-95.
- Valerio, LG Jr, Petersen, DR. (1998). Formation of liver microsomal MDA-protein adducts in mice with chronic dietary iron overload. *Toxicol. Lett.*, (1-2): 31-39.
- Valk, EE., Hornstra, G. (2000). Relationship between E vitamin requirement and polyunsaturated fatty acid intake in man:a review. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 70:31-42.
- Van Haften, RI., Evelo, CT., Penders, J., Eijnwachter, MP., Haenen, GR., Bast, A. (2001). Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by tocopherols and alpha-tocopherol derivatives. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1548: 23-28.
- Van Poppel, G., (1993). Carotenoids and cancer: an update with emphasis on human intervention studies. *Eur. J. Cancer.*, 29A: 1335-1344.
- Wagner, B.A., Buettner, G.R., Burns C.P. (1996). Vitamin E slows the rate of free radical-mediated lipid peroxidation in cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 334 (2): 261-267.
- Wang, X., Quinn, PJ. (1999). E vitamin and its function in membranes. *Prog. Lipid Res.*, 38:309-36.
- Worwood, M.(1980). Serum ferritin-iron metabolism. Iron Newyork. *Churchill Livingstone*, 4:59-60.
- Yanardag, R., Bolkent, S., Kizir, A. (2001). Protective effects of DL- alpha-tocopherol acetate and sodium selenate on the liver of rats exposed to gamma radiation. *Biol. Trace Elem. Res.*, 83(3): 263-273.
- Young, IS., Woodside, JV. (2001). Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.*, 54: 176-186.
- Zhao, Y., Li, H., Gao, Z., Xu, H. (2004). Effects of dietary baicalin supplementation on iron overload-induced Mouse liver oxidative injury. *Eur. J. Phar.*, 509: 195-200.

ÖZGEÇMİŞ

02.01.1980 tarihinde Bornova' da dünyaya gelen Neslihan TORTOP, ilköğretimini Acıpayam Cumhuriyet İlkokulu'nda, orta öğretimini Pamukkale Ortaokulu' nda ve lise öğretimini Denizli Anafartalar Lisesi'nde tamamladı. Yüksek öğrenimine Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde devam ederek, 2001 yılında lisans diploması almaya hak kazandı. 2003 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Yabancı dili İngilizce' dir.