

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MEME KANSERLİ HASTALARIN SERUM PROTEİN
KARBONİL GRUBU DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sibel SÖYLEMEZ

Tez Yöneticisi

Doç. Dr. Banu SANCAK

ANKARA - 2006

TEŐEKKÜR

Tez çalıŐmalarım ve yüksek lisans eğitimim süresince benden emeğini ve ilgisini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Banu SANCAK'a teŐekkürü bir borç bilirim. Başta Anabilim Dalı BaŐkanı Prof. Dr. Hatice PAŐAOđLU olmak üzere tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı đretim üyelerine, hasta numunelerinin toplanmasındaki katkılarından dolayı Medikal Onkoloji Bilim Dalı đretim yesi Prof. Dr. Deniz YAMAÇ'a, gerek çalıŐmalarım sırasında gerekse günlük hayatımda benden destek ve arkadaŐlıđını esirgemeyen Öđr. Gör. Dr. Özlem GÜLBAHAR'a ve tez çalıŐmalarım sırasındaki yardımlarından dolayı Uz. Dr. Tahsin YÜKSEL'e ve Adem NAL'a teŐekkür ederim. Bu günlere gelmemdeki sınırsız destek ve zverilerinden dolayı ağabeyim Namık SÖYLEMEZ'e ve canım anneme sonsuz teŐekkürler.

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Serbest Radikaller	2
2.1.1. Serbest Radikal Kaynakları	2
2.1.2. Serbest Radikal Çeşitleri	3
2.1.3. Serbest Radikallerin Oluşturduğu Hücre Hasarı	6
2.1.3.1. Protein Oksidasyonu	6
2.1.3.1.1. Protein Oksidasyonunun Sınıflandırılması	9
2.1.3.1.1.1. Global Modifikasyon	9
2.1.3.1.1.2. Spesifik Modifikasyon	14
2.1.3.1.2. Karbonil Gruplarının Tayini	14
2.1.3.1.3. Proteinlerin İleri Oksidasyon Ürünleri	15
2.1.3.1.4. Okside Proteinlerin Birikimi	16
2.1.3.1.5. Protein Oksidasyonunun Önemi	16
2.1.3.1.6. Oksidatif Hasarın Belirteci Olarak Protein Oksidasyonu Kullanılmasının Avantaj Ve Dezavantajları	17
2.1.3.1.7. Protein Oksidasyonunun Belirteci Olarak Karbonil Gruplarının Kullanılmasının Avantajları	18
2.1.3.2. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu	19
2.1.3.3. Serbest Radikallerle Oluşan DNA Hasarı	21
2.1.3.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkisi	21
2.2. Antioksidan Sistem	21
2.3. Kanser ve Protein Oksidasyonu	24
2.4. Karbonil Grupları ve Kanser İlişkisi	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM	27
3.1. Kullanılan Gereçler	27
3.1.1. Hasta Kanları	27

3.1.2. Deneyleerde Kullanılan Araçlar	27
3.1.3. Deneyleerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	27
3.2. Uygulanan Yöntemler	27
3.2.1. Hasta Kanları	27
3.2.2. Kan Alma ve Serum Hazırlama Protokolü	28
3.2.3. Metodların Uygulanması	28
3.2.3.1. Serum Protein Karbonil Gruplarının Tayini	28
3.2.3.2. Süpernatandaki Protein Miktarının Tayini	29
3.3. Sonuçların Analizi	30
4. BULGULAR	31
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	34
6. ÖZET	38
7. SUMMARY	39
8. KAYNAKLAR	40
9. ÖZGEÇMİŞ	49

1. GİRİŞ

Kanser gelişimi, normal hücrenin neoplastik hücreye dönüştüğü başlangıç evresi, neoplastik hücrenin çoğaldığı gelişme evresi ve malign özelliklerin kazanıldığı ilerleme evresi olmak üzere üç aşamada gerçekleşmektedir. Organizmada normal ya da patolojik metabolizma sonucu oluşan serbest radikaller DNA, lipid ve proteinlerde hasara yol açarak karsinogenezin ilk iki evresinde etkili olurlar.^{25,76} DNA ve proteinlerde in vivo olarak oluşan oksidatif hasarın, lipid hasarından daha önemli olduğu bildirilmiştir.¹⁴ Serbest radikallere bağlı enzim inaktivasyonu ile okside proteinlerin birikmesi hücre fonksiyonların bozulması ve hücre ölümünde önemli rol oynar.²¹

Proteinler oksidatif hasarın majör hedefleri olarak tanımlanmaktadır.⁸³ Oksidatif olarak modifiye olan proteinler inflamatuvar hastalıklar, ateroskleroz, nörolojik hastalıklar, iskemi-reperfüzyon hasarı ve kanser gibi farklı patolojik durumlarda birikirler.²⁷ İyonize radyasyon, metal katalizli oksidasyon, fotokimyasal süreç ve enzim katalizli redoks reaksiyonlarının oluşturduğu reaktif oksijen türleri protein oksidasyonuna neden olabilmektedir.⁸⁷ Aminoasit yan zincirlerinin karbonil türevlerine modifikasyonu, polipeptit zincirinin fragmentasyonu, protein-protein çapraz bağının oluşumu gibi olaylar protein oksidasyonunun muhtemel sonuçlarıdır.²⁷ Oksidatif hasarın belirteci olarak protein karbonil gruplarının kullanılması diğer oksidasyon ürünleri ile kıyaslandığında göreceli olarak daha stabil olması, daha erken oluşması gibi nedenlerle bazı avantajlara sahiptir.¹⁸ Protein oksidasyonunun ürünü olan karbonil grupları alzheimer hastalığı, diyabet mellitus, inflamatuvar kemik hastalığı, artrit gibi bazı hastalıklarda bir belirteç olarak görülmektedir.¹⁶

Protein oksidasyonunun değişik kanser türlerinde gösterildiği çalışmalar vardır.¹⁰⁴ Bu çalışmalar genelde kanserli hastalarla sağlıklı kontrol gruplarının karşılaştırılması şeklindedir. Meme kanseri tanısı konan hastaların tedavi öncesi ve 3 kür kemoterapi sonrasındaki serum protein karbonil grubu düzeylerinin sağlıklı kontrol gruplarıyla karşılaştırılması amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

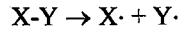
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller

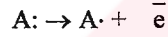
Atomlardaki elektronlar orbital adı verilen bölgelerde yer alır. Her orbital birbirine zıt yönde yerleşmiş en fazla iki elektron içerebilir. Serbest radikaller, bir ya da daha fazla ortaklaşmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Biyolojik moleküllerin çoğu nonradikaldir, yani sadece çift elektronlar içerirler.^{38,39,53,97}

Kararlı bir molekül 3 yolla serbest radikal halini almaktadır.⁸⁵

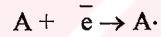
1- Homolitik parçalanma



2- Tek bir elektron kaybetme



3- Tek bir elektron alma



Çoğu serbest radikaller tarafından oluşturulan pro-oksidan maddeler ile bu moleküllere karşı koruyucu olarak bulunan antioksidan aktivite arasında bir denge bulunmaktadır. Bu dengenin pro-oksidan yapılar lehine bozulması oksidatif stres olarak adlandırılır.¹⁷Organizmada artan serbest radikaller DNA, protein ve lipid gibi molekülleri etkileyerek, hücre aktivitelerinde bozulmaya neden olur.^{9,17,26,54,59,102}

2.1.1. Serbest Radikal Kaynakları

a. Endojen Kaynaklar

Serbest radikaller hücrenin tüm fraksiyonlarında oluşabilme özelliğindedirler.²⁹

⁴⁸ Radikal oluşumu hücre tiplerine göre değişiklik göstermesine rağmen, tüm aerobik hücrelerde belirli düzeylerde radikal oluşmaktadır.^{2,11,25,48,53,97}

Mitokondriyal elektron transport zinciri

Mikrozomal elektron transport zinciri

Fagositik hücreler

Ksantin oksidaz gibi oksidan sistemler

İskemi / reperfüzyon gibi oksidatif stres yapıcı durumlar

Otooksidasyon reaksiyonları

b. Ekzojen Kaynaklar

İyonize radyasyon

Sigara ve hava kirliliği

Alkol, ilaçlar, aşırı demir ve bakır alımı gibi diyetsel nedenler

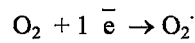
Asbest, güneş ışığı, ısı şoku, stres gibi nedenler

2.1.2. Serbest Radikal Çeşitleri

Radikaller, Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Reaktif Nitrojen Türleri (RNS) olarak bulunabilirler. Aerobik organizmalarda, radikaller daha çok oksijen radikalleri şeklinde görülür.^{10,37} Çünkü oksijen ortamda sürekli bulunan, elektrofilik ataklara en müsait olan moleküldür.^{10,37} Normal metabolizmada oksijenin % 98'i oksidaz yoluyla suya indirgenirken, kalanı oksijenaz yoluyla potansiyel olarak toksik reaktif türlere dönüşür.^{24,44,45} Oksijen atomu, toplam sekiz elektron içermektedir. Bunlardan iki tanesi dış yörüngede eşleşmemiş olarak bulunur. Oksijenin bu özelliği diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar.¹⁰

Süperoksit Radikali (O₂^{·-})

Oksijenin tek bir elektron alarak indirgenmesi ile kararsız bir yapı olan süperoksit radikali (O₂^{·-}) oluşur.¹⁰

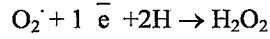
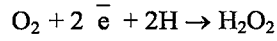


Süperoksit radikali, her ne kadar bir serbest radikal ise de özellikle hasar oluşturu bir tür değildir. Bunun nedeni yarı ömrünün uzun olmasına karşın bulunduğu yerden uzaklaşma yeteneğinin az olmasıdır. Asıl önemi hidrojen peroksiti (H₂O₂) oluşturması ve geçiş metal iyonlarının redükleyicisi olmasıdır.¹⁵

O₂^{·-}, mitokondriyal elektron transport zinciri sırasında oksijenin otooksidasyonu sonucu oluşur. Ayrıca, sitozolde Ksantin Oksidaz, NADPH Oksidaz ve Cyt P450 tarafından da oluşturulur. Makrofajlar ve polimorfonükleer lökositler (PMNL) tarafından gerçekleştirilen fagositoz sırasında oksijenin tüketimi artar. Bu da plazma membranında bulunan NADPH Oksidaz tarafından O₂^{·-} oluşumunu tetikler.⁶

Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Oksijenin 2 elektron alıp redüklenmesi veya O₂'e bir elektron ilave edilmesi sonucu oluşur.¹⁵

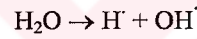


Elektronları çiftleşmiş olduğu için radikal olarak kabul edilmez. Asıl önemi, Fe ve Cu gibi geçiş metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalini oluşturmasıdır.¹⁵

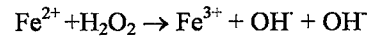
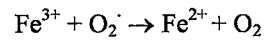
Hidroksil Radikali (OH)

Yarılanma ömrü çok kısadır. Ancak çok güçlü bir oksidan olduğundan kuvvetli hasarlar oluşturur.¹⁵ DNA'da serbest radikal zincir reaksiyonları ve kimyasal baz değişiklikleri yaparak mutasyonlara ve onkojenik aktivite artmasına neden olur.^{6,38}

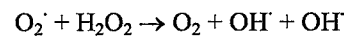
OH, iyonize radyasyon ile suyun elektrolizi sırasında oluşabilir.



Toksik OH' oluşumunda demir, bakır gibi bazı metal iyonları da rol alabilir. Fe³⁺'ün O₂'e indirgenmesi ile oluşan Fe²⁺, H₂O₂ ile reaksiyona girerek OH'i oluşturabilir. Bu reaksiyon "Fenton Reaksiyonu" olarak isimlendirilir.

