

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKUT HİPOBARİK HİPOKSİDE YAŞLI VE GENÇ SIÇAN KALP  
KASINDA OKSİDATİF HASAR

Eda AĞAŞCIOĞLU

Spor Bilimleri ve Teknolojisi Programı  
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Haydar DEMİREL

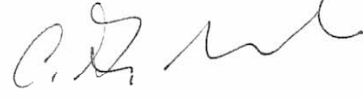
ANKARA

2007

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Spor Bilimleri ve Teknolojisi Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

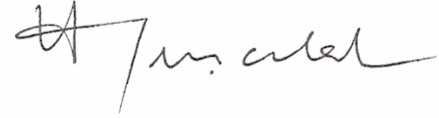
Jüri Başkanı: Prof. Dr. Caner Açıkada  
Hacettepe Üniversitesi



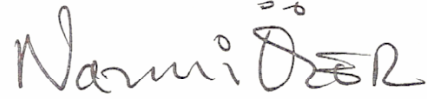
Danışman: Prof. Dr. A. Haydar Demirel  
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Hakan Fıçıcılar  
Ankara Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Nazmi Özer  
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Metin Baştuğ  
Ankara Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Ozer  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesine katkılarından dolayı:

Öncelikle tez danışmanım olarak tez çalışmalarım süresince yaptığı yönlendirmeler, öğrettiği teknik ve ayırdığı zaman için Prof. Dr. Haydar Demirel'e;

Lipit peroksidasyon ve protein oksidasyon parametrelerini tayin yöntemlerini öğreten ve çalışmalarımız esnasında karşılaştığımız her türlü sıkıntımızda hiçbir karşılık beklemeden gerek tecrübesiyle gerekse bilgisiyle bizden yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Ufuk Çakatay'a;

İhtiyacım olduğunda teknik destek ve bilgi paylaşımını esirgemeyen ve tez komitesinde görev alarak bu çalışmaya değerli katkılar sağlayan Prof. Dr. Hakan Fıçıcılar'a ve Prof. Dr. Metin Baştuğ'a;

İhtiyacım olduğunda bilgisine başvurduğum ve tez komitesinde görev alarak çalışmamıza değerli katkılar sağlayan Prof. Dr. Nazmi Özer'e;

Tez komitesinde görev alarak çalışmamıza değerli katkılar sağlayan Prof. Dr. Caner Açıkkada'ya;

Bize yükselti çemberini ve hayvan laboratuvarını kullanma imkânı veren AÜ Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'na;

Hayvan dokusu alımı esnasında, karşılaştığım her türlü sıkıntıda yanımda bulunan, özellikle laboratuvar çalışmalarım ve tez yazımı süresince yardımını esirgemeyen arkadaşım Rıdvan Çolak'a;

Akut hipobarik hipoksi hayvan deneyleri esnasında, hayvanların barınması, beslenmesi ve doku alımında bilgi ve becerilerini bizimle paylaşmaktan çekinmeyen arkadaşım Ali Doğan Dursun'a;

Hayvan dokusu alımı esnasında yardımını aldığımız Yrd. Doç. Dr. Nazan Koşar'a ve istatistiksel analizleri için bilgisine başvurduğumuz Dr. Tahir Hazır'a;

Bilgisine başvurduğum ve akademik problemlerim karşısında bana yol gösteren Enstitü Sekreteri Füsün Torun Hanım'a;

Bu tez çalışması ve yazımı esnasında bana sağladığı manevi destek ve sıkıntılı zamanlarımda gösterdiği anlayıştan dolayı eşim Mehmet Ali Ağaşçioğlu'na ve ona ayıramadığım zaman karşısında sükûnetini bozmayan kızım Miray Su Ağaşçioğlu'na;

Her ihtiyacım olduğunda yardımına koşan ablam Günay Çakmak'a ve Sahure Çakmak'a içten teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Ağaçcıoğlu, E. Akut hipobarik hipoksida yaşlı ve genç sıçan kalp kasında oksidatif hasar. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Spor Bilimleri ve Teknolojisi Doktora Tezi, Ankara, 2007.** Bu tez çalışmasının hedefi; 1) akut orta şiddetli (6000m) ve şiddetli (8000m) hipobarik hipoksida yaşlı ve genç sıçan kalp kasında oluşan oksidatif hasarı; 2) yaşlı sıçanlarda genç sıçanlarınkine göre miyokardiyal oksidatif hasarın, orta ve şiddetli hipobarik hipoksida, nasıl olacağını; 3) önceden akut orta şiddetli hipobarik hipoksiye tabi tutulan yaşlı ve genç sıçan kalp kasının sonradan şiddetli hipobarik hipoksida oluşan oksidatif hasara karşı koruma geliştirip geliştiremeyeceğini araştırmaktır. Bu nedenle çalışmamızda yaşlı (20 ay) ve genç (4 ay) Wistar Albino sıçanları kullanılmıştır. Sıçanlar 6000m, 8000m ve 6000+8000m akut hipobarik hipoksida 6 saat tutulmuş ve kalp kası oksidatif hasarı ve Hsp72 düzeyleri incelenmiştir. Oksidatif hasar parametreleri olarak PCO, AOPP, LHP, T-SH ve P-SH düzeyleri saptanmıştır. Oksidatif hasar parametreleri genel olarak her bir yükselti seviyesinde yaşlı sıçanlarda genç sıçanlarınkine göre daha yüksek olarak bulunmuştur. Diğer taraftan hem yaşlı hem de genç sıçan gruplarında genel olarak yükselti seviyesi arttıkça PCO, AOPP, LHP düzeyleri de artmıştır.

T-SH ve P-SH düzeyleri ise yaşlı ve genç sıçanlarda yükselti seviyesi arttıkça azalmıştır. Hsp72 düzeyinde ise gruplarda herhangi bir artış saptanmamıştır. Bulgularımız yaşlıların miyokard dokusunun genel olarak serbest radikal hasarına daha yatkın olabileceği görüşünü desteklerken, akut hipobarik hipoksinin yaşlılarda ekstra oksidatif hasara neden olabileceği görüşünü desteklememektedir. Ayrıca Hsp72 bulgularımız, 6000m hipobarik hipoksi koşulunun yaşlı ve genç sıçanlarda Hsp72 indüksiyonunu uyurabilecek kadar şiddetli bir stres oluşturmadığı yönündedir.

Anahtar Kelimeler: Akut hipobarik hipoksi, yaşlı, kalp kası, oksidatif hasar, Hsp72

## ABSTRACT

**Ağaçcıoğlu, E. Old and young rats' heart muscle oxidative damage in acute hypobaric hypoxia. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Sport Science and Technology, Ankara, 2007.**

This thesis was aimed at researching 1) the level of old and young rats heart muscles oxidative damage in the situation of acute mild (6000m) and acute severe (8000m) hypobaric hypoxia; 2) under the condition of either acute mild or severe hypobaric hypoxia how would the old rats myocardial oxidative damage level be comparing to young rats myocardial oxidative damage; 3) whether or not young and old rats heart muscles, under severe hypobaric hypoxia condition, would develop protection against oxidative damage if they would go under mild hypobaric hypoxia situation before going to severe hypobaric hypoxia. In the present study 20 month-old Wister Albino rats were considered as old and 4 month-old Wister Albino rats were considered as young. Young and old rats were exposed to 6000m, 8000m and 6000+8000m acute hypobaric hypoxia for 6 hours. Heart muscles oxidative damage parameters (AOPP, PCO, LHP, T-SH, P-SH) and Hsp72 levels were determined. In general, oxidative damage parameters were found to be higher in old rats' heart muscles than young rats' hearts muscles on each altitude level. Besides, either young or old rats' heart muscles AOPP, PCO, LHP levels illustrated increments in parallel to the inclining levels of altitudes.

T-SH and P-SH levels exhibited decrements in opposite to the increasing levels of altitudes. There was no change in Hsp72 level across all the groups. Our findings support common belief that older myocardial tissue is more prone to oxidative damage than younger myocardial tissue, but contrary to common belief acute hypobaric hypoxia could not cause an extra oxidative damage to old rats' heart muscle. Moreover, Hsp72 result demonstrated that 6000m acute hypobaric hypoxia could not create enough stress to stimulate Hsp72 induction.

**Key Words:** Acute hypobaric hypoxia, old, heart muscle, oxidative damage, HSP72

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Serbest Radikaller	6
2.2. Hipoksi ve Serbest Radikaller	8
2.3. Yaşlanma ve Serbest Radikaller	10
2.4. Protein Oksidasyonu	10
2.5. Protein Karbonil Oluşumu	12
2.6. Protein Tiyol Gruplarının Oksidasyonu	13
2.7. İleri Oksidasyon Protein Ürünlerinin Oluşumu	13
2.8. Lipit Peroksidasyonu	14
2.9. Sıcak Şoku Proteinleri	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Gereçler	18
3.2. Yöntemler	19
3.2.1. Deney Kurgusu	19
3.2.2. DeneKler	19
3.2.3. Biyokimyasal Analizler İçin Dokunun Hazırlanması	20
3.2.4. Doku Homojenizasyonu	20
3.2.5. Biyokimyasal Analizler	20
3.2.5.1. Protein Karbonil Gruplarının Tayini	20
3.2.5.2. Total Tiyol ve Non-Protein Tiyol Tayini	21
3.2.5.3. İleri Oksidasyon Protein Ürünlerinin Tayini	22

3.2.5.4. Lipit Hidroperoksitlerin Tayini	22
3.2.5.5. Hsp72 Düzeyinin Belirlenmesi	23
3.2.5.6. Sol Ventrikül Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	24
3.3. Verilerin Analizi	24
4. BULGULAR	25
4.1. Oksidatif Hasar Değişkenlerini Yaşlı ve Genç Sıçan Gruplarına Göre Karşılaştırılması	26
4.1.1. Yaşlı ve Genç Sıçan Kontrol Grupları	26
4.1.2. Yaşlı ve Genç Sıçan 6000m Grupları	26
4.1.3. Yaşlı ve Genç Sıçan 8000m Grupları	27
4.1.4. Yaşlı ve Genç Sıçan 6000+8000m Grupları	27
4.2. Oksidatif Hasar Değişkenlerinin Yükselti Seviyelerine Göre Karşılaştırılması	27
4.2.1 Yaşlı Sıçan Grupları	27
4.2.1.1. Yaşlı Sıçan Kontrol ve 6000m Grupları	27
4.2.1.2. Yaşlı Sıçan Kontrol ve 8000m Grupları	28
4.2.1.3. Yaşlı Sıçan Kontrol ve 6000+8000m Grupları	28
4.2.1.4. Yaşlı Sıçan 6000m ve 8000m Gruplarının	29
4.2.1.5. Yaşlı Sıçan 6000m ve 6000+8000m Grupları	29
4.2.1.6. Yaşlı Sıçan 8000m ve 6000+8000m Grupları	29
4.2.2. Genç Sıçan Grupları	29
4.2.2.1. Genç Sıçan Kontrol ve 6000m Grupları	29
4.2.2.2. Genç Sıçan Kontrol ve 8000m Grupları	30
4.2.2.3. Genç Sıçan Kontrol ve 6000+8000m Grupları	30
4.2.2.4. Genç Sıçan 6000m ve 8000m Grupları	30
4.2.2.5. Genç Sıçan 6000m ve 6000+8000m Grupları	31
4.2.2.6. Genç Sıçan 8000m ve 6000+8000m Grupları	31
4.3. PCO ve PSH Korelasyonu	31
4.4. Hsp72 Düzeyi	32
5. TARTIŞMA	33
5.1. ROS ve Protein Hasarı	34
5.1.1. Yaşlanma ve Protein Karbonil	34

5.1.2. Akut Hipobarik Hipoksi ve Protein Karbonil	35
5.1.3. Yaşlanma ve İleri Oksidasyon Protein Ürünleri	37
5.1.4. Akut Hipobarik Hipoksi ve İleri Oksidasyon Protein Ürünleri	37
5.1.5 Yaşlanma ve Tiyoller	38
5.1.6. Akut Hipobarik Hipoksi ve Tiyoller	38
5.2. ROS ve Lipit Peroksidasyonu	40
5.2.1. Yaşlanma ve Lipit Peroksidasyonu	40
5.2.2. Akut Hipobarik Hipoksi ve Lipit Peroksidasyon	40
5.3. Yaşlanma, Akut Hipobarik Hipoksi ve Hsp72	41
6. SONÇ ve ÖNERİLER	44
KAYNAKLAR	46



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AHH	Akut hipobarik hipoksi
gk	Genç sıçan kontrol grubu
yk	Yaşlı sıçan kontrol grubu
g6m	Genç 6000m yükselti seviyesi sıçan grubu
y6m	Yaşlı 6000m yükselti seviyesi sıçan grubu
g8m	Genç 8000m yükselti seviyesi sıçan grubu
y8m	Yaşlı 8000m yükselti seviyesi sıçan grubu
g6+8m	Genç 6000+8000m yükselti seviyesi sıçan grubu
y6+8m	Yaşlı 6000+8000m yükselti seviyesi sıçan grubu
PCO	Protein karbonil
AOPP	İleri oksidasyon protein ürünleri
LHP	Lipit peroksidasyon
PSH	Protein tiyoller
TSH	Total tiyoller
Np-SH	Serbest tiyoller (Non-protein tiyoller)
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
HSPs	Sıcak şoku proteinleri
HSP72	Sıcak şoku proteini 72

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
2.1. Moleküler oksijen ve ROS oluşumu	6
2.2. Lipit peroksidasyonu	15
4.1. AHH'nin genç ve yaşlı sıçan PCO ve PSH düzeylerine etkisi	26
4.2. AHH'nin genç ve yaşlı sıçan AOPP düzeyine etkisi	28
4.3. AHH'nin genç ve yaşlı sıçan TSH düzeyine etkisi	30
4.4. AHH'nin genç ve yaşlı sıçan LHP düzeyine etkisi	31
4.5. PCO ve PSH korelasyonu	32
4.6. Genç ve yaşlı sıçanlarda Hsp72 düzeyi	32

## TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
2.1. Serbest radikaller, özellikleri ve organizmadaki kaynakları	7
2.2. Oksidasyona yatkın olan amino asitler ve oksidasyon ürünleri	11
4.1. AHH yaşlı ve genç sıçan sol ventrikül oksidatif hasar değişkenleri ortalamaları ve standart sapmaları	25

## 1. GİRİŞ

Yaşlanma, yaşam sürecinin doğal bir sonucudur. Yaşlanma sürecinde metabolizmada çok sayıda geridönüşümsüz değişiklikler oluşmaktadır. Bunların en önemlilerinden birisi de metabolizma sırasında oluşan reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin DNA, RNA, lipitler ve proteinlerde yol açtığı hasar ürünlerinin birikmesidir (11,27). Yaşlanmayla redoks dengesi zaman içinde birikimsel olarak bozulmakta ve metabolizmada daha çok serbest radikal oluşmaktadır (27,127). Diğer taraftan metabolizmayı çeşitli streslere karşı koruyan adaptif mekanizmalar yaşlı hayvanlarda genç hayvanlardakine göre azalma göstermektedir (34,35,45). Bu nedenlerle yaşlılar serbest radikal hasarına karşı daha açık durumda bulunmaktadır. Nitekim yaşlı sıçanlarda genç sıçanlara göre daha yüksek düzeyde radikal hasarı tespit edilmiş olup (51,127), bu hasar özellikle kalp, beyin, akciğer ve diyafram kası gibi oksijen ihtiyacı daha fazla olan dokularda daha belirgin olarak gözlenmiştir (7,82).

Organizmada yaşlanma dışında çeşitli fizyolojik ve fizyolojik olmayan koşullar da serbest radikal oluşumunu artırabilir. Genellikle artmış oksijen tüketiminde karşımıza çıkması beklenen serbest radikal üretimindeki artış, paradoks gibi gözükmeyle beraber, metabolizmanın normal koşullardan daha düşük oksijen derişimine maruz kalması durumlarında da artmaktadır (158). Hipobarik hipoksi bu durumlara bir örnektir (158). Hipokside gerek mitokondride gerekse ekstramitokondriyal yollardan sentezlenen serbest radikal düzeyinde artış olduğu belirtilmektedir (2,115,158). Hipoksiye ilk adaptasyonda hızlı bir şekilde NO sentezlenmektedir (95,97,159). NO bir taraftan HIF1 $\alpha$  transkripsiyon faktörünü aktive ederken, diğer taraftan da oksijen radikallerinin sentezini artırmaktadır. Oksijen radikalleri hipoksiye uyum esnasında HIF1 $\alpha$ 'nın ortamda daha uzun süreli olarak kalmasını sağlar (18,140). Fakat oluşan serbest radikaller hücrede lipit, protein ve DNA hasarlarına neden olmaktadır (2). Çeşitli streslere karşı sentez hızı artan stres proteinleri (örn. Hsp90, Hsp70) hem HIF1 $\alpha$ 'nın aktivasyonunda rol alırken, hem de hücre içinde hasar görmüş proteinlerin onarımında ve sentezinin artırılmasında rol alır (6,20,105). Hipobarik hipokside artan serbest

radikal sentezi bir taraftan organizmanın hipoksik koşullara uyumunu temin ederken, diğer taraftan çeşitli radikal hasarlarına neden olmaktadır.

Normal yaşamda insanların önemli bir kısmı çeşitli nedenlerle hipoksi koşullarına maruz kalabilmektedir. Bunlar içerisinde en ciddi risk grubunu savaş pilotları oluşturmaktadır. F-16 uçaklarının ve helikopterlerin kabin içi basıncı ayarlanmamıştır. F-16 pilotları yüksek irtifalarda hipobarik hipoksinin etkilerinden korunmak için gaz maskesi kullanmaktadırlar. Fakat uçuş esnasında yaptıkları ani manevralar yer çekimi 'G' etkisini yaratmakta ve bu etki F-16 pilotları için akut ve kısa süreli hipoksi koşulunu oluşturmaktadır. Helikopter pilotlarında ise kabin içi basınç ayarı bulunmaması yanı sıra gaz maskesi de kullanılmamaktadır. Özellikle helikopter pilotlarının ihtiyaca bağlı olarak yüksek irtifalarda uçtukları göz önüne alındığında, doğrudan akut hipobarik hipoksiye maruz kaldıkları görülmektedir. Bu durumda serbest radikal üretimine bağlı olarak kısa ve uzun vadede savaş pilotlarında bazı ciddi metabolik problemler olması kaçınılmazdır.

