

ARSENİĞİN İNSAN VE BAZI CANLILARDA  
OKSİDATİF ENZİMLER ÜZERİNE ETKİLERİ

Halil İsa KURU

Yüksek Lisans

Kimya Anabilim Dalı

Temmuz-2007

ARSENİĞİN İNSAN VE BAZI CANLILARDA  
OKSİDATİF ENZİMLER ÜZERİNE ETKİLERİ

Halil İsa KURU

Dumlupınar Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca  
Kimya Anabilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Sait ALTİKAT

Temmuz-2007

**KABUL VE ONAY SAYFASI**

Halil İsa KURU'nun YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Arseniğin İnsan ve Bazı Canlılarda Oksidatif Enzimler Üzerine Etkileri” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

/ / 2007

**İmza:**

Üye :

Üye :

Üye :

Fen Bilimleri Enstitüsün Yönetim Kurulu'nun ... / ... / 2007 gün ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr. M. Sabri ÖZYURT  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ARSENİĞİN İNSAN VE BAZI CANLILARDA OKSİDATİF ENZİMLER ÜZERİNE ETKİLERİ

Halil İsa KURU

Kimya, Yüksek Lisans Tezi, 2007

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Sait ALTİKAT

### ÖZET

Bu çalışmada, kronik olarak arsenik kontaminasyonuna uğramış içme suyu kullanan insanlarda, oksidan – antioksidan sistem üzerindeki değişiklikler araştırıldı. Kontrol grubu ve kronik olarak arsenik maruziyetine kalan kişilerin oluşturduğu grup olmak üzere iki grup üzerinde çalışmalar yapıldı. Bu çalışmada iki gruptan kjan numuneleri alınarak, bu numunelerin plazmalarında lipit peroksidasyon düzeyi belirteci olan malondialdehit (MDA) seviyesi, antioksidan enzimlerden katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitelerinin düzeyi araştırıldı. Kronik olarak arseniğe maruz kaşlmış insanlarda, kontrol grubuna göre MDA düzeyinin istatistiksel olarak anlamsız ( $p>0,05$ ) olarak arttığı, CAT ve SOD aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,001$ ) olarak azaldığı tespit edildi.

Sonuç olarak, arsenik maruziyetinin insanlarda, lipit peroksidasyonunu artırarak ve antioksidan enzimlerin aktivitelerini inhibe ederek oksidatif stres oluşturduğu kararına varıldı.

**Anahtar Kelimeler :** Arsenik, Katalaz (CAT), Süperoksit Dismutaz (SOD), Malondialdehit (MDA), Lipit peroksidasyonu, Oksidatif Stres.

## **EFFECTS ON ARSENIC ON OXIDATIVE ENZYMES OF HUMANS AND SOME LIVINGS**

Halil İsa KURU

Chemistry, M. S. Thesis, 2007

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Sait ALTIKAT

### **SUMMARY**

In this study, changes on the antioxidant – oxidant system on humans who use drinking water exposed to arsenic-contaminated chronically, were investigated. Studies were made on two groups as control group and group consisting of ones being exposed to arsenic chronically. In this study, taking blood samples from two groups, level of malondialdehyde (MDA) the measurement of lipid peroxidation from the plasma of these samples, level of one of the antioxidant enzymes, catalase (CAD) and superoxide dismutase (SOD) enzyme activities, were investigated. In humans, exposed to arsenic chronically, it is seen that MDA according to control group increased non-significantly ( $p>0,05$ ) statically, catalase and superoxide dismutase activities decreased significantly ( $p<0,001$ ) statically.

As a result, it is decided that arsenic submissions cause oxidative stress on humans, increasing lipid peroxidation and inhibating activities of antioxidant enzymes.

**Key Words** : Arsenic, Catalase (CAT), Superoxide Dismutase (SOD), Malondialdehyde (MDA), Lipid peroxidation, Oxidative Stress.

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanması ve yürütülmesi süresinde beni yönlendiren, benden desteğini ve ilgisini esirgemeyen, bilgi ve hoşgörülerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Sait ALTİKAT 'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım sırasında bana bu çalışma olanağını sağlayan Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Yunus ERDOĞAN' a, çalışmam sırasında yakın ilgi ve alakalarını gördüğüm, Kimya Bölümünün değerli hocalarıma, araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve yüksek lisans arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Analizlerin yapılmasında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Ahmet MAVİ' ye, istatistiksel analizlerin yapılması sırasında büyük emeği geçen D. P. Ü. Biyoloji Bölümü Öğretim Elemanı Sayın Yrd. Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA' ya ve çalışmalar boyunca yardım aldığım Arş. Gör. Vedat ÇETİN, Arş. Gör. Halil İLKİMEN' e ve Türkan GÜNEY' e teşekkür ederim.

Ayrıca tüm hayatım boyunca yanımda olup beni her zaman destekleyen aileme saygı ve sevgilerimi sunarım.

Halil İsa KURU

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET .....	iv
SUMMARY .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2. 1. Arsenik .....	3
2. 1. 1. Arseniğin Fiziksel Ve Kimyasal Özellikleri .....	3
2. 1. 2. Arsenik Formları .....	5
2. 1. 3. Arseniğin Kullanım Alanları .....	5
2. 1. 4. Arseniğin Vücuda Giriş Yolları .....	6
2. 1. 5. Arsenik Türevlerinin Metabolizması .....	7
2. 1. 6. Arseniğin Toksik Ve Kanserojen Etkileri .....	10
2. 2. Serbest Radikaller .....	13
2. 2. 1. Reaktif Oksijen Türleri .....	14
2. 2. 1. 1. Süperoksit radikalleri .....	15
2. 2. 1. 2. Hidroksil radikalleri .....	16
2. 2. 1. 3. Hidrojen peroksit .....	18
2. 2. 1. 4. Hipoklorik asit .....	18
2. 2. 1. 5. Sinklet O <sub>2</sub> .....	19
2. 2. 1. 6. Reaktif nitrojen türleri .....	19
2. 2. 1. 7. Alkil radikali, organik radikaller .....	20
2. 2. 1. 8. Peroksil radikali ve lipit peroksidasyonu .....	20
2. 2. 1. 9. Organik peroksit radikali .....	22
2. 2. 1. 10. Perhidroksil radikali .....	22
2. 2. 1. 11. Alkoksil radikali .....	22
2. 2. 2. Oksijen Türevi Olmayan Serbest Radikaller .....	22
2. 2. 3. Serbest Radikallerin Kaynakları .....	24
2. 2. 3. 1. Endojen serbest radikal kaynakları .....	24
2. 2. 3. 2. Ekzojen serbest radikal kaynakları .....	27
2. 2. 4. Serbest Radikallerin Etkileri .....	27
2. 2. 4. 1. DNA hasarı.....	28

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<b><u>Sayfa</u></b>
2. 2. 4. 2. Disülfit bağı oluşumu ve proteinlere etkileri .....	28
2. 2. 4. 3. Karbonhidratlara etkileri .....	29
2. 2. 4. 4. Lipit peroksidasyonu .....	30
2. 3. Antioksidan Savunma Sistemleri .....	34
2. 3. 1. Enzimatik Antioksidanlar .....	35
2. 3. 1. 1. Süperoksit dismütaz .....	35
2. 3. 1. 2. Katalaz .....	37
2. 3. 1. 3. Mitokondrial sitokrom oksidaz .....	38
2. 3. 1. 4. Glutasyon peroksidaz .....	38
2. 3. 1. 5. Tiyoredoksin redüktaz .....	38
2. 3. 1. 6. Glutasyon redütaz .....	39
2. 3. 1. 7. Glutasyon-S-transferaz .....	39
2. 3. 2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar .....	40
2. 3. 2. 1. Enzimatik olmayan antioksidanlar .....	40
2. 3. 2. 2. Vitamin C .....	40
2. 3. 2. 3. Vitaimn E .....	41
2. 3. 2. 4. Vitamin A Ve P-karoten .....	42
2. 3. 2. 5. Melatonin .....	42
2. 3. 2. 6. Ürikasit .....	43
2. 3. 2. 7. Albumin .....	43
2. 3. 2. 8. Sistein .....	43
2. 3. 2. 9. Bliürbin .....	43
2. 3. 2. 10. Seruloplazmi .....	44
2. 3. 2. 11. Ferritin, transferin ve lagtoferrin .....	44
2. 3. 2. 12. Haptoglobin ve hemopeksin .....	44
2. 3. 2. 13. Mannitol .....	44
2. 3. 2. 14. Oksiprunol .....	44
2. 3. 2. 15. Probukol .....	44
2. 3. 2. 16. Desferroksamin .....	44
2. 3. 2. 17. Lipoik asit .....	44
2. 3. 2. 18. Flavonoitler .....	45
2. 4. Oksidatif Stres .....	45
2. 4. 1. Oksidatif Stres Belirteçleri .....	45
3. MATERYAL VE METOD .....	48
3. 1. Materyal .....	48
3. 1. 1. Kullanılan Kimyasallar .....	48
3. 1. 2. Kullanılan Cihazlar .....	49
3. 1. 3. Kullanılan Çözeltiler .....	49
3. 2. Metod .....	51
3. 2. 1. Katalaz Aktivitesi Ölçme Yöntemi .....	51



## İÇİNDEKİLER (devam)

	<b><u>Sayfa</u></b>
3. 2. 2. Süperoksit Dismütaz Aktivite Tayini .....	52
3. 2. 3. Plazma Mda Analizi .....	54
3. 2. 4. Total Protein Tayini .....	56
3. 2. 5. İstatistiksel Analiz .....	57
4. BULGULAR .....	58
5. TARTIŞMA .....	63
KAYNAKLAR .....	70

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. 1. Arsenik Metabolik Yolu .....	8
2. 1. Karbonhidrat Metabolizmasında Antioksidan Aktivite .....	29
2. 2. LPO Aracılığı ile Oluşan Hücre Hasarı .....	33
2. 3. Oksijenin Suya Dönüşümü .....	36
3. 1. SOD İnhibisyon Grafiği .....	54
3. 2. MDA Standart Grafiği .....	55
3. 3. Protein Standart Grafiği .....	57
4. 1. Kontrol ve KAMKK grubu MDA düzeyi Ortalama ve standart sapma değerleri .....	61
4. 2. Kontrol ve KAMKK grubu MDA düzeyi Ortalama ve standart sapma değerleri .....	62
4. 3. Kontrol ve KAMKK grubu MDA düzeyi Ortalama ve standart sapma değerleri .....	62

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1. 1. Genel Özellikleri .....	3
1. 2. Fiziksel Özellikleri .....	3
1. 3. Atomik Özellikler .....	4
1. 4. Radyoaktif Özellikleri .....	4
1. 5. Arsenik Maruziyetinin Biyolojik İndikatörleri .....	9
1. 6. Arsenik Kaynağı ve İnsanlarda Oluşturduğu Kanser Türleri .....	13
2. 1. Oksijen Türevi Bileşikler .....	15
2. 2. Oksidatif Stres ve Antioksidan Belirteçleri .....	46
3. 1. Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçme Yöntemi .....	51
3. 2. 50 µl'lik Numune Hacmi Göz Önünde Bulundurularak Hazırlanmış SOD Aktivitesi Ölçüm Prosedürü .....	53
3. 3. Plazmada MDA Analizinin Yapılışı .....	55
3. 4. Total Protein Ölçümünde İşlem Basamakları .....	56
4. 1. Kronik Olarak Arseniğe Maruz Kalan Kişilerin MDA, CAT ve SOD Değerleri .....	58
4. 2. Kontrol Grubu MDA, CAT ve SOD Değerleri .....	60
4. 3. Gruplar Arasında Değerlerin Karşılaştırılması .....	61

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
As	Arsenik
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
HO·	Hidroksil radikali
HO <sub>2</sub> ·	Hidroperoksi radikali
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
6-OHDA	6-hidroksi dopamin
LOO·	Lipit peroksit radikali
O <sub>2</sub>	Moleküler oksijen
ONOO·	Peroksinitrit radikali
NO·	Nitrikoksit radikali
NO <sub>2</sub>	Azot dioksit
NO <sub>2</sub> ·	Azot dioksit radikali
<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CAT	Katalaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
GP-x	Glutasyon peroksidaz
GSH	Redükte glutasyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutasyon
GST	Glutasyon -S- transferaz
KAMKK	Kronik olarak arseniğe maruz kalan kişiler
LPO	Lipit peroksidasyonu
MDA	Malondialdehit
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid hidrojen fosfat
NOS	Nitrit oksit sentetaz
OS	Oksidatif stress
PUFA	Poliansatüre (çoklu doymamış) yağ asitleri

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devamı)**

SOD	Süperoksit dismutaz
SOR	Serbest oksijen radikalleri
TBA	Tiyobarbütirik asit

## 1. GİRİŞ

Doğada çok az miktarda bulunan arsenik genellikle oksijen, klor ve kükürtle bileşik halde bulunur. Bitki ve hayvanlarda ise karbon ve hidrojenle bileşik yapar. İnsan vücudunda en çok bulunan 12. elementtir. Çoğu arsenik bileşiğinin özel bir tadı ve kokusu yoktur. Çevrede bulunan arsenik buharlaşmaz, çoğu arsenik bileşiği suda çözünür, arsenik bulaşmış maddelerin yanmasıyla havaya karışabilir, havadan yere inerek birikebilir, parçalanmaz, ancak bir türden diğerine dönüşebilir. Solunum ve sindirim yollarıyla vücuda alınabilir [1].

İnorganik arsenik insanlar için çok zehirli olup organik arsenik daha az zararlıdır. Besinlerde ve sudaki yüksek miktarda (60 ppm) arsenik öldürücü olabilir. Arsenik bilinen bir kanserojendir. İnorganik arseniğin solunması akciğer kanserine, besin yoluyla alınması ise cilt, mesane, böbrek, karaciğer ve akciğer kanserine neden olabilir. Arsenik sinir sistemi, mide-barsak ve cilt dokularına zarar verir. Yüksek miktarlarda solunması akciğer ve solunum yollarında yaralara neden olabilir [2].

Arseniğin çevreye başlıca yayılma ve taşınma yolu sulardır. Arseniğin su aracılığıyla ekolojik sistemde dağılımı, canlı yapılarda birikimine neden olmaktadır. Genel popülasyonda toplam günlük arsenik alımı 0.200 mg/kg'dır. Endüstriyel atıkların arıtılmadan çevreye bırakılması, insan sağlığı açısından önemli sorunlara yol açmaktadır. Güney Kalküta' da bakır asetoarsenit üreten bir fabrikanın yakınında yaşayan 17 ailenin 53 üyesinde (% 67), arsenikle kirlenmiş suyun kullanılmasına bağlı olarak kronik arsenik zehirlenmesi ortaya çıkmış; yapılan ölçümlerde yüzeysel kuyu sularındaki arsenik düzeyinin 5-58 mg/L (ppm) arasında olduğu saptanmıştır [3].