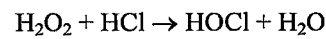


Demir tarafından katalizlenen bir diğer reaksiyonda "Haber Weis Reaksiyonu"dur. Bu reaksiyon sonucunda da hidroksil radikali oluşur.^{6,15}



Hipoklorik Asit (HOCl)

Vücutta aktive olmuş nötrofillerden oluşur ve güçlü oksidandır. Hem içeren myeloperoksidaz, fagositik hücrelerin sitoplazmasında H₂O₂ ve Cl⁻ iyonlarından HOCl oluşturur.^{37,67}



Singlet Oksijen

Yapısında ortaklanmamış elektron bulundurmaması sebebiyle serbest oksijen radikali olmayıp reaktif oksijen türleri grubunda yer alan bir moleküldür. Serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına sebep olması açısından önemlidir.¹

Singlet oksijenin, O_2^{\cdot} radikallerinin dismutasyon ve H_2O_2 'nin hipokloritle reaksiyonlarında olduğu gösterilmiştir.²² Ayrıca, oksijenin elektronlarının dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün ters yönünde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi ile de oluşabilir.³⁷

Perhidroksil Radikali (HO_2^{\cdot})

Süperoksit radikaline direkt olarak bir proton verilerek perhidroksil (HO_2^{\cdot}) radikali oluşturulabilir. Perhidroksil radikali süperoksitten daha kuvvetli oksidandır.^{15,29}

Karbon Merkezli Radikaller

OH, yağ asitleri, nükleik asitler, karbohidratlar ve proteinler gibi çeşitli moleküllerden bir proton çıkarıp karbon merkezli radikallerin oluşmasına neden olur.¹⁵

Peroksil Radikali (ROO^{\cdot})

Karbon merkezli radikaller hızlı bir şekilde oksijenle reaksiyona girerek peroksil (ROO^{\cdot}) radikalini oluştururlar. ROO^{\cdot} , çok uzun ömürlü olup lipid peroksidasyonunu başlatan radikaldir.¹⁵

Alkoksil Radikali (RO^{\cdot})

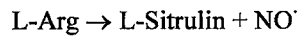
Peroksil radikalinden bir oksijen atomunun çıkarılması sonucu alkoksil (RO^{\cdot}) radikali oluşur.¹⁵

Till Radikali (RS^{\cdot})

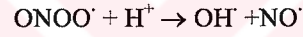
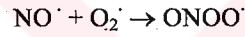
OH'in tiollerle reaksiyona girerek bir proton koparması sonucu merkezinde sülfür atomu içeren till (RS^{\cdot}) radikali oluşur.¹⁵

Nitrik Oksit ve Türevleri

Nitrik oksit (NO[·]) ve Nitrojen dioksit (NO₂[·]) çiftleşmemiş elektronlara sahiptir, bu yüzden serbest radikaldirler. Nitroz oksit (N₂O) ise serbest radikal değildir. Nitrik oksit vücutta özellikle endotel hücreleri olmak üzere pek çok hücre tarafından üretilir. Nitrik oksit, yarı esansiyel bir amino asit olan L-Arjininden, moleküler oksijen ve kofaktör olarak NADPH varlığında, nitrik oksit sentaz (NOS) etkisiyle sentezlenir.^{5,20,99}



NO[·] zayıf redüktan, NO₂[·] kuvvetli oksidandır. Nitrik oksit, süperoksit radikaliyle reaksiyona girerek reaktif ara basamak ürünü olan peroksinitriti (ONOO[·]) oluşturur. Peroksinitrit, güçlü oksidandır ve birçok biyolojik molekülde hasar meydana getirir.³⁷



2.1.3. Serbest Radikallerin Oluşturduğu Hücre Hasarı

Serbest radikaller oldukça reaktif moleküllerdir. Hücrenin çeşitli bileşenleri ve hücre dışı makromoleküllerle etkileşerek hücrede yapısal ve fonksiyonel bozukluğa neden olurlar²⁹ (Tablo 1). Oksijen radikallerinden etkilenen başlıca hücre komponentleri arasında nükleik asitler, proteinler, nörotransmitterler, DNA ve yağ asitleri bulunmaktadır.^{39,53,70}

2.1.3.1. Protein Oksidasyonu

Protein oksidasyonu, reaktif oksijen türleri veya oksidatif stresin sekonder ürünleri tarafından indüklenen, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır.⁸¹ Fizyolojik ve çevresel faktörlerin etkisiyle oluşan, ROS ve diğer reaktif maddeler, proteinlerin yapısını değiştirebilmektedir. ROS'un proteinler üzerinde oluşturduğu oksidatif hasar, dört şekilde gerçekleşebilir.^{8,88}

Protein İskeletinin Oksidasyonu: Protein zincirinin oksidatif atağı, ROS varlığında, protein iskeletinde bulunan α hidrojen atomunun HO[·] formunda çıkmasıyla başlamakta ve karbon merkezli radikal oluşmaktadır. Karbon merkezli radikal sırasıyla, alkil peroksi ve alkoksi radikallerini oluşturmak üzere moleküler oksijenle reaksiyona girmekte ve bu radikallerin

her biri aynı ya da farklı proteinlerin amino asit artıklarıyla karbon merkezli yeni radikaller oluşturmaktadır.^{9,19}

Tablo 1. Serbest radikallerin hücresel hedefleri

Hedef	Sonuç
Mikromoleküller	
Ansature thiol içeren amino asitler	Protein denatürasyonu
Karbonhidratlar	Hücre yüzeyi reseptör değişiklikleri
Nükleik asit bazları	Hücre siklusu değişiklikleri
Ansature lipidler	Kolesterol ve yağ asidi oksidasyonu lipid çapraz bağlanma, organel ve permeabilite değişiklikleri
Kofaktörler	Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerin kullanımı ve aktivitesinin azalımı
Nörotransmitterler	Nörotransmitter kullanımı ve aktivitesinin azalması
Antioksidanlar	Kullanım azalması
Makromoleküller	
Protein	Peptid zinciri bölünmesi, denatürasyon
DNA	İplikcik bölünmesi, baz modifikasyonu
Hiyalüronik asid	Sinoviyal sıvı viskozitesinde değişme

Peptid Bağlarının Kırılması: Protein molekülü üzerinde alkoksi radikalinin oluşturulması, peptid bağının kırılacağı yeri belirtmektedir. Peptid bağının kırılması alfa amidasyon veya diamid ismi verilen mekanizmalarla gerçekleşmekte ve yeni oluşan peptid zincirlerinin C- ve N- terminallerinde doğal protein yapısında bulunmayan diamid, izosiyanat, amid ve alfa ketoaçil gruplarından birisi oluşmaktadır.⁹

Amino Asit Yan Zincirlerinin Oksidasyonu: Protein yapısındaki amino asitlerin yan zincirleri de ROS tarafından oksidasyona uğrayabilmektedir.⁸⁸ Oksitlenmeye en duyarlı amino asit yan zincirlerinden bir kısmı, Tablo 2’de gösterilmiştir.⁹

1.Alifatik Yan Zincirler: ROS atağı sonucunda, amino asitlerin alifatik yan zincirlerinden hidroperoksitler, peroksi radikalleri, alkoller, karbonil bileşikleri oluşmaktadır.¹⁹

2.Aromatik Yan Zincirler: Tirozin, triptofan, fenilalanin ve histidin, serbest oksijen radikallerinin başlıca hedefleri arasındadır. ROS’un bu amino asitlerle etkileşimi, aromatik halkanın oksitlenmesi ile sonuçlanır.⁹

Tirozin artıklarının peroksinitritle reaksiyonu sonucunda ditirozin ve 3-nitrotirozin türevleri oluşur. 3-nitrotirozin reaktif nitrojen türlerinin oluşumunda önemlidir.¹⁹

Tablo 2. Oksitlenmeye En Duyarlı Amino Asitler

Amino Asitler	Oksidasyon Ürünleri
Sistein	Disülfidler, sisteik asit
Triptofan	2-,4-,5-,6-,7- Hidroksitriptofan, nitrotriptofan
Metiyonin	Metiyonin-sülfik asit, metiyonin sülfon
Tirozin	3,4-Dihidroksifenilalanin, tirozin-tirozin çapraz bağlanmaları
Fenilalanin	2,3-Dihidroksifenilalanin, 2-,3-,4-hidroksifenilalanin
Histidin	2-Oksohistidin
Arjinin	Glutamik semialdehit
Prolin	2-Pirolidon,4- ve 5- hidroksiprolin piroglutamik asit, glutamik semialdehit
Lizin	α -Aminoadipik semialdehit
Treonin	2-Amino-3-ketobütirik asit
Glutamat	Piruvik asit, oksalik asit

3. Heteroatom İçeren Yan Zincirler: Treonin ve serinin oksidasyon ürünleri hakkında yeterli bilgi olmamasına rağmen, karbonil grubu içeren ürünlerin oluştuğu gösterilmiştir.¹⁹

Sistein ve metiyonin ise birçok ROS türeviden tarafından oksidasyona uğrayabilmektedirler. Uygun şartlarda metiyonin yan zincirleri metiyonin-sülfik asite, sistein yan zincirleri de disülfid yapısına dönüşebilmektedir.^{9,88,89}

Çapraz Bağlanma Reaksiyonları: ROS'un indüklediği aynı ya da farklı proteinler arasında farklı mekanizmalarla çapraz bağlı türevler oluşabilmektedir. Bu mekanizmalar şunlardır:⁸⁸

◆ Bir proteinin serbest amin grubuyla, glikolize bir proteinin karbonil grubunun etkileşimi

◆ İki farklı protein molekülündeki lizil artıklarının ϵ -NH₂ gruplarıyla Malondialdehitin (MDA) etkileşimi

◆ Sistein sülfidril gruplarının oksidasyonu yoluyla çapraz disülfid bağlarının oluşması

◆ Proteine bağlı ya da serbest HNE'nin aldehit grubu ile diğer bir proteindeki lizinin ϵ -NH₂ grubu arasındaki etkileşim

◆ İki farklı protein molekülünün karbon merkezli radikallerinin etkileşimi ile karbon-karbon kovalent bağlarının oluşması

2.1.3.1.1. Protein Oksidasyonunun Sınıflandırılması

Proteinlerin oksidatif modifikasyonları için genel kabul gören bir sınıflandırma yoktur. Ancak, oksitlenen kalıtın ve oluşan ürünün özelliğine göre iki gruba ayrılabilir.⁵⁷

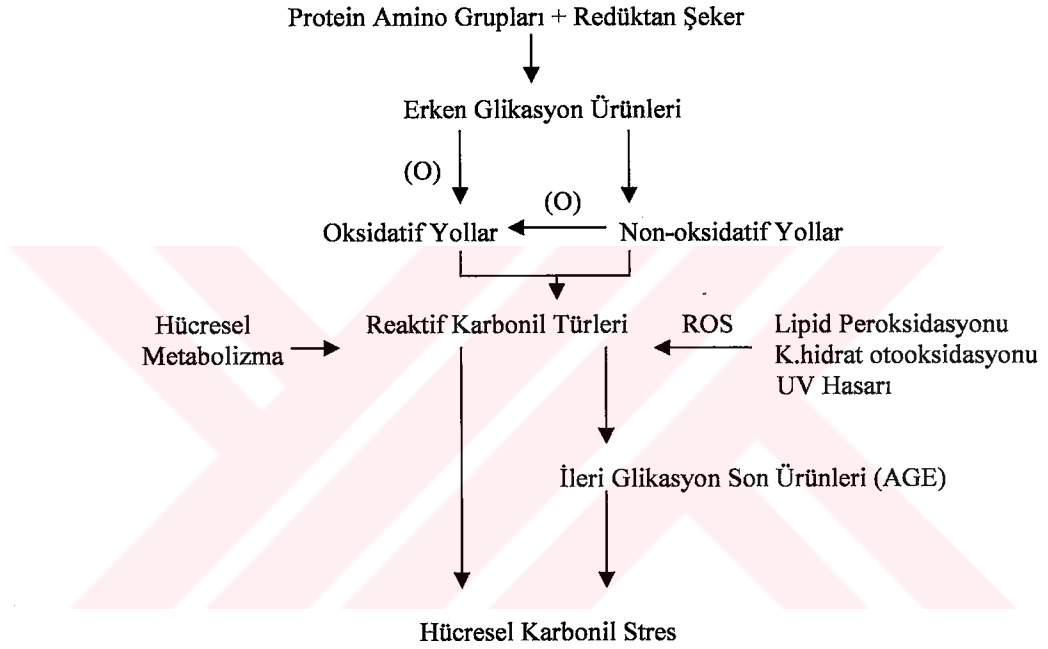
2.1.3.1.1.1. Global Modifikasyon (Karbonil Gruplarının Oluşumu)

Birden çok kalıtın değiştiği ve birden çok ürünün oluştuğu modifikasyonlardır. Karbonil gruplarının oluşumu bu türe örnek verilebilir.