Akut hipobarik hipoksinin risk oluşturduğu bir diğer grup da yüksek rakımda bulunan yerleşim yerlerine iş seyahati amacıyla giden, rekreasyon amaçlı yürüyüş, kamp ve dağ sporları yapan kişilerden oluşmaktadır. Nitekim sözü edilen koşullar, farkında olmadan bir çok kişiyi akut dağ hastalığı (ADH) riskine sokmaktadır. ADH baş dönmesi, mide bulantısı ve yorgunluk gibi belirtiler göstermekte ve bu belirtilerin bir çoğunun organizmada ani ve yüksek miktarda serbest radikal oluşumundan kaynaklandığı ileri sürülmektedir (130,131). Hipobarik hipoksiye maruz kalan bir diğer grup da ticari uçaklarda yolculuk yapanlardır. Ticari uçakların kabin içi hava basıncı 1530-2440m ye (5000- 8000 feet) göre ayarlanmıştır. 2440m deki atmosferik hava basıncı 565mm Hg (75 kPa) dır. Bu değer 118mm Hg (15.7 kPa) PO<sub>2</sub> ye denk gelmektedir (137). Bu durumda hava yolculukları normalden daha düşük oksijen derişiminde gerçekleşmektedir. Böylece, başta akciğer hastaları (140) olmak üzere, çocuklar ve hamile kadınlar uçuş esnasında belirli bir sağlık riski altındadırlar. Nitekim kronik obstruktif akciğer hastalarında normal koşullarda bile perifer kaslarında yüksek miktarda serbest radikal oluşmaktadır (77). Risk altında olan bir diğer grup da

yaşlılardır. Özellikle yaşlı nüfusun ve ortalama yaşam süresi beklentisinin gelişmiş ülkelerde giderek artması, doğa sporlarının popülerlik kazanması, emeklilik nedeniyle artan serbest zamanlarını seyahat ve rekreasyonel aktivitelerle geçiren yaşlı sayısındaki artışı beraberinde getirmektedir. Öte yandan, mevcut literatürde bu konuda bir çalışma bulunmamakla beraber, akut hipobarik hipoksiye uyum esnasında organizmada gözlenen serbest radikal hasarının yaşlılarda daha dramatik sonuçlar vermesi beklenebilir. Çünkü yaşlanmayla oksijen radikalleri ile antioksidan enzim mekanizması arasındaki denge giderek bozulmaktadır (100). Diğer taraftan yaşlılarda hipobarik hipoksi çalışması genellikle ileri yaşlarda ortaya çıkan ve hipoksi koşullarının yarattığı etkiye benzerlik gösteren Huntington (100), alzheimer (100,120), aterosklerozis (24) gibi hastalıkların etyolojisinin aydınlatılmasına da katkıda bulunacaktır. Çünkü bu hastalıkların oluşumunda ve/veya gelişiminde serbest radikallerin önemli rol aldığı bilinmektedir. Ayrıca çeşitli stres koşulları karşısında sentezi artan ve dokuda koruyucu rol üstlenen stres proteinlerinin indüksiyonu yaşlılarda önemli ölçüde azalma göstermektedir (122,123). Bütün bunlar göz önüne alındığında yaşlılarda akut hipobarik hipoksi koşullarında ortaya çıkan serbest radikal hasarının ortaya konmasının ayrı bir önemi olduğu görülmektedir. Bu tez çalışmasının birinci amacı yaşlı ve genç sıçanlarda akut orta şiddetli ve şiddetli hipobarik hipoksinin yol açtığı oksidatif hasarı araştırmaktır. Bu amaçla, özellikle oksijen ihtiyacı fazla olan ve yaşamsal önemi olan kalp dokusu incelenecektir. İkinci amacı ise yaşlı sıçanlarda genç sıçanlarınkine göre miyokardiyal oksidatif hasarın, orta ve şiddetli hipobarik hipokside, nasıl olacağını araştırmaktır.

Çalışmalar sıcak şoku proteinleri sentezinin önceden indüklenmesinin hücreyi sonraki daha ciddi strese karşı koruyarak direncini artırdığını göstermektedir. Hücrelerin önceden sıcak şokuna maruz bırakılmaları daha sonraki ölümcül sıcak şoku stresine karşı direnç kazanmalarını sağlamıştır (89). Bu termal direnç artışının hücrelerdeki Hsp72 miktarındaki artış ile doğrudan alakalı olduğu tespit edilmiştir (89,90). Önceden sıcak şoku veya egzersiz ile indüksiyonu artırılmış miyokard Hsp72 kalp hücrelerini iskemi-reperfüzyon sonrası oluşabilecek hasara karşı koruduğu bildirilmiştir

(34,88,93). Bu çalışmalar çapraz tolerans olarak da adlandırıldığı gibi, herhangi bir nedenle indüklenmesi artan stres proteinlerinin, başka bir stresle ortaya çıkan hasar karşısında yer aldığı dokuyu koruduğunu göstermektedir. Akut hipobarik hipoksida ortaya çıkan doku hasarı ile iskemi-reperfüzyon sırasında ortaya çıkan hasar karşılaştırıldığında her ikisinin de serbest radikallerden kaynaklandığı görülmektedir (87,122,123,160). Keza, akut hipobarik hipoksinin genç deney hayvanların kalp kası da dahil olmak üzere çeşitli dokularında Hsp72 düzeylerini artırdığı gösterilmiştir (96). Bu nedenle, önceden akut orta şiddetli hipobarik hipoksiye maruz bırakılan sıçan kalp dokusunun sonradan akut şiddetli hipobarik hipoksi koşulunda oluşan oksidatif hasara karşı daha dayanıklı olması beklenir. Bu tez çalışmasının üçüncü amacı da, önceden akut orta şiddetli hipobarik hipoksiye tabi tutulan yaşlı ve genç sıçan kalp kasının sonradan şiddetli hipobarik hipoksida oluşan oksidatif hasara karşı koruma geliştirip geliştiremeyeceğini araştırmaktır.

Soru 1: Akut orta ve şiddetli hipobarik hipoksi yaşlı ve genç sıçanlarda myokardiyal oksidatif hasara yol açar mı?

Hipotez 1: Gerek orta ve gerekse şiddetli akut hipobarik hipoksi yaşlı ve genç sıçanlarda myokardiyal oksidatif hasara yol açar ve bu hasar şiddetli hipobarik hipoksida her iki yaş grubunda da daha fazladır.

Soru 2: Akut hipobarik hipoksi koşullarında oluşan miyokardiyal oksidatif hasar yaşlı sıçanlarda genç sıçanlarınkine göre daha fazla mıdır?

Hipotez 2: Gerek orta ve gerekse şiddetli akut hipobarik hipoksida oluşan miyokardiyal oksidatif hasar yaşlı sıçanlarda genç sıçanlarınkine göre daha fazladır.

Akut orta şiddetli (6000m) ve şiddetli (8000m) hipobarik hipoksiye maruz bırakılan yaşlı ve genç sıçanların miyokard dokusu AOPP, PCO, LHP, T-SH, P-SH düzeyleri tesbit edilerek bu hipotezler test edildi.

Soru 3: Yaşlı ve genç sıçanların önceden akut orta şiddetli hipobarik hipoksiye tabi tutulmaları, akut şiddetli hipobarik hipoksi koşullarında miyokard hücrelerinde oluşan radikal hasarı azaltır mı?

Hipotez 3: Önceden akut orta şiddetli hipobarik hipoksiye tabi tutmak, yaşlı ve genç sıçanların miyokard hücrelerinde akut şiddetli hipobarik hipoksi koşullarında oluşan radikal hasarını azaltır. Bu azalma gençlerde daha belirgindir.

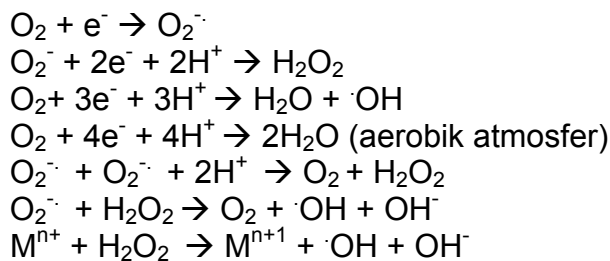
Bu amaçla akut orta şiddetli hipobarik hipoksiye maruz bırakılan genç ve yaşlı sıçanlar, 24 saat sonra akut şiddetli hipobarik hipoksiye maruz bırakıldılar. Genç ve yaşlı sıçanların miyokard dokusu AOPP, PCO, LHP, T-SH, P-SH ve Hsp72 düzeyleri, daha önce 6000m ye maruz bırakılmadan doğrudan 8000m de kalan sıçanlardan elde edilen aynı verilerle karşılaştırılarak bu hipotez test edildi.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Serbest Radikaller

Yapılarında eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanır. Biyolojik serbest radikaller genellikle oldukça reaktif ve dayanıksız olup buldukları ortamdaki moleküllerle reaksiyona girerek oksidatif hasar oluştururlar. Serbest radikaller normal metabolik reaksiyonlar aracılığı ile oluşabildiği gibi ultra viyole, iyonizasyon gibi radyoaktif etkenlere bağlı olarak da meydana gelmektedir (1,2,27-29,70-72). Organizmada süperoksit, hidroksil gibi serbest radikallerin (Şekil 2.1) yanı sıra hidrojen peroksit, singlet oksijen gibi prooksidanlar da mevcuttur. Prooksidanlar radikal olmayıp radikal oluşumuna öncülük eden moleküllerdir. Serbest radikaller metabolizmada mitokondri ve mitokondri harici 'ekstra mitokondri' yollarla örneğin oksijenaz enzimleri (ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, siklooksijenaz, miloperoksidaz, glikoz oksidaz, lipooksijenaz ve nitrik oksit sentaz) aracılığı ile oluşmaktadır (1.2). Metabolizmadaki serbest radikaller ve prooksidan kaynakları tablo 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Moleküler oksijen ve ROS oluşumu (2)

Organizmada radikal oluşumu, metabolik açıdan olumsuz sonuçlar doğurmasına rağmen oksijen aerobik yaşam için kaçınılmazdır. Bu nedenle yaşamını oksijen tüketimine dayalı olarak devam ettiren her canlı moleküler oksijenin kullanımından kaynaklanan reaktif oksijen türevleri (ROS) ve reaktif nitrojen türevlerinin (RNS) direkt etkileri ile bunların getirdiği ikincil metabolik değişimlerden etkilenmek durumundadır. Serbest radikallerin oluşumu sadece hipoksi veya hiperoksi gibi oksijenin metabolik açıdan normalden az

veya fazla olduğu koşullarda değil aynı zamanda oksijen tüketiminin fizyolojik ve metabolik olarak normal olduğu normoksi koşullarında da gerçekleşebilmektedir (2,83,144,145). Canlılar ROS ve RNS ile başa çıkabilecek antioksidan enzim sistemlerine (Süperoksit dismutaz, Katalaz ve Glutasyon peroksidaz gibi) ve enzim dışı 'non-enzimatik' işlevleri olan bazı metabolik yollara (Protein-SH, GSH (44) gibi) sahiptirler. Antioksidan savunma mekanizmaları birbirlerine uyumlu şekilde çalışırlar. Örneğin antioksidan enzimler inaktive olmuşsa veya çalışamayacak şekilde hasar görmüşse, artan oksidatif strese bağlı olarak organizmada hasar meydana gelmektedir (73). Radikallerin neden olduğu DNA, protein ve lipit hasarı hemen her zaman etkin bir şekilde engellenememektedir. Oksidatif hasara uğramış DNA ve bazı okside proteinler çok az da olsa kısmen onarılabilmektedir. Diğerleri mitokondriyal hasar, hücre ölümü ve hatta doku hasarına kadar giden önemli fizyopatolojik olaylara neden olabilmektedir (2, 147-149).

Tablo 2.1. Serbest radikaller, özellikleri ve organizmadaki kaynakları (2)

ROS/RNT	Sembol	Serbest Radikal	Ömür	Kaynağı
Süperoksit	$O_2^{\cdot-}$	E	$10^{-6}$ sn	Mitokondri, kalpdamar sistemi
Hidrojen Peroksit	$H_2O_2$	H	Sabit	Hücre içi reaksiyonlar
Hidroksil Radikali	$\cdot OH$	E	$10^{-9}$ sn	Fenton reaksiyonu
Peroksil	ROO	E	1 sn	Lipit, protein, şeker gibi moleküllerin oksidatif hasarı
Nitrik Oksit	$NO^{\cdot}$	H		Mitokondri, endotel hücreler
Peroksinitrit	$ONOO^{\cdot}$	H	$10^{-3}$ sn	Süperoksit ve nitrik oksit
Singlet Oksijen	$^1O_2$	H	$10^{-6}$ sn	Kimyasal reaksiyonlar sonucu
Ozon	$O_3$	H	Sabit	Atmosfer

## 2.2. Hipoksi ve Serbest Radikaller

Hipoksi, ortamdaki oksijen konsantrasyonunun az olması veya ortam normal oksijen konsantrasyonunda iken dokuya her hangi bir nedenle yeteri kadar oksijen taşınmaması ya da organların mevcut oksijeni kullanamamasından ileri gelmektedir (59,60). Hipobarik hipoksi ise kana geçen oksijen miktarında azalma durumudur. Akciğerlerdeki oksijen basıncının düşük olması, gaz değişim alanının daralması, akciğer hastalığı ve yükseltiye maruz kalma hipobarik hipoksi nedenlerindedir. Ayrıca hipoksi çeşitli kimyasallar (toksik ajanlar) veya yaşamı tehdit eden koşullarda (yangın vb gibi) da karşımıza çıkabilmektedir. Hipoksinin nedeni ne olursa olsun yaşamını oksidatif fosforilasyonla idame ettiren organizmalar için metabolizmada oksijen derişimini normal seviyede tutmak hayati önem taşımaktadır. Çünkü oksidatif fosforilasyonda çok hücreli organizmalar bir taraftan yaşam için gerekli enerjiyi temin ederken diğer taraftan son ürün olan dört elektronu indirgeyerek su üretirler (Şekil 2.1). Bu nedenle çok hücreli organizmalar için hipoksiye uyumun kritik bir anlamı vardır. Hipoksidede hücre ve organizma düzeyinde birçok değişimler yaşanır. Organizma düzeyinde hiperventilasyon, eritrosit üretimi artması, kılcal damar oluşumu gibi uyum mekanizmaları geliştirilirken, hücre düzeyinde oksidatif fosforilasyondan anaerobik glikolize geçiş, hücre içine daha çok glikoz alımı ve hipoksi uyaran transkripsiyon faktörü sentezinin artması gibi değişimler gözlenmiştir (22,59,60).

Metabolik açıdan hipoksiye ilk uyumda hızlı bir şekilde NO oluşmaktadır (95,99,136). NO bir taraftan HIF1 $\alpha$  transkripsiyon faktörünü aktive ederken diğer taraftan oksijen radikallerinin oluşumunu artırmaktadır. Oksijen radikalleri hipoksiye uyum esnasında HIF1 $\alpha$ 'nın ortamda daha uzun kalmasını sağlar (18,140). Ayrıca serbest radikaller ile ilintisi olan ve hipoksi koşullarına benzer etki gösteren bazı hastalıkların mekanizmalarında HIF1 $\alpha$  transkripsiyon faktörünün etkin olduğu ifade edilmektedir (139).

Hipoksidede reaktif oksijen türleri (ROS) mitokondri ve ekstra mitokondriyal yollardan (oksijenaz enzimleri aracılığı ile) oluşmaktadır.

Bilindiği gibi aerobik respirasyonun son basamağında indirgenen elektronlar ortamdaki oksijen ile uzaklaştırılmaktadır. Fakat ortamda oksijen yeteri kadar bulunmadığında elektronlar birikir ve oksijen radikallerini oluşturur. Bu nedenle hipoksizde mitokondri, oksijen radikali üretme merkezi haline gelmektedir. (22,42,97). Sıçan karaciğerinde yapılan bir çalışmada şiddetli hipoksi koşullarında teneffüs edilen oksijenin % 50'sinin süperoksit anyonunu oluşturduğu belirtilmektedir (47). Mitokondride ROS oluşumu bir yada daha fazla mitokondriyal kompleksin otooksidasyonu sayesinde oluşabilir (76). Hipoksizde mitokondri kompleks I, II veya III'nin bloke edilmesinin ROS oluşumunu azalttığı belirtilmiştir (23)

Hipoksizde diğer ROS oluşum kaynağı ise oksijenin substrat olarak kullanıldığı ekstrasitokondriyal yollardır (2). Hipoksizde ATP azalmasına bağlı olarak ATP-Ca<sup>++</sup> kanalları yetersiz çalışır. Ortamda Ca<sup>++</sup> birikmesine neden olur ve böylece Ca<sup>++</sup> bağımlı proteazlar aktive olarak ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaz'a dönüştürür. Ksantin oksidaz ürik asidin parçalanmasını katalizler ve süperoksit oluşur (106). Hipoksizde artan katekolaminlerin otooksidasyonu da süperoksit radikali oluşturur (9). Yine hemoglobin ve miyoglobinin otooksidasyonu sitosolik NADH artışına neden olmaktadır. Çalışmalar ksantin oksidaz (58,63,74) ve NADPH oksidazın (58,107,112,128) yetersiz miyokard fonksiyonu sırasında süperoksit radikal oluşumunu artırdığını göstermektedir. Ateroskleroz gibi damar daralmasına yol açan rahatsızlıklar dokuda hipoksik koşullara benzer bir etki yaratmaktadır (24).

Oksijenin bilinen bütün bu metabolik yollarına rağmen hipoksizde hangi yolun daha etkin bir şekilde radikal oluşumunda rol aldığı tam olarak bilinmemektedir. Fakat çalışmalar hipoksizde mitokondrinin daha etkin olduğunu göstermektedir (22,23).

### 2.3. Yaşlanma ve Serbest Radikaller

Serbest radikal teorisine göre yaşlanmanın en önemli nedenlerinden birisi, yaş ilerledikçe metabolizmada ROS ve RNT oluşumunun artması ve bunların makro moleküllerin modifikasyonuna neden olmasıdır (11,26,148,149,159). Aslında yaşlılıkta redoks homeostazındaki denge kaybolmaktadır. Bir yandan antioksidan enzim mekanizması yeterince işlev görememekte, diğer yandan ilerleyen yaşlarda hücrede daha çok radikal oluşumu söz konusu olmaktadır. Normal aerobik koşullarda mitokondride % 1-5 arasında elektron kaçağından dolayı süperoksit ( $O_2^-$ ) radikali oluşurken bu miktar yaşlılıkta artmaktadır (119,147,148). Artan radikal miktarı bir taraftan mitokondri ölümüne neden olurken diğer taraftan hücredeki kalan mitokondrilerin iş yükünü daha da artırmaktadır. (11,61,140). Yaşlı dokuda oluşan serbest radikaller DNA, protein ve lipitlere hasar vermektedir (118,126,127). Hasar görmüş bu yapıların yaşlı dokularda birikmesi kalp-damar hastalıkları, kanser, immüne sistemin fonksiyon kaybı gibi vücuda yıkım getiren rahatsızlıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (19,51,63,102,107). Huntington (100), Alzheimer (100,120), Atherosklerozis (19,24,63) gibi genellikle ileri yaşlarda ortaya çıkan ve hipoksi koşullarına benzer özellikler gösteren hastalıkların ana mekanizmalarının altında yatan nedenin de radikaller olduğu bilinmektedir. Yaşlı organizmanın hipoksik koşullara maruz kalmasında ise karşılaşılan oksidatif stresin çok daha fazla olacağı aşikârdır.

### 2.4. Protein Oksidasyonu

Protein oksidasyonu, proteinlerin ROS/RNT veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyon sonucu oluşur (85,146). Protein oksidasyonunun metabolik açıdan negatif sonuçları vardır. Bunlar enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitesinin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitesindeki artış olarak sıralanabilir (33,146).

Protein oksidasyonun başlıca moleküler mekanizmaları PCO oluşumu ile karakterize edilen metal katalizli protein oksidasyonu, nitrotirozin, protein

tiyol (P-SH) gruplarının kaybı, ileri oksidasyon ürünlerinin oluşumu (AOPP), protein hidroperoksitlerin (PrOOH) oluşumu olarak sıralanabilir.

Proteinlerdeki amino asitlerin oksitlenmesi çok sayıda reaktif türevler ve stabil ürünleri oluşturur. Bu amino asitlerden oksidasyona en yatkın olanları ve oksidasyon ürünleri Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Oksidasyona yatkın olan amino asitler ve oksidasyon ürünleri (26,27,32,65).