Doğal dengeyi bozan kirleticiler arasında yer alan arsenik, gerek doğada serbest halde bulunabilmesi ve gerekse canlı yapıda oluşturduğu değişik toksik etkileri nedeniyle insan ve hayvan sağlığı açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle içilebilir sulara bulunan arsenik düzeylerine belirli sınırlandırmalar getirilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), içme ve kullanma sularında 10 µg/L (ppb)' ye kadar arsenik bulunabileceğini, 50 ppb'den daha yüksek miktarlarda arsenik içeren suların ise kesinlikle kullanılmaması gerektiğini bildirmiştir [4]. Halk sağlığına olumsuz etkileri nedeniyle içme sularında bulunan arsenik düzeylerine belirli sınırlamalar getirilmiştir [5]. Çocuklarda (0-6 yaş), akut ve subkronik maruz kalmalar için olası referans değerler 0.015 ve 0.005 mg/kg-gün olarak bildirilmiştir [4]. Ülkemizde 1970 tarihli Gıda Maddeleri ve Umumi Sağlığı İlgilendiren Eşya ve Levazımın Hususi Vasıflarını Gösteren Tüzük'teki 425. Maddede sulardaki en yüksek arsenik düzeyi 50 ppb olarak kabul edilmiştir [6].

TSE'nün 1984 tarih ve TS 266 No'lu yayınında da içme ve kullanma sularında izin verilen arsenik miktarı 50 ppb olarak bildirilmiştir [5].

Arsenik ve arsenikli bileşiklerin insanlarda karsinojen olması nedeniyle içme sularının arsenikle kontaminasyonu, büyük bir halk sağlığı sorunu yaratır. Arseniğe maruz kalmanın insan sağlığı üzerine genel olumsuz etkileri arasında kardiyovasküler ve periferel vasküler hastalıklar, gelişme anomalileri, nöyolojik ve davranış bozuklukları, diabet, işitme kayıpları, portal fibrozis, hematolojik bozukluklar (anemi, löykopeni ve eozinofili) ve multipl kanserler, deri, akciğer, karaciğer, idrar kesesi, böbrek ve kolon kanserleri sonucu ölüm oranlarında artış görülmektedir [7]. Hopenhayn ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, gebelik boyunca içme sularıyla 50 ppb den daha fazla düzeyde arseniğe maruz kalmanın düşük doğum ağırlığına neden olduğu ortaya çıkmıştır. İçme suyuyla arseniğin kronik alımının periferel kan lenfositlerinde, ağız mukozası ve idrar yolları hücrelerinde karsinojen etkinin göstergesi olarak mikronükleusların oluştuğu kanıtlanmıştır. Arsenikten kaynaklanan sağlık problemlerinin kötü beslenme ile arttığı, akciğer kanserinin oluşumunda arsenik ve sigaranın sinerjik olarak etkilediği de ortaya çıkarılmıştır. Yüksek miktarda arsenik içeren (ortalama 412 ppb) içme sularını kullanan bir kasaba halkında yapılan çalışmada, lenfositlerdeki replikasyon indekslerinde anlamlı farklılıklar ve proliferasyon yeteneğinde azalma saptanmıştır [8]. Güney Tayvan'da 1988 yılında 891 yetişkin üzerinde yapılan bir çalışmada, arseniğin alımına bağlı olarak diabetes mellitus prevalansının arttığı belirlenmiştir. Japonya'da 382 erkek ve 516 kadın üzerinde uzun süreli inorganik arsenik alımının kardiyovasküler sistem üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, hipertansiyon prevalansının 1.5 kat arttığı bildirilmiştir. ABD'nde 30 eyaletin içme sularındaki arseniğe bağlı olarak vasküler hastalıklardan ölüm oranları araştırılmış ve arter, arteriol ve kapiller hastalıklarından standart ölüm oranları (SMR) kadınlarda 1.9, erkeklerde 1.6 olarak bulunmuştur. 50 ppb düzeyinde arsenik içeren suyun günde 1 litre ömür boyu içilmesinden kaynaklanan karaciğer, akciğer, idrar kesesi kanserinden ölüm riski 1000 kişide 13 olarak hesaplanmıştır [1,7].

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2. 1. Arsenik

#### 2. 1. 1. Arseniğin Fiziksel Ve Kimyasal Özellikleri

Arsenik, yerkabuğunda geniş bir alana yayılmış ve yerkabuğundaki ortalama konsantrasyonu 2 ppm olan,  $5,78 \text{ g/cm}^3$  yoğunluğa sahip olan bir metaloiddir. Arsenik 200'den fazla mineral türünde bulunmakla beraber doğada jeolojik olarak geniş bir alana yayılmış trivalent ve pentavalent formlarda yiyecek ve yeraltı sularında mevcut olup en çok bilinen minerali arsenopirittir ( $\text{FeAsS}$ ) [8].

**Çizelge 1. 1.** Genel özellikleri [9].

İsim, Sembol, Atom Numarası	Arsenik, As, 33
Periyot, Grup, Blok	4. periyot, 5A grubu, p Bloğu
Atom Ağırlığı	74,92160 g/mol
Elektron Konfigürasyonu	$[\text{Ar}]4s^2 3d^{10} 4p^3$

**Çizelge 1. 2.** Fiziksel özellikleri [9]

Oda koşullarında fiziksel hali	Katı
Yoğunluk (Oda koşullarında)	$5,727 \text{ g/cm}^3$
Yoğunluk (Sıvı, Erime noktasında)	$5,22 \text{ g/cm}^3$
Erime noktası	$614 \text{ }^\circ\text{C}$ (887 K, 1137 $^\circ\text{F}$ )
Kaynama noktası	$817 \text{ }^\circ\text{C}$ (1090 K, 1503 $^\circ\text{F}$ )



**Çizelge 1. 3.** Atomik özellikler [9]

Oksidasyon basamakları	+3, +5
Elektronegatiflik	2,18 (Pauling skalası)
İyonlaşma enerjileri	1. İ. E. 947,0 kJ/mol 2. İ. E. 1798 kJ/mol 3. İ. E. 2735 kJ/mol
İyonik bağ uzunluğu	115 pm
Kovalent bağ uzunluğu	119 pm
Wander walls bağ uzuluğu	185 pm

**Çizelge 1. 4.** Radyoaktif özellikleri [9]

İzotoplar	Yarılanma süresi	Işıma türü
<sup>75</sup> As	Karalı yapıya sahip	
<sup>74</sup> As	17,78 dakika	e <sup>-</sup> yakalama β <sup>-</sup> (beta) β <sup>+</sup> (pozitron) γ (gama)
<sup>73</sup> As	80,3 dakika	e <sup>-</sup> yakalama γ (gama)

### 2. 1. 2. Arsenik Formları

Metalloid özellik gösteren ve yer kabuğunda en bol bulunan elementlerden biridir. Volkanik aktivitesi olan ve jeotermal bölgelerde bulunur ( $As_2S_3$  ve  $FeAsS$  gibi) [8].

#### A) Anorganik formları:

- Arsenik trioksit (Rodentisit)
- Sodyum arsenit (İnsektisit)
- Bakır aseto arsenit (İnsektisit)
- Arsenik triklorür (İnsektisit)
- Arsenik pentoksit
- Arsenik asit
- Kurşun arsenat (İnsektisit)
- Potasyum asit arsenat (Deri ve kağıt endüstrisinde)

#### B) Organik formları:

- Monometilarsonat
- Dimetilarsinat (Herbisit)
- Arsenobetain
- Difenilklor arsin (Kimyasal savaş gazı)
- Betaklorvinilklor arsin (Lewisit) (Kimyasal savaş gazı)

### 2. 1. 3. Arseniğin Kullanım Alanları

Arseniğin metalik formda kullanılmasının herhangi bir faydası olmadığı için bu tür çalışmalar genellikle yapılmamaktadır. Endüstride arseniğin en bilinen uygulamaları yarı iletken teknolojilerinde ve laser üretimindedir [9]. Bunun yanında antik çağlardan beri zehir olarak kullanılmaktadır. Her yıl dünyada 50.000 tonun üzerinde üretilen arsenik türevleri yaygın kullanım alanı bulmaktadır. Arsenik trioksit (beyaz arsenik), sodyum arsenit ile birlikte mono-sodyum metanarsonat, di-sodyum metanarsonat gibi organik bileşikler, potasyum ve kurşun arsenit gibi alkali tuzları herbisit olarak sık kullanılır. Bu bileşikler, yabancı bitki tohum ve filiz öldürücü özelliklerinin yanında, pamuk ve meyve ağaçlarında defoliant olarak da

kullanılırlar. Bakır asetoarsenit (Paris yeşili) ve kurşun arsenat kuvvetli insektisidlerdir. Arsenik bileşikleri ayrıca bazı deterjanların yapısında, boya pigmentlerinde (Emerald yeşili), deri ve kağıt endüstrisinde (potasyum asit arsenat), seramik, cam ve lastik imalatında da kullanılmaktadır [1].

#### 2. 1. 4. Arseniğin Vucuda Giriş Yolları

Arsenik, insanlar tarafından veya antropojenik olarak hava, su, toprak ve besinlere çevresel taşınım sonucu besinler ve içme suları ile organizmaya girebilirler. Besinlerin normal bileşeni olabildikleri gibi kirlilik olarak da bulunabilirler. Hava, su ve toprak, doğal kaynaklar ve teknolojik nedenlerle metallere kirlenebilir. Metaller çevrede jeolojik ve biyolojik devirlerle dağılıma uğrarlar. Dağılım ve taşınma sonucu metaller emisyonla uğradıkları yerlerden çok uzaklarda da birikerek çevredeki konsantrasyonları artar (Grönland buzullarında kurşun konsantrasyonunun daha önceki yıllara göre 200 kat artması bu yeniden dağılım ve taşınmayı gösterir) [9].

◆Mineral yataklarından geçen sular buradaki metalleri çözerek zararlı hale getirmektedir.

Örneğin Kütahya Emet'teki yeraltı sularının arsenikle kirlenmesi

◆Çevre kirlenmesi sonucu arsenik biyoakkümülyasyonla besin zincirine geçebilir.

Denizler, göller, akarsular insan aktiviteleri (endüstri atıkları gibi) sonucu metallere kirlenir. Metaller biyolojik parçalanmaya dayanıklıdır. Ayrıca bazıları çevrede lipofil özellik kazanarak su bitki ve hayvanlarda birikirler. Böylece besin zinciri ile insanlara ulaşırlar (Japonya'da Minamata bölgesinde cıva ile kontamine olmuş balıkların yenmesi ile görülen zehirlenme olayı).

◆Doğal kaynaklar veya teknoloji nedeniyle arsenik ile kirlenen toprakta yetişen bitkilerde metal birikimi olabilir.

◆Fosil kaynaklı katı ve sıvı yakıtların içerdiği pekçok metal (arsenik, kurşun, kadmiyum, selenyum, vanadyum gibi) yakın çevremizdeki havayı kirletir.

Ayrıca egzoz gazlarından çıkan kurşun bileşikleri trafiğin yoğun olduğu şehirlerin havasını kirletir.

◆Endüstride metallerin işlenmesi ve teknoloji sırasında doğrudan maruz kalma ile pek çok mesleki zehirlenme olabilir.

(Kronik kurşun, cıva, kadmiyum zehirlenmesi gibi). Endüstride metal zehirlenmeleri başlıca inhalasyon yolu ile olmaktadır. Ancak talyum, alkil kurşun, nikel, arsenik ve berilyum gibi metallerin deri yolu ile de absorpsiyonları önemlidir.

◆ Yaşam tarzı ile ilgili faktörler:

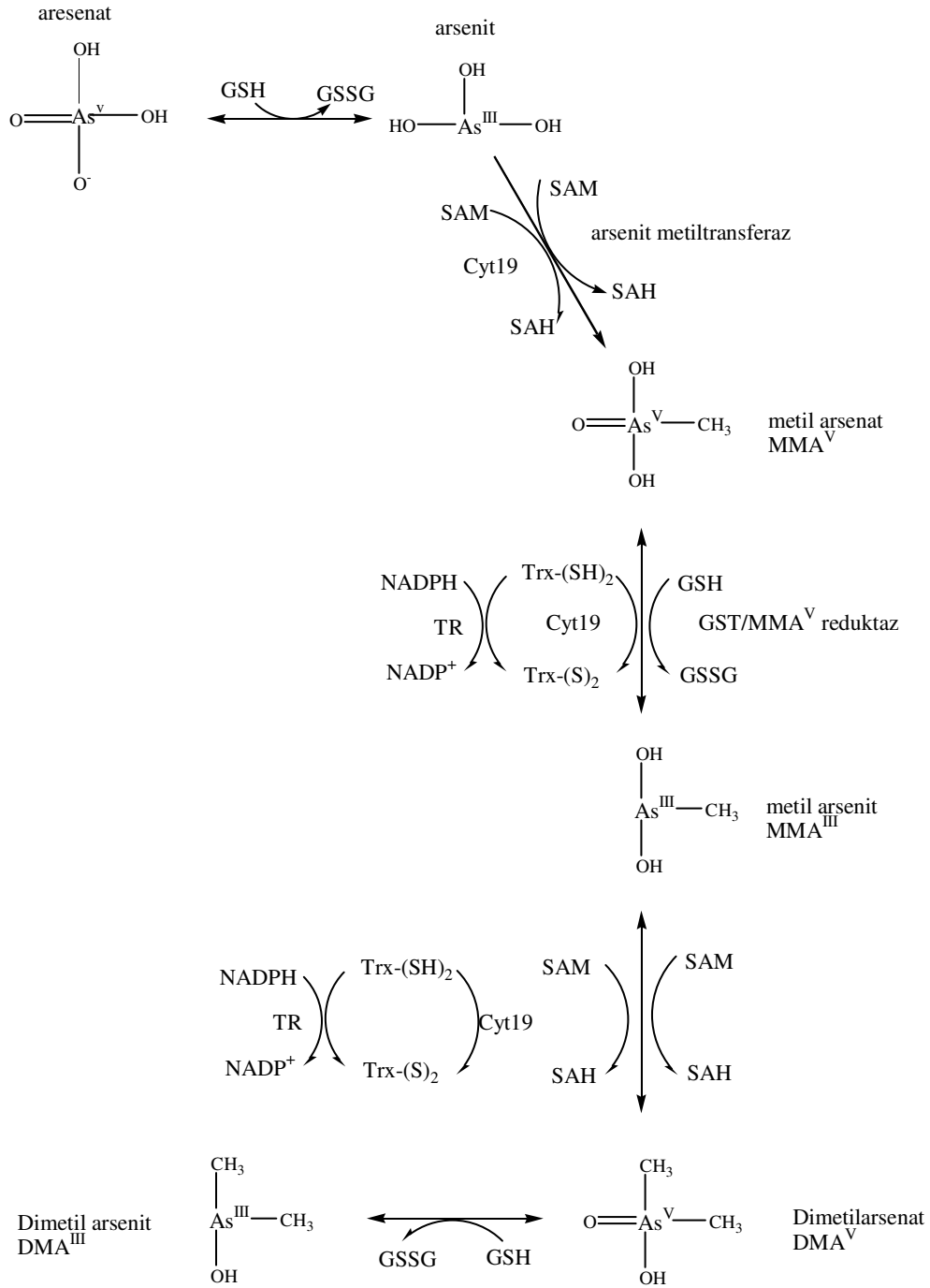
Sigara içimi toksisiteyi indirekt etkileyebilir.