Oksidatif stresin, proteinleri geri dönüşümsüz ve nonenzimatik olarak modifiye ettiği bilinmektedir.^{9,21} Son yıllarda amino asitlerin yanı sıra karbonhidrat ve lipidlerin oksidasyonu ile oluşan ve reaktif karbonil bileşikler (RCC) olarak isimlendirilen karbonil

türevlerinin de, proteinleri aynı şekilde modifiye ettiği ve protein karbonil bileşiklerini oluşturduğu gösterilmiştir.⁶¹ Karbonhidrat ve lipidlerden türeyen ve organizmada biriken reaktif karbonil bileşiklerinin başta proteinler olmak üzere, biyomoleküller üzerinde oluşturduğu geri dönüşümsüz nonenzimatik modifikasyonların tümü “karbonil stres” olarak adlandırılmaktadır.⁷ (Şekil 1)

Şekil 1. Hücresel Karbonil Stres



Karbonil strese yol açan modifikasyonlar birkaç mekanizma ile gerçekleşebilmektedir.⁶¹

1. Proteinlerin, ROS tarafından oksitlenmesi aracılığıyla peptid bağlarının yıkılması sonucunda karbonil grupları ortaya çıkabilir.⁹⁰ Protein ana yapısının oksidasyonu sırasında oluşan alkil peroksit türevleri ve alkoksil radikalleri peptid bağına ya diamid ya da α amidasyon yolu ile yıkabilirler. (Şekil 2, Reaksiyon A) Diamid yolu üzerinden parçalanmada proteinin C- terminal bölgesinden derive olan peptid fragmanı N- terminal kısmında bir isosiyanat yapıya sahipken, proteinin N-terminal bölgesinden derive olan peptid fragmanı C-terminal kısmında diamid yapıya sahiptir. α amidasyon yolu üzerinden yıkılmada ise proteinin N-terminal

bölgesinden elde edilen peptid fragmanı C-terminal kısmında bir amid grubuna sahipken, proteinin C-terminal kısmından derivate olan fragmandaki N-terminal amino asit kalıtı ise α ketoaçil derivesi olarak yerini alır.³²

Ayrıca aspartil, prolil ve glutamil yan zincirlerine ROS atağı sonucunda da peptid bağının yıkımı gerçekleşebilir. (Şekil 2, Reaksiyon C)³²

Proteinlerin radyolizisi sırasında oluşan peptid fragmanlarının sayısının prolil kalıtlarının sayısına yaklaşık olarak eşit olduğu gözlenmiş, prolil kalıtının oksidasyonu ile peptid bağının parçalanmasının başlayabileceği ileri sürülmüştür.⁷⁸ Prolil kalıtlarının oksitlenmesi sonucu 2-pirolidon oluşumuyla birlikte peptid bağı yıkımının oluşabileceği gösterilmiştir. (Şekil 2, Reaksiyon B) 2-pirolidon asit hidrolizi ile 4-aminobütirik asit ortaya çıkarır. Protein hidrolizatlarının içerisinde 4-aminobütirik asidin varlığı, prolinin oksidasyonu sonucu peptid bağının ayrıldığına kanıtı olarak kabul edilmektedir.⁹⁵

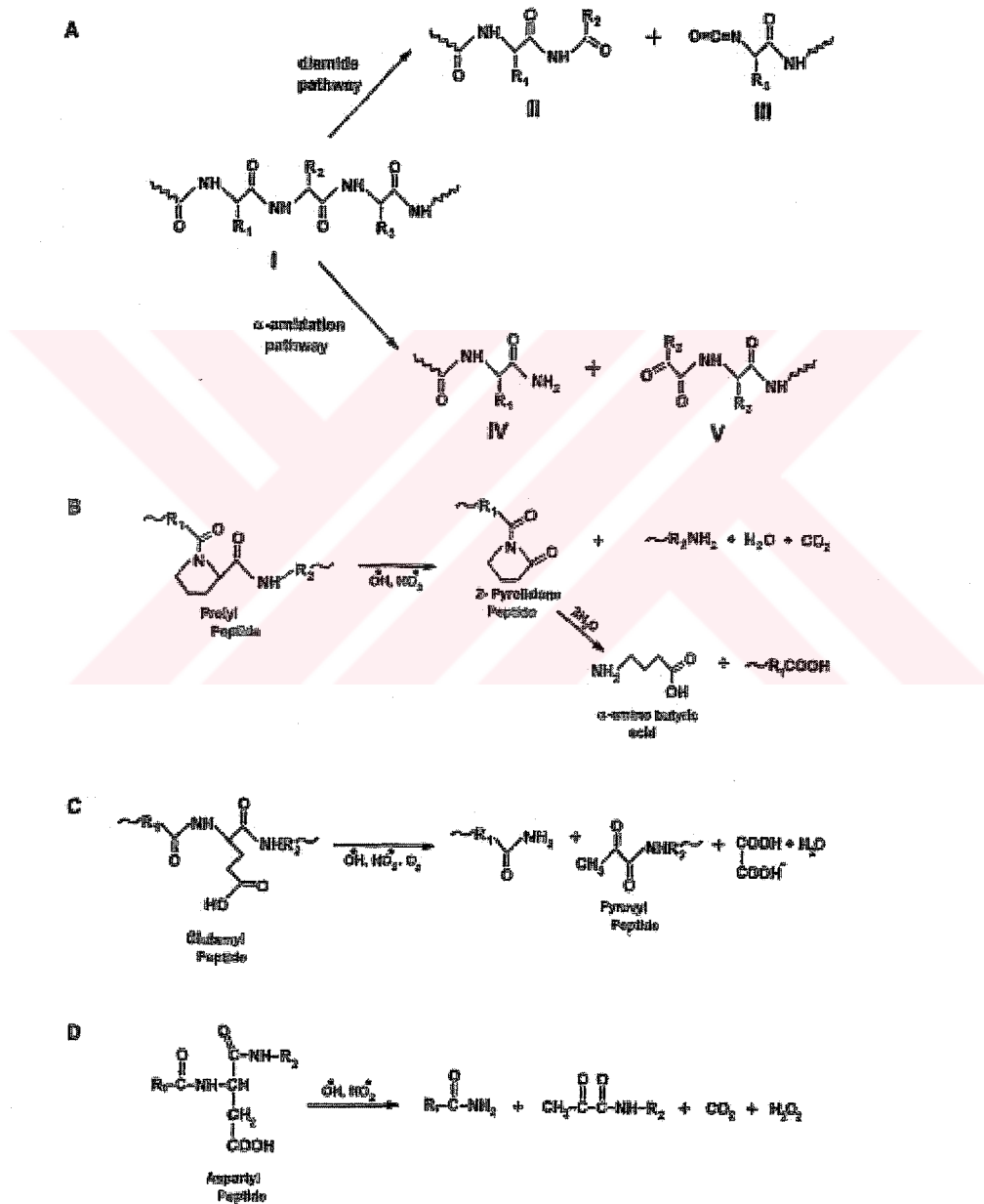
2. Metal kataliz aracılı oksidasyon sistemleri ile, protein yapısında bulunan prolin, lizin, arjinin, treonin gibi amino asit yan zincirlerinin oksidasyonu, peptid bağı yıkım ürünlerine benzer şekilde karbonil bileşiklerinin oluşumuyla sonuçlanmaktadır.^{88,93} Histidinin metal katalizli oksidasyonu sonucunda ise 2-oxo-histidin oluştuğu gözlenmiştir.⁹⁰ E.coli glutamin sentetaz ile yapılan çalışmalar sonucu enzim üzerinde metal bağlanma bölgesinde yer alan amino asit kalıtlarının bölge spesifik bir mekanizma ile metal katalizli oksidasyona oldukça duyarlı olduğu gösterilmiştir.²⁸ Lizin kalıtının amino grubuna Fe (II)'nin bağlanması sonucu oluşan şelat kompleksinin H_2O_2 ile reaksiyonu sonucunda OH oluşur. OH' 'ın lizin kalıtı ile reaksiyonu sonucu ise 2-amino-adipik-semialdehit oluşur. Fe(II) ile bazı amino asitlerin benzer reaksiyonları sonucunda da karbonil grupları oluşur.²⁸

Ancak ROS türevlerinin hepsi, karbonil grupları oluşturacak kadar reaktif değildir.²¹ Sonuçta, redoks siklusu oluşturabilen Fe(II)/Cu(I) gibi metal iyonlarının protein üzerindeki katyon bağlanma bölgelerine tutunması, karbonil gruplarının oluşumuna yol açan metal katalizli oksidasyon reaksiyonlarının başlamasına neden olmaktadır.⁷³

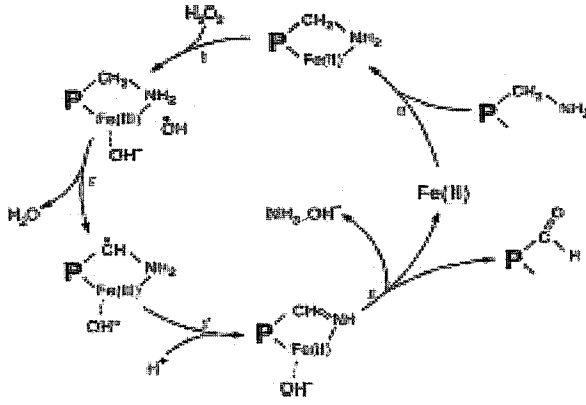
3. Reaktif karbonil grubu içeren proteinler aynı zamanda, indirgeyici şekerler veya onların oksidasyon ürünleri ile proteinlerin lizin rezidülerinin primer amino gruplarının sekonder

reaksiyonları sonucu (şekil 4, Reaksiyon A) oluşabileceği gibi,³³ poliansature yağ asitlerinin peroksidasyonu esasında oluşan α - β ansature aldehitler ile sistein, lizin ya da histidin kalıtlarının Michael ekleme reaksiyonları sonucu da oluşabilir.⁹⁶ (şekil 4, Reaksiyon B)

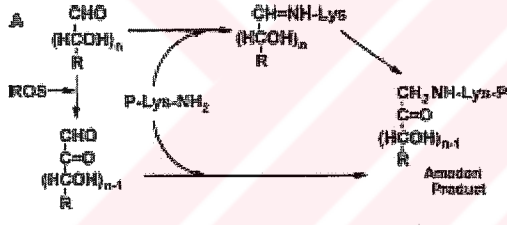
Şekil 2. Polipeptid zincirin serbest radikal aracılı yıkılması



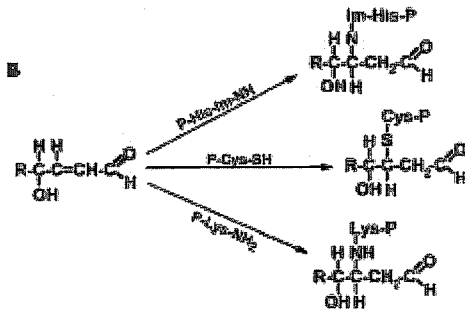
Şekil 3. Protein amino asit rezidülerinin bölge-spesifik metal katalizli oksidasyonu



Şekil 4a . Glikasyon/glikoksidasyon aracılığıyla protein karbonil türevlerini üretilmesi



Şekil 4b . Amino asitler ile α - β -ansature aldehydlerin reaksiyonu aracılığıyla protein karbonil türevlerini üretilmesi.



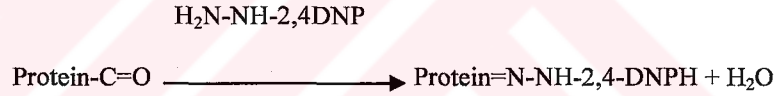
2.1.3.1.1.2. Spesifik Modifikasyon

Hem oksitlenen kalıtın hem de oluşan ürünün oldukça spesifik olduğu modifikasyonlardır. Fenilalanin kalıtlarının o-tirozine ve tirozinin ditirozine dönüşümleri spesifik modifikasyona örnek olarak verilebilir.⁵⁷

3-nitrotirozin, ditirozin, klorin deriveleri ve çeşitli mono/di hidroksi fenilalanin deriveleri için kullanılan metotlar spesifik modifikasyon türlerinin analizi için kullanılan metotlardır.⁸¹

2.1.3.1.2. Karbonil Gruplarının Tayini

Protein oksidasyon miktarını belirlemek için birçok farklı yöntem bulunmaktadır.⁸¹ En çok kullanılan protein oksidasyon yöntemi, oksidasyon sonucu oluşan karbonil gruplarının dinitrofenilhidrazin ile birleşip dinitrofenilhidrazon oluşturması ile karbonil grubu düzeylerinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır.¹⁸



Total protein karbonil grubu düzeylerinin ölçümü, DNPH ile reaksiyon sonrası spektrofotometre, ELISA ve Western blot immünoassay yöntemleri ile yapılabilir.⁸¹ Karbonil gruplarının tayini için DNPH dışında; borohidrit ile karbonil gruplarının alkole indirgenmesi, floresein amin ile karbonil gruplarının reaksiyonu sonucu schiff baz oluşumu, siyanoborohidrit ile sekonder amine indirgenmesi, floreseintiosemikarbazid ile tiosemikarbazon oluşması gibi alternatif metodlar bulunmaktadır.⁵⁶

Protein karbonil gruplarını tayin metodları normal olarak donanımlı herhangi bir biyokimya laboratuvarında uygulanabilir, pahalı ekipman gerektirmez. Karbonil grupları stabildir ve protein preparatlarında düşük miktarlarda (1 nmol/mg protein, 1/3000 amino asit) bulunmaktadır. İn vivo oksidatif hasar şartlarında ise düzeyleri 2 -8 kat daha yüksek gözlenebilir.⁸¹

Tablo 3. Proteinlerin oksidasyon miktarlarının tayini için bazı metodlar

Modifikasyon	Tayin Metodu
Karboniller	DNPH ile yapılan analizler -Spektroskopi -HPLC -ELISA -Western blotting -İmmünohistokimya
Disülfit	SDS-jel elektroforez ,DTNB
Çapraz bağlar, agregatlar	SDS-jel elektroforez
Fragmanlar	HPLC
2-oxo-histidin	Amino asit analizi
Metiyonin sülfoksit	ZnBr ile ayrılma / amino asit analizi
Klorotirozin	Hidrolizis / nitrozo naftol / HPLC
Nitrotirozin	İmmünoassay, Hidrolizis – HPLC HPLC/ elektrokimyasal tayin
Ditirozin	Floresans Proteolizis veya hidrolizis- HPLC

2.1.3.1.3. Proteinlerin İleri Oksidasyon Ürünleri

Proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri (advanced oxidation protein products; AOPP), ilk defa Witko-Sarsat¹⁰¹ ve arkadaşları tarafından, hemodiyaliz hastalarının plazmasında tanımlanmıştır.