Amino asit	Ürünler
Sistein	Sülfenik (Cys-SOH), sülfirik (Cys-SO <sub>2</sub> H), ya da sülfonik (Cys-SO <sub>3</sub> H) türevlerin oluşumu için sülfidril grupların oksidasyonu (Cys-SH) Bir (intramoleküler çapraz bağ) ya da iki protein (intermoleküler çapraz bağ) içinde iki sistein kalıntısının arasında disülfid bağın oluşmu (Cys-S-S-Cys) , Bir sülfidril grubu ve glutatin arasında miks disülfid bağların oluşumu (Cys-S-S-glutathion)
Glutamik asit, tirozin, lizin, lösin, valin, prolin, izolösin,	Hidroperoksit
Histidin	2-okso-histidin, asparagin, aspartik asit
Lizin, arjinin, prolin, treonin	Amino asit yan zincirlerinin direkt oksidatif atağa uğraması sonucu karbonil türevlerinin oluşumu
Lizin, sistein, histidin	Sekonder modifikasyon reaksiyonları ile karbonil türevlerin oluşumu (Proteinlerin karbonhidrat, lipid ve ileri glikasyon ve lipoxidationson ürünleri ile reaksiyonları)
Metinon	Metionin sülfoksit, metionin sülfon
Fenilalanin	2,3-Dihidroksifenilalanin, 2-,3-,4-hidroksifenilalanin, o-tirozin, m-tirozin
Triptofan	2-,4-,5-,6- ve 7-Hidroksitriptofan, nitrotriptofan, kinürenin, formil ve hidroksi kinürenin
Tirozin	3,4-Dihidroksifenilalanin, tirozin-tirozin çapraz bağları, Tyr-O-Tyr, çapraz bağlı nitrotirozin
Arginin	Glutamik semialdehit, 5-hidroksi-2-amino valerik asit
Glisin	Amino valerik asit

## 2.5. Protein Karbonil Oluşumu

Amino asitlerin  $\alpha$ -karbon veya R yan zincirlerinin oksidatif modifikasyonları ve bu modifikasyonu takiben reaktif oksijen aracılı peptit bağının ayrılma reaksiyonu ile PCO türevleri oluşmaktadır (65). Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda bir çok amino asit (histidin, prolin, arjinin, ve lizin gibi) kalıntısında ve/veya proteinlerin peptit omurgasında hasar meydana gelmektedir (31,154).

PCO oluşumunda  $Fe^{++}$  ve  $Cu^{++}$  gibi redoks aktif geçiş grubu metalleri de rol oynamaktadır.  $Fe^{++}$  ve  $Cu^{++}$  iyonları proteinlerdeki katyon bağlama bölgelerine bağlanarak  $H_2O_2$  ve  $O_2^-$  gibi ROS türevleri ile reaksiyona girerler. Böylece proteinler karbonillenir (151). Proteinler oksidantlara maruz kaldıklarında birçok kovalent değişikliğe uğrar. Bu değişikliklerden bazıları serbest radikallerin protein molekülleri üzerine direkt etkileri sonucu oluşabildiği gibi, bazıları da oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent olarak bağlanmasıyla meydana gelir. Proteinlerin radikal aracılı hasarı; elektron kaybı, metal-iyon katalizli reaksiyonlar, lipit ve şekerlerin otooksidasyonu ile başlatılabilmektedir. Bu ürünlerin oluşum hızının artması veya temizleyici mekanizmaların yetersiz kalması, proteinler dahil olmak üzere diğer hücrel moleküllerdeki oksidatif modifikasyonların artışına yol açar.

Oksidatif hasara uğramış proteinlerin birikimi sadece protein oksidasyon hızını değil, aynı zamanda proteinlerin yıkılım hızını da yansıtır (26,65). Bu nedenle PCO düzeyinin tespiti protein oksidasyonunu belirlemede duyarlı ve genel olarak kabul görmüş bir yöntemdir (28,29,30,72). Literatürde deney hayvanları ve insan çalışmalarında PCO düzeyi yaşlılarda genel olarak daha yüksek bulunmuştur (27,29,50,86). PCO düzeyi hipoksi koşullarında da yaşlılardakine benzer şekilde yüksek seyretmektedir (124,132).

## 2.6. Protein Tiyol Gruplarının Oksidasyonu

Serbest radikaller proteinlerdeki tiyol gruplarının oksidasyonuna yol açarak oksidatif protein hasarına neden olurlar (12,62,114). Sistein amino asiti'nin (sülfhidril) –SH grubu oksidatif strese oldukça yatkındır. Değişik mekanizmalarla –SH gruplarının oksitlenmesi sonucu oluşan tiil (-S<sup>·</sup>) radikali proteinlerdeki disülfid bağlarının ve merkaptil radikalinin oluşmasına yol açar (146,151,152). Oksitlenen–SH grupları proteinlerin kendi yapısında ve bir başka protein ile çapraz bağ oluşturmasına olanak tanır (151,152). Tiyol gruplarının disülfidlere ve oksiasitler gibi oksitlenmiş türevlere dönüşümü protein oksidasyonunun en erken gözlenebilen belirtisidir (38). Glutatayon ve sistein gibi biyolojik tiyoller radikallerle indüklenen protein inaktivasyonunu, ya doğrudan bu radikallerle reaksiyona girerek ya da dolaylı olarak proteinlerdeki serbest tiyol grupları ile geri dönüşümlü bağlar oluşturarak önler (26,37,84,114). Bir antioksidan olarak fonksiyon gösteren protein tiyolleri serbest radikallerle reaksiyona girer ve lipitleri radikal hasarından korur (146). Böylece vitamin E ve/veya lipitler oksidatif hasardan korunabilirler (30).

Literatürdeki çeşitli kaynaklar serbest radikallerin gerek yaşlanmayla (26-28,40,116,117,104) gerekse hipoksik ortamda P-SH gruplarını oksitlediğini göstermektedir (36,96-98). Yaşlı sıçanların iskelet kasında (28, kalp, kan plazması ve beyin dokusunda (28,29,71) yapılan çalışmada P-SH ve T-SH seviyelerinin gençlerinkine kıyasla düşük olduğu tespit edilmiştir. Hipoksizde çalışmalarında ise soleus kası P-SH ve T-SH değerleri gerek yaşlı sıçan gruplarında, gerekse genç sıçan gruplarında yükseltide azalma göstermiştir.

## 2.7. İleri Oksidasyon Protein Ürünlerinin Oluşumu

İlk kez Wirko-Sarsat tarafından 1996 yılında üremik hastaların plazmasında belirlenmiştir. AOPP ditirozin çapraz bağlı, disülfid köprülü ve protein karbonil içeren protein oksidasyon ürünleri olarak tanımlanır (4,156). Ditirozin (3,3'-ditirozin), sulu çözeltilerde, ortamda hidrojen peroksit varlığında oluşmaktadır (5). Witko-Sarsat ve diğ. (1996) AOPP düzeylerinin protein oksidasyon belirteçleri ile korelasyon gösterdiğini tespit etmiş ve AOPP'nin



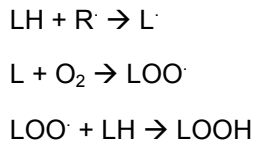
protein oksidasyonun derecesini belirlemede duyarlı bir marker olduğunu ifade etmiştir. Çalışmalar AOPP'nin MDA'dan daha duyarlı oksidatif stres belirteci olduğunu göstermektedir (49,156). Plazma AOPP düzeylerinin protein oksidasyonun göstergesi olan plazma ditirozin ve ileri glikasyon son ürünü olan pentozidin düzeyleri ile korelasyon gösterdiği, fakat lipit peroksidasyon marker'ı olan tiyobarbitürik asit ile reaksiyonlaşan maddelerle korelasyon göstermediği bildirilmiştir (49,156).

Literatürde yaşlı sıçan iskelet kasında (28,66,70) ve kalp kasında yapılan çalışmalarda AOPP değerleri genç hayvanlarınkine göre daha yüksek olarak bulunmuştur (29,70-72). Hipoksi koşullarında ise AOPP ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde hipoksik koşullarda insan plazmasında (121) ve diğerinde ise hayvan plazmasında (36) yüksek düzeyde AOPP tespit edilmiştir.

### **2.8. Lipit Peroksidasyonu**

Doymamış yağ asiti (PUFA) içeren hücre zarı serbest radikal hasarına karşı duyarlıdır. Lipit peroksidasyonu, lipitlerin özellikle hidroksil radikali olmak üzere ROS radikalleri tarafından başlatılan bir dizi reaksiyonlar sonucu meydana gelir ve hücre zarında zincirleme reaksiyon olarak devam eder. İlk önce  $H^+$  atomu uzaklaştırılır ve lipit radikali ( $L\cdot$ ) oluşur. Lipit radikalinin moleküler oksijenle reaksiyona girmesi lipit peroksit ( $LOO\cdot$ ) radikalini meydana getirir. Lipit peroksit radikali hücre zarındaki diğer doymamış yağ asitleri ile etkileşime girerek yeni lipit radikalleri oluştururken kendisi de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine ( $LOOH$ ) dönüşürler (Şekil 2.2). Böylece reaksiyonlar zinciri kendi kendini katalizleyerek devam eder (135). Lipit peroksidasyonu önlenemediğinde hücre ve mitokondri zarlarında oksidatif hasar meydana gelir. Hücre zarı hasarı protein ve DNA oksidasyonunu artırır ve hepsi birden mitokondriyal hasarı iletir. Oluşan bu oksidatif hasarlar serisi hücre ölümü ve/veya doku hasarına kadar gider (2,143).

Lipit peroksidasyon tespiti doku hasarı ve yaşlanma sürecinde önemli oksidatif hasar belirteçidir (8,92,157). Yaşlılarda bir lipit peroksit belirteci olan TBARS (101) ve MDA düzeyi yüksek bulunmuştur (103). Yaşlı erkek ve dişi sıçanların kalp kası (72), plazmasında (71) ve iskelet kası (28) LHP düzeyinin yüksek olduğu bulunmuştur. Hipoksik koşullardaki LHP düzeyi farklı çalışmalarda çelişkili gözükmemektedir. Hipoksizde iskelet kası lipit peroksidasyonunda artış tespit edilemezken (10,124) 5500m kronik hipobarik hipoksizde ise kalp kası, akciğer, karaciğer ve böbreklerde yüksek düzeyde MDA saptandığı bildirilmiştir (108).



Şekil 2.2. Lipit peroksidasyonu

### 2.9. Sıcak Şoku Proteinleri

Sıcak Şoku Proteinleri (HSPs) hücreyi tehdit eden çeşitli stresler (toksik ajanlar, radikaller, hipoksi, iskemi-reperfüzyon, geçiş metalleri gibi) karşısında sentezlenmektedir (34,35,73,122,123). HSPs hücre homeostasisini ve hücreyi akut streslere karşı korumaktadır. HSPs çeşitli alt gruplardan oluşmaktadır: 8-32kDa, 50-60kDa, 70kDa, 90kDa ve 100kDa ve üstü. Bu proteinler organizmadan organizmaya çeşitlilik göstermekle birlikte HSPs 65-78kDa (HSPs70 alt grubu) her organizmada sentezlenmektedir (36). Özellikle 70 kDa ağırlığındaki stres proteinleri grubu hücre proteinlerinin % 1-2 'sini oluşturmaktadır. Hsp72 ve Hsp73 bu ailenin en belirgin elemanlarıdır. Hsp73 yapısal formu oluştururken Hsp72 indüklenebilir formu oluşturur. . Hsp72, protein agregasyonunu engeller, hasar görmüş proteinlerinin tekrar normal formunu almasına yardımcı olur ve ribozom tarafından sentezlenmekte olan polipeptitlerin doğru yapıda katlanmasını sağlar (122).

Hücrelerin önceden ölümcül olmayan sıcak stresine maruz bırakılması hücrelerin daha sonraki ölümcül sıcak stresine karşı direncini artırmaktadır. Sıcak stresi sonucunda sentezi artan Hsp72'nin daha ciddi bir sıcak stresine

karşı hücreyi koruduğu bilinmekte olup, bu olaya termotolerans denmektedir (90). Çalışmalar Hsp72'nin kalp kası hücrelerinde sıcak stresi yanı sıra hipoksi, egzersiz, iskemi-reperfüzyon vb streslerle indüklendiğini göstermektedir (34,122,126). Uygulanan herhangi bir stres yoluyla HSP proteinlerinin artırılmasının daha sonra meydana gelen ölümcül farklı bir strese karşı hücre ya da dokuyu koruması çapraz tolerans olarak adlandırılır. Önceden indüklenerek dokudaki miktarları artırılan Hsp72 iskemi-reperfüzyon sonrası oluşan hücre ölümlerini (apoptosis ve nekrosis) azaltmakta ve oksidatif hasara karşı kalp kası hücrelerini korumaktadır (34,123). Uzun süreli kronik egzersiz sonrası kalp kası hücrelerindeki Hsp72 artışı % 500 lere ulaşmakta ve sonuç olarak kalp kası hücrelerinde iskemi-reperfüzyon ile oluşan lipid peroksidasyonu azalırken kalp kasının kontraktilitesinin korunması sağlanmaktadır (34,123).

Oksijen radikalleri HSP genini aktive ederek HSP'lerin sentezini sağlamaktadır (64). Keza,  $H_2O_2$  bir taraftan HSF'nin nükleer translokasyonunu sağlarken diğer taraftan bu faktörün sıcak şoku proteinleri genine bağlanma aktivitesini artırmaktadır (64). Eritrofagositoz esnasında hücrelerin kendi ürettikleri radikallere karşı kendi yapılarını korumak için HSP'leri sentezlemekteydiler (25). Yeni doğmuş domuz yavruları 1 den 4 saate kadar normobarik hipoksiye tabi tutulmuş ve hiposiden 22 saat sonra hayvanların beyinde Hsp27, HIF1 $\alpha$  ve nNOS sentezinde artış gözlenmiştir (18). Bir başka çalışmada ise yine hipokside Hsp90 proteininin NOS ve HIF1 $\alpha$  ile ilişkiye girerek bu enzim ve faktörün regülasyonunda rol aldığı bildirilmiştir (21).

Hücreyi çeşitli streslere karşı koruyan Hsp72 genç ve yaşlılarda benzer şekilde sentezlenmekle birlikte yaşlı hücrelerde Hsp72'nin indüksiyonunda azalma tespit edilmiştir (35,56,57). Bu azalma, beyin, karaciğer, adrenal, deri (13) ve fibroblastlar (88) yanı sıra kalp kası hücrelerinde de gösterilmiştir. Gerçekten de, yaşlı kalp kası hücreleri Hsp72 indüksiyonu açısından gerek sıcak şoku uygulaması (15,34,35) ve gerekse koşu egzersizlerine genç kalp kası hücreleri kadar yanıt verememektedir. (35). Özellikle ilerleyen yaşla beraber metabolizmada bazal radikal düzeyinde

artış olmasına rağmen bu proteinin sentezinin indüklenmesindeki azalma, yaşlıların strese adaptasyonunda gerileme olduğunu göstermektedir. Nitekim yaşlılarda aterosklerozis, kalp krizi, enfaktüs gibi önemli hastalıkların oluşma nedenlerinden birisi olarak yaşlı hücrelerde daha az Hsp72 indüksiyonu ve biriken oksijen radikali hasar ürünleri olduğu ileri sürülmüştür (35,51).

Yaşlanma sürecinde bir taraftan serbest radikal oluşumu artarken diğer taraftan antioksidan enzim savunma mekanizmaları yeteri kadar fonksiyon gösteremez. Bunlara ek olarak yaşlanmada çeşitli hücrel stresler karşısında sıcak şoku proteinleri de daha az indüklenmektedir. Ayrıca hipobarik hipokside normalden daha çok serbest radikal oluşumunu söz konusu olduğundan, yaşlıların hipobarik hipoksiye maruz kalmaları durumunda ciddi bir risk altında olmaları kaçınılmazdır. Bu tez çalışması yaşlı miyokard kasının akut orta şiddetli ve şiddetli hipobarik hipoksi koşullarına yanıtını oluşturan oksidatif hasar marker'leri (PCO, P-SH, AOPP, LHP), non-enzimatik antioksidan mekanizmasından olan total tiyol ve Hsp72'yi göz önüne alarak araştıracaktır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Akut hipobarik hipoksi koşullarında sıçan miyokard kası sol ventrikülünde meydana gelen oksidatif hasar ve miyokard hücrelerinin oksidatif stres karşısındaki yanıtının araştırıldığı bu tez çalışmasında kullanılan araç ve yöntemler aşağıda belirtilmiştir.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 07.11.2006 tarih, 2006/65 dosya numaralı kararı ile etik kurul izni alınmıştır. Ayrıca ek hayvan kullanımı için de 09.04.2007 tarih, 2007/84 dosya numaralı karar ile etik kurul izni alınmıştır.

#### 3.1.Gereçler

- Spektrofotometre: Spectra max plus 384 (Molecular Devices., Amerika Birleşik Devletleri)
- Derin Dondurucu: -80 °C., -20 °C (Revco., Amerika Birleşik Devletleri)
- İnkübatör: GFL 7601 Hybridisaiton Incubator (GFL., Almanya )
- Vorteks: Vx100 (Lanet., Amerika Birleşik Devletleri)
- Soğutmalı Santrifüj: Z 323K (Hermle., Almanya)
- Su Banyosu: (Memmert., Almanya)
- Manyetik Karıştırıcı: MR 3001 K (Heidolph., Almanya)
- pH metre: Professional Meter PP-50 (Sartorius., Almnaya)
- Bıçaklı Homojenizatör: X250D (CAD., Almanya)
- Hassas Terazisi: CP 225D., CP202S-OCE (Sartorius., Almanya)
- Çok Kanallı Pipet 10-100 µL (Eppendorf., Almanya)
- Pipet 0,5-10, 10-100,20-200, 100-1000, 500-50000 µL (Eppendorf., Almanya)
- Deiyonize Su Cihazı (Millipore, Amerika Birleşik Devletleri)
- Kamara ve Atmosferik Basınç Kontrol Ünitesi: APCU-01 (Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Elektronik Mühendisliği Laboratuvarı, Türkiye)

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Deney Kurgusu

Bu çalışmada akut orta (6000m) ve şiddetli (8000m) hipobarik hipoksinin genç ve yaşlı sıçanların kalp kası üzerine etkileri araştırılmıştır. Kullanılan hipobarik hipoksi deneyleri daha önce farklı amaç ve deneysel kurgularla sıçanlarda uygulanmıştır (40,41). Genç ve yaşlı sıçanlar rastgele yöntemle 4 er gruba ayrıldılar. Buna göre sıçanlar ya doğrudan 6000 veya 8000m lik yapay yükselti ortamında 6 saat süreyle tutuldular, ya da önce 6000m yükselti koşullarında 6 saat tutulmalarını takip eden 24. saatte 6 saat süreli olarak 8000m yükselti ortamına tabi tutuldular. Deney bitiminden hemen sonra sıçanlar 50 mg/kg pentobarbital sodyum ile uyutularak kalp dokusu çıkarıldı.