### 2. 1. 5. Arsenik Türevlerinin Metabolizması

Arseniğin kronik olarak artışı kromozom ve genler üzerinde negatif değişimlere neden olmaktadır. Aslında düşük miktarlardaki arsenik (yetişkinler için 20 µg/gün ) insan vücudu için gerekli bir mineraldir [7]. Doğal olarak yeryüzünde ve yiyeceklerde bulunan arsenatlar şeklindeki organik arsenik bileşikleri çok zehirli değildir. Vücut tarafından böbreklerde kolaylıkla giderilirler [10].

Arsenat, GSH tarafından indirgenerek arsenit oluşturur. Arsenit, SAM metil donoru tarafından oksidatif metilasyon ile metilarsenat(MMA<sup>V</sup>)'a ve SAH'e dönüşür. Metilarsenat önce indirgenerek metilarsenit(MMA<sup>III</sup>) ve daha sonra oksidatif metilasyon ile dimetilarsenat(DMA<sup>V</sup>) dönüşür. Dimetilarsenat indirgenerek dimetilarsenit(DMA<sup>III</sup>) oluşturur [11].

Arsenik trioksitler gibi, inorganik arsenik bileşikleri endüstriyel olarak kullanılırlar ve toprağı, dolayısıyla yiyecek maddelerini kirleterek esas problemi teşkil ederler. Bunlar vücutta, saçta, ciltte, tırnaklarda ve iç organlarda birikirler. Ortalama olarak insan vücudunda 10-20 mg'ın üzerindeki oranlarda bulunan arsenik problem yaratır. Böbrek fonksiyonlarındaki azalma da arsenik birikimini artırır. Arsenik absorpsiyonu en fazla %5 gibi düşük oranlarda gerçekleşir ve büyük kısmı dışkı ve idrar yoluyla vücuttan atılır. Tavsiye edilen güvenlik limiti yetişkinlerde 15 µg/kg (vücut ağırlığı/hafta) dır. Çözünebilen inorganik arsenik bileşikleri kuvvetli zehir olduklarından yüksek dozlarda emilimi, sindirim sistemi semptomlarına, kardiyovasküler ve sinir sistemi fonksiyonlarında bozukluklara ve sonuçta ölüme sebebiyet vermektedir. İçme suyundaki arseniğin ( $\leq 50 \mu\text{g As/l}$ ) uzun süreli etkileşimi sonucunda deri, akciğer ve böbrek kanserine yakalanma riski çok yüksek olup aynı zamanda deri görüntüsünün değişimi görülmektedir. Mesleki arsenik alınımı büyük oranda soluma yoluyla olup genelde akciğer kanseri ile sonuçlanmaktadır. Besin maddelerinden alınan günlük toplam arsenik, çoğunlukla 20 ile 300 µg/gün'dür. Besinlerin içindeki arseniğin yaklaşık % 25'i inorganik olup, bu durum besinin emilim şekline yüksek oranla bağlıdır. Arseniğin akciğerlere etkisi sigara içenlerde yaklaşık 10 µg/gün iken, sigara kullanmayanlarda 1 µg/gün'dür. Arsenik bileşiklerinin



Şekil 1. 1. Arsenik metabolik yolu.

insanlarda acı veren tümörlere sebep olmasından dolayı, oksit, asit veya tuzlarının MAK değerleri saptanamamıştır. Arsinin (AsH<sub>3</sub>) MAK değeri 0.2 mg/m<sup>3</sup> (0.05ppm)'dir. Arsin hariç diğer tüm arsenik bileşiklerinin TRK değeri 0.2 mg/m<sup>3</sup>'dür (As olarak). Amerika Birleşik

Devletleri'nde izin verilen limit değerler; kalsiyum arsenat için  $0.2 \text{ mg/m}^3$  , arsin için  $0.2 \text{ mg/m}^3$  , tüm inorganik arsenik bileşikleri için  $0.01 \text{ mg/m}^3$  ve organik arsenik bileşikleri için ise  $0.5 \text{ mg/m}^3$ 'dür. Japonya'da arseniktrioksitin havada izin verilen maksimum konsantrasyonu  $0.5 \text{ mg/m}^3$  ve arsinin  $0.2 \text{ mg/m}^3$ 'dür. İsveç'te bu değer tüm arsenik bileşikleri için  $0.05 \text{ mg/m}^3$  olarak belirlenmiştir [12,13].

- **Zehirlenmenin tanımlanması ve biyolojik indikatörleri:**

Arseniğe maruziyetin biyolojik indikatörleri idrar, kan ve saç arsenik konsantrasyonlarıdır. İdrardaki arsenik, kandan daha iyi bir biyolojik indikatör olup yakın zamandaki maruziyeti gösterir.

USA'de Kalifornia ve Nevada'da yapılan bir araştırmada içme suyundaki arsenik konsantrasyonu  $400 \text{ } \mu\text{g/L}$ 'ye ulaştığı zaman idrar konsantrasyonu  $75 \text{ } \mu\text{g/L}$ , kan konsantrasyonu  $14 \text{ } \mu\text{g/L}$ 'ye ulaşmaktadır.

Saç ve tırnaktaki arsenik, geçmiş maruziyet için iyi bir indikatördür [14].

**Çizelge 1. 5.** Arsenik Maruziyetinin Biyolojik İndikatörleri [14]

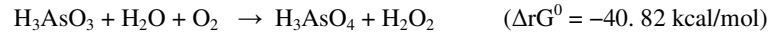
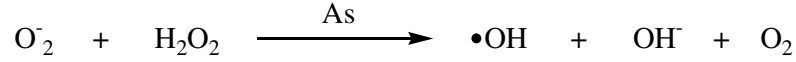
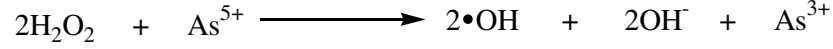
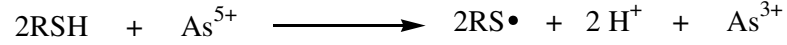
	Normal	Aşırı Maruziyet
İdrar $\mu\text{g/l}$	5 - 50	$\geq 100$
Kan $\mu\text{g/l}$	1 - 4	50
Saç $\mu\text{g/l}$	$\leq 1$	

- **Serbest radikal oluşumu:**

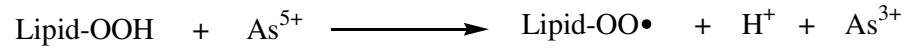
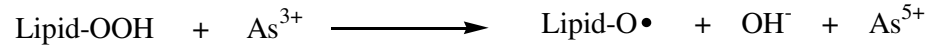
Metaller, serbest radikal kaynakları arasında önemli bir yere sahiptir. Metallerin fizyolojik şartlarda çeşitli oksidasyon basamaklarında bulunur. Oksidasyon basamakları arasındaki elektron alışverişi yükseltgenme indirgenme reaksiyonları ile olur [15].



Arsenik gibi metaller bu özelliklerinden dolayı serbest radikal reaksiyonlarını hızlandırır ve katalizör görevi görürler. Bu tip maddelere “ oksidan stressor ” adı verilir [13].



Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki önemli bir etkileri de lipit peroksidasyonudur [15].



### 2. 1. 6. Arseniğin Toksik Ve Kanserojen Etkileri

Arseniğin toksik etkisi, kimyasal şekline olduğu kadar maruziyet şekli ve süresine de bağlıdır.

İnsektisit olarak arsenik triklorüre maruziyet temas yerinde yanma ile ve olası bir bronkopnömoni gelişimi ile karakterizedir.

Arsin ( $\text{AsH}_3$ ) renksiz ve hafif sarmısak kokulu bir gazdır ve başlıca yarı iletken endüstrisinde kullanılır. Bu gazın toksisitesi hemolize neden olarak şiddetli anemi ve sarılık olarak ortaya çıkar. 250 ppm arsinin kısa bir süre solunması veya 25-30 ppm arsinin 30 dakika gibi daha uzun bir süre solunması fatal olabilir.

Akut maruziyette, ateş, kusma, ekstremitelerde kramplar, anoreksi, melanozis oluşabilir. Kardiyak aritmiler, konvülziyonlar ve paraliz gibi semptomlar ve ölüm oluşabilir.

Zehirlenen kişi hayatta kalırsa maruziyetten 1 veya 2 hafta sonra periferik nöropati ve kan tablosu değişimi (Kemik iliğini baskılanmasıyla anemi, lökopeni, granülositopeni) gibi diğer semptomlar da gelişir. Bu etkiler reversibldir. Arsenik trioksit için letal doz 100–200 mg'dır.

Kronik maruziyette arsenik bileşiklerinin diagnozu zordur. Öncelikli hedef organları sinir sistemi ve deridir. Yıllar içinde motor ve duyu nöronlarında periferik nöropatiler

(Demyelinizasyon) gelişebilir. Derideki etkiler avuç içleri ve ayak tabanında dermatit, hiperpigmentasyon ve keratoz gelişimi ile karakterizedir.

Karaciğer hasarı, arseniğin kronik maruziyetinin bir diğer belirtisi olabilir. Sarılıkla başlar ve siroz şeklinde gelişir. Periferik vasküler hastalıklar da gelişebilir (Taiwan ve Şili’de içme suyu ile arseniğe maruz kalan kişilerde görülen gangren şeklinde vasküler etkiler).

Düşük düzeylerde arseniğe maruz kalmak bulantı, kusma ve ishale, kırmızı ve beyaz kan hücrelerinin yapımında düşmeye, kalp ritminde bozulmaya, kan damarlarında patolojilere, el ve ayaklarda içnelenme ve karıncalanma hissedilmesine neden olabilir. Uzun süre maruziyet durumunda ciltte kararmaya, el ve ayaklarda ve gövdede siğil ve kabarmaların olmasına neden olabilir. Doğrudan cilt teması kızarma ve şişmelere neden olabilir.

Yüksek düzeyde maruziyet durumunda idrarda saptanabilir, ancak maruziyetten kısa bir süre sonra tahlil yapılması gerekir. Ancak maruziyetten sonraki 6-12 ay boyunca saç ve tırnakta saptanabilir. Ancak bu testler düşük düzeyde maruziyetlerde anlamlı değildir ve olası bir sağlık etkisi konusunda fikir vermez. EPA'nın içme suyu için verdiği en üst sınır 0,05 ppm'dir, ancak bu düzey ileride düşürülebilir.

İnsanlarda kronik arsenik zehirlenmesinde görülen belirtiler arasında nazal septum perforasyonu, larinks ve kulak kanalının şiddetli irritasyonu, ellerde ve ayaklarda simetrik hiperkeratoz, deri pigmentasyonu, palmoplantar keratoz, anemi, konjunktivit, trakeit, akrosiyanoz, periferik nöropati ve polinöyrit sayılabilir. Polinöyrit hem sensorik, hem de motorik fonksiyonlarda gözlenir. Diğer belirtiler ise anoreksi, kaşeksi, siroz ve dermatittir.

Arsenik ve arsenikli bileşiklerin insanlarda karsinojen olması nedeniyle içme sularının arsenikle kontaminasyonu, büyük bir halk sağlığı sorunu yaratır. Arseniğe maruz kalmanın insan sağlığı üzerine genel olumsuz etkileri arasında kardiyovasküler ve periferik vasküler hastalıklar, gelişme anomalileri, nöyolojik ve davranış bozuklukları, diabet, işitme kayıpları, portal fibrozis, hematolojik bozukluklar (anemi, lökopeni ve eozinofili) ve multiple kanserler, deri, akciğer, karaciğer, idrar kesesi, böbrek ve kolon kanserleri sonucu ölüm oranlarında artış gösterilmektedir [7]. Hopenhayn ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, gebelik boyunca içme sularıyla 50 ppb den daha az düzeyde arseniğe maruz kalmanın düşük doğum ağırlığına neden olduğu ortaya çıkmıştır. İçme suyuyla arseniğin kronik alımının periferik kan lenfositlerinde, ağız mukozası ve idrar yolları hücrelerinde karsinojen etkinin göstergesi olarak mikronükleusların oluştuğu kanıtlanmıştır. Arsenikten kaynaklanan sağlık problemlerinin kötü beslenme ile arttığı, akciğer kanserinin oluşumunda arsenik ve sigaranın sinerjik olarak etki ettiği



de ortaya çıkarılmıştır. Yüksek miktarda arsenik içeren (ortalama 412 ppb) içme sularını kullanan bir kasaba halkında yapılan çalışmada, lenfositlerdeki replikasyon indekslerinde anlamlı farklılıklar ve proliferasyon yeteneğinde azalma saptanmıştır [8]. Güney Tayvan'da 1988 yılında 891 yetişkin üzerinde yapılan bir çalışmada, arseniğin alımına bağlı olarak diabetes mellitus prevalansının arttığı belirlenmiştir. Japonya'da 382 erkek ve 516 kadın üzerinde uzun süreli inorganik arsenik alımının kardiyovasküler sistem üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, hipertansiyon prevalansının 1,5 kat arttığı bildirilmiştir. ABD'nde 30 eyaletin içme sularındaki arseniğe bağlı olarak vasküler hastalıklardan ölüm oranları araştırılmış ve arter, arteriol ve kapiller hastalıklarından standart ölüm oranları (SMR) kadınlarda 1,9, erkeklerde 1,6 olarak bulunmuştur. 50 ppb düzeyinde arsenik içeren suyun günde 1 litre ömür boyu içilmesinden kaynaklanan karaciğer, akciğer, idrar kesesi kanserinden ölüm riski 1000 kişide 13 olarak hesaplanmıştır [1, 7].