AOPP, klorlu oksidanların proteinlerle ileri reaksiyonu sonucu oluşan bir üründür. Klorlu oksidanların başlıca kaynağı da, Myeloperoksidaz enzimi (MPO) aktivitesine sahip fagositik hücrelerdir. Çünkü MPO organizmada, in vivo klorlu oksidan üretebilen tek enzimdir.⁵¹

Fagositik hücreler tarafından oluşturulan HOCl, ROS türleri içerisinde, en toksik ve en reaktif olan ajandır. Başlıca hedefi membran proteinleri ve onların thiol grupları olan hipoklorik asit, kloraminleri oluşturmak üzere endojen aminlerle reaksiyona girerek, kloraminlerle okside olan proteinler üzerinde AOPP oluşturmaktadır.²³

2.1.3.1.4. Okside Proteinlerin Birikimi

Oksidatif hasara uğrayan proteinlerin onarımı mümkün olmadığından, endojen proteazlarla proteolitik yolla yıkılmaları gerekir.⁸⁹ Ancak oksidatif hasarın derecesi, proteinlerin metabolik sonlarını belirlemekte ve kısmi oksidasyon, proteinlerin hidrofilik özelliğini artırırken; ileri derecelerdeki oksidasyon, proteinlere hidrofobik özellik kazandırmaktadır. Bu nedenle, kısmen denatüre ya da hafif derecede okside olan proteinler, proteolitik atağa karşı daha duyarlı iken ileri derecede okside olanlar ise daha dirençlidir.²¹

Proteolitik yıkıma dirençli okside proteinlerin yanı sıra; çapraz bağlı ya da glikozile protein konjugatları tarafından, endojen proteazların inhibe edilmesi de, okside proteinlerin birikimine sebep olmaktadır.⁸⁹

Bu nedenle, hücrelerdeki okside protein düzeylerinin, protein oksidasyon hızı ile proteolitik yıkım hızı arasındaki dengeye bağlı olduğu ve dengenin bozulmasıyla, okside proteinlerin birikmeye başladığı söylenebilir.⁸⁸

Diğer taraftan oksidasyon, bireysel olarak proteinlerde biyolojik aktivite kaybına sebep olsa da; okside proteinlerin organizmada birikimi, biyomoleküllerin katalitik ve yapısal bütünlüğünün kaybına ve metabolik düzenleyici yolların kesintiye uğramasına neden olmakta ve böylece tüm hücre fonksiyonları bozulmaktadır.⁸⁹

Stabiliteilerinin ve yarı ömürlerinin uzun olması nedeniyle, okside proteinlerin, in vivo oksidatif stresin göstergesi olarak kullanılabilceği öne sürülmektedir.¹⁹

2.1.3.1.5. Protein Oksiasyonunun Önemi

Oksidasyon araştırmalarında bugün en büyük iddialardan biri in vivo oksidatif stresin tayinidir. Proteinler tüm doku ve hücrelerde yer almaları ve oksidatif modifikasyona duyarlılıkları nedeniyle oksidatif hasarın yararlı bir belirteci olarak kullanılabilirler.⁷⁷ Proteinler

oksidatif hasara muhtemelen en duyarlı moleküllerdir ve hasarın etkisi diğer moleküllere oranla oldukça fazladır.¹⁸

Proteinlerde in vivo olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücre fonksiyonları etkilerler. Ateroskleroz, romatoid artrit, iskemi-reperfüzyon hasarı, amfizem, nörodejeneratif hastalıklar, alzheimer, parkinson, muskuler distrofi, yaşlanma, akut pankreatit, kataraktogenez ve kanser gibi hastalıkların protein oksidasyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir.⁸¹ Bu hastalıklarda okside proteinlerde bir artış olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.⁸¹

2.1.3.1.6. Oksidatif Hasarın Belirteci Olarak Protein Oksidasyonu Kullanılmasının Avantaj ve Dezavantajları

Lipid peroksidasyonu ve DNA oksidatif baz modifikasyonlarının ürünlerinin ölçümüne oranla, proteinler oksidatif hasarın belirteci olarak bazı avantajlara sahiptir. Proteinlerin her biri kendine özgü biyolojik fonksiyonlara sahip olduklarından, modifikasyonları sonucu özgül fonksiyonel bozukluklar ortaya çıkar. Proteinlerin oksidatif modifikasyonu sonucu açığa çıkan ürünler göreceli olarak stabil olup duyarlı analizlerle düzeyleri ölçülebilir. Bu nedenle protein oksidasyonu oksidatif hasarın düzeyini göstermede uygun bir belirteç olarak kullanılabilir.

Protein modifikasyonunun şekli oksidanın tipi hakkında önemli bilgiler verebilir. Örneğin; lizin rezidüleri üzerindeki aminoasit eklentiler ve klorotirozil grupları, nötrofil ve/veya monosit kaynaklı oksidasyonu yansıtır ve HOCl ile oksidasyonun spesifik belirteçleridir. Oksidasyon ürünlerinin bu her iki tipi de insan ateroskleroz lezyonlarında bulunmuştur.⁸¹

Oksidatif hasarın bir belirteci olarak protein, lipid veya DNA'nın hangisinin kullanılacağı belirlenmesinde oksidatif stresin yapısı önemli bir rol oynar. Örneğin; HOCl protein oksidatif modifikasyonunun çok iyi bir indükleyicisi iken lipid ve DNA modifikasyonuna neredeyse hiç neden olmaz. Bu nedenle oksitleyici olarak HOCl ön planda olduğunda, proteinler belirteç olarak kullanılmalıdır.

Karboniller ROS'un hemen hemen tüm tipleri tarafından indüklenbilir. Bu nedenle oksidatif hasarın kaynağı hakkında önemli bilgiler vermezler. Protein karbonil gruplarının

düzeylerinin yüksek bulunması yalnızca oksidatif stresin değil hastalıklarla bağlantılı fonksiyon bozukluklarının da bir işaretidir.

Protein oksidasyonunun oldukça spesifik olan yapısı, aynı zamanda oksidatif hasarın göstergesi olarak bu makromoleküllerin kullanımının dezavantajlarından birini oluşturur. Protein oksidasyon ürünlerinin çeşitliliği nedeniyle oksidatif hasarın tipini belirleyebilmek amacıyla farklı analiz metodları geliştirme ihtiyacı doğmuştur.⁸¹

2.1.3.1.7. Protein Oksidasyonunun Belirteci Olarak Karbonil Gruplarının Kullanılmasının Avantajları

Protein karbonil grubu içeriği genel bir indikatördür ve protein oksidasyonunun en yaygın kullanılan belirteçidir. Protein karbonil gruplarının birikimi alzheimer, romatoid artrit, diabetes mellitus, sepsis, kronik böbrek yetmezliği, respiratuar distres sendromu ve kanser gibi bazı hastalıklarda gösterilmiştir.¹⁸

Global modifikasyonlar, spesifik bir proteinin kalıtlarının yapısal bir fraksiyonunu sıklıkla etkilerken, spesifik modifikasyonlar yalnızca risk altındaki kalıtı veya proteinlerin çok küçük bir kısmını etkilerler. Örneğin, ditirozinin insan aortasının AS bölgelerinde belirgin bir şekilde arttığı belirlenmiştir.⁵⁷ Tirozinin gerçek içeriği her 3300 tirozin kalıtı için 1 kalıttır ve ditirozin düzeylerinin ölçümü stabil izotop dilüsyon gaz kromatografisi mass spektrometriyi kullanan oldukça hassas bir metod gerektirmektedir. Oysa protein karbonil grubu içeriği kolaylıkla ölçülebilir.⁵⁷

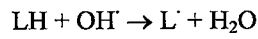
Bir belirteç olarak protein karbonil gruplarının kullanımı lipid peroksidasyonu ürünleri ile karşılaştırıldığında bazı avantajlar sağlayabilir. Çünkü protein oksidasyonunun yaygın göstergesidirler, göreceli olarak erken oluşurlar ve daha stabildirler. Okside olmuş proteinler hücreler tarafından saatler ya da günler içinde yıkılırlar.^{35,36} Oysa lipid peroksidasyon ürünleri dakikalar içerisinde yıkılabilir.⁸⁴ Protein karbonil grupları erken oluşumlarına rağmen uzun süreçte yıkılırlar.⁶⁹ Protein karbonillerinin kimyasal stabilitesi karbonillerin laboratuvar ölçümleri için uygun ve saklanmaları için faydalı bir yönüdür. Depolandıklarında -80°C'de stabilitelelerini 3 ay boyunca korudukları kanıtlanmıştır.³⁴

Protein karbonil grupları ROS'un çoğu tipi için oksidatif hasarın bir belirtici olarak görev yapmaktadırlar. Çünkü oksidanların hemen hemen tüm ürünleri tarafından in vitro olarak indüklenebilmektedirler. Bu nedenle oksidatif hasarın kaynağını tam olarak açıklayamazlar. Protein oksidasyonunun tayini için spesifik veya global modifikasyon seçimi, yapılacak olan araştırmanın amacına bağlı olup, birçok durumda oksidatif hasarın iyi bir belirtici olabilir. Bu güne kadar bildirilmiş spesifik modifikasyonlar risk altında bulunan kalıtların veya proteinlerin küçük bir bölümünü etkilerken global modifikasyonlar proteinlerin önemli bir bölümünü etkilemektedir.¹⁸

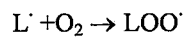
2.1.3.2. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan ve membran yapısındaki poliansature yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olaydır. Olay otokatalitik olarak bir kez başladığında zincirleme olarak yürütülmektedir.

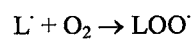
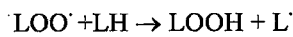
Lipid peroksidasyonu organizmada oluşan kuvvetli oksitleyici bir radikal etkisiyle zar yapısındaki poliansature yağ asit (PUFA) zincirindeki α -metilen gruplarından bir hidrojen atomunun uzaklaşmasıyla başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu serbest radikalın süperoksit anyonu ve hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Bununla birlikte, lipid peroksidasyonunun uyarılmasında asıl etkili radikal hidroksil radikalidir.³⁹



Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Moleküler oksijen ile birleşen L^\cdot (lipid radikali) LOO^\cdot (peroksil radikali)ni oluşturur.^{6,15}



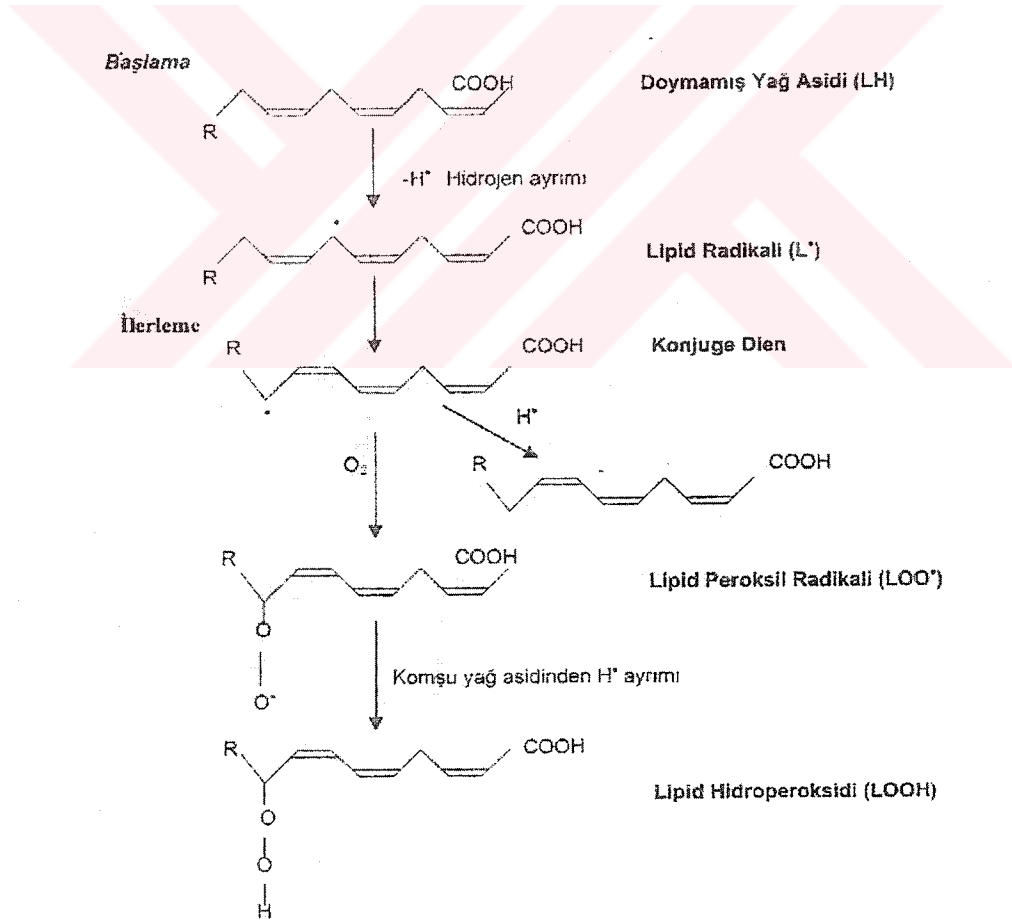
LOO^\cdot , membran yapısındaki diğer poliansature yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikali oluşumuna neden olur. Bu sırada kendileri de, açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak LOOH 'e (lipid hidroperoksit) dönüşür. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder. Lipid peroksitlerinin yıkımı, geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir.^{6,15}