### 3.2.2. Denekler

Bu çalışmada 30 adet genç (4 aylık) ve 30 adet yaşlı (20 aylık) Wistar Albino erkek sıçanlar denek olarak kullanıldı. Sıçanlar kendi içlerinde kontrol, akut orta şiddetli (6000m), akut şiddetli (8000m) ve akut orta şiddetli+şiddetli (6000+8000m) hipobarik hipoksi gruplarına ayrıldılar. Kontrol grubunda 6 ve deney gruplarında 6+2 adet sıçan bulunduruldu. Deney gruplarındaki 2 adet fazladan sıçan, özellikle yaşlı sıçanların normal yaşam sürecinde ve deney esnasında ölme ihtimallerine karşı yedek olarak düşünüldü. Nitekim, yaşlı sıçanlardan biri ortama adaptasyon esnasında ve genç sıçanlardan biri ise 8000m akut hipobarik hipoksi deneyi esnasında öldü. Deney grupları aşağıdaki şekilde oluşturuldu:

- 1) Yaşlı Kontrol
- 2) Genç Kontrol
- 3) Yaşlı 6000m = Yaşlı akut orta şiddetli hipobarik hipoksi
- 4) Genç 6000m = Genç akut orta şiddetli hipobarik hipoksi
- 5) Yaşlı 8000m = Yaşlı şiddetli hipobarik hipoksi
- 6) Genç 8000m = Genç şiddetli hipobarik hipoksi
- 7) Yaşlı 6000+8000m = Yaşlı orta şiddetli ve şiddetli hipobarik hipoksi

8) Genç 6000+8000m = Genç orta şiddetli ve şiddetli hipobarik hipoksi

### 3.2.3. Biyokimyasal Analizler İçin Dokunun Hazırlanması:

Deney süresinin sonunda sıçanlar sodyum pentobarbütirat (50mg/kg) ile anestezi edildikten sonra kalp dokuları alındı ve hızla dissekte edilerek sol ventriküller izole edildi ve yaklaşık 50-80mg lık parçalara ayrılarak farklı tüplerin içerisine konuldu. Doku örnekleri likit nitrojen içerisinde donduruldu ve biyokimyasal analizler için -80°C de saklandı.

### 3.2.4. Doku Homojenizasyonu

Miyokard sol ventrikül oksidatif hasar belirteçlerinin (PCO, AOPP, LHP, T-SH, P-SH) düzeylerini belirlemek için gereken süpernatantlar, dokunun potasyum tamponu ( $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ , 100mM, pH 7.4) ile 1:21 oranında homojenizasyonu ve 2800g'de 4 °C'de ve 10 dk santrifüj işleminden sonra elde edildiler.

Miyokard sol ventrikül Hsp72 proteininin tayini için süpernatant, yine dokunun potasyum tamponu ( $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ , 100mM, pH 7.4) ile 1:10 oranında homojenizasyonu ve 2800 g'de 4 °C'de ve 10 dk santrifüj işleminden sonra elde edildi. Biyokimyasal analizler ayrıntılı olarak aşağıda verilmiştir.

### 3.2.5. Biyokimyasal Analizler

#### 3.2.5.1. Protein Karbonil Gruplarının Tayini:

PCO Reznik ve Packer'in (1994)'de tanımladıkları ve Çakatay ve diğ (2005) düzenleme yaptığı yöntemle belirlendi.

#### Çözeltiler:

- 2,5M HCL çözeltisi
- 10 mM DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazin)
- % 20'lik TCA (Triklorasetik asit)
- %10 TCA
- Etanol- Etil asetat (1:1)
- 6M Guanidin Hidroklorür

**Yöntem:** Deney tüpüne 2,5 M HCl içinde hazırlanmış 10 mM DNPH'den 2 mililitre (ml) eklendi. Tüpler oda ısısında her 15 dakikada bir vortekslenmek suretiyle karanlıkta 1 saat inkübe edildi. Daha sonra %20'lik Triklorasetik asit (TCA) 'den 2,5 ml ve %10 TCA'dan 2 ml ilave edilerek 10 dakika süre ile 2800 g'de santrifüj edildi. Santrifüjleme işleminin sonunda elde edilen çökelti 2 ml etanol-etil asetat karşımı ile 3 kez vortekslemek ve santrifüjlemek suretiyle yıkandı. Elde edilen yıkanmış çökelti 1 ml 6M Guanidin HCl içinde 37 °C'deki sıcak su banyosuda 15 dakika süre ile bekletilerek çözüldü. Her numunenin 360 nm dalga boyundaki absorbansı, spektrofotometrik olarak okundu. DNPH'ın (2,4-dinitrofenilhidrazin) ekstinksiyon katsayısı ( $\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) kullanılarak iskelet kası protein karbonil konsantrasyonu hesaplandı.

### 3.2.5.2. Total Tiyol ve Non-Protein Tiyol Tayini:

Total thiol (T-SH) ve non-protein thiol (NP-SH) Sedlak ve Lindsay (1968)'in tanımladıkları, Çakatay ve diğ (2003)'de düzenleme yaptığı yöntemle belirlendi.

#### Çözeltiler:

-0.01M DNTB (5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoik asit) çözeltisi, 19,8 mg DNTB 5 ml'ye absolü metanol ile tamamlanır

-Tris tamponu (0.2 M, pH 8.2):12.1 g Tris bir miktar deiyonize suda çözüldükten sonra üzerine 3,362g EDTA (0.2 M'a karşılık) ilave edilir HCl ile pH 8.2'ye ayarlanır, 50 ml'ye deiyonize su ile tamamlanır.

-Tris tamponu: (0.4 M pH 8.9) 24.2 g Tris bir miktar deiyonize su'da çözüldükten sonra üzerine 50 ml 0.4 M EDTA Na<sub>2</sub> ilave edilir, pH 8.9'a HCl ile ayarlandıktan sonra, deiyonize su ile 500 mL'ye tamamlanır.

-%50'lik TCA (Triklorasetik asid)

#### Yöntem:

**Total Tiyol (TSH):** Deney ve kör olarak alınan 2 tüpten deneye 50µL homojenat, köre ise deiyonize su kondu. Her iki tüpe de 150 mikrolitre (µl) Tris tamponu ve 10 µl DNTP ilave edilip vortekslendi. Son hacim 790 µl absolü metanol ilavesiyle 1 ml'ye tamamlandı. Tüpler 15 dakika süre ile karanlıkta vortekslenmek sureti ile inkübe edildi. İnkübasyonu takiben 3000



g'de santrifüjlendi. Numunelerin absorbanası reaktif körüne karşı 412 nm'de okundu.

**Nonprotein Tiyol (Np-SH):** 250 µl homojenat üzerine, 200 µl deiyonize su ve 50 µl %50 TCA ilave edildi. Tüpler vortekslendikten sonra 15 dk süreyle santrifüjlendi. 200 µl süpernatant üzerine 400 µl (Tris-EDTA pH 8.9) 10 µl DTNB ilave edildi ve homojenat içermeyen reaktif körüne karşı 412 nm'de okundu. DNTP'nin molar ekstinksiyon katsayısı ( $\epsilon = 13100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) kullanılarak tihol konsantrasyonları hesaplandı. T-SH ile NP-SH arasındaki farktan protein tiol (P-SH) konsantrasyonu hesaplandı.

### 3.2.5.3. İleri Oksidasyon Protein Ürünlerinin Tayini:

AOPP, Witko-Sarkat ve arkadaşlarının 1996'da tanımladıkları ve Kayalı ve diğ (2007) düzenleme yaptığı yöntemle belirlendi.

#### Çözeltiler:

- Fosfat tamponu ( pH:7.4)
- Potasyum iyodür (1.16M)
- Asetik asit (%100)

**Yöntem:** Deney tüpüne 200 µl homojenat, 800 µl fosfat tamponu ve 10 µl potasyum iyodür vortekslenerek 2' süre ile inkübe edildi. İnkübasyonu takiben tüplere 20 µl asetik asit ilave edilip 340nm'de okundu. Chloramin-T eşitliği dikkate alınarak AOPP düzeyleri hesaplandı.

### 3.2.5.4. Lipit Hidroperoksitlerin Tayini:

LHP, Wolff 'un 1994'de tanımladığı, Çakatay ve diğ (2003)'de düzenleme yaptığı yöneme göre tespit edilmiştir.

#### Çözeltiler:

- Ksilenol Oranj (100 µM)
- Amonyum ferro sülfat (250µM)
- Methanol ( %90 HPLC grade)
- Bütil hidroksitoluen (4 mM)
- Sülfirik Asit (25 mM)

-FOX 2 reaktifi, %90'lık metanolde yukarıdaki konsantrasyonlarda içerir.

**Yöntem:** Deney tüpüne, 50 µl homojenat ve üzerine 950 µl FOX 2 reaktifi ilave edilip vortekslenerek karanlıkta 30 dk süre ile inkübe edildi. Süpernatantların absorbansları reaktif körüne karşı 560nm'de okundu ve standart eğri dikkate alınarak, LHP düzeyleri belirlendi.

### 3.2.5.5. Hsp72 Düzeyinin Belirlenmesi

#### Çözeltiler:

- Laemmli Sample buffer (Bio- Rad)
- β-merkapttaethanol
- Ayrıştırıcı Jel (% 12)
- Toparlayıcı Jel (% 4)
- Tris Buffer (Running Buffer)
- Towbin Transfer Buffer (pH: 8.3)
- TBS Solüsyonu
- TTBS Solüsyonu (TBS Buffer + Tween 20, % 0.05)
- konjuge HSP 70 özel monoklonal antikor (Stress Gen, Canada)
- 25x konjuge alkalen fosfataz kiti (Bio-Rad)

**Yöntem:** Hsp72 protein miktarı poliakrilamide jel elektroforezi ve immünoblat teknikleri kullanılarak belirlendi (15,38). Önceden protein konsantrasyonu tayin edilmiş örneklerin 'Samplelar' protein içeriği Laemmli Sample buffer (Bio-Rad) ve % 5'lik β-merkapttaethanol eklenerek belirlendikten sonra denature edildiler. Protein içeriği belirlenen örneklerden 80 mg protein tek boyutlu sodium dodecyl sulfate (% 12 SDS) poliakrilamide jel elektroforezine yüklendi. Bio-Rad elektroforez sistemi ve tris buffer 'Runnig Buffer' yardımı ile 100 V, 1:30 dk süreyle proteinlerin ayrılması sağlandı. Ardından proteinler 0,45 µ kalınlığında nitroselüloz membranlara (BioRad), yarı kuru transfer sistemi (BioRad) ve transfer buffer yardımı ile 15 V elektrik kullanılarak 30 dk transfer edildi. Elde edilen membranlar, % 5 lük süt tozu içeren TTBS ile 2 saat oda ısısında bloklandı ve sonra içerisinde konjuge Hsp70 özel monoklonal antikor (Stress Gen, Canada) 1:1000 oranında ve % 1'lik süt tozu bulunan TTBS'te 2 saat inkübe edildi.

İnkübasyonu takiben 4 kez TTBS ve 1 kez TBS ile yaklaşık 10'ar dk yıkandı. Yıkama işlemi sonunda renk verici madde (25x konjuge alkalen fosfataz kit; Bio-Rad) ile bantlar görünene kadar inkübe edildi.

### **3.2.5.6. Sol Ventrikül Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi:**

Miyokard sol ventrikül protein konsantrasyonu Bradford yöntemine göre belirlenmiştir (Bradford 1976).

#### **Bradford (Komasi Mavisi) Yöntemi:**

##### **Çözeltiler:**

-Komasi brillant mavisi G-250

-Ethanol %100

-o-fosforik asid %85

**Bradford boyası:** 47,5 ml etanole 2,5 ml deiyonize su eklenerek son hacimin 50 ml olması sağlandı. Karışıma 100 mg Komasi brillant mavisi eklendi, karışıma 850ml deiyonize su eknererek son hacmin 900ml olması sağlandı. Elde edilen karışıma %85 fosforik asit eklenerek hacim 1 litreye tamamlanarak 3 defa filtre kâğıdı ile filtreden geçirildi.

**Yöntem:** Çoklu pipet (12 lik) kullanarak 200 µl bradford boyası mikropate yüklendi üzerine 4 µl homojenat eklendi. 30 dk inkübasyonun sonunda 595nm dalga boyunda köre karşı verdiği absorbans değeri BSA (bovin serum albümin) ile elde edilen standart (0,156-1,25 mg/ml) eğri ile hesaplandı.

### **3.3. Verilerin Analizi**

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi, SPSS 8.0 istatistiksel programı ile Kruskal-Wallis nonparametrik ANOVA, Mann-Whitney U-test ve Spearman korelasyonu kullanılarak yapıldı. Man-Whitney U-testinde ikiden fazla yapılan karşılaştırmalarda p değeri Bonferroni düzeltmesi yapılarak dikkate alınmıştır (Alpar, 2001). Diğer analizler için istatistiksel anlamlılık sınırı özellikle belirtilmemişse  $p < 0.05$  olarak kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda akut orta şiddetli ve şiddetli hipobarik hipoksinin yaşlı ve genç sıçan kalp kasında yol açtığı oksidatif hasar düzeyleri incelenerek oluşan oksidatif hasar düzeyinin yaşlı sıçanlardaki durumu genç sıçanlarinkine göre değerlendirilmiştir. Ayrıca yaşlı ve genç sıçanların önceden akut orta şiddetli hipobarik hipoksiye tabi tutulmaları akut şiddetli hipobarik hipoksidede oluşan oksidatif hasarı azaltıp azaltmayacağı araştırılmıştır. Bu nedenle yaşlı (20 ay) ve genç (4 ay) sıçanlar 6000m, 8000m ve 6000+8000m akut hipobarik hipoksidede 6 saat tutulmuş ve kalp kası oksidatif hasar parametreleri ve HSP72 düzeyleri incelenmiştir.

Akut hipobarik hipoksidede yaşlı ve genç sıçan sol ventrikül oksidatif stres değişkenleri ortalamaları ve standart sapmaları tablo 4.1.'de verilmiştir. Genel olarak yaşlı sıçanlarda her bir yükselti seviyesinde AOPP, PCO ve LHP düzeyleri genç sıçanlarinkine göre daha fazla bulunmuştur. TSH ve PSH düzeyleri ise genellikle yaşlı sıçanlarda gençlerinkine kıyasla daha az saptanmıştır. Ayrıca yükselti seviyeleri arttıkça AOPP, PCO, LHP, TSH ve PSH düzeyleri gerek yaşlı gerekse genç sıçanlarda farklılık göstermiştir. Farkın hangi gruplardan kaynaklandığı aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

PCO ve PSH değişkenleri arasında hem totalde hem de sadece yaşlı sıçan grupları veya genç sıçan grupları dikkate alındığında da yüksek negatif ilişki görülmektedir. Diğer taraftan HSP72 düzeyinde hiçbir grupta herhangi bir artış saptanmamıştır.

Tablo 4.1. AHH yaşlı ve genç sıçan sol ventrikül oksidatif hasar değişkenleri ortalamaları ve standart sapmaları.

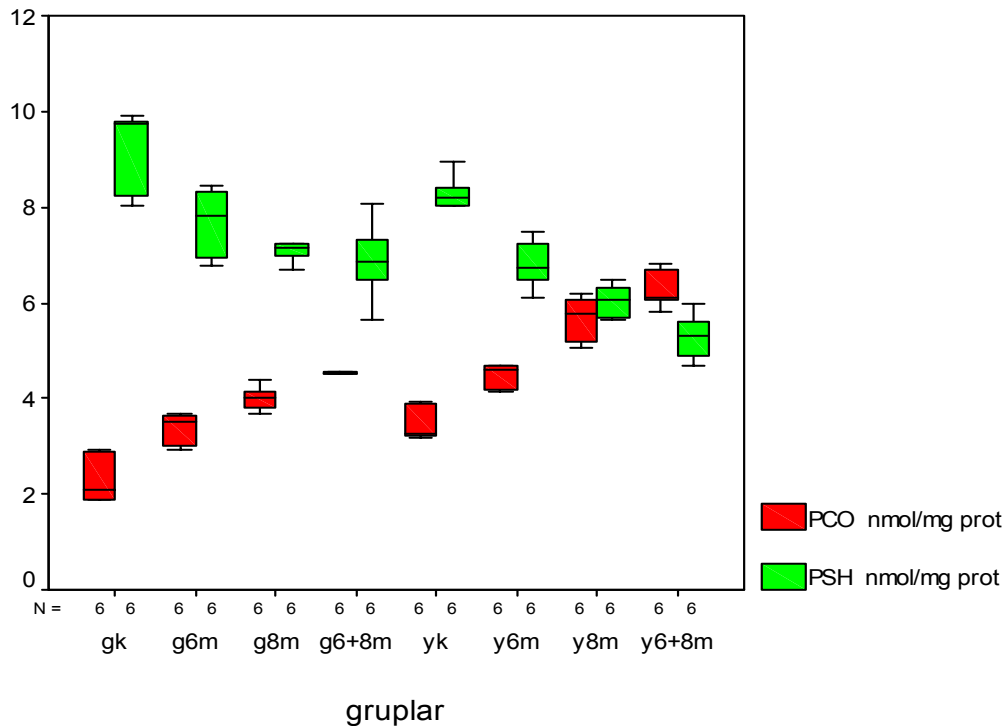
	GK	G6m	G8m	G6+8m	YK	Y6m	Y8m	Y6+8m
AOPP	45,400 ±2,68	45,216 ±1,96	56,775 ±1,08	57,497 ±3,26	52,884 ±3,188	52,336 ±3,40	65,215 ±2,982	64,050 ±2,78
LHP	8,271 ±0,45	9,460 ±0,14	12,693 ±0,550	14,200 ±0,55	11,237 ±0,53	12,635 ±0,77	14,831 ±0,69	15,886 ±0,72
PCO	2,292 ±0,49	3,382 ±0,31	4,002 ±0,26	4,552 ±0,11	3,463 ±0,35	4,475 ±0,25	5,682 ±0,46	6,270 ±0,39
PSH	9,236 ±0,87	7,688 ±0,70	7,064 ±0,20	6,867 ±0,81	8,148 ±0,62	6,802 ±0,52	6,032 ±0,36	5,308 ±0,47
TSH	9,815 ±0,93	8,432 ±075	7,835 ±0,342	7,640 ±0,837	8,767 ±0,96	7,615 ±0,46	6,658 ±0,345	5,852 ±0,42

#### 4.1. Oksidatif Hasar Değişkenlerinin Yaşlı ve Genç Sıçan Gruplarına Göre Karşılaştırılması

Yaşlı ve genç sıçanların sol ventrikülünden elde edilen oksidatif hasar değişkenleri AHH yükselti seviyelerinde Mann-Whitney U-testi ile karşılaştırılmıştır.

##### 4.1.1. Yaşlı ve Genç Sıçan Kontrol Grupları

Yaşlı sıçan kontrol AOPP, LHP ve PCO düzeyleri genç sıçan kontrol AOPP, LHP, PCO düzeylerinden daha fazla bulunmuştur ( $p < 0,05$ ; Şekil 4.1, 4.2, 4.4). PSH ve TSH bazal düzeyi yaşlı ve genç sıçan kontrol gruplarında anlamlı bir fark göstermemiştir ( $p > 0,05$ ; Şekil 4.1 ve 4.3).



Şekil 4.1. AHH'nin genç ve yaşlı sıçan PCO ve PSH düzeylerine etkisi

##### 4.1.2. Yaşlı ve Genç Sıçan 6000m Grupları

Yaşlı 6000m sıçan grubu AOPP, LHP, PCO düzeyleri genç 6000m sıçan grubu AOPP, LHP, PCO düzeylerinden daha yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ; Şekil 4.1, 4.2, 4.4). PSH düzeyi 6000m yaşlı sıçanlarda genç sıçanlarınkine göre daha az bulunurken ( $p < 0,05$ ; Şekil 4.1) TSH düzeyi yaşlı ve genç 6000m sıçan gruplarında farklı değildir (Şekil 4.3).

### **4.1.3. Yaşlı ve Genç Sıçan 8000m Grupları**

AOPP, LHP, PCO düzeyleri yaşlı sıçanlarda genç sıçanlara göre daha yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ; Şekil 4.1, 4.2, 4.4). 8000m PSH ve TSH düzeyi yaşlı sıçanlarda genç sıçanlarınkine göre daha az bulunmuştur ( $p<0,05$ ; Şekil 4.1 ve 4.3).