Halk sağlığına olumsuz etkileri nedeniyle içme sularında bulunan arsenik düzeylerine belirli sınırlamalar getirilmiştir. WHO, içme sularında 10 ppb'ye kadar arsenik bulunabileceğini 50 ppb'den yüksek miktarları içeren suların ise kesinlikle kullanılmaması gerektiğini bildirmiştir. Çocuklarda (0-6 yaş), akut ve subkronik maruz kalmalar için olası referans değerler 0.015 ve 0.005 mg/kg-gün olarak bildirilmiştir [4]. Ülkemizde 1970 tarihli Gıda Maddeleri ve Umumi Sağlığı İlgilendiren Eşya ve Levazımın Hususi Vasıflarını Gösteren Tüzük'teki 425. Maddede sulardaki en yüksek arsenik düzeyi 50 ppb olarak kabul edilmiştir [6]. TSE'nün 1984 tarih ve TS 266 No'lu yayınında da içme ve kullanma sularında izin verilen arsenik miktarı 50 ppb olarak bildirilmiştir [5]

Arsenik bilinen bir kanserojendir. İnorganik arseniğin solunması akciğer kanserine, besin yoluyla alınması ise cilt, mesane, böbrek, karaciğer ve akciğer kanserine neden olabilir [2].

International Agency for Research on Cancer (IARC), kimyasal maddeleri insandaki karsinojenik etki risklerine göre beş gruba ayırmıştır:

#### Grup 1. İnsanda Karsinojenik Etkililer

Arsenik ve bileşikleri, kadmiyum, krom (6 değerli), nikel ve bileşikleri bu gruptadır.

#### Grup 2A. İnsanda Karsinojenik Etki Olasılığı Bulunanlar

Cisplatin bu grupta yer almaktadır.

#### Grup 2B. İnsanda Muhtemelen Karsinojenik Etkili Olanlar

Kurşun ve anorganik bileşikleri bu gruptadır.

Grup 3. İnsandaki Karsinojenik Etkileri Yönünden Sınıflandırılabilir Olmayanlar

Grup 4. İnsanda Karsinojenik Etkisi Olmayanlar

**Çizelge 1. 6.** Arsenik kaynağı ve insanlarda oluşturduğu kanser türleri [2].

<b>İnsanlarda Kanser Oluşturan Arsenik</b>	
<b>Kaynağı</b>	<b>Kanser Türü</b>
Cu Rafinesi	Pulmoner Karsinoma,
As Peptidleri	Lenfoma, Lösemi
Kimyasal Tesisler	Dermal Karsinoma,
İçme Suyu (oral)	Hepatik Anjiyosarkoma
Sigara dumanı	

## **2. 2. Serbest Radikaller**

Bir veya daha fazla sayıda eşlenmiş elektron içeren ve yüksek reaktivite gösteren atom veya moleküllere "serbest radikal" denir [16]. Ayrıca bu moleküllere "oksidan moleküller" veya "reaktif oksijen türleri (ROS)" de denmektedir [17].

Her ne kadar da serbest radikal reaksiyonları, nötrofil, makrofaj gibi bağışıklık sistemi hücrelerinin savunma mekanizması için gerekli olsada, serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır [18].

Hücrelerdeki oksidatif hasarların oluşumunda ilk sırada yer alan serbest radikaller normal hücresel bileşenleri bağlayarak, membran lipidlerinin doymamış bağları ile reaksiyona girerler, proteinlerini denatüre ederler ve nükleik asitlerine saldırırlar [19]. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) ilk hedefleri hücre zarlarındaki çoklu doymamış yağ asitleri olup, bunun sonucunda zarlarda lipid peroksidasyon sonucu hücre yapı ve fonksiyonunda önemli hasarlara neden olurlar [20]. Ayrıca DNA ve nükleik asitler üzerine serbest radikallerinin etkisiyle DNA zincirinde kopmalar ve bazlarda kırılmalar meydana gelmektedir [21]. Proteinler açısından bakıldığında ise Triptofan, Tirozin, Fenilalanin, Histidin, Metiyonin

gibi sülfür içeren aminoasitlere sahip proteinler serbest radikaller ile reaksiyonları daha hızlı gerçekleşmektedir [22]. Oluşan bu hasarları belirlemek için ksenobiyotiğin toksisitesini, hastalığın patojenezini ve birçok biyogöstergeninin bulunması gereklidir [23]. Birçok molekül elektron kazanarak veya kaybederek serbest radikal haline gelebilirken, sadece sınırlı bir kısmı patolojik olaylarda yer alırlar [24].

Bu serbest radikallerin üretiminin artması iki şekilde gerçekleşebilir [16]. Serbest radikallerin endojenik üretimi normal aerobik metabolizma sonucu gerçekleşir [25]. Bunun sonucunda ise; sitokrom oksidasyonunun, peroksizomların etkisi, organik materyallerin ısı etkisiyle bozulmasının ve metal iyonlarının etkisi sonucunda da serbest radikaller oluşur veya üretimi artar [26]. Çevresel kaynaklı etkenler; sigara dumanı, inflamasyon, tütün içimi, radyasyon, ilaçlar, hiperoksit, fotokimyasal, hava kirliliği, organik çözücüler, anestezipler, pestisitler, aromatik hidrokarbonlar, alkol ve çevre kirleticiler olarak özetlenebilir [16].

Ksenobiyotiklerin oksidatif stres sonucu ortaya çıkan serbest radikaller ve organizmanın savunma mekanizmasını oluşturan antioksidanlar sağlık ve hastalıkta biyogösterge olarak değerlendirilmektedir. Serbest radikaller; vücutta ayrıca yangı, bağışıklık sistemine ait hastalıklar, yaşlanma, nörolojik hastalıklar, ateroskleroz, hipertansiyon, iskemik hasar, karsinogenezis, mutajenezis, infeksiyöz hastalıklar, karaciğer hastalıkları, akciğer hastalıkları, göz hastalıkları ve ürolojik hastalıklar gibi hastalıklara da neden olabilir [27, 28].

Biyolojik sistemlerde önemli serbest radikallerin çoğu oksijene dayanır. Bunlardan süperoksit radikali hem çevresel etkenler, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikali [29].

### **2. 2. 1. Reaktif Oksijen Türleri**

Oksijen 8 atom numaralı doğada dioksijen ( $O_2$ ) olarak bulunan kararsız bir elementtir. Bu kararsız konumu, enerji düzeylerinde bulunan elektronlarının yapısıyla ilişkilidir [30, 31].

Oksijen molekülündeki aynı yöne dönen iki elektrona sahip 2p son orbitali önemlidir. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron, bir orbitali bırakıp diğerine geçtiğinde veya farklı yönde döndüğünde "singlet oksijen" oluşur. Orbitallerden birine ters dönüşlü iki elektron veya ikisine ters dönüşlü iki elektron daha gelirse "oksijen radikali" elde edilir.

Çizelge 2. 1. Oksijen türevi bileşikler

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Hidroksil (HO <sup>·</sup> )	Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
Alkoksil (RO <sup>·</sup> )	Singlet Oksijen (O <sub>2</sub> <sup>1</sup> )
Peroksil (ROO <sup>·</sup> )	Ozon (O <sub>3</sub> )
Süperoksit (O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> )	Hipoklorid (HOCl)
Nitrik oksit (NO <sup>·</sup> )	Lipid hidroperoksit (LOOH)
Azot dioksit (NO <sub>2</sub> <sup>·</sup> )	Peroksinitrit (ONOO <sup>·</sup> )

Oluşan radikal eşleşmemiş tek elektronu nedeniyle çok dengesizdir ve hızla ortamdaki kaybolur. Bu yüzden bu radikaller tek elektronlarını bir başka moleküle verebilir (redüksiyon) ya da bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilirler (oksidasyon). Sonuçta nonradikal yapıyı radikal şekle dönüştürebilirler. Bu özellikleri ile reaktif oksijen partikülleri iki ana başlık altında incelenmektedir [30, 31].

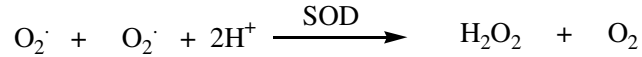
### **2. 2. 1. 1. Süperoksit radikalleri (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)**

Süperoksit radikalleri (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), hücrelerde redükte elektron taşıyıcılarının otooksidasyonu ile üretilmektedirler. Süperoksit oluşumu; a-) elektron taşıyıcısının redoks durumuna ve b-) ortamdaki oksijen derişimine bağlıdır. Zayıf bir oksidan olan süperoksit radikalinin kendi başına önemli hücre hasarlarına yol açması mümkün görülmemektedir. Ancak süperoksit radikalleri oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyonları başlatabilir [16]. Bu reaksiyonların en önemlilerinden biri Haber-Weiss reaksiyonudur. Bu reaksiyonda O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> demir varlığında etkileşerek oldukça reaktif olan HO<sup>·</sup> radikallerini oluşturmaktadırlar.



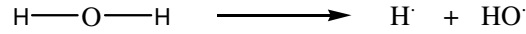
Üretilen bu OH<sup>·</sup> Radikalleri oldukça reaktif olup DNA gibi yapılarla reaksiyonlara girerek önemli hasarlara yol açabilmektedir [32].

$O_2\cdot$  radikalleri, hücre içi demir depolarından demiri serbest hale getirir. Serbest hale geçen demir iyonu Haber-Weiss gibi radikal üreten reaksiyonlarda veya diğer serbest radikal aracılığı ile hücre hasarında rol oynayabilir. Süperoksit radikalleri çok kısa bir yarı ömre sahip olup dismutasyon reaksiyonu ile  $H_2O_2$  ve oksijen üretirler. Dismutasyon reaksiyonu spontan olarak meydana gelmekte ve reaksiyon süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile katalizlenmektedir.



### **2. 2. 1. 2. Hidroksil radikalleri (HO $\cdot$ )**

Hidroksil radikali (HO $\cdot$ ), biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü serbest radikaldir. Dokular radyasyona maruz kaldıklarında, enerjinin çoklu hücre içindeki su tarafından absorblanır ve radyasyon oksijen-hidrojen arasında kovalent bağın kırılmasına neden olur. Sonuçta şekilde görüldüğü gibi iki radikal meydana gelir. Bu radikallerden biri hidrojen (H $\cdot$ ) ve diğeri ise hidroksil radikali (HO $\cdot$ ).



(Hidroksil radikali)

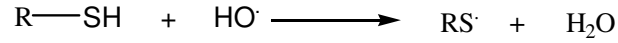
Hidrojen peroksitin ( $H_2O_2$ )  $Fe^{+2}$  veya  $Cu^{+2}$  ile reaksiyona girmesiyle de HO $\cdot$  oluşmaktadır.  $H_2O_2$  toksisitesinin büyük çoğunluğunun temelinde bu oluşan OH $\cdot$  olduğu düşünülmektedir. Bu reaksiyon ilk defa 1894 yılında Fenton tarafından gözlenmiş ve günümüzde de Fenton reaksiyonu olarak bilinmektedir.



HO $\cdot$  radikalleri başta lipid, protein ve nükleik asitler (DNA ve RNA) olmak üzere hemen hemen bütün hücresel moleküllerle reaksiyona girebilmektedirler. HO $\cdot$  DNA da bulunan deoksiriboz molekülüne etki ederek çeşitli ürünler oluşturduğu ve bu oluşan ürünlerin bazılarının mutajenik oldukları görülmüştür. Yine OH $\cdot$  aromatik halkaya katılma özelliği gösterdiklerinden DNA ve RNA'da bulunan pürin ve pirimidin bazlarına katılarak radikal

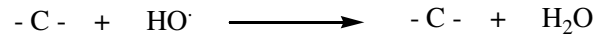
oluşumuna neden olurlar. Örneğin: Timine katılarak timin-radikalini oluşturur ve bu radikal oksijenle reaksiyona girerek son derece reaktif olan timin peroksil-radikaline dönüşmektedir. Bu gibi bir dizi reaksiyona katılabilen HO· DNA'nın baz ve şekerlerinde ciddi hasarlar oluşturarak DNA iplik kırılmalarına neden olurlar. Hasar çok kapsamlı olursa hücrel koruyucu sistemler tarafından tamir edilemeyebilir ve bunun sonucunda mutasyonlar ve hücre ölümleri meydana gelir [16, 33].

DNA'nın pürin ve pirimidin bazları ile etkileşmenin yanı sıra tiyol grubu içeren biyolojik moleküllerden H atomu da koparabilmektedir.

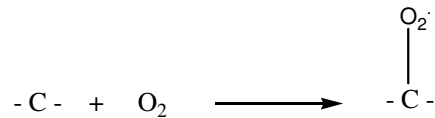


Sonuçta oluşan sülfür radikalleri ilginç kimyasal özelliklere sahiptir. Sülfür radikalleri, O<sub>2</sub> ile kombine olabilir ve oksisülfür radikallerini oluşturur. RSO<sub>2</sub>· ve RSO· gibi bunların bir çoğu da biyolojik moleküllerde hasara neden olurlar.

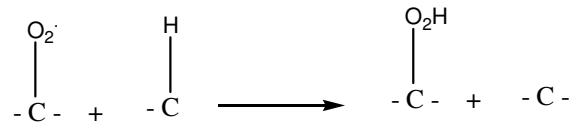
HO·'in sebep olduğu en iyi karakterize edilmiş olan biyolojik hasar lipid peroksidasyon olayıdır. HO· membran fosfolipitlerinin doymamış yağ asit yan zincirlerine hücum eder. Bu özellikle araşidonik asit gibi doymamış yağ asit yan zincirlerinden -C atomunun birinden H atomunun çıkartılması ve su oluşumu şeklinde gerçekleşir.



Bu reaksiyon sonunda membranda -C· radikali kalır. Bu -C· radikali oksijen ile kombine olarak peroksil radikalini oluşturur.



Peroksil radikaller reaktiftir ve yakınındaki doymamış yağ asitlerinin yan zincirlerine saldırır;

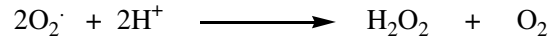


Böylece HO· radikalleri, yüzlerce yağ asitlerinin yan zincirlerini lipit hidroperoksitlere dönüştürür. Membranda lipit hidroperoksitlerinin birikimi membran fonksiyonunu bozar. Peroksil radikaller ve sitotoksik aldehitler, membran proteinlerinde ciddi bir hasara neden olurlar ve membrana bağlı bazı enzimleri ve reseptörleri inaktive ederler [31, 34, 35].

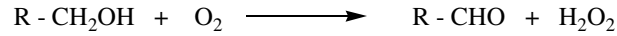
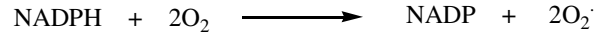
### **2. 2. 1. 3. Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Hidrojen peroksit eşleşmemiş elektrona sahip olmadığından aslında bir radikal değildir. Süperoksit anyonunun (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) hidrojenle yaptığı reaksiyona Dismutasyon reaksiyonu adı verilir ve Dismutasyon hızı asidik pH değerlerinde hızlanır [31, 36].

Reaksiyon şu şekilde ifade edilir;

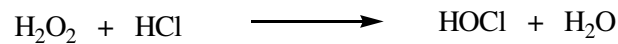


Bazı enzimler ya tekli (NADPH oksidaz) ya da çiftli (Glukoz oksidaz) elektron eklenmesini katalize ederek O<sub>2</sub><sup>-</sup> veya H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşmasını sağlarlar.