Lipid hidroperoksitlerinden aldehitler ve diğer karbonil bileşikleriyle etan, pentan gibi uçucu gazlar oluşur.^{40,85} Aldehitler içinde en önemlileri malondialdehid (MDA) ve 4hidroksinonenal (4-HNE)dir. Aldehitler, sitotoksik, hepatotoksik, mutojenik ve genotoksik özelliklere sahiptir.^{29,39,40,41}

Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına indirekt olarak da ürettiği reaktif aldehitlerle diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olur. Membran permeabilitesi ve mikroviskositesi önemli ölçüde etkilenir.² Serbest radikallerin lipid peroksidasyonuna yol açarak çeşitli hastalıkların oluşumunda rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur.²⁹

Şekil 4: Lipid peroksidasyonu⁸⁰



2.1.3.3. Serbest Radikallerle Oluşan DNA Hasarı

Çok basamaklı bir oluşum olan karsinogenezisin onkojenik teorisinde serbest radikal reaksiyonlarının önemli etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. İnsan vertebra hücre DNA'sında, normal olarak inaktif ve transkripsiyonları kısıtlı olan onkojenler mevcuttur. Onkojenik aktivatörler serbest radikal mekanizmasıyla DNA zincirinde kırıklar ve baz mutasyonları oluşturarak başlatıcı ve ilerletici reaksiyonları meydana getirirler.⁶

Karsinogenezis oluşumunda yer alan karsinojenik maddelerin oluşturduğu etki mekanizmalarının, serbest radikal aracılığı ile olduğu gösterilmiştir.^{6,15,29} DNA, okside edici radikaller tarafından kolaylıkla hasara uğratılabilmektedir.¹⁵

Serbest radikal bileşikleri DNA bazları üzerinde geri dönüşümsüz değişikliklere neden olurlar. DNA hasarının bir göstergesi olarak kabul edilen, timin ile OH'nin oluşturduğu "timin glikol" ve guanin ile OH'nin oluşturduğu "8-hidroksi guanin" önemli bileşiklerdir. Bu bileşikler insan ve rat idrarında tespit edilebilmektedirler.¹⁰⁰

2.1.3.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkisi

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin ootoksidasyonu sonucu hidrojenperoksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Okzoaldehitler, DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece yaşlanma ve kanser etiolojisinde rol oynarlar. Serbest radikallerin oluşturduğu karbonhidrat hasarı, sinoviyal sıvının önemli bileşeni olan hiyalüronik asit ve diğer proteoglikanların parçalanmasına neden olup, romatoid artrit patogenezinde önemli role sahip oldukları gösterilmiştir.^{2,100}

2.2. Antioksidan Sistem

Oksijenli yaşamla birlikte aerobik organizmalar oksijen kaynaklı radikalleri oluşturmaya başlamışlardır. Bununla eş zamanlı olarak, serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere, organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki dengenin korunamadığı durumlarda, hücre hasarı ve ölümüne kadar giden birçok patolojik değişiklik meydana gelmektedir.^{79,85}

Antioksidanların ilk belirlenen etkileri, membran yapısında bulunan lipidlerin peroksidasyona karşı korunması olmuştur. Bunun sonucunda, başlangıçta antioksidanlar lipid peroksidasyonunu engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Günümüzde ise, antioksidanların tanımı lipidlerin yanı sıra proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar gibi diğer hedef molekülleri koruyucu etkilerini de içerecek şekilde genişletilmiştir. Böylece antioksidanlar, hedef moleküldeki oksidan hasarı engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmaktadır.^{79,85}

Antioksidanlar, etki mekanizmalarına göre dört gruba ayrılırlar:¹³

1. Süpürücü etki gösterenler: Oluşturdukları etki ile yeni radikal oluşumunu engeller ve oluşmuş olan radikalleri daha az zararlı hale getirirler. Glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, ferritin ve seruloplazmin gibi metal bağlayıcı proteinler süpürücü etkiye örnektir.
2. Giderici etki gösterenler: Oksidan ile etkileşip onlara bir hidrojen atomu aktararak aktivitelerini inhibe eden bileşiklerdir. β -karoten, C ve E vitaminleri bu tür etkiye örnektir.
3. Zincir kırıcı etki gösterenler: Zincirleme olarak devam eden reaksiyonları belli yerlerinde kırarak, oksidan etkiyi durdururlar. Ürik asit, bilirubin ve albumin bu etkiye örnektir.
4. Onarıcı etki gösterenler: Bu grupta DNA tamir enzimleri ve metiyonin sülfoksit redüktaz sayılabilir.

Antioksidanlar çeşitli kriterlere göre gruplanabilirler:¹⁰³

1. Yapılarına göre
 - a. Enzimler
 - b. Enzim olmayan proteinler
2. Kaynaklarına göre
 - a. Organizmaya ait olanlar (endojen antioksidanlar)
 - b. Dışarıdan alınanlar (eksojen antioksidanlar)
3. Çözünürlüklerine göre

- a. Suda çözünenler
- b. Lipidlerde çözünenler

4. Yerleşimine göre

- a. Hücre içinde bulunanlar
- b. Plazma ve diğer ekstraselüler sıvılarda bulunanlar

Enzimatik yapıda olan önemli bazı endojen antioksidanlar:

Süperoksit Dismutaz (SOD) : 2 molekül süperoksitin, 2 molekül proton ile reaksiyonunu katalizleyerek, hidrojenperoksit dönüşümünü sağlar. Sitozolik SOD'un ve vasküler endotele bağlı olarak bulunan ekstraselüler SOD'un kofaktörleri çinko ve bakırdır. Bu enzimlerin aktivitesinden Cu, stabilitesinden ise Zn sorumludur. Mitokondrial SOD'un kofaktörü ise mangandır.³⁰

Katalaz (CAT) : Hidrojenperoksitin oksijen ve suya redüksiyonunu sağlar. Özellikle yüksek konsantrasyonlardaki H₂O₂'ye daha fazla etkilidir. Glutasyon peroksidazdan farklı olarak organik hidroperoksitlere etki etmez.³⁰

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) : Aktif merkezinde selenosistein bulunan glutasyon peroksidaz, substrat olarak GSH'ı kullanır. H₂O₂'yi suya redükte eder.³⁰

Nonenzimatik yapıda olan antioksidanlar :

Ekzogen kaynaklı nonenzimatik antioksidanlar; β-karoten, E ve C vitamini gibi moleküllerdir.

Endojen kaynaklı nonenzimatik antioksidanlar; ferritin, ürik asit, bilirubin, laktoferrin, transferrin, melatonin, askorbik asit, albumin ve glutasyon gibi moleküllerdir.²

Glutasyon: Hücre içi tioller arasında en sık bulunanıdır. Tripeptid (L-glutamil-L- sisteinil glisin) bir yapıya sahiptir.

Biyolojik sistemlerde direkt ve indirekt fonksiyonları vardır.^{1,66} GSH homeostazisi thiol/ disülfid dengesinin korunmasında önemlidir. Yapılan pek çok çalışmada, GSH'ın azalmasının çeşitli oksidanlara bağlı sitotoksisteyi artırdığı gösterilmiştir. Bunun tam tersi olarak GSH düzeyi artırılırsa sitotoksistenin önlenildiği görülmüştür.^{31,82}

Tablo 4. Antioksidanların gruplandırılması^{2,86}

Ekzojen Antioksidanlar	Endojen Antioksidanlar
Yiyeceklerdeki doğal antioksidanlar Vitamin A β -karoten Vitamin C Vitamin E	Enzimler Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi Süperoksit dismutaz Katalaz Glutatyon peroksidaz Glutatyon-S-transferaz Hidroperoksidaz
Antioksidan yiyecek aditifleri Bütile hidroksitoluen (BHT) Bütile hidroksianizol (BHA) Etoksikin Sodyum benzoat Propil galat Fe-süperoksitdismutaz (bakteriyel)	Enzim olmayanlar a. Lipit fazda bulunanlar β -karoten, α -tokoferol b. Sıvı fazda bulunanlar(hücre sitozölü veya kan plazmasında) Askorbik asit, melatonin, ürat, sistein, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, myoglobin, hemoglobin, ferritin, metionin, albümin, bilirubin, glutatyon

2.3. Kansere ve Protein Oksidasyonu

Kanser anormal doku büyümesidir. Kanser hücreleri ayrıca lokal dokulara invazyon ve vücudun diğer dokularına metastaz özelliklerine sahiptirler. Büyümesi, hızlı gelişen tümörlerde bile normal dokulardan çok farklı değildir. Ancak büyümenin kontrolsüz olması ve apoptozisin bulunmaması nedeniyle tümör gelişim göstermektedir.⁷⁴

Kanserin nedeni tam olarak bilinmemekle beraber insanda tümörlerin büyük bir kısmının çevresel faktörlere bağlı olduğu ileri sürülmektedir. Bu etkenler kimyasal ajanlar, virüsler ve radyasyondur. Ayrıca kanser gelişiminde genetik faktörlerin de rol oynadığı bilinmektedir.⁶⁸

Serbest radikallerin karsinogenezde oynadığı rol çoklu biyokimyasal etkileşimlerin bir sonucudur. Özetlenecek olursa:

1. DNA'daki nükleotidlerle etkileşim sonucu mutasyonların oluşması⁶³
2. Premalign ve malign hücrelerde direkt olarak hücre proliferasyonunun artışı²⁵
3. Hücre içi sinyal transdüksiyonunun değişmesi¹²
4. Hücre proliferasyonunda, adhezyon ve apoptozis direncinde görevli transkripsiyon faktörlerinin aktiflenmesi⁹⁴
5. Kalsiyum bağımlı ve kalsiyumdan bağımsız onkogen aktivasyonu²⁵
6. DNA polimerazı aktive eden poliaminlerin sentezinde görevli ornitin dekarboksilaz enziminde eksiklik⁶⁴
7. Siklooksijenaz inflamasyon enziminin indüklenmesi ile tümör hücreleri için otokrin bir büyüme faktörü olarak değerlendirilen prostoglandinlerin miktarında artış⁶⁴
8. Nitrotirozin gibi serbest radikaller sonucu oluşan protein rezidülerinin anjiyogenez için uyarıcı nitelik taşıma olasılığı⁴
9. Prostaglandin sentezi artışı nedeniyle immün sistemde genel bir supresyon durumu oluşması^{52,105}

Yukarıda sayılan durumlardan en önemlisi kalıcılığı itibariyle proteinler üzerine olan hasardır, çünkü mitokondri DNA'sının histonlarla sarılı olmayışı ve elektron taşıma sistemine yakınlığı dolayısıyla zaten normal somatik DNA'ya oranla daha fazla mutasyona maruz bırakıcı etkenle karşılaşma olasılığı vardır. Bu olgu, elektron taşıma sistemindeki proteinlerin okside olarak kalıcı hasara maruz kalmasıyla iyice artacaktır.⁹⁸

2.3.1. Karbonil Grupları ve Kanser İlişkisi

Deney hayvanlarında yapılmış karsinogenez araştırmaları protein oksidasyonu ve karsinogenez arasındaki ilişkiye dikkat çekmektedir. Örneğin, karsinojen benzoapiren uygulanan rat'larda DNA'daki nükleotid hasarını gösteren 8-hidroksideoksiguanozin düzeylerinin yükselmesi protein karbonil grupları yükselmesiyle eş zamanlı gerçekleşmektedir.⁵⁰

Ayrıca renal karsinojen ve aynı zamanda renal ve hepatik bir tümör promotörü olan ferrik nitritoasetat, kinon redüktaz aktivitesini düşürürken protein karbonil seviyelerini anlamlı miktarda yükseltmektedir.⁴⁷ Bu bulgular, karsinogenez aşamasında karbonil grupları oluşumunun sürece katılabileceğine işaret etmektedir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Gereçler

3.1.1. Hasta Kanları

Deneylerde kullanılan hasta kanları Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Medikal Onkoloji Polikliniği'nden (24 hasta) temin edildi. Hastalardan alınan kan numuneleri serumuna ayrıldıktan sonra deney yapılıncaya kadar yaklaşık $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Kontrol grubu, öyküsünde hiçbir hastalığı olmayan, ilaç kullanmayan, sigara ve alkol alışkanlığı olmayan sağlıklı bireyler arasından seçilerek kan numuneleri alındı.

3.1.2. Deneylerde Kullanılan Araçlar

1. Santrifüj (Hermle Z 380)
2. Soğutmalı Santrifüj (Hermle Z 323 K)
3. Etüv (Nüve EN 400)
4. Hassas Teraziler (Schimadzu)
5. Vorteks (Heldolf Reax 200)
6. Spektrofotometre (Schimadzu, UV 1601)
7. Derin Dondurucu (Arçelik 2020D)

Ve araştırma laboratuvarında biyokimyasal tetkikler için gerekli olan diğer malzemeler kullanıldı.