### **4.1.4. Yaşlı ve Genç Sıçan 6000+8000m Grupları**

Yaşlı 6000m+8000m sıçanları AOPP, LHP, PCO değişkenleri genç 6000m+8000m grubu sıçanlarının AOPP, LHP, PCO değişkenlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla bulunmuştur ( $p<0,05$ ; Şekil 4.1, 4.2, 4.4). Yaşlı 6000m+8000m grubu PSH ve TSH düzeyi genç 6000m+8000m grubu PSH ve TSH düzeyinden daha az saptanmıştır ( $p<0,05$ ; Şekil 4.1, 4.3).

## **4.2. Oksidatif Hasar Değişkenlerinin Yükselti Seviyelerine Göre Karşılaştırılması**

AHH yükselti düzeyleri arasındaki oksidatif protein hasarı ve oksidatif stres hasar değişkenleri yaşlı ve genç sıçanlarda Kruskal-Wallis nonparametrik ANOVA testi ile analiz edilmiş ve genel olarak AHH yükselti düzeyleri arasında genç ve yaşlı sıçan parametrelerinde anlamlı farklılıklar göstermiştir. Farkın hangi yükselti düzeyinden ileri geldiği ise Mann-Whitney U nonparametrik testi ve Bonferroni düzeltmeli p değeri ile belirlenmiştir.

### **4.2.1 Yaşlı Sıçan Grupları**

Yaşlı sıçan AOPP, LHP, PCO, PSH, TSH değerleri Kontrol, 6000m, 8000m ve 6000m+8000m yükselti seviyeleri arasında anlamlı farklılık göstermiştir. Hangi grupların fark yarattığı aşağıda açıklanmıştır.

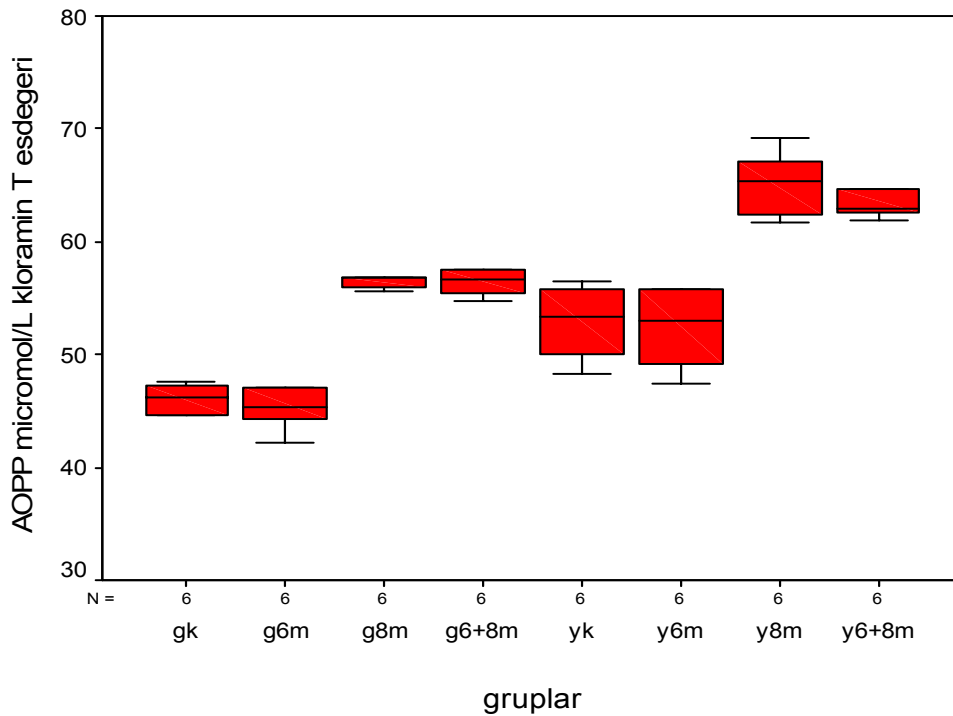
#### **4.2.1.1. Yaşlı Sıçan Kontrol ve 6000m Grupları**

Yaşlı sıçan 6000m grubu LHP, ve PCO düzeyleri yaşlı kontrol grubununkine kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ( $p<0,0083$ ; Şekil 4.1, 4.4). Yaşlı sıçan 6000m PSH düzeyi ise kontrol grubuna göre daha az bulunmuştur ( $p<0,0083$ ; Şekil 4.1). AOPP ve TSH

düzeyleri ise yaşlı kontrol ve yaşlı 6000m sıçan grupları arasında istatistiksel bir fark göstermemiştir (Şekil 4.2, 4.3).

#### 4.2.1.2. Yaşlı Sıçan Kontrol ve 8000m Grupları

AOPP, LHP ve PCO düzeyleri 8000m yaşlı sıçan grubunda, yaşlı kontrol grubununkine kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ( $p < 0,0083$ ; Şekil 4.1, 4.2, 4.4). TSH ve PSH düzeyleri ise 8000m yaşlı sıçan grubunda kontrol grubuna kıyasla daha az bulunmuştur ( $p < 0,0083$ ; Şekil 4.1, 4.3).



Şekil 4.2 AHH'nin genç ve yaşlı sıçan AOPP düzeyine etkisi

#### 4.2.1.3. Yaşlı Sıçan Kontrol ve 6000+8000m Grupları

AOPP, LHP ve PCO düzeyleri 6000+8000m yaşlı sıçan grubu yaşlı kontrol grubununkine kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ( $p < 0,0083$ ; Şekil 4.1, 4.2, 4.4). TSH ve PSH düzeyleri ise 6000+8000m yaşlı sıçan grubunda kontrol grubuna kıyasla daha az bulunmuştur ( $p < 0,05$ ; Şekil 4.1, 4.3).

#### **4.2.1.4. Yaşlı Sıçan 6000m ve 8000m Grupları**

Yaşlı 8000m sıçan grubu AOPP, LHP, PCO düzeyleri yaşlı 6000m sıçan grubununkinden daha yüksek bulunmuştur ( $p<0.0083$ ; Şekil 4.1, 4.2, 4.4). Yaşlı 8000m sıçan grubu TSH düzeyi yaşlı sıçan 6000m grubununkinden daha az bulunmuştur ( $p<0.0083$ ; Şekil 4.3). Fakat yaşlı 8000m sıçan grubu PSH düzeyi yaşlı 6000m sıçan grubununkinden fark göstermemiştir (Şekil 4.1).

#### **4.2.1.5. Yaşlı Sıçan 6000m ve 6000+8000m Grupları**

Yaşlı 6000+8000m sıçan grubu AOPP, LHP ve PCO düzeyleri yaşlı 6000m sıçan grubununkinden daha fazla bulunurken TSH ve PSH düzeyleri daha az bulunmuştur ( $p<0.0083$ ; Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4).

#### **4.2.1.6. Yaşlı Sıçan 8000m ve 6000+8000m Grupları**

Yaşlı 6000+8000m sıçan grubu AOPP, LHP, PCO ve PSH düzeyleri yaşlı 8000m sıçan grubununkinden istatistiksel olarak farklı saptanmazken TSH düzeyi daha az bulunmuştur ( $p<0.0083$ ; Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4).

#### **4.2.2. Genç Sıçan Grupları**

Genel olarak genç sıçan grupları AOPP, LHP, PCO, PSH, TSH düzeyleri de yaşlı sıçan gruplarında olduğu gibi her bir yükselti seviyeleri arasında anlamlı farklılık göstermiştir. Farkın hangi gruplardan kaynaklandığı aşağıda açıklanmıştır.

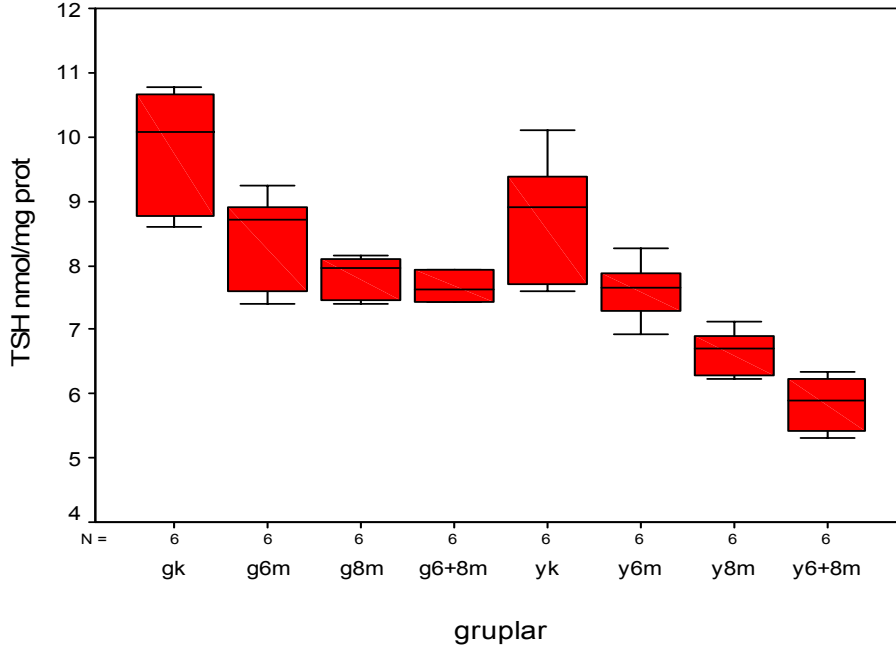
##### **4.2.2.1. Genç Sıçan Kontrol ve 6000m Grupları**

Genç sıçan 6000m grubu LHP, PCO düzeyleri genç sıçan kontrol grubununkinden istatistiksel olarak daha yüksek saptanmıştır ( $p<0.0083$ ; Şekil 4.1 ve 4.4). Fakat genç sıçan 6000m grubu AOPP, PSH ve TSH düzeyinde genç sıçan kontrol grubuna göre bir farklılık çıkmamıştır (Şekil 4.1, 4.2, 4.3).



#### 4.2.2.2. Genç Sıçan Kontrol ve 8000m Grupları

Genç sıçan 8000m grubu AOPP, LHP ve PCO düzeyleri genç sıçan kontrol grubununkinden istatistiksel olarak daha yüksek ve PSH ve TSH düzeyleri daha az bulunmuştur ( $p < 0.0083$ ; Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4).



Şekil 4.3. AHH'nin genç ve yaşlı sıçan TSH düzeylerine etkisi

#### 4.2.2.3. Genç Sıçan Kontrol ve 6000+8000m Grupları

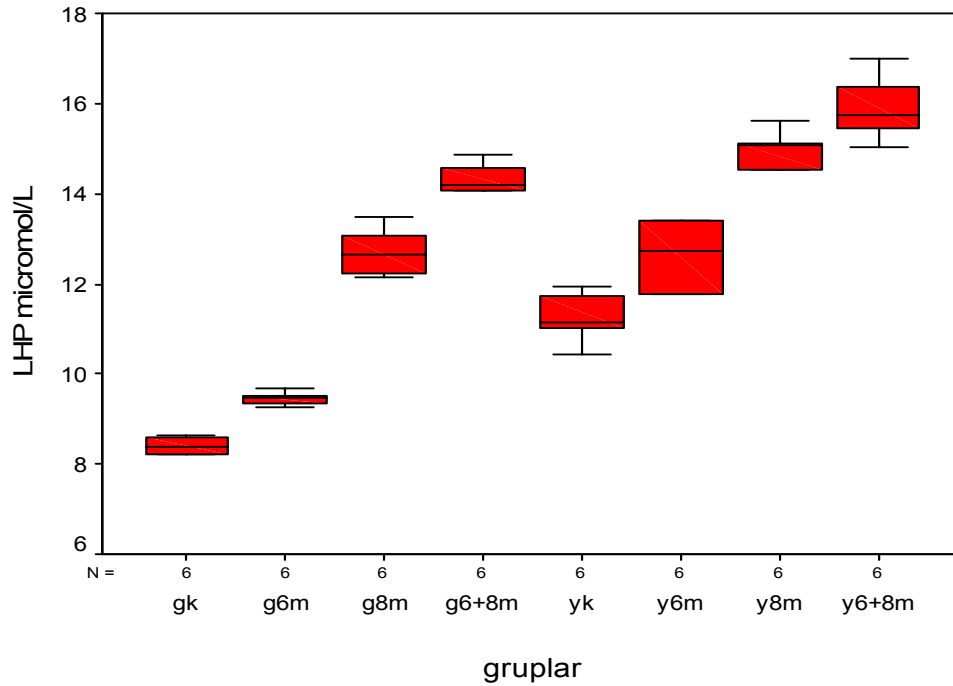
Genç sıçan 6000+8000m grubu AOPP, LHP ve PCO düzeyleri genç sıçan kontrol grubununkinden daha fazla bulunmuştur ( $p < 0.0083$ ; Şekil 4.1, 4.2 ve 4.4). Genç sıçan 6000+8000m grubu PSH ve TSH düzeyleri ise daha az bulunmuştur ( $p < 0.05$ ; Şekil 4.1, 4.3).

#### 4.2.2.4. Genç Sıçan 6000m ve 8000m Grupları

Genç sıçan 8000m grubu AOPP, LHP ve PCO düzeyleri genç sıçan 6000m grubununkinden daha yüksek bulunurken ( $p < 0.0083$ ; Şekil 4.1, 4.2, 4.4). PSH ve TSH düzeylerinde herhangi bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.1, 4.3).

#### 4.2.2.5. Genç Sıçan 6000m ve 6000+8000m Grupları

Genç sıçan 6000+8000m grubunda da AOPP, LHP ve PCO düzeyleri genç sıçan 6000m grubununkinden istatistiksel olarak daha yüksek bulunurken ( $p < 0.0083$ ; Şekil 4.1, 4.2, 4.4), yine PSH ve TSH düzeylerinde herhangi bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.1, 4.3).



Şekil 4.4. AHH'nin genç ve yaşlı sıçan LHP düzeylerine etkisi.

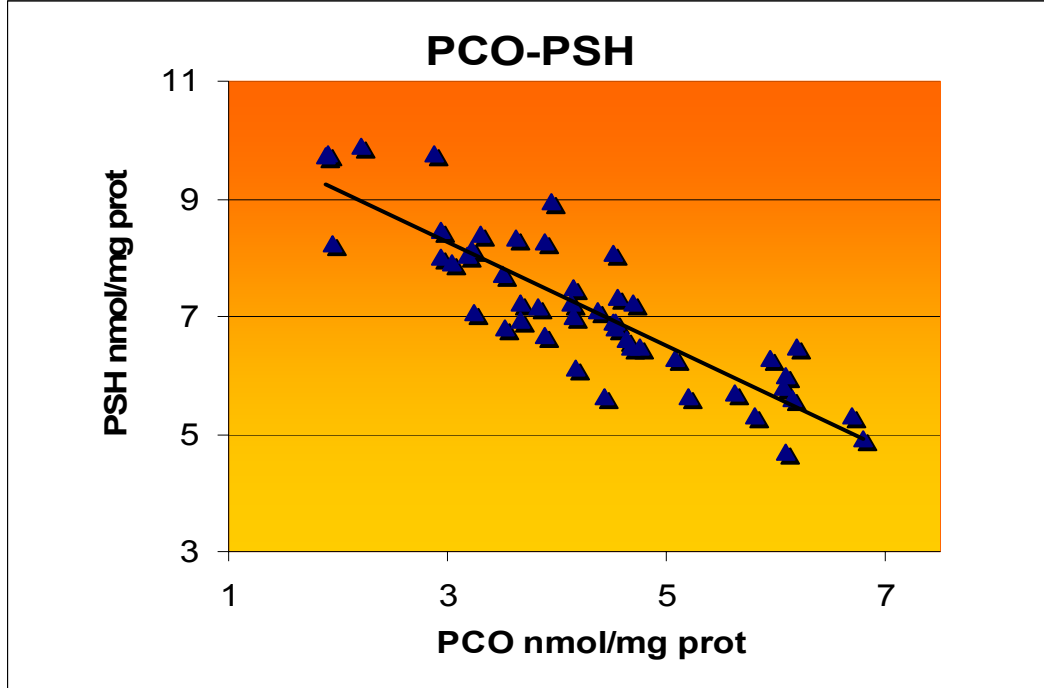
#### 4.2.2.6. Genç Sıçan 8000m ve 6000+8000m Grupları

Genç sıçan 6000+8000m grubu LHP ve PCO düzeyleri genç sıçan 8000m grubununkinden istatistiksel olarak daha yüksek bulunurken ( $p < 0.0083$ ; Şekil 4.1 ve 4.4). AOPP, PSH ve TSH düzeylerinde genç 6000+8000m sıçan grubu ile genç 8000m sıçan grubu arasında herhangi bir fark bulunmamıştır.

### 4.3. PCO ve PSH Korelasyonu

PCO ve PSH parametreleri arasındaki ilişki Pearson Korelasyonu ile tespit edilmiştir. Yaşlı-genç sıçan grupları ayırımı ve AHH yükselti düzeyleri farklılıkları dikkate alınmaksızın 'totalde' yapılan korelasyon testinde PCO ve PSH değişkenleri arasında istatistiksel olarak anlamlı yüksek düzeyde negatif ilişki tespit edilmiştir ( $r = -0,862$ ,  $p < 0,001$ ; Şekil 4.1 ve 4.5). Bu ilişkinin

sadece yaşıli sıçan grubu veya sadece genç sıçan grubu göz önüne alındığında da var olduğu görülmektedir (sırasıyla  $r=0,810$ ,  $p<0,01$ ;  $r=0,847$ ,  $p<0,01$ ).



Şekil 4.5. PCO ve PSH korelasyonu

#### 4.4 Hsp72 Düzeyi

Hsp72 düzeyini tayin etmek amacıyla %12lik poliakrilamid jel hazırlanmış ve sıçan sol ventrikül örnekleri üç ayrı denemede her yuvaya sırasıyla 105 $\mu$ g, 150 $\mu$ g ve 300 $\mu$ g olacak şekilde yüklenmiştir. Gerek 105 $\mu$ g, 150 $\mu$ g miktarlarındaki yüklemelerde Hsp72 düzeyi belirlenemezken, 300 $\mu$ g miktarındaki son yüklememizde Hsp72 protein bandı izlenmeye başlanmış ancak örnekler arasında bir fark görülmemiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Genç ve yaşıli sıçanlarda Hsp72 düzeyi

## 5. TARTIŞMA

Serbest radikal oluşumu ve oksidatif hasar hipoksi gibi metabolizma için normal olmayan koşulların yanı sıra oksijen tüketiminin fizyolojik ve metabolik açıdan normal olduğu koşullarda da gerçekleşebilmektedir (2,83,144,145). Yaşlanma bu koşulla bir örnektir. Gerek yaşlanmada (71,100, 145) gerekse hipoksi koşullarında (9,87,97) redoks dengesizliği söz konusudur. Her ikisinde birden normalden daha fazla radikal oluşur. Oluşan radikaller başta makro moleküller olmak üzere mitokondriyal hasar, hücre ölümü ve hatta doku hasarına kadar giden önemli fizyopatolojik olaylara neden olabilmektedir (2,43). Huntington (100), alzheimer (100,120), aterosklerozis (24) gibi genellikle ileri yaşlarda ortaya çıkan ve hipoksi koşullarına benzerlik gösterdiği ifade edilen hastalıkların ana mekanizmalarının altında yatan nedenin serbest radikaller olduğu bilinmektedir.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgularımıza göre ilk hipotezimiz 'Gerek orta ve gerekse şiddetli akut hipobarik hipoksi yaşlı ve genç sıçanlarda miyokardiyal oksidatif hasara yol açar, bu hasar hipoksinin seviyesiyle ilgili olarak artar.' kabul edilmiştir. Bu hipotezi test etmek için AOPP, PCO, LHP, P-SH TSH değişken düzeyleri yaşlı ve genç sıçan kalp kasında saptanmıştır. Elde ettiğimiz bulgular her iki deney hayvanı grubunda hipobarik hipoksi şiddetinin artmasıyla oksidatif hasarın arttığını göstermektedir.