### **2. 2. 1. 4. Hipoklorik asit (HOCl)**

Hipokloröz asit de radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri (ROS) içinde yer almaktadır. Fagositik hücrelerin bakterileri öldürülmesinde önemli rol oynarlar. Aktive olan nötrofiller, monositler, makrofajlar ve eozinofiller süperoksit radikallerini (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) üretirler. Radikal üretimi fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde büyük önem arz etmektedir. Özellikle nötrofiller miyeloperoksidaz enzimleri aracılığıyla önce O<sub>2</sub><sup>-</sup>'in oluştururlar ve daha sonra dismutasyonuyla oluşan hidrojen peroksiti klorür iyonu ile birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'i meydana getirirler.



### **2. 2. 1. 5. Singlet O<sub>2</sub> (O<sub>2</sub><sup>1</sup>)**

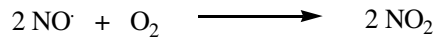
Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmadığından serbest radikal değil ancak serbest radikal reaksiyonlarını başlattıklarından serbest radikal sınıfına dahil edilmiştir. Singlet O<sub>2</sub>, oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi süperoksit radikalinin dismutasyonu ve hidrojen peroksidin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir. Vücutta deri ve retina gibi gün ışığına maruz kalan bölgelerde sıkça olduğu tespit edilmiştir.

Serbest oksijen radikallerinin etkisiyle peroksil radikalleri (ROO<sup>·</sup>), alkoksil radikalleri (RO<sup>·</sup>) karbon merkezli radikaller (R<sup>·</sup>) veya tiyol radikalleri (RS<sup>·</sup>) oluşur. Bu radikaller oksijenle tekrar reaksiyona girerek yeni serbest radikaller üretirler [37].

### **2. 2. 1. 6. Reaktif nitrojen türleri (NO, NO<sub>2</sub>, NO<sup>+</sup>, NO<sup>-</sup>)**

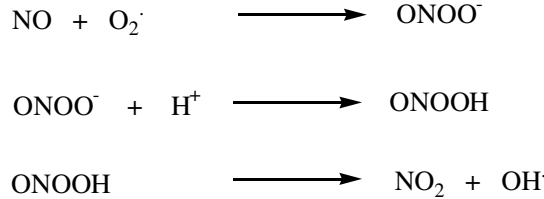
Lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir [38]. Düşük konsantrasyonlarda iken, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilen NO, bilinen en düşük molekül ağırlıklı, biyoaktif memeli hücresi sekresyon ürünüdür [39, 40, 41]. Diğer radikallerden farklı olarak düşük dozlarda toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevleri gerçekleştirir [38]. NO<sup>-</sup>, bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır [42]. Bu lipofilik serbest radikal damar endotel hücrelerinde Nitrik Oksid Sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-argininden sentezlenir. NOS'ın birçok izoformu tanımlanmıştır. NO<sup>-</sup>'in yarı ömrü 10-20 saniyedir. Kolayca düz kasa geçerek Guanilat Siklaz (GC) enziminin "hem" demirine bağlanır ve cGMP sentezini uyarıp damar gevşemesini uyarır. Sentezlenen NO, aynı zamanda tiyol gruplarını S-nitrozilasyona uğratarak protein ve reseptör fonksiyonlarını da değiştirir. NO, Fe-S kümelerine afinite gösterdiği için bu grupları içeren akonitaz enzimine de bağlanır. Bu enzim hücre içi demir trafiğini kontrol eder. NO, akonitaz enzimine mRNA bağlanmasını artırır ve enzimin aktivitesini düşürür.

NO<sup>-</sup> metabolize olurken moleküler oksijen ile bağlanıp nitrojen dioksidi (NO<sub>2</sub>) oluşturur:





NO'in ROS'leri ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitriti (ONOOH) oluşturduğu ve bunun da ileri dekompozisyonla HO<sup>·</sup> radikalinin oluşumuna yol açtığı ifade edilmektedir:



OH<sup>·</sup> radikali ise biyolojik olarak yıkıcı bir moleküldür. Ayrıca, peroksinitrit de tirozin gibi fenolik amino asitleri nitrolayarak toksik nitro- türevlerini (nitrotirozin) oluşturmaktadır. Sonuç olarak NO, endotel hücre disfonksiyonu ve buna bağlı ateroskleroz, hipertansiyon ve DM gibi bazı önemli hastalıklarda rol oynayabilmektedir.

#### **2. 2. 1. 7. Alkil radikali, organik radikaller (R<sup>·</sup>) :**

Hidroksil radikali, yağ asitleri başta olmak üzere; nükleik asitler, karbohidratlar ve proteinler gibi çeşitli moleküllerden bir proton çıkarıp karbon merkezli organik radikallerin oluşmasına neden olur [43].

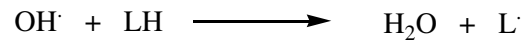
#### **2. 2. 1. 8. Peroksil radikali (ROO<sup>·</sup>) ve lipit peroksidasyonu:**

Karbon merkezli radikaller, hızlı bir şekilde oksijen ile reaksiyona girerek peroksil radikalini oluştururlar. Bu peroksil radikali lipit peroksidasyonunu başlatan radikal olup, çok uzun ömürlüdür. Biyomembranlar ve hücre içi organeller (mitokondri, endoplazmik retikulum vs. ) membran fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin varlığı nedeniyle oksidatif ataklara duyarlıdır. Lipit peroksidasyonundaki ROS'ların oluşumu; metabolik dismutasyon, redüksiyon ya da fotokimyasal olarak oluşan O<sup>·</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile başlar. Fenton reaksiyonu ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den Fe<sup>+2</sup> etkisi ile tetikleyici (initiator) faktör HO<sup>·</sup> radikali meydana gelmektedir [43, 44, 45].

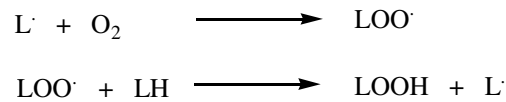
Biyolojik membranlarda serbest radikallerle indüklenen lipit peroksidasyonu; başlatma (initiation), ilerleme (propagation), yıkım (degradation) ve sonlanma (termination) olmak üzere dört aşamada gerçekleşir [43,45]:

1. Başlatma (initiation) safhası: Hidroksil radikallerinin poliansatüre yağ asitlerinin bir metilen grubundaki divinil (allilik) H atomunu koparması ile zincir reaksiyonu başlamaktadır

[46, 47]. Yağ asidinde çift bağ varlığı, C-H bağını zayıflatarak H<sup>+</sup> atomunun koparılmasını kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle membran lipitlerindeki doymamış yağ asitleri peroksidasyona özellikle duyarlıdır. Bu reaksiyon hem membran lipitleri; hem besinsel yağlarda gerçekleşmektedir. Fosfolipitlerde bu H<sup>+</sup>, kolesterolün C-7 hidrojeninden koparılmaktadır. Metilen grubundaki H atomunun çıkartılması ile geride karbon üzerinde eşleşmemiş bir elektron kalmaktadır (<sup>·</sup>CH-). Oluşan bu yapıya karbon merkezli radikal veya lipit alkil radikali (L<sup>·</sup>) denilmektedir:



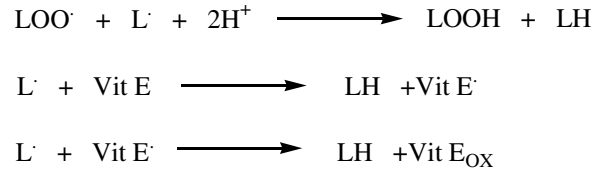
İlerleme (Propagation) safhası: Oluşan bu radikal moleküler düzenlenme ile konjuge dien formuna çevrildikten sonra moleküler oksijen ile reaksiyona girerek lipit peroksil radikali (LOO<sup>·</sup>) ile lipit peroksidi (LOOH) oluşturur:



Yıkım (Degradation) safhası: Konjuge dienlerin oluşumuna yol açan çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu; yağ asidi zincirinin ayrılması ve sonrasında genellikle tiyobarbitürik asit reaktif maddeler olarak bilinen ürünlerin açığa çıkması izlemektedir.

Sonlanma (Termination) safhası: Demir ile bakır iyonları, bu iyonların fosfat esterleri ile oluşturdukları asit şelatları ile Hem, hemoglobin ve miyoglobini de içeren bazı demir proteinleri lipit hidroperoksitlerini bozarak peroksidasyonu sonlandırmaktadır [43, 45].

Lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu safhada, süperoksidi bakır/çinko-bağımlı (sitozolik) ile manganez-bağımlı (mitokondrial) süperoksit dizmutazlar; düşük konsantrasyonlardaki (düşük K<sub>m</sub>) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi sitozolik ve mitokondrial GSH-Px, yüksek konsantrasyonlardaki (yüksek K<sub>m</sub>) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi ise perokzimal katalaz etkisizleştirmektedir. Ek olarak sonlandırıcı safhada lipit peroksidasyonunu kesen ya da etkilerini onaran mekanizmalar da bulunmaktadır. Zincir kırıcı özellikteki α-tokoferol ve bütül hidroksitoluen, peroksil radikalleri için lipitlerle yarışmalı mekanizma ile lipit peroksidasyonunu sonlandırmaktadır [45]. Vitamin E'nin etkisi aşağıda gösterilmiştir:



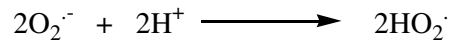
Reaksiyon akışına dikkatle bakıldığında, lipit peroksidasyonunun kendisini tetikleyerek yeniden lipit radikalleri ve peroksitleri oluşturduğu görülmektedir. NO<sup>•</sup> 'nun ise zincir kırıcı antioksidatif etkisini peroksil radikalleri ile nitrozoperoksil bileşikleri oluşturarak gösterdiği bildirilmiştir. Demir içeren laktoferrin ile ferritin birinci ve ikinci basamakta etkisini göstermektedir. GSH-Px, yağ asidi hidroperoksitlerini detoksifikiye ederek ikinci safha da yer almaktadır [45, 46].

#### **2.2.1.9. Organik peroksit radikali (RCOO<sup>•</sup>):**

Lipit yıkımında ortaya çıkan serbest radikallerden biri de organik peroksit radikalidir [46].

#### **2.2.1.10. Perhidroksil radikali (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>):**

Perhidroksil (hidroperoksil) radikali, süperoksit radikalinin düşük pH'da (pK<sub>a</sub>) [48] protonlanmasıyla oluşur ve daha kuvvetli bir oksidandır. Yaklaşık olarak süperoksidin % 3'ü hücrelerde protonlanmış olarak bulunmaktadır [49].



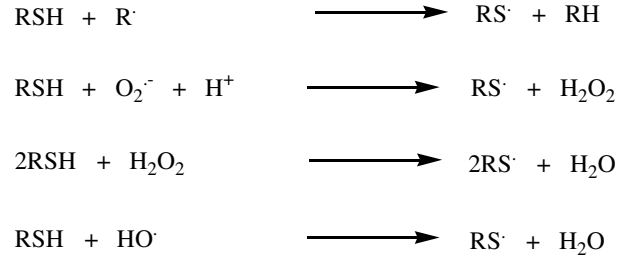
#### **2.2.1.11. Alkoksil radikali (LO<sup>•</sup>):**

Fe<sup>+2</sup> gibi geçiş metalleri iyonlarının, lipit hidroperoksidi indirgemesi ile oluşur. Alkoksil radikalinin okside LDL oluşturarak hücre ölümüne sebep olduğu bildirilmiştir [46].

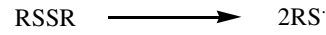
#### **2.2.2. Oksijen Türevi Olmayan Serbest Radikaller**

Oksijen ve ksenobiyotik radikallerinden başka radikaller de vücutta oluşabilmektedir [46].

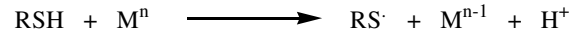
1) Antioksidan etkili tiyol bileşikleri (R-SH) serbest radikalleri etkisizleştirirken, kendileri de tiyil radikallerine (RS<sup>•</sup>) dönüşür:



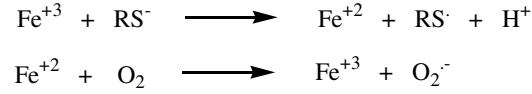
Işığın etkisiyle kendiliğinden de serbest radikal formuna dönüşürler:



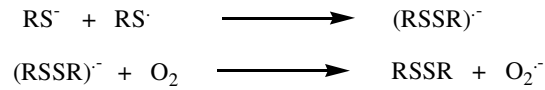
Geçiş metallere varlığında oksitlenerek  $\text{RS}\cdot$  radikali oluşurlar:



Tiyol bileşikleri prooksidan etkisini  $\text{Fe}^{+3}$ 'ü,  $\text{Fe}^{+2}$ 'ye indirirken de gösterildiği gibi tiyol radikallerini ortaya çıkarmaktadırlar. Daha da önemlisi bu reaksiyonlar sonucunda fazladan bir süperoksit radikali de meydana gelmektedir:



Genellikle tiyol bileşikleri vücutta bir tiyolat anyonu ile reaksiyona girmekte ve oluşan disülfid radikal anyonu ( $\text{RSSR}\cdot$ ) ise moleküler oksijenle birleşerek süperoksit ortaya çıkarmakta; bu bileşik de SOD tarafından yıkılmaktadır [43]:



2) Karbon merkezli radikaller, birçok biyolojik sistemde oluşabilmektedir. Örnek olarak  $\text{CCl}_4$  verilebilir:



3) Karbon merkezli radikaller çoğunlukla  $\text{O}_2$  ile reaksiyona girerek peroksil radikali

verirler:



4) Fosfor merkezli radikallerin de olduğu bildirilmiştir.

5) Azot merkezli radikaller de oluşabilir. Örneğin eritrositlerde fenilhidrazin metabolizmasında fenilhidrazin radikali ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}=\text{N}\cdot$ ) oluşur. Bu başlık altında nitrik oksit (NO) önem arz etmektedir.

### **2. 2. 3. Serbest Radikallerin Kaynakları**

Serbest radikaller organizmada metabolik aktivite sonucu olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında yada çeşitli dış kaynaklı etkenler ile oluşabilir [50, 51].

#### **2. 2. 3. 1. Endojen serbest radikal kaynakları**

##### **Plazma membranları**

Plazma membranları, hem serbest radikal oluşturma hem de serbest radikallere hedef olup zincir reaksiyonlarının ve lipid peroksidasyonun gerçekleştiği yer olması nedeniyle büyük öneme sahiptir.

Prostaglandin sentezinde, siklooksijenaz enzimleri tarafından katalizlenen araşidonik asidin oksidasyonu sırasında  $\text{OH}\cdot$  radikali oluşur [52].