3.1.3. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Hidroklorik asit, bakır sülfat, sodyum hidroksit, sodyum karbonat, Na-K tartarat, etanol, etil asetat, trikloroasetik asit, 2,4-DNPH için Merck tercih edildi.

Bovine Serum Albumin (BSA) ve Folin Ciolteu's Fenol Reaktifi için Sigma kullanıldı.

3.2. Uygulanan Yöntemler

3.2.1. Hasta Kanları

Cerrahi tedavi uygulanmamış, yeni teşhis edilmiş aktif tümörü bulunan 24 hastanın kanları alınarak; bu hastalara 3 kür 5-fluorouracil, adriamicin, siklofosfamid tedavisi uygulandı ve bu hastaların kemoterapi sonrasında tekrar kanları alındı. Kontrol grubu mamografi ile memesinde benign veya malign bir lezyon bulunmadığı saptanan sağlıklı bireylerden seçildi. (n:10)

Tablo 6: Hasta Özellikleri

	YAŞ	PATOLOJİK EVRE	
		n	%
MEDIAN	46	I	12 50
RANGE	27 -74	IIB	2 8,3
		IIIA	3 12,5
		IIIB	1 4,16
		IIIC	4 16,6
		TAM REMİSYON	2 8,3

3.2.2. Kan Alma ve Serum Hazırlama Protokolü

Serum protein karbonil grupları için 9 ml kapasiteli, steril, Vacuette marka hazır tüpler kullanıldı. Alınan kanlar, 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Serum numuneleri ayrılarak, ependorf tüplerde analiz gününe kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

3.2.3. Metodların Uygulanması

3.2.3.1. Serum Protein Karbonil Gruplarının Tayini

Protein karbonil grubu düzeyleri Levine⁵⁶ ve arkadaşlarının, 2,4-dinitrofenilhidrazinin karbonil grupları ile reaksiyonu sonucu 2,4-dinitrofenilhidrazon oluşması prensibine dayanan spektrofotometrik metoduna göre tayin edilmiştir.



Reaktifler:

1. %20 TCA
2. 2 M HCl
3. 10 mM 2,4-DNPH (2 M HCl'de hazırlandı)
4. Etanol/Etilasetat (1/1)
5. 2 N NaOH

Deneyin Yapılışı:

Tüplere 3,9 ml distile su, 0,1 ml serum konularak dilüsyonlar hazırlandı. Analiz için kullanılacak olan numunelerin her biri için iki ayrı ependorf tüpü hazırlandı. Tüplere 500 µl numune, 500µl %20'lik TCA eklenerek vortekslendi ve soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 11.000g'de 3 dakika santrifüjlendi. Süpernatant kısımları ayrılarak çalışmaya pellet kısmıyla devam edildi. Tüplerden birisine 500 µl 10 mM 2,4-DNPH, diğerine 500µl 2 M HCl eklendi ve 5 - 10 dakikada bir vortekslenmek suretiyle 1 saat oda sıcaklığında beklendi. Daha sonra her bir tüpe 500 µl %20 TCA eklendi, 11.000g'de 3 dakika santrifüjlenerek süpernatantları ayrıldı. Elde edilen pelletler, üzerlerine 1 ml etanol/etilasetat karışımı eklendikten sonra 11.000g'de 3 dakika santrifüjlenerek yıkandı. Süpernatantları ayrıldıktan sonra 1 ml etanol/etilasetat eklenip yıkama işlemi iki kez daha tekrarlandı. Bundan sonra pelletlerin üzerine 1 ml 2 N NaOH eklenerek çözünene kadar vortekslendi. Numuneler 37 °C'de etüvde 30 dakika bekletildikten sonra spektrofotometrede 380 nm'de, her bir numunenin 2 M HCl ilave edilerek hazırlanan ikinci tüpüne

karşı okundu. Ardından numunelerde protein tayini yapıldı. $\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ alınarak hesaplanan sonuçlar elde edilen protein miktarlarıyla nmol/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.3.2. Süpernatandaki Protein Miktarının Tayini

Protein tayini Lowry⁶⁰ metodu ile yapıldı.

Reaktifler:

1. A reaktifi:%2 Na_2CO_3 (0,1 M NaOH içerisinde)
2. B1 reaktifi:%2 Na-K tartarat
3. B2 reaktifi:%1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
4. Folin ciocalteu's Fenol: Distile su ile 1/1 oranında dilüe edildi
5. Standart: 1mg/ml bovin serum albumin (BSA)

Deneyin Yapılışı:

32 kısım A reaktifi, 1 kısım B1 reaktifi ve 1 kısım B2 reaktifi olacak şekilde B1,B2,A sırasıyla karıştırılmak suretiyle reaktif karışımı elde edildi. Numune, kör, standart 1,2 ve 3 tüpleri hazırlandı. Numune tüpüne 80 μl , köre 100 μl , standart 1'e 90 μl , standart 2'ye 80 μl ve standart 3'e 60 μl distile su konuldu. Standart tüplerine sırasıyla 10 μl , 20 μl ve 40 μl olarak BSA eklendi. Numune tüpüne 20 μl numune eklendikten sonra her tüpe 2 ml reaktif karışımı konularak iyice karıştırılıp 20 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Üzerlerine Folin ciocalteu's Fenol eklenip 40 dakika daha oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. 750 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı.

$$\text{Hesap: } \frac{\text{Numune absorbansı}}{\text{Standart absorbansı}} \times \text{standart konsantrasyonu} = \text{mg protein /ml}$$

3.3. Sonuçların Analizi

Verilerin istatistikî bilgileri Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 10.0 for Windows programı ile elde edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal-Wallis varyans analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. İkili grup karşılaştırılmasında Mann-Whitney U analizi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada meme kanserli hastalarda kemoterapi öncesi ve kemoterapi sonrası serum protein karbonil grubu düzeyleri incelenerek, sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Grupların serum protein karbonil grubu değerleri nmol/mg protein olarak Tablo 7'de, istatistiksel değerlendirme ise Tablo 8'de gösterilmiştir. Ölçümlerde de görüldüğü gibi; kemoterapi öncesi ile kemoterapi sonrasında serum protein karbonil düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p < 0,05$) vardır.

Sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu ile kemoterapi öncesi karşılaştırıldığında serum protein karbonil grubu düzeylerinin arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ($p < 0,001$) görülmektedir. Kontrol grubu ile kemoterapi sonrası karşılaştırıldığında serum protein karbonil grubu düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. ($p > 0,05$) Ancak göreceli olarak serum protein karbonil grubu düzeyi kemoterapi sonrasında kontrol grubundan daha yüksektir ve kontrol < sonra < önce olacak şekilde yükselmektedir. (Şekil 5)

Tablo 7: Serum protein karbonil gruplarının değerleri, ortalama ve standart sapmaları ile median değerleri.

Sıra No	Kontrol	KT. Öncesi	KT. Sonrası
1	0,70	0,911	0,806
2	0,55	3,12	1,376
3	0,61	2,6	1,245
4	0,69	2,5	2,028
5	0,62	2,003	1,134
6	0,64	0,991	0,494
7	0,53	3,596	2,246
8	0,68	2,755	2,379
9	0,54	3,1	2,358
10	0,67	1,874	1,556
11	-	1,895	1,122
12	-	1,333	1,055
13	-	1,353	0,638
14	-	1,377	0,645
15	-	0,866	0,107
16	-	2,42	0,344
17	-	1,566	0,516
18	-	0,928	0,194
19	-	0,527	0,244
20	-	0,947	0,803
21	-	2,27	1,931
22	-	1,807	1,166
23	-	0,633	0,331
24	-	2,762	2,127
Ort ± SD	0,62 ± 0,06	1,83 ± 0,87	1,11 ± 0,73
Median	0,63	1,84	1,09

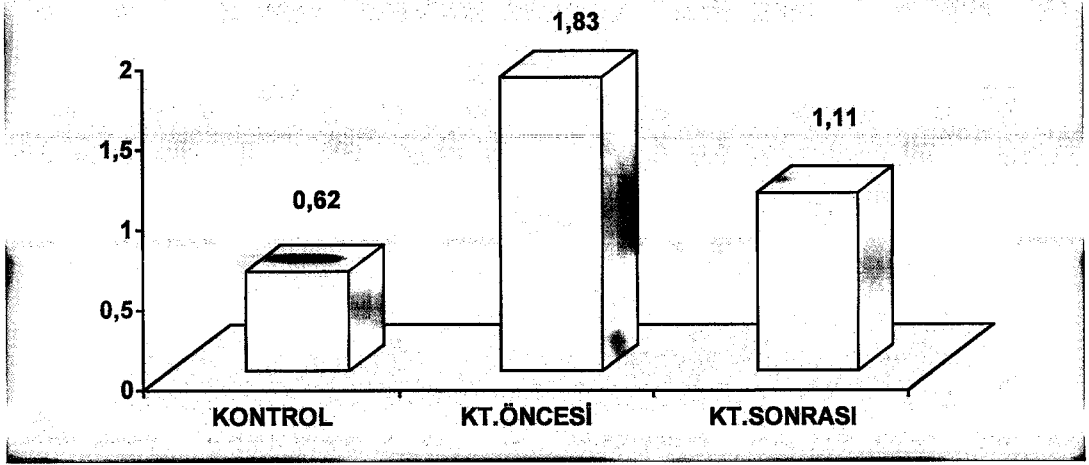
Tablo 8: Protein karbonil gruplarının istatistiksel değerlendirilmesi.

Grup	Protein Karbonil ¹	n	P değeri		
	Ort ± SD		Kontrol	Önce	Sonra
Kontrol	0,62 ± 0,06	10	-	0,00*	0,118
Grup A	1,83 ± 0,87	24	0,00*	-	0,005*
Grup B	1,11 ± 0,73	24	0,118	0,005*	-

¹: nmol/mg protein

*: istatistiksel olarak farklı

Şekil 6: Serum protein karbonil grubu düzeyleri.



5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Nörodejeneratif hastalıklar, diyabet, romatoid artirit, sepsis, kronik böbrek yetmezliği ve kanser gibi birçok hastalığın etiopatogenezinde oksidatif stres önemli rol oynamaktadır.^{9,21} Kanser hastalarında tümör büyümesi ve oluşumu ile oksidan-antioksidan denge arasında bir ilişki vardır.³ Özellikle reaktif oksijen türevlerinin kanserin başlangıç döneminde artabileceği bilinmektedir. Ancak kanser etiolojisi birçok faktöre dayalı bir hastalıktır, sadece serbest radikaller sorumlu tutulmamaktadır.¹⁸

Günümüzde oksidatif hasar belirteci olarak, lipid türevleri yerine daha stabil ve uzun ömürlü olan protein oksidasyon ürünlerinin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır.^{18,19} Proteinlerin oksidatif modifikasyonları, hidroksil, peroksil, alkoksil, hidroperoksit, hipoklorik asit ve peroksinitrit gibi ROS türevleri varlığında, direkt ve indirekt birçok yolla gerçekleşebilir.^{9,21}

Oksidatif hasarın nispeten erken aşamasında oluşan ve malondialdehit, okside glutatyon gibi diğer hasar parametrelerine göre, dolaşımda daha uzun süre ve stabil olarak kalabilen protein karbonil grupları¹⁸, güvenilir bir belirteç olarak kabul edilmektedir.^{18,65} Protein yapısındaki aminoasitlerin yan zincirlerinin oksidasyonu ya da peptid bağlarının oksidatif yıkımı, protein karbonil gruplarını oluşturabilmektedir.^{88,93} Protein karbonil gruplarının oluşumunda gözlenen diğer bir yol da, sistein, histidin, lizin aminoasitlerinin nükleofilik yan zincirlerinin, lipid veya karbonhidratlardan türeyen reaktif karbonil bileşikleriyle etkileşimidir.^{9,88}

Kanser ve protein karbonil grupları ilişkisini inceleyen ilk çalışma çocukluk çağı kanserleri üzerine Polonya'da yapılmıştır. 25'i beyin tümörü, 25'i kemik tümörü, 5'i karaciğer tümörü, 5'i lenfoma ve 5'i de germ hücre tümörü olmak üzere toplam 65 vakada serum protein karbonil grubu seviyeleri ölçülerek aynı yaş ortalamasındaki 40 sağlıklı çocuğun verileriyle kıyaslanmış ve kanserli grupta protein karbonil grubu düzeyleri sağlıklı gruptakinden iki kat yüksek olarak bulunmuştur. İstatistiksel fark ileri düzeyde anlamlı olarak belirlenmiştir.⁷² Biz de meme kanseri olan 24 hastayla yaptığımız çalışmada, hasta grubunun serum protein karbonil düzeylerini sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulduk.($p < 0,001$).Meme kanserli hastaların kemoterapi aldıktan sonraki serum protein karbonil düzeyleri, tedavi öncesi

döneme göre anlamlı olarak düşüş gösterirken ($p < 0,05$) , kontrol grubu düzeyine ulaşamamaktadır.