İkinci hipotez 'Orta ve şiddetli akut hipobarik hipokside oluşan miyokardiyal oksidatif hasar yaşlı sıçanlarda genç sıçanlarinkine göre daha fazladır.' kabul edilmiştir. Bu hipotez de AOPP, PCO, LHP, P-SH TSH değişken düzeyleri ile test edildi. Oksidatif hasar değişkenleri her bir yükselti düzeyinde yaşlı sıçan kalbinde genç sıçanlarinkine kıyasla daha fazla saptanmıştır.

Üçüncü hipotezimiz ise 'Önceden akut orta şiddetli hipobarik hipoksiye tabi tutulan yaşlı ve genç sıçan kalp kasının sonradan şiddetli hipobarik hipokside oluşan oksidatif hasara karşı koruma geliştirip geliştiremeyeceğini araştırmaktır.' kabul edilmemiştir. Bu hipotezde de ilk iki hipotezin testinde

kullanılan oksidatif hasar değişkenleri ve ayrıca Hsp72 düzeyi tayin edilerek test edilmiştir. Akut hipobarik hipoksi koşullarında Hsp72 düzeyinde herhangi bir artış saptanamazken protein oksidasyonu ve lipit peroksidasyonu düzeylerinde artış tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular aşağıda ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

### **5.1. ROS ve Protein Hasarı**

Ökaryotik hücrelerin yaklaşık dörtte üçünü oluşturan proteinler, serbest radikallerin ilk hedeflerindedir (41). Ayrıca hücredeki birçok metabolik olaylarda önemli rolleri nedeniyle proteinler oksidatif hasara uğradıklarında hücre içinde daha geniş çaplı etkilere neden olabilmektedirler (32).

Proteinler oksidanlara maruz kaldıklarında kovalent değişikliğe uğrarlar. Bu değişikliklerden bazıları serbest radikallerin protein molekülleri üzerine direkt etkileri sonucu oluşabildiği gibi, bazıları da oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent olarak bağlanmasıyla meydana gelir. Proteinlerin radikal aracılı hasarı; elektron kaybı, metal-iyon katalizli reaksiyonlar, lipit ve şekerlerin otooksidasyonu ile başlatılabilmektedir. Bu ürünlerin oluşum hızının artması veya temizleyici mekanizmaların yetersiz kalması, proteinler dahil olmak üzere diğer hücre sel moleküllerdeki oksidatif modifikasyonların artışına yol açar (65).

#### **5.1.1. Yaşlanma ve Protein Karbonil**

PCO her ne kadar belli bir yapısal proteinin hasarını göstermiyorsa da global olarak kabul gören önemli bir oksidatif protein hasar parametresidir (17,26,30,86). Literatürde deney hayvanları (28,29,86) ve insan (72) çalışmalarında PCO düzeyi yaşlılarda genel olarak daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda literatüre paralel olarak yaşlı denek grubu bazal PCO düzeyleri, genç denek grubu PCO düzeylerinden yüksek bulunmuştur. Literatürdeki çalışmalar genel olarak yaşlanmadaki redoks homeostazındaki dengesizliği antioksidan enzim sistemlerinin etkinliğindeki azalmaya bağlamaktadırlar (72,100). Bu paradigma bilim çevreleri tarafından yaygın olarak kabul edilmesine karşın, Garcia-Arumi ve diğ. (1998) yaşlıların lenfositlerinde yaptıkları bir çalışmada antioksidan enzim sistemlerinin

etkinliğinde bir azalmanın söz konusu olmadığını, bunun yerine serbest radikal oluşumunda artış olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada PCO düzeyleri yaşlı grubunda daha yüksek olarak saptanmıştır. Yaşam beklentisi kısa olan *Drosophila*'larda mitokondriyal  $H_2O_2$ 'in yaşam beklentisi uzun olan aynı türe göre daha yüksek düzeyde olduğu ve bu mutantların yaşam süreçlerinin kısa oluşunda antioksidan enzim mekanizmalarının yetersizliğinin rol oynamadığı ifade edilmiştir (153). Yaşlı ve genç insan ve hayvan çalışmalarında, erkeklerin antioksidan enzim aktiviteleri incelenmiş ve iyi beslenme alışkanlığı olan yaşlı erkeklerin genç erkekler kadar yüksek antioksidan enzim aktivitelerine sahip oldukları bildirilmiştir. (103,125). Diğer taraftan ilerleyen yaşla birlikte canlıların hareketliliğinde azalma olduğu bilinmektedir. Hareketlilikteki azalmanın radikal oluşumundaki artışa katkısı olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (78-81,86). Yaşlılıkta antioksidan enzim sentezi ve/veya antioksidan enzim aktivitesinde azalma olduğu henüz tam olarak açığa kavuşmuş değildir. Bununla birlikte yaşlılıkta daha çok serbest radikal oluşmaktadır. Bizim bulgumuzda bu durumu destekler niteliktedir.

### **5.1.2. Akut Hipobarik Hipoksi ve Protein Karbonil**

Yaşlanma ve hipoksi birbirinden çok ayrı mekanizmalarını gibi düşünülse de radikaller açısından ele alındığında benzerlikler göstermektedir. Hipoksi koşullarında radikal oluşumunda artış olmaktadır (9,97). Sıçan karaciğerinde yapılan bir çalışmada şiddetli hipoksi koşullarında teneffüs edilen oksijenin % 50'sinin süperoksit radikal anyonunu oluşturduğu belirtilmektedir (47). Mitokondrilerin hipoksi koşullarında önemli bir radikal oluşum kaynağı olduğu bilinmektedir (42,97). Hipobarik hipoksi koşullarında 4 hafta süre ile günde bir saat yaptırılan egzersizde sıçanların 'quadriseps' kası kırmızı bölgesinde PCO düzeylerinde artış tespit edilmiştir (124). Fakat diğer bir çalışmada radikal hasarının 4000-5000m yükseltide yapılan kısa süreli düşük yoğunluktaki egzersizden ziyade hipoksiden kaynaklandığı belirtilmiştir (132). Akut 8500m yükseltiye maruz bırakılan 10 haftalık erkek farelerin iskelet kası mitokondriyal PCO düzeylerinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği tespit edilmiştir (97,98). Çalışmamızda da miyokardiyal PCO

düzeyleri'nin hem yaşlı hem de genç gruplarda yükseltinin şiddetine paralel bir artış gösterdiği bulunmuştur. Her iki sıçan grubunda da 6000m ve 8000m PCO düzeyi kontrol düzeyidekinden daha yüksek bulunmuştur. 8000m sıçan grupları PCO düzeyi belirgin şekilde daha yüksektir. 6000m+8000m genç denek grubu PCO düzeyinde 8000m genç denek grubu PCO düzeyinden daha fazladır. Bu bulgu önceden uyguladığımız akut orta şiddetli hipobarik hipoksida (6000m) koşulu 8000m yükselti koşulunda oluşan radikal hasarını azaltmamış aksine ek bir hasar yaratmıştır. Yine yaşlı denek grubunda herhangi bir fark çıkmaması önceden uygulanan hipobarik hipoksinin şiddetli hipoksida radikal hasar oluşumunu azaltmadığını göstermektedir. Öte yandan PCO düzeyinin yaşlı 6000+8000m ve 8000m grupları arasında fark göstermemesi TSH düzeyinin azalmasıyla kısmen de olsa açıklanabilir. Bilindiği gibi PSH ve TSH oksidatif hasar belirteci olmaları yanı sıra nonenzimatik antioksidan mekanizmasının bir parçasıdır (26,27). Yaşlı denek 6000m+8000m ve 8000m grupları PCO düzeyinde fark çıkmamasının diğer bir neden ise verileri nonparametrik istatistik yöntemi ile analiz etmiş olmamız olabilir. Çünkü p değerini Bonferroni düzeltmesi yaparak dikkate aldık. Genç sıçan 6000+8000m PCO düzeyini 8000m PCO düzeyinden daha yüksek çıkması ise 6000m'de oluşan protein karbonillerinin bir gün içinde metabolizmada yıkıma uğrayamadığı ve/veya bir kısmının yıkıma uğradığı ve diğer kalanlarının 8000m de oluşan yeni PCO grupları ile beraber kümülatif etki yarattığıdır. PCO'in lipid hidroperoksite göre nispeten erken dönemde oluşması ve stabil olması (31,32) bu duruma açıklık getirmektedir.

Ayrıca her bir yükselti düzeyinde yaşlı sıçan gruplarında PCO seviyesi aynı yükselti düzeyine karşılık gelen genç sıçan grubu PCO seviyesine göre daha fazla bulunmuştur. Bu fark belki yaşlılardaki proteozom aktivitesindeki azalmaya bağlı olarak ya da antioksidan mekanizmaların etkinliğindeki azalmayla açıklanabilir (33). Serbest radikaller kanda antioksidan olarak da görev yapan albüminin bu yetisinin azalmasına neden olmuşlardır (16). Fakat T-SH bazal bulgularımız, yaşlanmayla antioksidan mekanizmasının etkinliğinde azalma olmadığı yönündedir. Genel olarak T-SH bulgularımız yaşlı ve genç her iki sıçan gruplarında yükselti şiddetine bağlı olarak etkin

koruma sağladığı yönündedir. Diğer taraftan yaşlanma ile birlikte mitokondri ve ekstramitokondriyal yollarla ortama daha fazla radikal bırakıldığı bilinmektedir (2,86,101). Hipoksizde de benzer bir durum söz konusu olduğundan yaşlı gruplarda her bir yükselti düzeyinde genç gruplarına göre daha yüksek PCO düzeylerinin saptanması aslında beklenen bir durumdur.

### **5.1.3. Yaşlanma ve İleri Oksidasyon Protein Ürünleri**

AOPP oldukça yeni bir protein oksidasyon hasar belirteçidir. İlk kez Wirko-Sarsat tarafından 1996 yılında üremik hastaların plazmasında belirlenmiştir. AOPP ditirozin çapraz bağları içeren protein oksidasyon ürünleri olarak tanımlanır (4,156). Yaşlılıkta oksidatif protein hasar oluşumunu belirlemede AOPP önem kazanmış ve yaşlı deney hayvanlarında ve insanlarda AOPP çalışılmıştır (26-30,65-72,141,142). Yaşlı sıçan iskelet kasında (28) ve kalp kasında yapılan çalışmalarda AOPP değerleri genç hayvanlarınkine göre daha yüksek olarak bulunmuştur (29,72). Mevcut bulgularımız da literatürle paralellik göstermektedir. Yaşlı sıçan sol ventrikül bazal AOPP değerleri genç sıçanların bazal AOPP değerlerinden daha yüksek olarak saptanmıştır.

### **5.1.4. Akut Hipobarik Hipoksi ve İleri Oksidasyon Protein Ürünleri**

Akut hipobarik hipoksizde kalp kasında, güncel bir protein hasar parametresi olan AOPP ilk defa bu çalışmada saptanmıştır. Çalışmamız bu yönüyle özgün bir nitelik taşımaktadır.

Literatürde hipoksi koşullarında AOPP ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda AOPP düzeyleri insan (121) ve hayvan plazmasında (36) tespit edilmiştir. Her iki çalışmada da AOPP düzeyleri normoksik koşullara göre yüksek bulunmuştur. Devi ve diğ. (2007) yaptığı çalışmada 5700m ve 6300m yükselti seviyeleri plazma AOPP düzeyleri arasında kontrol gruplarına göre fark bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise yaşlı ve genç sıçan kontrol ve 6000m grupları arasında, 8000m ve 6000m+8000m grupları arasında AOPP düzeylerinde fark saptanmamıştır. Öte yandan biz her iki sıçan grubunda da 8000m AOPP değerlerini 6000m ve kontrol AOPP değerlerinden istatistiksel olarak yüksek bulduk. Devi ve diğ.



(2007) 5700m ve 6300m de AOPP için yüksek değerler elde etmelerindeki neden; onların intermitten hipobarik hipoksi uygulamış olmaları ve deney hayvanlarını daha uzun süre strese tabi tutmaları olabilir. Çalışmamızda denekler 6 saat süre ile hipobarik hipoksiye tabi tutuldular ve bu süre hem yaşlı hem de genç sıçan gruplarında 6000m AOPP düzeyinde artışa neden olacak kadar etkili olmamış olabilir. 8000m ve 6000m+8000m grupları arasında fark saptanmaması da bu düşüncemizi destekler niteliktedir. Her bir yükselti seviyesindeki yaşlı grubun sol ventrikül AOPP değerlerinin genç sıçan grubununkinden daha fazla bulunmasının yine yaşlılıktaki redoks mekanizmasındaki dengenin bozulması ile ilişkili olduğu görüşündeyiz.

### 5.1.5 Yaşlanma ve Tiyoller

Serbest radikaller'in neden olduğu bir başka protein hasarı mekanizması da proteinlerdeki tiyol (-SH) gruplarının oksitlenmesi olarak bilinir (12,66,113). Sistein amino asiti'nin (sülfidril) -SH grubu oksidatif strese oldukça yatkındır. Tiyol gruplarının disüfitlere ve oksiasitler gibi oksitlenmiş türevlere dönüşümü protein oksidasyonunun en erken gözlenebilen belirtisidir (37). Ayrıca protein tiyollerinin lipid peroksidasyonu başlatan oksidanlarla reaksiyona girerek lipidleri radikal hasarından koruduğunu belirtilmektedir (146). Literatürdeki çeşitli kaynaklar serbest radikallerin yaşlanmayla P-SH gruplarını oksitlediğini göstermektedir (26-28,40,104,116,117) Yaşlı sıçanların iskelet kasında yapılan çalışmada P-SH ve T-SH seviyelerinin gençlerinkine kıyasla düşük olduğu tespit edilmiştir (28). Yine yaşlı sıçanların kalp, kan plazması ve beyin dokusunda yapılan çalışmalarda P-SH ve T-SH seviyeleri yaşlılarda daha düşük düzeyde bulunmuştur (28,29,71,72). Fakat bizim bulgularımız literatür ile benzerlik göstermemektedir. Yaşlı sıçan grubu bazal P-SH ve T-SH düzeyleri genç sıçan grubu bazal P-SH ve T-SH düzeylerinden farklı değildir.

### 5.1.6. Akut Hipobarik Hipoksi ve Tiyoller

Hipoksik ortamda protein tiyollerinin oksidasyona uğradığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (36,97,98). Bu çalışmalardaki soleus kası T-SH değerlerinin hipoksik ortamda azalması, kalp dokusundaki bulgularımızla

benzeşmektedir. Genel olarak gerek yaşlı sıçan gruplarında, gerekse genç sıçan gruplarında yükseltinin şiddeti arttıkça P-SH ve T-SH seviyelerinde azalma tespit edilmiştir. En yüksek P-SH ve T-SH düzeyleri genç hayvan kontrol grubu ve ardından yaşlı hayvan kontrol grubunda tespit edilmiştir. Bununla birlikte 8000m ve 6000m+8000m genç hayvan gruplarının kalp kası sol ventrikül P-SH ve T-SH değerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunamazken, yaşlı sıçan grubunun aynı yükselti seviyeleri arasında ise T-SH değerlerinde fark bulunmuştur. Yaşlı sıçan 6000m+8000m grubunda her iki yükselti seviyesinde (6000m ve 8000m) birden T-SH oksidasyona uğramıştır. Genç hayvan gruplarında ise sadece 8000m'de ciddi anlamda protein tiyollerini oksidasyonu uğramıştır. Genç hayvan gruplarında antioksidan olarak görev gören indirgenmiş glutatyonun (GSH) etkin olabileceğini belirtmek gerekir. GSH'ın birincil dereceden P-SH oksitlenmesini engellemede antioksidan olarak görev aldığı ifade edilmektedir (71,72). Yaşlılıkta kalp kasında GSH düzeyinde azalma olduğu gösterilmiştir (72). GSH'ın azalması ile birlikte hidrojen peroksit, süperoksit iyonu, hidroksil radikali ve lipit peroksitin düzeylerinin arttığı bildirilmektedir (133). Mitokondri içi GSH'ın kritik düzeyde azalması mitokondriyal ölümün en önemli nedenlerinden biri olarak belirtilirken (101,150), mitokondrinin yapısal protein tiyollerini oksitlenmekten etkin bir şekilde koruduğu gösterilmiştir (113). Glutatyon ve sistein gibi biyolojik tiyoller radikallerle indüklenen protein inaktivasyonunu, ya doğrudan bu radikallerle reaksiyona girerek ya da dolaylı olarak proteinlerdeki serbest tiyol grupları ile geri dönüşümlü bağlar oluşturarak önler (27,37,43). P-SH ve GSSG arasındaki reaksiyon ya GSH oluşumunu sağlar veya proteinlerle disülfid bağı oluşturarak inaktif protein oluşumuna neden olmaktadır (75). Bu nedenle çalışmamızın eksik kalan yönlerinden birisi GSH ve GSSG belirlememiş olmamızdır. Bu parametreler bize protein tiyollerinin oksitlenmeleri hakkında daha iyi karar vermemize olanak verebilirdi.

Farklı çalışmalarda P-SH ve/veya T-SH değerleri ile PCO değerleri arasında yüksek negatif korelasyon elde edilmiştir (27,65). Çalışmamızda da P-SH ve PCO arasında hem totalde, hem genç ve yaşlı gruplarda hem de

her bir yükselti seviyesinde yüksek negatif korelasyon saptandı. Çalışmamızda yükselti seviyesi arttıkça P-SH ve PCO arasındaki korelasyon daha güçlü gözlemlendi. Bu verilerimiz yükselti arttıkça oksidatif protein hasarının arttığı düşüncemizi desteklemektedir.

## **5.2. ROS ve Lipit Peroksidasyonu**

DNA ve protein oksidasyonu lipit peroksidasyonundan daha önemli gibi gözükse de (17) lipitlerde oluşan oksidatif hasarlar da hücrede önem taşımaktadır. Lipit peroksidasyonu lipitlerin ROS radikalleri tarafından 'özellikle hidroksil radikali' başlatılan bir dizi reaksiyonlar sonucu meydana gelir ve hücre zarında zincirleme reaksiyon olarak devam eder (135). Lipit peroksidasyonu önlenemediğinde hücre ve mitokondri zarlarında oksidatif hasar meydana gelir. Hücre zarı hasarı protein ve DNA oksidasyonunu artırır ve hepsi birden mitokondriyal hasarı iletir. Oluşan bu oksidatif hasarlar serisi hücre ölümü ve/veya doku hasarına kadar gider (2,143). Lipit peroksidasyon tespiti doku hasarı ve yaşlanma sürecinde önemli oksidatif hasar belirteçidir (39,92,157). Ayrıca lipit hidroperoksit radikal hasara uğramış geniş lipit ailesinin ilk peroksidan hasar belirteçidir (8).

### **5.2.1. Yaşlanma ve Lipit Peroksidasyonu**

Çeşitli çalışmalar yaşlanma sürecinde lipit peroksidasyon hasarında artış olduğunu göstermektedir. Yaşlılarda mitokondri radikal sentezi artışına paralel olarak bir lipit peroksit belirteci olan TBARS artışı tespit edilmiştir (101). Yaşlı erkek ve dişi sıçanların kalp (72), plazma (71) ve iskelet kası (28) LHP düzeyi yüksek belirlenmiştir. Çalışmamızda yaşlı sıçan kalp dokusu sol ventrikülünden elde edilen LHP bulguları literatürle aynı doğrultudadır. Yaşlı sıçanların bazal LHP düzeyi genç hayvanların bazal LHP düzeyinden farklı olarak bulundu. Yaşlı hayvan kalp kası sol ventrikülünde daha yüksek LHP seviyesi saptanmıştır.