##### **Enzimler**

Aktive fagositik hücrelerde, plazma membranındaki indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NADPH oksidaz)  $\text{O}_2\cdot^-$  radikali üretimine aracılık eder [53].

En çok çalışılan enzimlerden biri de ksantin oksidazdır. İn vivo olarak ksantin/hipoksantin oksidasyonu ksantin dehidrojenaz enzimiyle katalizlenir. Bu enzim; substratlardan aldığı elektronları,  $\text{O}_2$  den çok nikotinamid adenin dinükleotid ( $\text{NAD}^+$ )'e taşır. Ksantin dehidrojenaz, purifikasyonu esnasında proteolitik enzimler tarafından tutulması veya tiyol (-SH) gruplarının oksidasyonu nedeniyle ksantin oksidaza dönüşür. Normal in vivo koşullarda, hayvan ve bitki dokularının sitozollerinde yerleşmiş olan bu enzim ile katalizlenen ksantin/hipoksantin metabolizması sonucu  $\text{O}_2\cdot^-$  radikali oluşmaz. Bununla birlikte, doku hasarı olduğunda dehidrojenaz-oksidad dönüşümü meydana gelir. Ksantin oksidaz,

hipoksantin ve ksantinin ürik aside oksidasyonunu katalizler ve bu esnada da  $O_2$ ,  $O_2^{\cdot -}$  ve  $H_2O_2$ 'e indirgenir [54].

Sitokrom P-450, detoksikasyon reaksiyonları sırasında  $O_2^{\cdot -}$  radikalleri oluşumuna neden olur [55].

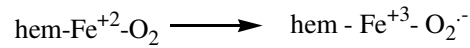
### **Otoksidasyon Reaksiyonları**

Bazı biyolojik moleküller oksijen varlığında oksitlenir ve bu esnada  $O_2$ ,  $O_2^{\cdot -}$  e dönüşür. Bu moleküller, gliseraldehid, indirgenmiş flavin mononükleotid (FMNH<sub>2</sub>), indirgenmiş flavin adenin dinükleotid (FADH<sub>2</sub>), adrenalin, noradrenalin, L-dopa, dopamin, tetrahidropteridinler ve sistein gibi tiyol bileşikleridir. Tetrahidropteridinler; nitrik oksid sentetaz, fenil alanin hidroksilaz ve tirozin hidroksilaz gibi oksijenaz enzimlerinin kofaktörüdür.

$O_2$ , çok reaktif olmadığı için bu otoksidasyonlar demir ve bakır gibi geçiş metal iyonlarının eklenmesiyle hızlandırılır, yani metal iyonlarıyla katalizlenir [50, 54,].

### **Hem Proteinleri**

Demir, hemoglobin ve miyoglobinin hem halkalarında  $Fe^{2+}$  şeklindedir ve  $O_2$  bağlanana kadar bu şekilde kalır.



$Fe^{2+}$  'ye  $O_2$ 'nin bağlanmasıyla,  $Fe^{3+}$  'e de  $O_2^{\cdot -}$  bağlanır. Oksihemoglobin molekülünün dekompozisyonu ile ise  $O_2^{\cdot -}$  açığa çıkar.

Hem halkasındaki  $Fe^{3+}$   $O_2$ 'ne bağlanamaz, bu yüzden inaktiftir ve methemoglobin olarak bilinir (miyoglobin ve metmiyoglobin için de durum aynıdır). İnsan eritrositlerindeki hemoglobinin %3'ünün her gün bu şekilde oksidasyona uğradığı saptanmıştır. Hemoglobin ve miyoglobin oksidasyonu nitrit iyonu veya geçiş metal iyonlarının (özellikle bakır) varlığında hızlanır [56, 57].

### **Mitokondriyel Elektron Transportu**

Çoğu aerobik hücrelerde de  $O_2^-$  radikalinin en önemli kaynağı, elektron transport zincirleridir. Bunlar bakteriyel membranlarda ve ökaryotik hücrelerin mitokondri ve endoplazmik retikulumlarında bulunur.

Mitokondrielerde solunum zincirindeki elektron taşıyıcılarından kaçan elektronlar moleküler oksijenle birleşerek  $O_2^-$  oluşturabilir.

Memeli sitokrom oksidaz aktivitesinin  $O_2$ 'e doymun olduğu durumlarda elektron taşınma oranı ve dolayısıyla  $O_2^-$  radikal oluşumu mitokondrieler tarafından artırılır.

Fizyolojik  $O_2$  düzeylerinde,  $O_2$ 'nin yaklaşık %1-3'ü mitokondride  $O_2^-$ 'e dönüştürülür. Mitokondrinin hasarı sonucu elektron taşınması ve  $O_2^-$  oluşumu artar [58].

### **Mitokondriyel DNA**

Solunum zincirinde mitokondri tarafından  $O_2$  radikallerinin oluşumu; mitokondriyel proteinlere, lipidlere ve DNA'ya hasar verir. Mitokondriyel DNA'daki mutasyonlar yaşlı dokularda birikir [59, 60].

### **Bakteriyel Süperoksid Oluşumu**

*E. Coli* üzerindeki çalışmalar, bazı sitozolik enzimlerin  $O_2^-$  oluşturduğunu fakat başlıca  $O_2^-$  kaynağının elektron transport zinciri olduğunu göstermiştir [61].

### **Peroksizomlar**

Peroksizomlar, yüksek konsantrasyonlarda oksidazlar içermelerinden dolayı hücrel  $H_2O_2$ 'in önemli kaynaklarıdır ve  $H_2O_2$  in prekürsörü olarak da  $O_2^-$ 'in oluştuğu gösterilmiştir. Peroksimal  $H_2O_2$  oluşturan enzimler arasında D-aminoasid oksidaz, urat oksidaz, L- $\alpha$  -hidroksiasid oksidaz ve yağ asidi-açıl-CoA oksidaz bulunur [62].

### **Endoplazmik Retikulum**

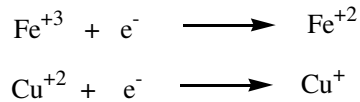
Farklı dokulardan izole edilen ve endoplazmik retikulum içeren mikrozomal fraksiyonlar, NADPH ile inkübe edildiğinde  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  oluştuğu gösterilmiştir. Bu oluşum oranı, yüksek  $O_2$  konsantrasyonlarında artar. Bu reaktif oksijen türleri, büyük ölçüde sitokrom P-450 sisteminden kaynaklanmaktadır [55, 63].

### **Çekirdek**

Hücre çekirdeğini çevreleyen membran, NADH veya NADPH varlığında ve O<sub>2</sub> konsantrasyonlarının artması ile O<sub>2</sub><sup>-</sup> oluşturan elektron transport zinciri içerir. Bu yol, oluşan oksijen radikallerinin nükleer DNA'ya yakın olmasından dolayı canlılar açısından önemlidir [54].

### **Metal İyonlarının Ayrışması**

Geçiş metalleri, özellikle demir ve bakır, fizyolojik şartlarda çeşitli oksidasyon basamaklarında bulunurlar. Oksidasyon basamakları arasındaki elektron alışverişi yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonları ile olur.



Geçiş metalleri bu özelliklerinden dolayı serbest radikal reaksiyonlarını hızlandırır ve katalizör vazifesi görürler. Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub><sup>-</sup>'den OH sentezini katalizlerler.

Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki asıl önemli etkileri ise lipit peroksidasyon üzerine olanlardır [51, 54, 64, 65].

### **2. 2. 3. 2. Eksojen serbest radikal kaynakları**

Eksojen serbest radikal kaynakları olarak ise radyasyon, doğal gaz, sudaki klor ve ozon gibi çevre kirlilikleri, sigara dumanındaki nitrik oksid ve aldehidler ve ayrıca ilaçlar, pestisidler ve diğer ksenobiyotikler gösterilebilir [66, 67].

Uyuşturucu ve alkol gibi alışkanlık yapan maddeler, antineoplastik ajanlar, stres [15], hava kirliliği, toksik kimyasallar, paraquat gibi pestisitler, demir, kurşun ve arsenik gibi metaller, antibiyotikler ve iyonize edici radyasyon başlıca eksojen radikal kaynaklarıdır [68, 69].

### **2. 2. 4. Serbest Radikallerin Etkileri**

Organizmadaki serbest radikal oluşumunun artışına veya antioksidan savunma sisteminin yetersizliğine bağlı olarak oksidan-antioksidan dengesinin radikaller lehine bozulması sonucunda, biyomoleküller ile serbest radikaller kolaylıkla reaksiyon verebilir ve zincirleme reaksiyonları başlatarak yeni serbest radikal oluşumuna neden olurlar [70]. Oluşan serbest radikallerin, çeşitli patolojik durumlara yol açtığı ve biyolojik sistemlerde çok



önemli fizyolojik roller oynadığı gözlenmektedir. Bu radikaller; proteinler, lipitler, karbohidratlar ve nükleik asitleri yıkıma uğratabilir. Poliansature yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olan lipit peroksidasyonu serbest radikallerin uyardığı hücre yıkımında önemli bir mekanizmadır. Birçok hastalıkta doku yıkımı serbest radikaller ve lipit peroksidasyonu sonucu oluşur [71].

#### **2. 2. 4. 1. DNA hasarı**

Herhangi bir nedenle oluşan serbest radikaller ve özellikle lipit peroksidasyonu ürünlerinden malondialdehid, hücre çekirdeğinde DNA ile tepkimeye girebilmektedir. Nükleik asit yapısındaki baz değişimleri veya DNA zincir kopması sonucu kromozal yapıda değişiklikler oluşturarak sitotoksositeye neden olmaktadır. Bugüne kadar oksidatif olarak değişmiş yaklaşık 20 çeşit DNA saptanmıştır [69].

$10^{-5}$  ile  $10^2$  nm arasında yayımlanan iyonize radyasyon, absorbe edilen moleküllerden elektron ayrılmalarına neden olur. Hücrelerin % 70-90'nının su olduğu düşünülürse, bu durumdan en çok organizmadaki su etkilenmektedir. Suyun radyolizi sonucu hidroksil radikali oluşur ve DNA'daki bazları, deoksiribozu etkileyerek, DNA zincirinde kırılmalara veya kopmalara neden olur. Radyasyonun oluşturduğu hasar oksijen kullanan dokularda daha da kendini hissettirir. Radyasyon moleküler oksijenin süperoksit radikaline dönüşmesini sağlamakta, bu radikal ise hem DNA zincirinin kırılması gibi etkilere neden olmakta hem de hidrojen peroksit ve dolaylı olarak hidroksil radikalinin oluşmasında kilit rolü üstlenmektedir [72]. Nitrik oksit radikaline ( $NO\cdot$ ) belirli süre (2 saat) maruz kalan hücrelerde ise DNA sentezin inhibisyonu sonucu DNA hasarının olduğu belirlenmiştir [73].

Radyasyon veya başka etmenler nedeniyle oluşan serbest radikallerin etkisiyle DNA'nın yapısının değişmesi canlının eşey hücrelerindeki mutasyona bağlı olarak döllerin veriminin azalmasına neden olabilmekte, canlıda mutajenik ve karsinojenik etkiler gözlenebilmektedir.

#### **2. 2. 4. 2. Disülfit bağı oluşumu ve proteinlere etkileri**

Glutatyon (GSH) gibi tiyollerin (R-SH) oksidasyonu thiyol ve oksijen radikallerinin oluşumuna neden olur. Her ne kadar hidroksil radikallerinden daha zayıf olsalar da tiyol radikalleri bazı biyolojik sorunlara neden olmaktadır. Bunlar sülfür merkezli radikallerdir (RSH) ve proteinlerdeki homolitik fisyon (sülfürlerin karşılıklı bağlanması) reaksiyonları disülfit bağı oluşturur. Bu da proteinlerin konfigürasyonlarını bozarak

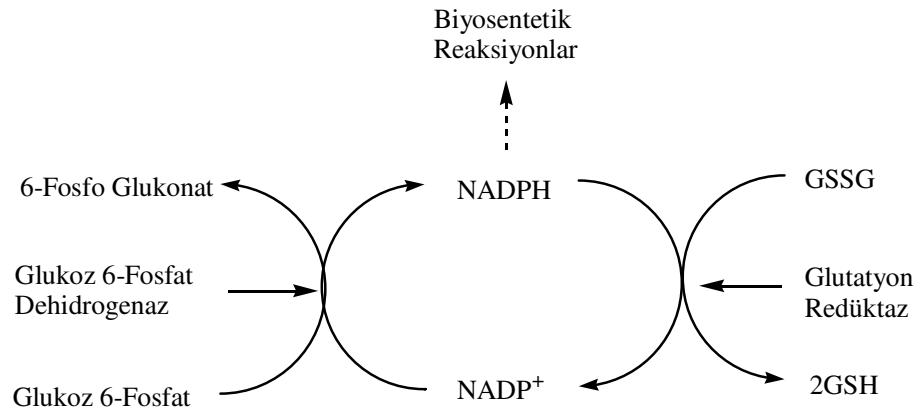
vücuttaki metabolik aktivitelerini engelleyerek proteinlerde ve protein içeren dokularda hasara neden olmaktadır. Bu hasar lipid peroksidasyonu sırasında oluşan radikallerin sülfidril gruplarının disülfid bağlanmalarında artışa neden olması sebebiyle daha da artar [74].

Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme dereceleri, proteini oluşturan amino asitlerin yapılarıyla ilgilidir. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden triptofan, tirozin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenerek sülfür ve karbon merkezli radikaller oluşturabilmektedirler [15].

### **2. 2. 4. 3. Karbonhidratlara etkileri**

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve çarpaz bağlar oluşturabilme özellikleri ile kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynamaktadırlar. Bununla birlikte poliansature yağ asitleri (PUFA) ve karbonhidrat oksidasyonunun bir ürünü olan glyxal'in de hücre bölünmesini inhibe ettiği kaydedilmiştir [15].

Karbonhidrat metabolizmasında, pentoz fosfat yolu antioksidanlardan glutatyonun geri üretimi için, dolayısıyla antioksidan aktivitenin devamı için önemlidir (Şekil 2.1).



**Şekil 2. 1.** Karbonhidrat metabolizmasında antioksidan aktivite

Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz enziminin katalize etmesi ile pentoz fosfat yolunda yeterli miktarda NADPH üretilebilmektedir. Alyuvarlardaki NADPH'in en önemli rolü sülfidril formundaki glutatyonun disülfid formunu (GSSH) indirgenmesidir [75].

Karbonhidrat metabolizmasındaki, glukoz 6-fosfat yetmezliği gibi temel kimyasal bozukluklar, pentoz fosfat metabolik yolunda yeterli NADPH sentezlenememesidir

ve bu olaya bağlı olarak redükte glutasyon (GSH) sentezi de azalmıştır. Antioksidan savunma sisteminin en güçlü elamanı olan GSH eksikliğinde organizma oksidan saldırılara ileri derece duyarlı duruma gelir. Böylelikle organizmadaki oranının üzerinde bir seviyeye ulaşan serbest radikaller diabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik proseslerde önemli rol oynamaktadırlar [76].