İnvivo şartlarda proteinler oksidatif ve nitrozatif hasarın başlıca hedefleridir. Pignatelli ve arkadaşları westernblot analizi ve immünopresipitasyon tekniği kullanarak yaptıkları çalışmada akciğer kanseri olan hastalarda özellikle fibrinojenin okside olduğunu, major plazma proteini olan albuminin okside olmadığını göstermişlerdir. Akciğer kanseri olan hastaların plazmalarında fibrinojen ve serüloplazmin düzeylerinin artışının sonucu olarak, bu proteinler oksidatif hasara karşı daha uygun hedefler olmaktadır. Okside olan fibrinojen, trombinin katalizlediği pıhtı oluşumuna engel olmaktadır. Bir çok protein ve enzimin amino asit rezidüleri okside olduklarında konformasyonel değişime uğramakta ve fonksiyonlarını kaybetmektedirler.⁷¹

Heidelberg Alman Kanser Araştırma Merkezi Kliniği'nde hastalar üzerinde ve tümör implante edilmiş deney hayvanlarında yapılmış çalışmalarda da serum protein karbonil grubu düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde yükseldiği gösterilmiştir.¹⁰⁴

Karbonil grupları çok reaktiftir ve protein ile nükleotidlerde artefaklar oluşturabilirler. Bazı karbonil bileşikler de DNA' da oluşturdukları modifikasyonlar yoluyla gen düzeyinde mutasyona yol açmaktadır.⁴⁶

Proteinlerde meydana gelen oksidatif hasar enzimatik fonksiyonların azalmasına ve protein katabolizmasının artışına neden olur. Özellikle kırmızı kürelerde meydana gelen protein oksidasyonu membran hasarından bağımsız olarak daha erken dönemde oluşur ve lipid peroksidasyona göre oksidatif hasarın daha erken bir göstergesidir.⁴⁹

Oksidatif stres belirteci olarak DNA, lipidler veya proteinlerin kullanılması ortamda bulunan ROS' un yapısına bağlıdır. Myeloperoksidaz sistemi tarafından üretilen hipoklorik asit (HOCl) karbonil gruplarının oluşumuna neden olurken, lipid ve DNA üzerindeki oksidan etkisi azdır.¹⁸

Protein karbonil düzeylerinin artışı sadece oksidatif stresi göstermez aynı zamanda protein disfonksiyonunun da göstergesidir.¹⁸

Mesane kanserli hastalar üzerine yapılan bir çalışmada proteinlere bağlı tiol grupları kanser hastalarında, sağlıklı bireylere göre yüksek bulunmuştur.¹⁰⁴ Özellikle hücre içi tiol

aktivitesinin sağlanmasında rol oynayan glutasyon düzeylerinin birçok kanser hastasında düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu hastalarda serum proteinlerinin ve tiol gruplarının azalışının, protein katabolizmasının ve degradasyonunun artışıyla beraber proteinlerde meydana gelen oksidatif modifikasyonlar sonucu olduğu düşünülmektedir.¹⁰⁴

Ushmorov ve arkadaşları fibrosarkomlu farelerde, kaseksinin etiopatogenezini araştırmışlardır. Protein katabolizmasının artışıyla beraber albumin düzeylerinin azalışı kanser kaseksisinin izlenmesinde kullanılmaktadır. Albumin düzeyinin azalışı, vücut kitlesinin azalmasıyla ve prognozla koreledir. Albuminin fonksiyonu onkotik basıncın sağlanması ve ödemin önlenmesidir. Fibrosarkomlu farelerde albuminin katabolizmasının artışı, protein oksidasyonu sonucu olabilir. Azalmış albumin düzeylerinin yanı sıra bu farelerde sistein/tiol ve glutasyon disülfid/glutasyon oranları da artmaktadır.¹⁰⁴

Karbonil gruplarının oluşumu ve tiol oksidasyonu ile ilgili bu çalışmalar protein oksidasyonu ve kanser arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızda da meme kanserli hastalarda tanı konduktan hemen sonra alınan kan örneklerindeki karbonil grupları düzeyi, hastalara tedavi verildikten sonraki dönemde bakılan karbonil düzeylerine göre anlamlı yükseklik göstermektedir. Ancak kullanılan kemoterapötik ajanlarla oksidatif hasar arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar kısıtlıdır. Li ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada oksidatif hasar belirteçlerinden olan MDA düzeyinin tedavide kullanılan ilaçlarla ilgisi tam olarak belirlenememiştir.⁵⁸

Zoli ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada meme kanseri hastalarında 5-FU ve adriamisin kullanılmış, kemoterapi öncesi ve sonrası apoptozis araştırılmış ve anlamlı bir fark bulunamamıştır.¹³ Burcombe ve arkadaşları tarafından meme kanserli hastalarda yapılan bir diğer çalışmanın sonucunda ise kullanılan kemoterapötiklerle apoptozis arasında klinik, patolojik ve radyolojik kriterlerde sonuçlar arasında kayda değer bir fark olmadığı bildirilmiştir.¹⁰⁶

Radyoterapi sonrasında saatler içerisinde piknoz ve karyoreksis gelişmekte ve hücre kaybı meydana gelmektedir.⁸ Radyasyona bağlı enteropatinin incelendiği bir çalışmada, aktinomisin-D, adriamisin, metotreksat, vinka alkaloidleri, 5-FU, hidroksiüre, bleomisin,

siklofosfamid ve nitroz üre grubuna dahil ajanların radyasyon tedavisinin barsak mukozası üzerine olan bu olumsuz etkileri artırdığı belirlenmiştir.^{75,91}

Bunun yanı sıra; radyasyonun da dahil olduğu çoğu kemoterapötik ajanların apoptozisi indüklediği bilinmektedir. Apoptozisi indükleyebilmek kanser tedavisinde istenen bir durumdur. Küçük hücreli olmayan akciğer tümörlerinde cisplatin, topotekan, gemitabine gibi antikanser ilaçların apoptozisi indüklerken, caspase -8 aktivasyonuna neden oldukları gösterilmiştir.⁶² Bunlara ilaveten, Tanaka ve arkadaşları postoperative ve adjuvan 5-FU uygulamasının etkinliğini göstermek için apoptozis ve P53 genini incelemişler, apoptozisin bu uygulamalarla indüklendiğini göstermişlerdir.⁹²

Sonuç olarak çalışmamızda meme kanserli hastalarda oksidatif hasarın belirteci olan ve protein oksidasyonunu gösteren karbonil grubu düzeylerinin arttığını ve kemoterapi sonrasında bu düzeylerde anlamlı bir düşüş olduğunu belirledik. Bu hastaların komplikasyonlar ve prognozu açısından izlenmesinde serum protein karbonil gruplarının kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Bu amaçla hasta gruplarının daha uzun süreli takibi uygun olabilir.

6. ÖZET

Protein oksidasyonu, protein disfonksiyonu ve hastalıklar arasındaki ilişki büyük ölçüde belirsizdir, ancak hastalıkların etiolojisinde enzimlerin ve yapısal proteinlerin oksidatif modifikasyonlarının rol oynadığı bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı meme kanserli hastalarda oksidatif stresle protein karbonil grupları arasındaki ilişkiyi göstermektir.

Protein karbonil grupları 2,4-dinitrofenilhidrazin ile karbonil gruplarının derivasyonu sonucu oluşan stabil 2,4-dinitrofenilhidrazon ürününün tesbitiyle gerçekleşir. Bu ürün spektrofotometrik olarak ölçülür.

Burada sunulan sonuçlar proteinlerin oksidatif modifikasyonunun göstergesi olan 2,4-dinitrofenilhidrazinle reaksiyona girmiş karbonil ürünlerinin tedavi almamış meme kanserli hastaların serumlarında, tedavi alan meme kanserli hastalara oranla arttığını göstermektedir.

Bu çalışmanın sonuçları meme kanserinde serbest radikal birikimini ve proteinlerin oksidasyonu ile hasar oluşumunu göstermektedir. Serum protein karbonil grupları meme kanserinin tedavisiyle ilişkilidir.

7. SUMMARY

The relationship among protein oxidation, protein dysfunction and diseases remain largely unclear, however, it is known that oxidative modification of enzymes and structural proteins may play a significant role in the aetiology of diseases.

The aim of this study was to investigate the relation between oxidative stress and protein carbonyl group in patients with breast cancer.

The assay for detection of protein carbonyl groups involve derivatisation of the carbonyl group with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), which leads to formation of a stable dinitrophenyl (DNP) hydrazone product. This product was detected by a spectrophotometric assay.

The result presented here show that the serum level of 2,4-dinitrophenylhydrazone-reactive carbonyl derivatives, as a marker of oxidative modification of proteins, increased in plasma of patients with breast cancer before treatment compared to patients with breast cancer after treatment with chemotherapy.

The results presented support the statement that in breast cancer accumulation of free radical species and an oxidation of susceptible protein injury occurs. Serum protein carbonyl groups level correlates with the treatment of breast cancer.

8. KAYNAKLAR

- 1) ADAMS J.D., LAUTERBURG B.H., MITCHELL J.R.: Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat: regulation and response to oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther*, 227, 749-754. (1983)
- 2) AKKUŞ İ.: Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1-84, 106-111. Mimoza Yayınları, Konya. (1995)
- 3) ALAGÖL H., ERDEM E., SANCAK B., TÜRKMEN G., ÇAMLİBEL M., BUĞDAYCI G.: Nitric oxide biosynthesis and malondialdehide levels in advanced breast cancer. *Aust N.Z.J. Surg*, 69, 647-650. (1999)
- 4) AMBS S., MERRIAM W.G., BENNETT W.P., FELLE-Y-BOSCO E., OGUNFUSIKA M.O., OSER S.M., KLEIN S., SHIELDS P.G., BILLIAR T.R., HARRIS C.C.: Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Res*, 58, 334-341. (1998)
- 5) ARIKAN S.: Mesane Kanserinde Klinik Evrelendirme ile Antioksidan Enzim Aktiviteleri Arasındaki İlişki, Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul. (1999)
- 6) BAŞAĞA H.S.: Biochemical aspects of free radicals. *Biochem cell Biol*, 68, 989-998. (1990)
- 7) BAYNES J.W. and THORPE S.R.: Role of oxidative stress in dibetic complications. *Diabetes*, 48, 1-8. (1999)
- 8) BERTHRONG M., FAJARDO L.F.: Radiation injury in surgical pathology. Part II. Alimentary Tract. *Am J Surg Pathol*, 5, 153-178 (1981)
- 9) BERTLETT B.S., STADTMAN E.R.: Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*, 272, 20313-20316. (1997)
- 10) BİNGÖL F., AYDIN S., AÇIKGÖZ Ş.: Serbest Radikaller. *Ankara Hastanesi Tıp Dergisi*, 28, 2. (1993)

- 11) BLAND J.S.: Oxidants and antioxidants in clinical medicine: Past, present and future potential. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*, 5, 255-281. (1995)
- 12) BOYUNAĞA H., ÇELİK C.: Serbest radikaller ve hücre sel denge. *Bilim Teknik Dergisi*, 347, 98-100. (1996)
- 13) BURCOMBE R., WILSON G.D., DOWSETT M., KHAN I., RICHMAN P.I., DALEY F., DETRE S., MAKRIS A.: Evaluation of Ki-67 proliferation and apoptotic index before, during and after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Breast Cancer Res*, 8, 3-31. (2006)
- 14) BUTTERFIELD D.A., KOPPAL T., HOWARD B., SUBRAMANIAM R., HALL N., HENSLEY K., YATIN S., ALLEN K., AKSENOV M., AKSENOVA M., CARNEY J.: Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitron and vitamin E. *Ann N Y Acad Sci*, 854, 448-462. (1998)
- 15) CHEESEMAN K.H., SLATER T.F.: An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49, 481-493. (1993)
- 16) CHEVION M., BERENSHTEIN E., STADTMAN E.R.: Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res*, 33, 99-108. (2000)
- 17) COOPER C.E., VOLLAARD N.B.J., CHOUERI T., WILSON M.T.: Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 30, 280-285. (2001)
- 18) DALLE-DONNE I., ROSSI R., GIUSTARINI D., MILZANI A., COLOMBO R.: Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329, 23-38. (2003)
- 19) DAVIES M.J., FU S., WANG H., DEAN R.T.: Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med*, 27, 1151-1163. (1999)
- 20) DAWSON V.L., DAWSON T.M.: Nitric oxide actions in neurochemistry. *Neurochem Int*, 29, 97-110. (1996)
- 21) DEAN R.T., FU S., STOCKER R., DAVIES M.J.: Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*, 324, 1-18. (1997)
- 22) DEL MAESTRO R.F.: An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiologica Scand*, 492, 153-168. (1980)