### **5.2.2. Akut Hipobarik Hipoksi ve Lipit Peroksidasyon**

Hipoksik koşullardaki lipit peroksidasyon verileri farklı çalışmalarda çelişkili gözükmemektedir. Bazı çalışmalar lipit peroksidasyonun hipoksi sonrası artış gösterdiğini savunurken, diğerleri bu değişimde herhangi bir artış

belirlememiştir. Hipokside iskelet kası lipit peroksidasyonunda artış tespit edilemezken (10,124), 5500m kronik hipobarik hipokside ise kalp kası, akciğer, karaciğer ve böbreklerde yüksek düzeyde MDA saptandığı bildirilmiştir (111). Yine 5700m ve 6300m hipobarik hipokside kan plazmasında (36) ve 5500m hipobarik hipokside koşullarında kalp dokusunda yüksek düzeyde lipit peroksidasyon hasarı tespit edilmiştir (160). Bulgularımız akut hipobarik hipoksi koşullarında lipitlerin peroksidatif hasara uğradığı yönündedir. Lipit peroksidasyon hasarı verilerimiz PCO verilerimiz ile benzerlik göstermektedir. Yükseltinin şiddetine paralel olarak lipitlerin peroksidatif hasara uğradığını belirledik. Yaşlı ve genç hayvan yükselti seviyeleri gruplarının hepsi kendi kontrollerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. LHP düzeyleri genç sıçan grubu 8000m ve 6000m+8000m arasında farklılık bulunurken yaşlı sıçan grubunda bu yükselti seviyeleri arasında fark tespit edilmemiştir. Yine PCO parametresinde olduğu gibi özellikle genç sıçan grubunda fark çıkması 8000m öncesi uygulanan 6000m yükselti düzeyinin serbest radikal oluşumunu azaltmadığını göstermektedir. Diğer taraftan 8000m ve 6000+8000m yaşlı sıçan grupları arasında fark çıkmaması yaşlı sıçan TSH düzeyindeki azalma ile açıklanabilir. Ayrıca denek sayımızın azlığı nedeniyle nonparametrik istatistik analiz yöntemi kullanmış olmamız ise fark bulunamamasındaki diğer bir olasılık olabilir. Bütün yükselti düzeylerinde yaşlı hayvan LHP değerleri aynı yükselti düzeylerine karşılık gelen genç hayvanların LHP değerlerinden daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Bulgularımız yükselti şartlarında yaşlıların lipit peroksidasyonu hasarına gençlere göre daha yatkın olduğunu göstermektedir. Yine yaşlanma sürecinde metabolizmada daha fazla radikal üretiliyor olması kuvvetle olası bir neden olarak karşımıza çıkmaktadır.

### **5.3.Yaşlanma, Akut Hipobarik Hipoksi ve HSP72**

Her türlü organizmada bulunan Hsp70 proteini çeşitli alt üyelerden oluşmaktadır (91). Bunlar içinde Hsp72 kalp dokusu için önemlidir (34,35,109,110). Literatür Hsp72 sentezinde yaşlılarda azalma olduğunu belirtirken, bazı çalışmalar ise herhangi bir azalmanın söz konusu olmadığı yönündedir. Yaşlı sıçanların iskelet kasında (93,94) Hsp72 proteinin çeşitli

stresler karşısında gençlerinkine benzer bir şekilde artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca Frier B ve Locke M. (2005) yaptıkları çalışmada diyet kısıtlaması ile birlikte yaşlı sıçan kalp kası Hsp72 protein sentezinin genç sıçan Hsp72 protein sentezi ile farklılık göstermediğini saptamışlardır (46). Fakat yaşlı sıçanların miyokard dokusunda (35,94) ve karaciğerinde (53) yapılan çalışmalarda sıcaklık veya egzersiz uyarını karşısında Hsp72 sentezinde azalma tespit edilmiştir. Yaşlı hayvanlarda çeşitli stresler karşısında Hsp72 sentezinde azalma olup olmadığı konusunda farklı sonuçlar vardır. Diğer taraftan çalışmalar genelde azalma olduğu yönündedir.

Sıcak şoku protein sentezini önceden bir stres karşısında uyarıp, sonradan uygulanan ikinci stres karşısında dokuyu oluşan strese karşı koruyacağı hipotezi ileri sürülmüştür. Çapraz tolerans olarak adlandırılan bu yaklaşım iskemi-reperfüzyon sonrası kalp kası dokusunu oluşan oksidatif strese karşı koruyabilmiştir (34). Sıcak uygulaması sonrası Hsp72 sentezinde artış gözlenmiştir (110). Bu nedenle çalışmamızda üçüncü hipotezi kurgularken çapraz tolerans yaklaşımından esinlendik ve ilk defa akut hipobarik hipokside Hsp72 düzeyi bu çalışmada tayin edildi. Önce sıçanları akut orta şiddetli hipobarik hipoksi koşuluna tabi tuttuk, yaklaşık 36 saat sonra sıçanları şiddetli hipobarik hipoksi koşullarına maruz bıraktık ve şiddetli hipobarik hipoksi sonrası daha az radikal hasarın oluşması yanı sıra Hsp72 düzeyinde artış bekledik. Fakat Hsp72 düzeyinde kalp dokusunda herhangi bir artış tespit edemediğimiz gibi oksidatif hasar değişkenleri açısından 8000m hipoksi uygulamasının 6000m hipoksi uygulaması üzerine ek bir hasar yarattığı gözlenmiştir. Hipokside yapılan diğer bazı çalışmalar bulgularımızı destekler niteliktedir. Literatürde, mitokondri korunmasında önemli rol alan Hsp60 protein düzeyinin hipoksik koşullarda değişmediği buna karşılık sitoplazmik Hsp60 proteininde azalma tespit edildiği bildirilmiştir (52). Şiddetli akut hipobarik hipoksi '7000m' koşullarında yapılan bir çalışmada ise oluşan radikal hasara karşı GSH incelenmiş ve GSH aktivitesi bloke edildiğinde Hsp70 proteini derişiminde ciddi bir artış tespit edilmiştir (96). Bir başka çalışmada ise Hsp72'nin P-SH'yı rejenere ettiği bildirilmiştir (92). Bazı in vitro çalışmalarda ise kalp kası hücrelerinin hipokside ancak

tumor necrosis faktör alfa (TNF $\alpha$ ) uygulamasından sonra Hsp72 proteinini sentezleyebildiği izlenmiştir (109,110). Bu çalışmalar, önemli bir noktanın altının çizilmesinin gerekliliğini göstermektedir: 6000m akut hipobarik hipoksi koşulu Hsp72 sentezini uyarmakta yeterli bir stres oluşturmamış olabilir. Diğer taraftan çalışmamızda 8000m hipobarik hipoksi Hsp72 sentezi açısından uygun bir stres yaratmış olabilir. Fakat 8000m uygulaması sonrası Hsp72 düzeyinde artış gözlenebilmesi için, deney bitiminden sonra en az 5 saat kadar beklenmesi gerekliydi. Ayrıca akut hipobarik hipoksi sonrası Hsp72 mRNA düzeyi incelenebilseydi Hsp72 mRNA'sında belli bir artış saptanabilirdi.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızdan elde edilen verilere göre üç önemli sonuca ulaşılmıştır. İlki; akut hipobarik hipoksi koşullarında sıçan kalp kası sol ventrikülünde gerek yaşlı gerekse genç sıçanlarda protein ve lipitlerde oksidatif hasar oluşmuştur. Genel olarak oksidatif hasar değişkenleri yükselti şiddetine paralel artmıştır. Fakat 6000m akut hipobarik hipoksinin AOPP üzerinde ciddi bir stres yaratmadığı gözlenmiştir. AOPP ile ilgili sonuçlar akut hipobarik hipoksi koşullarında ilk defa bu çalışmada ortaya konulmuştur. Ayrıca PCO ve P-SH belirteçlerinin yüksek negatif korelasyon göstermesi ( $P<0,001$ ;  $r=-0,845$ ) akut hipobarik hipoksi koşullunda proteinlerin çok fazla oksidatif hasara uğradığını göstermektedir. İkincisi; her bir yükselti şiddetinde oksidatif hasar değişkenleri yaşlı sıçanlarda genç sıçanlarınkine kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Genel olarak TSH ve PSH düzeyleri yaşlılarda yükselti şiddetine ters yönde bir azalma göstermiştir. Bu sonuçlar bir yandan yaşlıların oksidatif hasara daha yatkın olduğunu gösterirken diğer yandan yaşlılardaki tiyol gruplarının protein oksitlenmesine karşı daha etkin rol alabildiğidir. Üçüncü ise; akut hipobarik hipoksi koşullarında kalp kasını oksijen radikallerine karşı koruyacağını ümit ettiğimiz Hsp72 düzeyinde herhangi bir artış tespit edilmemiştir. Bu veri bize 6000m hipobarik hipoksi koşullarının Hsp72 sentezi açısından ciddi bir stres oluşturmadığını gösterebilmektedir. Diğer bir olasılık ise yükselti düzeylerinde deney hayvanlarının kalış süresinin yeterli olmadığıdır. Bir başka olasılık ise proteinlerin yanlış katlanmalarında veya okside olmalarında bu savunma mekanizmasının yetersiz kalmış olabileceğidir. Ya bu olasılık çok ciddi algılanmıyor, ya da hipobarik hipokside Hsp72 sistemi devreye girmiyor. Belki de Hsp72 düzeyinde artış olmamasında bu koşulların bir kaç birden etkilidir. Bir başka akut hipobarik hipoksi çalışması ile bu durumun aydınlığa kavuşması gerekmektedir.

Bu çalışma temel olarak akut yükseltide oluşan reaktif oksijen radikali hasarı ve buna karşılık Hsp72'nin rolünü incelemiştir. Fakat çalışmamızda nitrit oksitten türeyen serbest radikallerle ilgili herhangi bir değişken incelenmemiştir. Son derece reaktif olan peroksinitrit tirozin amino asiti ile

tepkimeye girerek nitrotirozini oluşturmaktadır (54). Nitrotirozin önemli bir oksidatif protein hasarı belirteçidir. Her ne kadar hipoksik koşullarda NO azaldığını gösteren çalışmalar mevcut ise de NO hipoksik koşullara uyum için ilk sentezlenen moleküllerdendir ve derişimi belli bir düzeyin üstüne çıktığında ciddi radikal hasarına neden olur (55, 105). Ayrıca akut hipobarik hipokside NO'nun toksik etkilerini gösterme olasılığı kronik hipoksiye göre daha güçlüdür. Bu nedenle çalışmamızda nitrotirozin düzeylerinin tespiti özellikle protein hasarı açısından bizim bulgularımızı daha kuvvetli kılabilirdi. Yine tiyol gruplarının redoks düzenlemesinde "regülasyonda" etkin rol aldığı bilinen GSH ve GSSH tespiti ve Redoks İndeksinin hesaplanması protein hasarı ile ilgili daha açıklayıcı yorum yapmamızı sağlayabilirdi. Bunlara ek olarak hipoksik koşullara uyumda salgılanan HIF1 $\alpha$  mRNA tespitinin bizim hipoksik koşulları hangi şiddette uyguladığımız hususunda geniş bilgi verme olasılığı bulunmaktaydı. Akut hipobarik hipokside oluşan oksidatif hasar ile ilgili soruların daha iyi cevaplanabilmesi için bu parametrelerin gelecekte çalışılması önem taşımaktadır.



## KAYNAKLAR

1. Acker H. (2005). The oxygene sensing signal cascade under the influence of reactive oxygene species. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 360, 2201-2210.
2. Aditi C. K., Kuppusamy P., ve Parinandi N. (2007). Oxygen, the Lead Actor in the Pathophysiologic Drama: Enactment of the Trinity of Normoxia, Hypoxia, and Hyperoxia in Disease and Therapy. *Antioxidant and Redox Signalling*, 9(10),1-14.
3. Alpar R. (2001). Spor Bilimlerinde Uygulamalı İstatistik. Nobel Yayın Dağıtım. Ankara. 144-145.
4. Alderman CJ., Shah S., Foreman JC., Chain BM., Katz DR. (2002). The Role of Advanced Oxidation Protein Products in Regulation of Dendritic Cell Function. *Free Radic Biol Med*, 32(5), 377-385.
5. Amado R., Aeschbach R., Neukom H. (1984). Dityrosine: in vitro production and characterization. *Methods Enzymol*, 107, 377-388.
6. Amin J, Anathan J, Vollemy R. (1988). Key features of heat shock elements. *Mol.Cel.Biol*,;8:3761-3769.
7. Amicarelli F, Ragnelli AM, Aimola P, Bonfigli A, Colafarina S, Di Ilio C, Miranda M.(1999). Age-dependent ultrastructural alterations and biochemical response of ratskeletal muscle after hypoxic or hyperoxic treatments. *Biochim Biophys Acta*, 1453(1):105-14.
8. Arab K., Steghens JP. (2004). Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylenolorange method. *Anal Biochem*, 325, 158-163.
9. Askew EW. (2002). Work at High Altitude and Oxidative Stress: Antioxidant Nutrients. *Toxicology*, 180(2), 107-119.
10. Bailey DM, Castell LM, Newsholme EA, Davies B.(2000). Continuous and intermittent exposure to the hypoxia of altitude: implications for glutamine metabolism and exercise performance. *Br J Sports Med*, 34(3),210-212.
11. Bejma J ve Ji L. (1999). Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscles. *J. Appl Physiol*, 87(1):465-470.
12. Bindoli A., Rigobello MP. (2002). Mitochondrial thioredoxin reductase and thiol status. *Methods Enzymol*, 347, 307-316.
13. Blake MJ, Udelsman R, Feulner GJ, Norton dd, Holbrook NJ. (1991). Stress induced HSP 70 expression in adrenal cortex: a glucocorticoid sensitive, age dependent response. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*;88:9873-9877.
14. Bradford A. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utliwing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem*, 72: 248-254.
15. Bongrazio M, Comini L, Gaia G, Bachetti T, Ferrari R. (1994) Hypertension, Aging and Myocardial Synthesis of Heat-Shock Protein 72. *Hypertension*, 24:620-624.

16. Bourdon E., Loreau N., Blache D. (1999) Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB*. 13, 233-244.
17. Butterfield DA., Kopal T., Howard B., Subramaniam R., Hall N., Hensley K., ve diğ. (1998). 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.
18. Callapina M, Zhou J, Schmid T, Kohl R, Brune B.(2005) NO restores HIF-1alpha hydroxylation during hypoxia: role of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*, 39(7):925-36.
19. Ceconi C., Boraso A., Cargnoni A., Ferrari R. (2003). Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? *Arch Biochem Biophys*, 420 (2). 217-221.
20. Chen JX, Meyrick B. (2004) Hypoxia increases Hsp90 binding to eNOS via PI3K-Akt in porcine coronary artery endothelium. *Lab Invest*, 84(2):182-90.
21. Chiral M, Grognet HF, Pulmer HC, David HC. (2004). Effect of hypoxia on stress proteins in the piglet brain at birth, ?, 56:775-779.
22. Chun YK, Kim MK, Park JW. (2002). Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF1 $\alpha$ . *J Korean Med. Sci*, 17, 581-588.
23. Clanton TL.(2007). Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 102(6), 2379-2388.
24. Clarkson AN., Sutterland BA., and Appleton I. (2005). The biology and pathology of hypoxia-ischemia: an update. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 53, 213-225.
25. Clerget M ve Polla BS. (1990). Erythrophagocytosis induces heat shock protein synthesis by human monocytes-macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 87, 1081-1085.
26. Çakatay U., Telci A. (2000). Oksidatif protein hasarı ve saptanmasında kullanılan marker'lar. *İst Tıp Fac Mecmuası*. 63, 314-317.2
27. Çakatay U. Telci A., Yılmaz İA., Tekeli, F., Akçay T., Sivas A. (2000) Yaşlanmanın Plazma Oksidatif Protein Hasarına Etkisi. *Cerrahpaşa J Medicine*, 31(4), 220-223.
28. Çakatay U. Telci A., Kayalı R., Tekeli, F., Akçay T., Sivas A. (2003). Regulation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle. *Clinical Biochemistry*, 36, 51-55.
29. Çakatay U., Kayalı R., Sivas A., Tekeli, F. (2005). Prooxidant activities of alpha-lipoic acid on oxidative protein damage in the aging rat heart muscle. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 40, 231-240.
30. Çakatay, U., Kayalı, U. (2006). Serbest Radikal Biyokimyasının Tarihsel Süreçteki Gelişimi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*. 37: 162 – 167.

31. Dalle-Donne I., Giustarini D., Colombo R., Rossi R., Milzani A. (2003) Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med*, 9,169-176.
32. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*, 329: 23-38
33. Davies K.J. (2001). Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome *Biochimie.*;83(3-4):301-10. Review.
34. Demirel HA, Power SK, Caillaud C, Coombes CJ, Naito H, Fletcher LA, ve diğ. (1998). Exercise training induces myocardial lipid peroxidation following ischemia-reperfusion. *Med. Sci. Sports. Exerc*, 30:1211-1216.
35. Demirel HA, Hamilton KL, Shanely RA, Tümer N, Koroly MJ, Power SK. (2003) Age and attenuation of exercise induced myocardial HSP 72 accumulation. *Am J Physiol Circ Physiol*, 285: H1609-H1615.
36. Devi SA, Vani R, Subramanyam MV, Reddy SS, Jeevaratnam K.(2007). Intermittent hypobaric hypoxia-induced oxidative stress in rat erythrocytes: protective effects of vitamin E, vitamin C, and carnitine. *Cell Biochem Funct*, 25(2),221-231.
37. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ.(1997).Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*, 324,(1):1-18.
38. Dean RT.(1999) Henry Drysdale Dakin (1880-1952): early studies on radical and 2-electronoxidation of amino acids, proteins and fatty acids. *Redox Rep*, 4(5),189-194.
39. Dinçer Y., Telci A., Kayalı R., Yılmaz İA., Çakatay U., Akçay T. (2000). Effect of  $\alpha$ -Lipoic acid on Lipid Peroxidation and Anti-oxidant Enzyme Activities in Diabetic Rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 29, 281-284.
40. Dubey A., Forster MJ., Lal H., Sohol RS. (1996). Effect of age and caloric intake on protein oxidation in different brain regions, and behavioral functions of the Mouse. *Arch Biochem Biophys*. 333, 189-197.
41. Du J., Gebicki JM.(2004). Proteins are major initial targets of hydroxyl free radicals. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 2334-2343.
42. Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z, Schumacker PT. (1998). Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 273(19),11619-11624.
43. Eaton P (2006). Protein thiol oxidation in health and disease: techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Radic Biol Med*, 40, 1889-1899.
44. Elias SJA and Arne H. (2000). Physiological function of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem*, 267,6102-6109.
45. Fargnoli J, Kunisada T, Fornace AJ Jr, Scheider EL, Holbrook NJ. (1990). Decreased expression of heat shock protein 70 mRNA and protein after heat treatment in cells of aged rats. *Proc. Natl. Sci USA*, 87:846-850.