#### **2. 2. 4. 4. Lipit peroksidasyonu (LPO)**

Lipitlerdeki doymamış yağ asitleri, otooksidasyona eğilimlidirler. Otooksidasyon iki çift bağ arasındaki metilen grubunun vresinden kolayca etkilenerek, hidrojen atomunun birini kaybetmesi ile oluşan serbest radikalden kaynaklanmaktadır. Hidrojen ayrılmasının ilk nedeni serbest oksijen radikallerinin hareketidir. SOR direkt hasara neden olabildikleri gibi birbirlerini etkileyerek, en reaktif radikal olan hidroksil radikalini oluşturmakta ve doymamış yağ asitlerine (PUFA) etki etmekteiler [68].

Otooksidasyon sonucu veya daha farklı yollardan oluşan serbest radikallerin oranı, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranda olursa organizmalarda biyomolekülleri etkilemektedirler. Bu etkiye en duyarlı olan moleküller lipitlerdir. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyon vererek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipit peroksidasyonu (LPO) olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipit peroksidasyonu ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür [15].

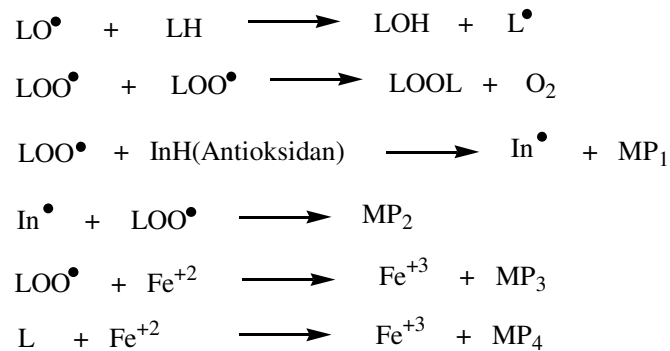
Lipit peroksidasyonu başlama, yayılma ve sonlanma reaksiyonları olmak üzere üç ayrı bölümde incelenebilmektedir.

LPO, otooksidasyonda olduğu gibi organizmada oluşan serbest radikallerden biri veya bir kaçının etkisi ile membran yapısında bulunan çoklu yağ asidi zincirindeki  $\alpha$ -metilen gruplarından bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Biyolojik sistemlerde LPO'nu başlatan serbest radikalin, süperoksit anyonu ve hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Bununla birlikte, LPO'nun uyarılmasında asıl etkili radikalin hidroksil radikali olduğu benimsenmektedir. Serbest radikal etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidinin radikal özelliği kazanmasına neden olmaktadır. Böylece oluşan lipit radikali dayanıksız bir bileşiktir. Molekül içi konjuge dien bağlarının farklı pozisyonlara gelmesi ile değişikliğe uğrayabilen kararsız lipit radikalinin moleküler oksijenle tepkimesi sonucu lipit peroksit radikali meydana gelir [77].

Yayıma basamağında ise lipit peroksit radikalleri başka bir peroksit radikali ile birleşebilir ya da membran proteinleriyle etkileşebilir. Fakat en önemlisi, peroksi radikallerinin membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomlarını çıkarabilmeleri ve peroksidatif zincir reaksiyonlarını yaymalarıdır. Böylece, yan zincirden hidrojen atomunun çıkarılması ile her defasında lipit hidroperoksitleri (LOOH) ve yeni bir peroksit ( $LOO^\bullet$ ) radikali oluşmaktadır [78].

Peroksidasyon bir defa başladıktan sonra yüzlerce yağ asidi zinciri lipit hidroperoksitlerine dönüştürülmekte, böylelikle olay kendi kendine katalizlenerek devam etmektedir. LPO'nda yayılma zincirinin uzunluğu; membrandaki lipit-protein oranı, doymamış yağ asidi içeriğinin artması, oksijen konsantrasyonu ve vitamin E benzeri zincir reaksiyonlarını kesen antioksidanların varlığı gibi pek çok faktöre bağlıdır [78].

LPO demir ve bakır iyonları ya da bu iyonların oluşturduğu fosfat esterleriyle oluşturduğu basit şelatları ( $Fe^{+2}$ -ADP), hem, hemoglobin ve myoglobini de içeren bazı demir proteinleri, lipit hidroperoksitlerini bozarak peroksidasyonu sonlandırmaktadırlar [78]. Bu kompleks bozunma ürünleri de etan, pentan, aldehit, peroksitler, alkoller, hidroksi yağ asitleri ve diğer karbonil bileşikleridir [79]. Eğer LPO sonucunda oluşan bozunma ürünleri arasında herhangi bir serbest radikal var ise zincir tepkimelerinin sonlanması aşağıdaki reaksiyonlarda gösterildiği gibi gerçekleşmektedir.



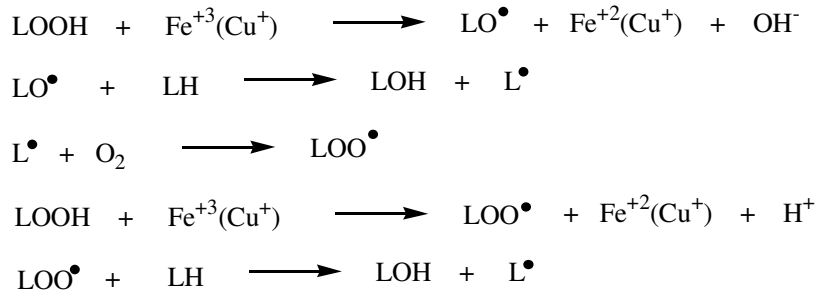
Lipit hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak reaktif olan aldehitler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda, malondialdehid (MDA) meydana gelir [79].

MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik yada kantitatif bir indikatörü değildir fakat lipit peroksidasyonunun derecesi ile iyi bir korelasyon gösterir. Bu sebeple organizma da

oluşan LPO düzeyini ölçmek için MDA seviyelerinin ölçümü, sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. MDA, tiyobarbitürik asit ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve oluşan bu çözeltinin absorpsiyon değerlerinden LPO'nun derecesi saptanmaktadır [79].

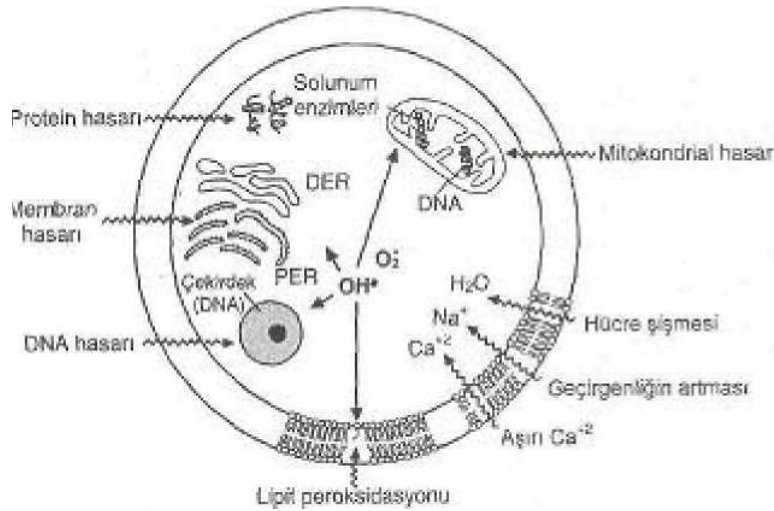
Peroksidasyonla oluşan ve son aldehit ürünlerinden olan MDA, membran bileşenlerinin çarpaz bağlanarak polimerizasyonuna yol açmaktadır. Bununda, hücre membranının şekil değiştirebilme, iyon transportu, enzim aktivitesi, hücre yüzey bileşenlerinin bütünlüğünün korunması gibi intrinsik özellikleri değiştirdiği, protein sentezini, inhibe ettiği, makrofaj hareketlerini durdurduğu ve kemo taksitise neden olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca MDA'nın difüzyon özelliğine sahip olduğu için DNA'nın azot bazları ile de reaksiyon verdiği ve bütün bu özelliklerinden dolayı lipid peroksidasyonun göstergesi olarak MDA'nın ölçümünün biyolojik olarak önemli olduğu bilinmektedir [15].

Bununla birlikte ortamda metal iyonlarının ve özellikle geçiş metallerinin varlığı LPO'nun derecesini artıracak yönde etki etmektedir. Geçiş metalleri aşağıdaki tepkimelerde ifade edildiği gibi LPO'nu başlatmaktan ziyade, sentezlenmiş olan



lipid hidroperoksitlerinin parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize ederler. Böylece daha az zararlı olan radikalleri daha zararlı hale getirmektedirler [15].

LPO ve kükürt içeren proteinlerin oksidasyonu sonucu membran geçirgenliği ve kırılabilirliğinin artması ile membran enzimlerinin aktivitesi azalmakta ve Şekil 2. 2'de ifade edildiği üzere hücreye  $\text{Ca}^{+2}$  girişi artmaktadır [69].



**Şekil 2. 2.** LPO aracılığı ile oluşan hücre hasarı

Hücre içi serbest  $Ca^{+2}$  artışına bağlı olarak artan fosforilaz aktivitesi fosfolipit kaybının artmasına, membran geçirgenliğinde değişiklik ve potansiyel kaybına bağlı toksik etkide artışa, proteaz aktivasyonu ile proteolitik etkinin şiddetlenmesine, katabolik enzimlerin aktivitesinde artışa ve endonükleaz aktivitesi ile DNA kırılmalarına yol açmaktadır [69].

Lipit peroksidasyonu, biyolojik zarların özelliklerinde ciddi hücre hasarlarına yol açan değişiklikler yaparak hastalık patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Yaşlanma, kronik kalp hastalıkları ve kanser başta olmak üzere birçok hastalıkta lipit peroksidasyonunun önemli rol oynadığı bilinmektedir. LPO sırasında oluşan; lipit hidroperoksitleri doğrudan DNA zincirlerini kırabilmekte, lipit peroksil ve alkoksil radikalleri ise DNA'da oksidasyona sebep olabilmektedirler [79].

Lipit peroksidasyonunun önlenmesinde vitamin E'nin selenyum ile de ilişkisi vardır. Selenyum, glutatyon peroksidaz (GPx) enziminin ayrılmaz bir parçasıdır. Çünkü GPx hücre membranında peroksidasyon olayını önler, böylece lezyon hücre duvarındaki yapılarda görülen bozukluklar engellenmiş olur [80].

### 2. 3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Aerobik organizmalar metabolizmaları esnasında oksijen kaynaklı radikalleri oluştururlar. Bununla beraber, serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri bulunur. Sağlıklı bireylerde oluşan ROS'lar ile antioksidan savunma sistemi arasında bir denge söz konusudur. Bu dengenin bozulması, oksidatif stresle sonuçlanmaktadır [81]. Antioksidanların ilk belirlenen etkileri membranların yapısında bulunan lipitlerin peroksidasyona karşı korunması olmuştur. Günümüzde ise, antioksidanların koruyucu etkilerinin lipitlerin yanı sıra proteinleri, nükleik asitleri ve karbonhidratları da kapsadığı gösterilmiştir. Böylece, antioksidanlar hedef moleküllerdeki oksidan hasarı engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmıştır ve bu tanımla bağlantılı olarak antioksidanların etkileri farklı akillerde olabilmektedir [82]. Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler [83]:

1) Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

- Başlatıcı reaktif türevlerini uzaklaştırıcı etki,
- Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etki,
- Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki.

2) Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

- Toplayıcı (scavenging) etki: ROS'u tutma ve çok daha az reaktif başka bir moleküle çevirme (Ör: Enzimler).
- Bastırıcı (quencher) etki: ROS ile etkileyip onlara bir proton ekleyerek aktivite kaybına neden olma (Ör: Flavonoidler, vitaminler).
- Onarıcı (repair) etki.
- Zincir kırıcı (chain breaking) etki: ROS ve zincirleme reaksiyonları başlatacak diğer maddeleri kendilerine bağlayıp fonksiyonlarını önleyici etki (Ör: Hemoglobin, seruloplazmin, mineraller).

Fizyolojik koşullarda, hücreler serbest radikal ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olabilecek oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur. Bu sistemler şu şekilde sınıflandırılabilir:

### **Enzimatik Antioksidanlar :**

1) Primer Enzimatik Antioksidanlar: Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-S-transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GR)'dir.

2) Enzimatik Antioksidanlarla İlişkili Olanlar: NADPH-kinolon oksidoredüktaz, epoksit hidrolaz, UDP-glukuronil transferaz, sülfonil transferaz, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) ve  $\alpha$ -fosfoglukonat dehidrojenazdır.

**Enzimatik Olmayan Antioksidanlar:** Bunlar glutatyon (GSH), vitamin A, C ve E ile flavonoidler, melatonin, ürik asit, albümin, haptoglobulin, sistein, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, ferritin, oksipurinol, ubiquinon, bilirubin, mannitol, lipoik asit ve hemopeksindir.

Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayanlar ise hücre dışında daha fazla etkilidir (istisna olarak; GSH hücre içi güçlü bir antioksidandır.) [82].

### **2. 3. 1. Enzimatik Antioksidanlar**

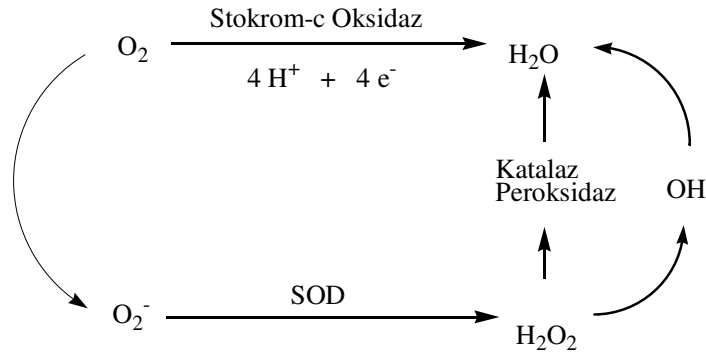
Aerobik organizmalar oksijen toksisitesinden başlıca üç enzim yardımıyla korunur. Bunlar; süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalazdır [74].

#### **2. 3. 1. 1. Süperoksit dismutaz (SOD, E.C. 1. 15. 1. 1)**

Hemen hemen bütün hücreler SOD'a sahiptir. Ancak bazı mikrobik türlerde oksijenin aşırısı enzimi engelleyebilmektedir. SOD formları oksijenin çift değerli indirgenmesine ek olarak genel solunum enzimleri yoluyla stokrom oksidaz ve bazı tek değerli indirgemelerin oluştuğunu işaret etmektedir. Örneğin bir hücre sudaki mevcut oksijen miktarının % 95'ini indirgeyebilirken % 5'ini süperoksit radikaline dönüştürebilmektedir [72]. Oksijenin suya dönüşümü ise Şekil 2. 3'de gösterildiği gibi gerçekleşmektedir.