- 23) DESCAMPS- LATSCHA B., WITKO SARSAT V.: Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney Int*, 59 (Suppl.78), 108-113. (2001)
- 24) DORMANDY T.L.: An approach to free radicals. *Lancet*, 2 (8357), 1010-1014. (1983)
- 25) DREHER D., JUNOD A.F.: Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer*, 32A, 30-38. (1996)
- 26) EVANS P., LYRAS L., HALLIWELL B.: Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. *Methods Enzymol*, 300, 145-156. (1999)
- 27) FAGAN J.M., SLECZKA B.G., SOHAR I.: Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, 31, 751-757. (1999)
- 28) FARBER J.M., LEVINE R.L.: Sequence of a peptide susceptible to mixed-function oxidation: probable cation binding site in glutamine synthetase. *J Biol Chem*, 261, 4575-4578. (1986)
- 29) FREEMAN B.A., CRAPO J.D.: Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 47, 412-426. (1982)
- 30) FREI B.: Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanism action. *Am J Med*, 97, 5-13. (1994)
- 31) GADEK J.E.: Adverse effects of neutrophils on the lung. *Am J Med*, 92, 27-31. (1992)
- 32) GARRISON W.M.: Reaction mechanisms in radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem Rev*, 87, 381-398. (1987)
- 33) GRANDHEE S., MONRIER V.M.: Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine. *J Biol Chem*, 266, 11649-11653. (1991)
- 34) GRIFFITHS HR: Antioxidant and protein oxidation. *Free Radic Res*, 33, 47-58. (2000)
- 35) GRUNE T., REINHEKEL T., DAVIES K.J.A.: Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *J Biol Chem*, 271, 15504-15509. (1996)
- 36) GRUNE T., REINHECKEL T., JOSHI M., DAVIES K.J.A.: Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress-role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J Biol Chem*, 270, 23514-23521. (1995)
- 37) GUTTERIDGE J.M.C.: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, 41, 1819-1828. (1995)

- 38) HALLIWELL B.: Free radicals, reactive oxygen species and human disease: A critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Path*, 70, 737-757. (1989)
- 39) HALLIWELL B.: Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med*, 91, 14-22. (1991)
- 40) HALLIWELL B., CHIRICO S.: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*, 57, 715-725. (1993)
- 41) HALLIWELL B.: Oxidative stress, nutrition and health, experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Rad Pres*, 25, 57-74. (1996)
- 42) HALLIWELL B.: Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet*, 344, 721-724. (1994)
- 43) HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.: *Free Radicals In Biology and Medicine*. 3. ed, Oxford University Press, New York. (1999)
- 44) HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.: Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet*, 1, 1396-1397. (1984)
- 45) HARMAN D.: Free radicals in aging. *Mol Cell Biochem*, 84, 155-161. (1988)
- 46) IUCHI Y., KANEKO T., MATSUKI S., ISHII T., IKEDA Y., UCHIDA K., FUJII J.: Carbonyl stress and detoxification ability in the male genital tract and testis of rats. *Histochem Cell Biol*, 121, 123-130. (2004)
- 47) IQBAL M., SHARMA S.D., RAHMAN A., TRIKHA P., ATHAR M.: Evidence that ferric nitrilotriacetate mediates oxidative stress by down-regulating DT-diaphorase activity: implications for carcinogenesis. *Cancer Lett*, 141, 151-157. (1999)
- 48) KEHRER J.P.: Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol*, 23, 21-48. (1993)
- 49) KELLER R.J., HALMES N.C., HINSON J.A., PUMFORD N.R.: Immunochemical detection of oxidized proteins. *Chem. Res. Toxicol.*, 6, 430-433. (1993)
- 50) KIM K.B., LEE B.M.: Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. *Cancer Lett*, 113, 205-212. (1997)

- 51) KLEBANOFF S.J.: Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *J Bacteriol*, 95, 2131. (1968)
- 52) KONER B.C., BANERJEE B.D., RAY A.: Effects of in vivo generation of oxygen free radicals on immune responsiveness in rabbits. *Immunol Lett*, 59, 127-131. (1997)
- 53) KONUKOĞLU D.: Serbest radikaller ve önemleri. *Aile Hek Derg*, 1, 197-200. (1997)
- 54) KOJIMA M., MATSUKI O., NAMURA T., YAMAOKA K., TAKAHASHI M., NIKI E.: Elevation of antioxidant potency in the brain of mice by low-dose γ -ray irradiation and its effect on 1-methyl-4-phenyl- 1,2,3,6-tetrahydropyridine (MTPT)-induced brain damage. *Free Radical biology & Medicine*, 26, 388-395. (1999)
- 55) LAMIRANDE E., GAGNON C.: Reactive oxygen species and reproduction. *Adv Exp Med Biol*, 366, 185-196. (1994)
- 56) LEVINE R.L., GARLAND D., OLIVER C.N., AMICI A., CLIMENT I., LENZ A.G., AHN B.W., SHALTIEL S., STADTMAN E.R.: Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Met In Enzimology*, 186, 464-478. (1990)
- 57) LEVINE R.L.: Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med*, 32, 790-796. (2002)
- 58) LI B., GUTIERREZ P.L., AMSTAD P., BLOUGH N.V.: Hydroxyl radical production by mouse epidermal cell line in the presence of quinone anti-cancer compounds. *Chem Res Toxicol*, 12, 1042-1049. (1999)
- 59) LIU J., WANG X., SHIGENAGA M.K., YEO H.C., MORI A.: Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein and DNA in the brain of the rats. *Faseb J*, 10, 1532-1538. (1996)
- 60) LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Biochem*, 193, 145-157. (1951)
- 61) LYONS T.J.: Glycation, carbonyl stress, eagles, and the vascular complications of diabetes. *Semin Vasc Med*, 2, 175-189. (2002)
- 62) MACLUSKEY M., BAILLIE R., CHNDRACHUD L.M., PENDLETON N., SCHOR A.M.: High levels of apoptosis are associated with improved survival in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*, 20, 2123-2128. (2000)

- 63) MARNETT L.J.: Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21, 361-370. (2000)
- 64) MARSH J.P., MOSSMAN B.T.: Role of asbestos and active oxygen species in activation and expression of ornithine decarboxylase in hamster tracheal epithelial cells. *Cancer Res*, 51, 167-173. (1991)
- 65) MASSY Z.A., NGUYEN-KHOA T., BEAUVAIS C.H.: Oxidative stress and chronic renal failure: markers and management. *J Nephrol*, 15, 336-341. (2002)
- 66) MEISTER A., ANDERSON M.E.: Glutathione. *Ann Rev Biochem*, 52, 711-760. (1983)
- 67) MOSLEN M.T.: Reactive oxygen species in normal physiology, cell, injury and phagocytosis. *Adv Exp Med Biol*, 366, 17-27. (1994)
- 68) MURRAY R.K., GRANNER D.K., MAYES P.A., RODWELL V.W.: *Harper's Biochemistry*, 24. ed, Appleton & Lange, 757. (1996)
- 69) PANTKE U., VOLK T., SCHMUTZLER M., KOX W.J., SITE N., GRUNE T.: Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Radic Biol Med*, 27, 9-10. (1999)
- 70) PARK J.R., TAPPEL A.L.: Protein damage and lipid peroxidation; effects of diethyl maleate, bromotrichloromethane and vitamin E on ammonia, urea and enzymes involved in ammonia metabolism. *Toxicology Letters*, 58, 29-36. (1991)
- 71) PIGNATELLI B., LI C.Q., BOFFETTA P., CHEN Q., AHRENS W., NYBERG F., MUKERIA A., BRUSKE-HOHLFELD I., FORTES C., CONSTANTINESCU V., ISCHIROPOULOS H., OHSHIMA H.: Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. *Cancer Res*, 61, 778-784. (2001)
- 72) POPADIUK S., KORZON M., RENKE J., WOZNIAK M.: Carbonyl groups content on the basis of protein peroxidation analysis with total antioxidant status in blood of children with cancers. *Wiad Lek*, 51, 107-112. (1998)
- 73) REZNICK A.Z., PACKER L.: Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*, 233, 357-363. (1994)
- 74) ROBBINS AND KUMAR: *Basic Pathology*. 4. edition, 247. (1990)

- 75) ROTMAN M., ROGOW L., DELEON G., HESKEL N.: Supportive therapy in radiation oncology. *Cancer*, 39, 744-750. (1977)
- 76) ROSS R.K., JONES P.A., YU M.C.: Bladder cancer epidemiology and pathogenesis. *Semin Oncol*, 23, 536-545. (1996)
- 77) SCHRECK A., ALBERMANN K., BAEUERLE P.A.: Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. *Free Radic Biol Med*, 17, 221-237. (1992)
- 78) SCHUESSLER H., SCHILLING K.: Oxygen effect in radiolysis of proteins. Part 2. bovine serum albumin. *Int J Radiat Biol*, 45, 267-281. (1984)
- 79) SEVEN A., CANDAN G.: Antioksidan savunma sistemleri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 27, 41-50. (1996)
- 80) SEVENIAN A., HOCHSTEIN P.: Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann Rev Nutr*, 5, 365-390. (1985)
- 81) SHACTER E.: Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev*, 32, 307-326. (2000)
- 82) SHAN X, AW T.Y., JONES D.P.: Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmac Ther*, 47, 61-71. (1990)
- 83) SHRINGARPURE R., DAVIES K.J.A.: Protein turnover the proteasome in aging and disease. *Free Radic Biol & Med*, 32, 1084-1089. (2002)
- 84) SIEMS W.G., ZOLLNER H., GRUNE T., ESTERBAUER H.: Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes: 1,4-dihydroxynonenal is not the main product. *J Lipid Res*, 38, 612-622. (1997)
- 85) SOUTHORN P.A., POWIS G.: Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc*, 63, 381-390. (1988)
- 86) SPALLHOLZ J.E.: Selenium and glutathione peroxidase; Essential nutrient and antioxidant component of the immune system. *Adv Eep Med Biol*, 262, 145-158. (1990)
- 87) STADTMAN E.R.: Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med*, 9, 315-325. (1990)

- 88) STADTMAN E.R., BERLETT B.S.: Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol*, 10, 485-494. (1997)
- 89) STADTMAN E.R., LEVINE R.L.: Protein oxidation. *Ann NY Acad Sci*, 899, 191-208. (2000)
- 90) STADTMAN E.R., LEVINE R.L.: Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25, 207-218. (2003)
- 91) STEWART J.R., GIBBS F.A.: Prevention of radiation injury: predictability and preventability of complications of radiation therapy. *Annu Rev Med*, 33, 385-395. (1982)
- 92) TANAKA F., OTAKE Y., YANAGIHARA K., YAMADA T., MIYAHARA R., KAWAND Y., LI M., INUI K., WADA H.: Apoptosis and P53 status predict the efficacy of postoperative administration of UFT in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*, 84, 263-269. (2001)
- 93) THEROND P., BONEFONT-ROUSSELOT D., DAVIT-SPRAUL A., CONTI M., LEGRAND A.: Biomarkers of oxidative stress: An analytical approach. *Curr Opin Nutr Metab Care*, 3, 373-384. (2003)
- 94) TOLEDANO M.B., LEONARD W.J.: Modulation of transcription factor NF-kappa B binding activity by oxidation-reduction in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 4328-4332. (1991)
- 95) UCHIDA K., KATO Y., KAWAKISHI S.: A novel mechanism for oxidative damage of prolyl peptides induced by hydroxyl radicals. *Biochem Biophys Res Commun*, 169, 265-271. (1990)
- 96) UCHIDA K., STADTMAN E.R.: Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 268, 6388-6393. (1993)
- 97) UYSAL M.: Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim*, 11, 336-341. (1998)
- 98) VAN DER LOO B., LABUGGER R., SKEPPER J.N., BACHSCHMID M., KILO J., POWELL J.M., PALACIOS-CALLENDER M., ERUSALIMSKY J.D., QUASCHNING T., MALINSKI T., GYGI D., ULLRICH V., LUSCHER T.F.: Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med*, 192, 1731-1744. (2000)

- 99) VAN DER VLIET A., EISERICH J.P., SHIGENAGA M.K., CROSS C.E.: Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract: epiphenomena or pathobiologic mechanism of disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 160, 1-9. (1999)
- 100) WINROW V., WINYORD R.G., MORRIS C.J., BLOKE D.R.: Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Brit Med Bulletin*, 49, 506-522. (1993)
- 101) WITKO-SARSAT V., FRIEDLANDER M., CAPELLERE-BLANDIN C., NGUYEN-KHOA T., NGUYEN A.T.: Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremic. *Kidney Int*, 49, 1304-1313. (1996)
- 102) WOLFF S.P.: Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzymol*, 233, 182-189. (1994)
- 103) YALÇIN S.: Antioksidanlar. *Klinik Gelişim*, 11, 342-346. (1998)
- 104) YILMAZ İ., AKCAY T., ÇAKATAY U., TELCI A., ATAUS S., YALCIN V.: Relation between bladder cancer and protein oxidation. *Inter. Urology and Neph.*, 35, 345-350. (2003)
- 105) ZEIS B.M., ANDERSON R.: Clofazimine-mediated stimulation of prostaglandin synthesis and free radical production as novel mechanisms of drug-induced immunosuppression. *Int J Immunopharmacol*, 8, 731-739. (1986)
- 106) ZOLI W., ULIVI P., TESEI A., FABBRI F., ROSETTI M., MALTONI R., GIUNCHI D.C., RICOTTI L., BRIGLIADORI G., VANNINI I., AMADORI D.: Addition of 5-fluorouracil to doxorubicin- paclitaxel sequence increases caspase-dependent apoptosis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res*, 7, 681-689. (2005)

9. ÖZGEÇMİŞ

01.04.1978 tarihinde Ankara'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Ankara'da tamamladıktan sonra lisans öğrenimimi 1996'da başladığım Erciyes Üniversitesi Yozgat Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde tamamladım. Çeşitli dershanelerde kimya öğretmeni olarak görev yaptım. Şubat 2004'te Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım.