46. Frier B, Locke M.(2005).Preservation of heat stress induced myocardial hsp 72 in aged animals following caloric restriction. *Exp Gerontol*, 40(7), 615-617.
47. Foldes-Papp Z, Domej W, Demel U, Tilz GP. (2005). Oxidative stress caused by acute and chronic exposition to altitude. *Wien Med Wochenschr.*;155(7-8):136-42.
48. Garcia-Arumi E., Andreu AL., Lopez-Hellin J., Schwartz S. (1998). Effect of oxidative stress on lymphocytes from elderly subjects. *Clin Sci*, 94, 447-452.
49. Gil-del Valle L., de la C Milian L., Toledo A., Vilaro N., Tapanes R., Otero Ma. (2005). Altered redox status in patients with diabetes mellitus type I. *Pharmacol Res*, 51, 375-380.
50. Goto S, Nakamura A, Radak Z, Nakamoto H, Takahashi R, Yasuda K. (1999) Carbonylated proteins in aging and exercise: immunoblot approaches. *Mech Ageing Dev*, 107(3):245-53.
51. Goto S, Takahashi R, Kumiyama AA, Radak Z, Hayashi T, Takenouchi M, Abe R. (2001). Implications of protein degradation in aging. *Ann N Y Acad Sci*, 928:54-64.
52. Gupta S, Knowlton AA. (2002). Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis. *Circulation*, 106(21),2727-2733.
53. Hall DM, Xu L, Drake VJ, Oberley LW, Oberley TD, Moseley PL. ve diğ.(2000). Aging reduces adaptive capacity and stress protein expression in the liver after heat stress. *J Appl Physiol*, 89(2), 749-759.
54. Halliwell B., (1997). What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo. *FEBS Lett.* 411, 157-160.
55. Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. (1999).Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radic Res*, 31(6),651-669.
56. Heydari AR, Takahashi R, Gudmann A, You S, and Richardson A. (1994). HSP70 and aging. *Experientia*, 50, 1092-1098.
57. Heydari AR, Wu B, Takahashi R, Strong R, and Richardson A. (1993). Expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet at the level of transcription. *Mol. Cell. Biol*, 13: 2909-2918.
58. Heymes C., Bendall JK., Ratajczak P., Cave AC., Samuel JL., Hasenfuss G. (2003). Increased Myocardial NADPH Oxidase Activity in Human Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(12), 2164-
59. Hochachka PW. (1998). Mechanism and evaluation of hypoxia-tolerance in humans. *Journal of Experimental Biology*, 2001:1243-1254.
60. Hochachka PW, Gunga HC, Kirsch K. (1998). Our ancestral physiological phenotype: An Adaptation for hypoxia tolerance and for endurance performance. *Proc. Natl. Acad Sci*, 95:1915-1920.

61. Hoppeler H ve Voght M. (2001) Muscle adaptation to hypoxia. *J Appl Physiol*, 204:3133-3139.
62. Hu ML (1994) Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol*, 233, 381-385.
63. Ide T., Tsutsui H., Kinugawa S., Suematsu N., Hayashidani A., Ichikawa K. ve diğ. (2000). Direct Evidence for Increased Hydroxyl Radicals Originating From Superoxide in the Failing Myocardium. *American Heart Association*, 86,152-157.
64. Jacquier-sarlin M ve Polla BS. (1996). Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA-binding activity by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: role of thioredoxin. *Biochem*, 318:187-193.
65. Kayalı R., Ufuk Ç. (2004). Protein Oksidasyon Ana Mekanizmaları. *Cerrahpaşa J Medicine*, 35,83-89.
66. Kayalı R., Çakatay U., Telci A., Akçay T., Sivas A., Altuğ T. (2004). Decrease in Mitochondrial Oxidative Protein Damage Parameters in the Streptozotocin-Diabetic Rat. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 20, 315-321.
70. Kayalı R., Çakatay U., Akçay T., Altuğ T. (2006). Effect of alpha-lipoic acid supplementation on markers of protein oxidation in post mitotic tissues of aging rat. *Cell Biochemistry and Function*, 24, 79-85.
71. Kayalı R., Çakatay U., Tekeli, F. (2007). Male rats exhibit higher oxidative protein damage than female of the same chronological age. *Mechanism of Aging and Development*, 128, 365-369.
72. Kayalı R., Çakatay U., Uzun H., Genç H. (2007). Gender difference as regards myocardial protein oxidation in aged rats: male rats have increased oxidative protein damage. *Biogerontology*, 8, 653-661.
73. Katschinski DM. (2004). On heat and cell and proteins. *News Physiol Sci*, 19:11-15.
74. Kergel KC ve Zhang HJ. (2007). An integrated view of oxidative stress in aging : basic mechanism, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Comp Physiol*, 292 (1).
75. Klatt P., Lamas S (2000). Regulation of protein function by S-glutathionylation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem*, 267, 4928-4994.
76. Khan, S., P.J.O'Brien. (1995). Modulating hypoxia-induced hepatocyte injury by affecting intracellular redox state. *Biochim Biophys Acta*. 1269:153-161.
77. Koechlin C., Maltais F., Saey D., Michaud A., LeBlanc P., Hayot M. ve diğ. (2005). Hypoxaemia Enhances Peripheral Muscle Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Thorax*, 60(10), 834-841.
78. Kondo H, Miura M, Itokawa Y. (1991). Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Acta Physiol Scand*. 142(4):527-8.

79. Kondo H, Miura M, Nakagaki I, Sasaki S, Itokawa Y. (1992). Trace element movement and oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol*. May;262(5 Pt 1):E583-90.
80. Kondo , H., Kodamo, J., Kishibe, T., Itokawa,Y. (1993). Oxidative stress during recovery from muscle atrophy. *FEBS*. 326 (1,2,3) 189-191.
81. Kondo, H. (2000). Oxidative stress in muscular atrophy. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Editors: Sen, Packer, Hanninen. :631-653.
82. Lakatta EG., Sollot SJ., Pepe S. (2001). The Old Heart: Operating on the Edge. *Norvatis Found Symp*, 235,172-196.
83. Lahiri S., Roy A., Baby SM., Hoshi TS., Prabhakar NR. (2006). Oxygen sensing in the body. *Pog Biophysics Mol Biol*, 91,249-286.
84. Levine RL., Mosoni L., Berlett BS., Stadtman ER. (1996). Methionine Residues as Endogenous Antioxidants in Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 93, 15036-15040.
85. Levine RL., Stadtman ER. (2001). Oxidative Modification of Proteins During Ageing. *Exp Gerontol*, 36(9), 1495-1502.
86. Li SY., Du M., Dolence EK., Fang CX., Mayer GE., Ceylan-Işık AF. ve di. (2005). Aging Induces Cardiac Diastolic Dysfunction, Oxidative Stress, Accumulation of Advanced Glycation Endproducts and Protein Modification. *Aging Cell*, 4, 57-64.
87. Li G, Xiao Y, Estrella JL, Ducsay CA, Gilbert RD, Zhang L.(2003). Effect of fetal hypoxia on heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in the adult rat. *Soc Gynecol Investig*, 10(5),265-74.
88. Li GC, Li L,Liu YK, Mark JY, Chen L, and Lee WM. (1991). Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein encoding gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:1681-1685.
89. Li GC, (1985). Elevated levels of 70 000 dalton heat shock protein in Transientlythermotolerant Chienese Hamster fibroblasts and in their heat resistant variant. *Int J. Radiat. Oncol. Physiol*,11:165-177.
90. Li GC, and Werb, (1982). Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance Chienese Hamster fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:3218-3222.
91. Lindgist S. (1986). The heat shock response. *Annu Rev. Biochem*;55:1151-1191.
92. Liu H, Lightfoot R, Stevens JL. (1996). Activation of heat shock factor by alkylating agents is triggered by glutathione depletion and oxidation of protein thiols. *J Biol Chem*, 271(9), 4805-4812.
93. Locke M, Tanguay RM, (1996) Diminished heat shock response in the aged myocardium. *Cell Stress Chaperones*, 1(4),105-136.

94. Locke M.(2000).Heat shock transcription factor activation and hsp72 accumulation in aged skeletal muscle. *Cell Stress Chaperones*, 5(1),45-51.
95. Lopez-Ramos JC, Martinez-Romero R, Molina F, Canuelo A, Martinez-Lara E, SilesE, Peinado MA. (2005). Evidence of a decrease in nitric oxide-storage molecules following acute hypoxiaand/or hypobaria, by means of chemiluminescence analysis. *Nitric Oxide*, 13(1):62-7.
96. Magalhaes J., Asensao A., Soares JMC., Neuparth M., Ferreira R., Oliveira J. ve di. (2004). Acute and severe hypobaric hypoxia-induced muscle oxidative stres in mice: the role of glutathione against oxidative damage. *Eur J Appl Physiol*, 91, 185-191.
97. Magalhaes J., Asensao A., Soares JMC., Ferreira R., Neuparth M., Marques F. ve di. (2005). Acute and severe hypoxia increases oxidative stress and impairs mitochondrial function in mouse skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 99, 1247-1253.
98. Magalhães J, Ferreira R, Neuparth MJ, Oliveira PJ, Marques F, Ascensão A. (2007). Vitamin E prevents hypobaric hypoxia-induced mitochondrial dysfunction inskeletal muscle. *Clin Sci*, 113(12),459-466.
99. Malyshev IY, Zenina TA, Golubeva LY, Saltykova VA, Manukhina EB, Mikoyan VD, ve diğ. (1999) NO-dependent mechanisms of adaptation to hypoxia. *Nitric Oxide*, 3(2):105-13.
100. Mariani E., Polidori MC., Cherubini A., Mecocci P. (2005). Oxidative stres in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 827 (1), 65-75.
101. Martha EVM., Ruth C., Adela T., Mohammed EH. (2007). Analysis of Age-associated Changes in Mitochondrial Free Radical Generation by Rat Testis. *Mol Cell Biochem.* ??
102. Mates JM., Cristina PG., Ignacio NC. (1999). Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*, 32(8), 595-603.
103. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I, Asenjo M, Márquez J. (2002).Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int J Biochem Cell Biol*, 34(5),439-458.
104. Mecocci P., Fano G., Fulle S., MacGarvey U., Shinobu L., Polidori ve diğ. (1999). Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 303-308.
105. Minet E, Mottet D, Michel G, Roland I, Raes M, Remacle J, Michiels C. (1999). Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1alpha-Hsp90 interaction. *FEBS Lett.*, 460(2):251-6.

106. Mohanraj P, Merola AJ, Wright VP, Clanton TL. (1998). Antioxidants protect rat diaphragmatic muscle function under hypoxic conditions. *Am. J. Physiol.* 84, 1960-1966.
107. Murdoch CE., Zhang M., Cave AC., Shah AM. (2006). NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc Res*, 71(2), 208-215.
108. Nakanishi K., Tajima F., Nakamura A. (1995). Effect of hyperbaric Hypoxia on antioxidant enzymes in rats. *J Physiol*, 489, 869-876.
109. Nakano M, Knowlton AA, Yokoyama T, Lesslauer W, Mann DL. (1996) Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced expression of heat shock protein 72 in adult feline cardiac myocytes. *Am J Physiol*, 270(4 Pt 2), 1231-1239.
110. Nakano M, Mann DL, Knowlton AA. (1997). Blocking the endogenous increase in HSP 72 increases susceptibility to hypoxia and reoxygenation in isolated adult feline cardiocytes. *Circulation*, 18;95(6), 1523-31.
111. Nakanishi K., Tajima F., Nakamura A. (1995). Effect of Hyperbaric Hypoxia on antioxidant enzymes of rats. *J Physiol*, 489, 869-876.
112. Nediani C., Borchi E., Giordona C., Baruzzo S., Ponziani V., Sebastiani M. (2007). NADPH oxidase-dependent redox signalling in human heart failure: relationship between left and right ventricle. *J Mol Cell Cardiol*, 42(4), 826-834.
113. Netto LES., Kowaltowski AJ., Castilho RF., Vercesi AE. (2002). Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage. *Methods Enzymol*, 348, 260-270.
114. Nordberg J., Arner ES. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.*, 31(11), 1287-1312.
115. Paddeng R., Ishaq B., Goldenberg A., Faulhammer P., Rose F., Weissmann N. et al. (2003). Essential Role of Complex II of the Respiratory Chain in Hypoxia-induced ROS Generation in the Pulmonary Vasculature. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 284, L710-L719.
116. Pansarasa O., Bertorelli O., Vecchiet J., Felzani G., Marzatico F. (1999). Age dependent changes of antioxidant activities, and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Radic Res*, 27, 617-622.
117. Pansarasa O., Castagna L., Colombi B., Vecchiet J., Felzani G., Marzatico F. (2000). Age, and sex differences in human skeletal muscle: role of reactive oxygen species. *Free Radic Res*, 33, 287-293.
118. Pepe S. (2005). Effect of Dietary Polyunsaturated Fatty Acids on Age-related Changes in Cardiac. *Exp Gerontol*, 40(5), 369-376.
119. Pepe S. (2000). Mitochondrial Function in Ischaemia and Reperfusion of the Aging Heart. *Clin Exp Pharmacol*, 27(9), 745-750.



120. Peers C, Pearson HA, Boyle JP. (2007). Hypoxia and Alzheimer's disease. 43,153-164. *Essays Biochem*, 43,153-164.
121. Pialoux V, Mounier R, Ponsot E, Rock E, Mazur A, Dufour S. Ve diğ. (2006) Effects of exercise and training in hypoxia on antioxidant/pro-oxidant balance. *Eur J Clin Nutr*, 60(12),1345-1354.
122. Powers SK, Locke AM, Demirel HA. (2001). Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury. *Med Sci Sports Exerc*, 33(3):386-92.
123. Powers SK, Demirel HA, Heather KV, Coombes JS, Naito H, Hamilton KL, ve diğ. (1998). Exercise training improves myocardial tolerance to vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am. J. Physiol.* 44:R1468-R1477.
124. Radak Z., Asona K., Lee KC., Ohno H., Nakamura A., Nakamoto H., Goto S. (1997). High altitude increases the accumulation carbonyl derivatives but not lipid peroxidation in keletal muscle of rats. *Free Rad Biol Med*, 22, 439-441.
125. Radak Z., Takahashi R., Kumiyama A., Nakamoto H., Ohno H., Ookawara T. (2002). Effect of Ageing and Late Onset Dietart Restriction on Antioxidant Enzymes and Proteasome Activities, and Protein Carbonylation of Rat Skeletal Muscle and Tendon. *Experimental Gerontology*, 37, 1421-1428.
126. Radak Z, Chung HY, Naito H, Takahashi R, Jung KJ, Kim HJ, Goto S. (2004). Age-associated increase in oxidative stress and nuclear transcription factor kB activation are attenuated in rat liver by regular exercise. *FASEBJ.*; 10.1096.
127. Radak Z, Chung HY, Goto S. (2005). Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontology.*;6(1):71-5.
128. Redout EM., Wagner MJ., Zidwijk MJ., Boer C.,Muster RJP., Hardeveld C. Ve diğ. (2007).Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. *Cardiovascular Research*, 75,770-781.
129. Reznick, A.Z., and L. Packer. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, 233:357-363.
130. Roche E, Romero-Alvira D. (1994). Role of oxygen free radicals in altitude-related disorders. *Med Hypotheses*, 42(2):105-9.
131. Roach RC, Loeppky JA, İcenogle MV. (1996). Acute mountain sickness: increased severity during simulated altitude compared with normabaric hypoxia. *J Appl Physiol*, 81(5):1908-1910.
132. Rodríguez FA, Casas H, Casas M, Pagés T, Rama R, Ricart A. Ve diğ. (1999). Intermittent hypobaric hypoxia stimulates erythropoiesis and improves aerobic capacity. *Med Sci Sports Exerc.* 31(2),264-8.

133. Rodrigo F., Mihails IP., John AC. (2007). Glutathione Depletion is necessary for Apoptosis in Lymphoid Cells Independent of Reactive Oxygen Species Formation. *JBS* (Papers in press)
134. Powers SK, Locke M, Demirel HA. (2001). Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury. *Med Sci Sports Exerc.* Mar;33(3):386-92. Review.
135. Ruth J. Bevan. (2000). Measuring in vivo Oxidative Damage: A Practical Approach. *Lipid Peroxidation Determination by HPLC* Editors. J.Lunec & H.R.Griffiths, John Wiley & Sons, LTD, 3-13.
136. Sandau KB, Fandrey J Brüne B. (2001). Accumulation of HIF1 $\alpha$  under the influence of nitric oxide.?, 97:1009-1015.
137. Samuels MP. (2004). The effects of flight and altitude. *Arch Dis Child.* 89: 448-455.
138. Sedlak J, Lindsay RH. (1968). Estimation of total, proteinbound, and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 25:192-205.
139. Semenza GL. (2000). HIF1 $\alpha$  and Human disease: one highly involved factor. *Genes and Development*, 14:1983-1991.
140. Sekhon HS, Thurlbeck WM (1995). Lung growth in hypobaric normoxia, normobaric hypoxia, and hypobaric hypoxia in growing rats. *J Appl Physiol*, Jan;78(1):124-31.
141. Sethumadhavan S., Chinnakannu P. (2006). Carnitine and Lipoic Acid Alleviates Protein Oxidation in Heart Mitochondria During Aging Process. *Biogerontology*, 7, 101-109.
142. Sethumadhavan S, Chinnakannu P.(2006).L-carnitine and alpha-lipoic acid improve age-associated decline in mitochondrial respiratory chain activity of rat heart muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 61(7),650-659.
143. Schrauwen P, Hesselink MK.(2004)Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes. *Diabetes*, 53(6),1412-1417.
144. Schumacker PT. (2002). Hypoxia, anoxia, and O<sub>2</sub> sensing: the research continues. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283,918-921.
145. Schumacker PT. (2003). Current paradigms in cellular oxygen sensing. *Adv Exp Med Biol*, 543, 57-71.
146. Shacter E. (2000) Protein oxidative damage. *Methods Enzymol*, 319, 428-436.
147. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:,10771-10778.
148. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(23):10771-8.

149. Stadtman ER. (2004). Role of oxidant species in aging. *Curr Med Chem*, 11(9),1105-1112.
150. Skulachev VP.(1996) Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett.*, 397(1),7-10.
151. Stadtman Er. Livine RL. (2000).Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci*, 899,191-208.
152. Stadtman Er. Livine RL. (2003). Free-radical mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25,207-213.
153. Sohal RS., Agarwal S., Dubey A., Orr WC. (1993). Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 90,7255-7259.
154. Tirosh O., Reznik AZ. (2000). Chemical bases and biological relevance of protein oxidation. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. C.K.Sen.L.Parker and O. Hanninen. Edit. Elsevier Science, 89-114.
155. Ushio-Fukai M. (2006) Redox signalling in angiogenesis: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res*, 71(2),226-235.
156. Witko-Sarsat V., Friedlander M., Capeillere-Blandin C., Nguyen-Khoa T., Nguyen AT., Zingraff J., ve diğ. (1996) Advanced oxidation protein products as a novel marker's of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.*, 49,1304-1313.
157. Wolff SP. (1994). Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzymol*, 233,182-189.
158. Wood JG, Johnson JS, Mattioli LF, Gonzalez NC. (2000). Systemic hypoxia increases leukocyte emigration and vascular permeability in conscious rats. *J Appl Physiol*, Oct;89(4):1561-8.
159. Zaobornyj T, Valdez LB, La Padula P, Costa LE, Boveris A. (2005). Nitric Oxide. 2005;13(1):62-7. Effect of sustained hypobaric hypoxia during maturation and aging on rat myocardium. II. mtNOS activity. *J Appl Physiol.*;98(6):2370-5.
160. Zhang QJ, Zhan H, Li T, Hao AG, Wan CH, Xin YM. (1999). Effects of simulated flight hypobaric hypoxia and oxygen inhalation on free radical metabolism in various organs of mice. *Space Med Med Eng (Beijing)*, Dec;12(6):414-7.