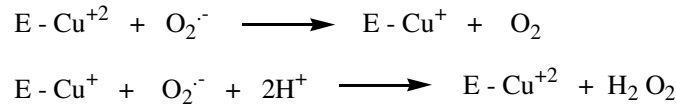
SOD bir metaloenzimdir (Stoplazmik SOD  $\text{Cu}^{+2}$  ve  $\text{Zn}^{+2}$  içerirken, mitekondrideki enzim  $\text{Mn}^{+2}$  içerir) ve aerobik hücrelerde her tarafa yayılmıştır. Mitekondriyal SOD, intramitekondriyal süper oksit anyonunu çok düşük veya sabit konsantrasyonlarda kalmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte oksijen toksisitesini engelleyen SOD'ın rolü halen tartışılmaktadır. Aerobik hücrelerdeki oksijenin çoğunluğu solunum zincirinde, oksijen radikallerinin toksisitesini engelleyen stokrom-c oksidaz enzimi varlığında indirgenerek su oluşur [74].



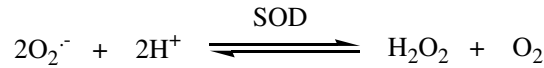


Şekil 2. 3. Oksijenin Suya Dönüşümü

SOD, toksik süperoksit anyonunun çok hızlı bir şekilde giderilmesini katalizler. Süperoksit oksidasyon metabolizmasının bir ürünüdür. SOD etkisiyle süperoksit hidrojenperoksit, daha sonra ise katalazın katalizlediği reaksiyonla moleküler oksijene ve suya dönüşmektedir. Reaksiyon, aşağıda da ifade edildiği üzere, SOD tarafından +2 yüklü bakıra bağlı enzimin indirgenmesi ve sonra oksitlenmesi şeklinde iki basamakta katalizlenmektedir [84].



Yukarıda ifade edilen iki tepkimenin toplam reaksiyonuna, tek tür reaktantın tepkimesiyle iki tür ürüne dönüşme reaksiyonu anlamına gelen ve aşağıda gösterilen dismutasyon reaksiyonu denmektedir [75].



SOD'ın aktif bölümü çevresindeki elektriksel alan, ES (Enzim-Substrat) kompleksinin oluşumunu yaklaşık olarak 30 kat artırmaktadır. Bu da dismutasyon reaksiyonunun oluşmasını kolaylaştırmaktadır. Reaksiyonda önce süperoksit anyonu enzimdeki arjininin guanido grubuna bağlanır. Bu bağlanma sırasında bir elektronunu  $Cu^{+2}$ 'ye vererek  $Cu^{+1}$ 'e dönüştürürken kendisi moleküler oksijene ( $O_2$ ) dönüşür. Başka bir süperoksit anyonu  $Cu^{+1}$ 'e verilen elektronu ve ortamdaki 2 protonu (FT) alarak  $Cu^{+1,i}$  tekrar

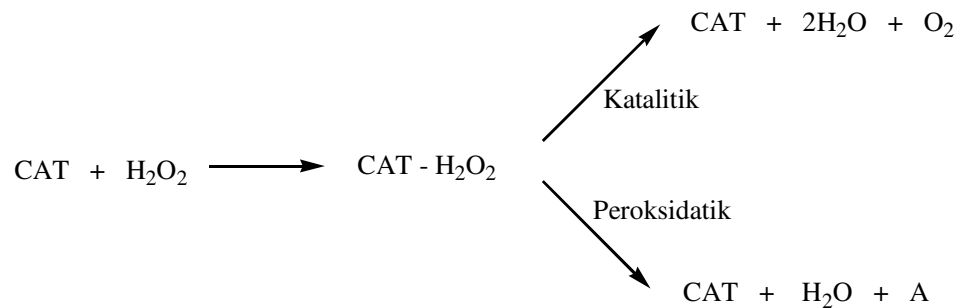
$\text{Cu}^{+2}$ 'ye dönüştürür ve hidrojen peroksit oluşur [85, 86]. Böylelikle SOD, süperoksit radikalının oluşturabileceği hasarları detoksifiye etmiş olur.

SOD'nin dismutasyon reaksiyonu, anyonik substrat moleküllerinin bağlanmasını ve proton, elektron ve diğer ajanların tamamının hızla gerçekleşen reaksiyonlarını kapsamaktadır [84].

### **2.3.1.2. Katalaz (CAT, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oksidoreduktaz, E.C. 1.11.1.6)**

Organizmaların, serbest radikallerin aşın birikmesine karşı kendilerini korumada görev alan enzimlerden biri de katalazdır. Katalaz, SOD'ın süperoksit radikallerinden oluşturduğu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile metabolik yollardan oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerektiği oranda indirgeyerek suya dönüştürür [68]. Vücut için toksik etkiye sahip H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in fazlalığı katalazın yanında peroksidazla detoksifiye edilmektedir [72]. Kanseri, diabet, katarakt, ateroskleroz, istemik-reperfüzyon hasarı, artrit, nörodejeneratif hastalıklar, beslenme yetersizliği ve yaşlanmayı içine alan pek çok patolojik şartlarda ortaya çıkan oksidatif strese karşı savunmada antioksidan sistemin öncelikli bir enzimi olan katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) primer antioksidan savunma sistemidir [79].

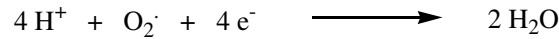
Katalaz enzimi, yapısında dört adet hem grubu içeren alt ünitelerden oluşmuş kompleks bir hemoproteindir. Yapısında prostetik grup olarak Fe<sup>+3</sup> içeren protoporfirin IX ihtiva etmekte ve sitokrom sistemi içeren tüm aerobik hücrelerde bulunmaktadır. Enzim esas olarak peroksizomlarda lokalize olmakla birlikte endoplazmik retikulum ve sitozolde de yoğunur. Aktivitesi karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde yüksektir. Bağ doku ise enzim aktivitesinin en düşük olduğu kısımdır. Aşağıdaki reaksiyonda ifade edildiği üzere katalazın peroksidatik ve katalitik olmak üzere iki fonksiyonu vardır. Katalazın temel fonksiyonu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in enzimatik parçalanmasının yanında (katalitik aktivite);



Düşük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunda, metil veya etil hidroperoksitler, metanol, etanol, fenol gibi küçük moleküllü elektron vericilerini indirgeyebilme özellikleri de (peroksidatik aktivite) bilinmektedir. Fakat katalaz, lipit peroksitleri gibi büyük molekülleri indirgeyememektedir. Enzim bir molekül H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den elektron alarak onu oksitlerken kendisi redüklenir, bir diğer molekül H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e elektron vererek onu indirgerken kendisi oksitlenerek başlangıçtaki durumuna dönmektedir [85].

### **2. 3. 1. 3. Mitokondrial sitokrom oksidaz**

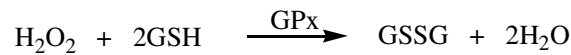
Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye eden enzimdir.



Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyon olup bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır. Ancak, süperoksit üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşar. Bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin zararlı etkilerine engel olurlar.

### **2. 3. 1. 4. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px, E.C. 1. 11. 1. 9):**

Glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve büyük moleküllü lipit hidroperoksitlerinin indirgenmesinden sorumludur. Sitozol ve mitokondride yerleşmiş 4 selenyum atomu içeren tetramerik yapıda bir enzimdir. Karaciğerde en yüksek; kalp, akciğer ve beyinde orta; kasta düşük aktivitede bulunur. GSH-Px'in plazma formu böbrek tarafından sentezlenmektedir. GSH-Px, düşük hidrojen peroksit konsantrasyonlarında GSH'nın okside glutatyona (GSSG, glutatyon disülfid) oksidasyonunu katalize eder; bu arada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de suya dönüştürülerek detoksifiye edilmiş olur[44, 87].



### **2. 3. 1. 5. Tiyoredoksin redüktaz (E.C. 1. 6. 4. 5):**

Tiyoredoksin redüktaz, piridin nükleotidleri ile disülfid/tiyol bileşikleri arasında elektronların transferini, FAD ve redoks aktif disülfid ile uyarılarak katalize eden, dimerik flavoenzim ailesinin bir üyesidir. Enzim ailesi, mekanizma ve yapı bakımından benzer lipoamit dehidrojenaz, glutatyon redüktaz ve merkürük redüktazı da içine alır. Bunlar tek basamakta

katalizlerini gerçekleştirirken, tiyoredoksin redüktaz iki basamakta reaksiyonu batırmaktadır. Tiyoredoksin redüktaz iki tiptedir: Prokaryotlarda 70 ve ökaryotlarda 112-130 kDa ağırlığında alt formlardadır [88, 89].

### **2. 3. 1. 6. Glutatyon redüktaz (GR, E.C. 1. 6. 4. 2):**

GSH-Px tarafından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve diğer lipit peroksitlerin redüksiyonu sırasında glutatyon, okside glutatyonla dönüştürülür. Bu okside formun ileride kullanılmak üzere tekrar redükte GSH'ya dönüştürülmesi gereklidir. Çünkü organizmanın glutatyon deposu sınırlıdır. Flavin nükleotidlere bağımlı bir enzim olan GR, pentoz fosfat yolundan elde edilen NADPH varlığında, glutatyon disülfiti tekrar redükte glutatyonla (GSH) çevirir [44, 87].



### **2. 3. 1. 7. Glutatyon-S-transferaz (GST, E.C. 2. 5. 1. 18):**

GST'ler iki protein alt biriminden oluşan bir enzim ailesidir. 20 adet sitozolik formu bulunur ve bunlardan beşi membrana bağlı enzimdir. Membrana bağlı enzimler arasında lökotrien-C4 sentetaz; mikrozomal GST 1, 2, 3 ve prostaglandin E sentetaz bulunur. GST 1 sadece GSH-Px aktivitesi; GST 2 ve 3 ise hem GSH-Px hem de lökotrien-C4 sentetaz aktivitesi göstermektedir. Organizmaya giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Ayrıca GSH-Px aktivitesi de gösterirler. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipit hidroperoksitleri (ROOH), Se-bağımsız olarak etkisizleştirirler:



Antioksidan aktivitelerinin yanısıra çok önemli fonksiyonları da vardır. Ağrı, ateş, yangı, kanser, apoptoz, alerji ve astım gibi süreçlerde yer alırlar. Bilirubin ve kortikosteroidler gibi endojen maddeleri geri dönüşümlü olarak bağlayarak; bunların hücre içi transportunda görev alırlar. Bazı güçlü alkilleyici ajanlara doğrudan kovalent bağlanarak hücre proteinler ve makromolekülleri bu ajanların etkisinden korurlar. GST'ler lökotrien B<sub>4</sub> ve prostaglandin sentezinde rol oynarlar [90].

### **2. 3. 2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar**

#### **2. 3. 2. 1. Glutatyon (GSH):**

Önemli bir intrasellüler antioksidandır ve ekstrasellüler alanda çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. Glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden meydana gelmiş bir tripeptittir. GSH'ya antioksidan özelliğini, sisteinin tiyol grubu kazandırır. Glutatyon, OH<sup>-</sup> ve singlet O<sub>2</sub> gibi ROS'ların temizleyicisidir. Serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Ayrıca proteinlerdeki -SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı muhafaza eder. Demirin, Fe<sup>+2</sup> (ferröz) halde tutulmasını sağlar. Böylece; protein ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller, hatta rejenere olmalarını sağlar. GSH birçok enzimin kofaktörüdür (Ör: HMGC<sub>o</sub>A Redüktaz). Tiroid hormon sentezinde rol oynar. Bazı moleküllerin hücre içi taşınmasına aracılık eder. Birçok kimyasalın karaciğerde detoksifikasyonunda rol oynar [44, 83].

#### **2. 3. 2. 2. Vitamin C (Askorbik asit):**

Vitamin C (askorbat), bir ketolaktondur. Suda eriyen vitaminlerden olan askorbik asit özellikle taze yeşil sebze ile meyve ve turuncgillerde bol miktarda bulunur, insanlarda askorbat hidroksilasyon reaksiyonlarını katalize eden enzimlerin kofaktörü olarak görev alır. Burada enzimlerin enzimatik aktivitelerini tam olarak kazanmaları için prostetik metal iyonlarına elektron sağlar. Örneğin kollajen sentezinde görevli prolil ve lizil oksidazlar için kofaktör olarak davranır. Çok güçlü bir indirgeyici ajan olan vitamin C; sulu fazlarda zincir kırıcı antioksidan olarak süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri, hipoklöröz asit, aküöz peroksil radikalleri ve singlet oksijen ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. Antioksidan etkisi esnasında, askorbat iki elektron ile indirgenerek semidehidroaskorbil radikaline ve sonra da dehidroaskorbata dönüşür. Dehidroaskorbat stabil değildir ve kolayca okzalik aside dönüşen diketogulonik aside hidrolize olur. Vücutta dehidroaskorbatın tekrar askorbata indirgeyen iki mekanizma vardır: Selenoenzim tiyoredoksin redüktaz ve redükte GSH. Ayrıca, antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller. Yine vitamin C, tokoferoksil radikalinin tokoferole redüklenmesini de sağlar [83, 91].

C vitamininin antioksidan etkisinin yanında oksidan etkisi de söz konusudur. Çünkü vitamin C ferrik demiri (Fe<sup>+3</sup>), ferröz demire (Fe<sup>+2</sup>) indirgeyen süperoksit dışındaki tek hücresel ajandır:



Bu yolla askorbik asit, proteine bağılı ferrik demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan indirgeyerek Fenton reaksiyonunda  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile etkileşmeye uygun olan ferröz demire dönüştürür. Yani  $\text{O}_2^-$  üretimine katkıda bulunur.

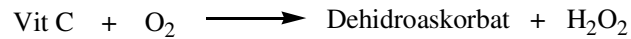
Vitamin C'nin  $\text{Fe}^{+3}$  ile doğrudan reaksiyonunda C vitamini radikali (Vit C) de oluşur:



Vit C çok reaktif değildir. Ya NADH redüktaz tarafından indirgenir ya da iki proton alıp serbest radikal reaksiyonlarının ilerlemesini durdurur:



Bundan başka vitamin C oksidasyonundan  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'de meydana gelebilir [87, 91]:

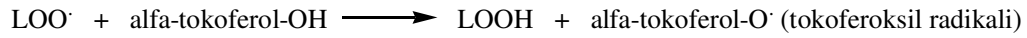


### **2.3.2.3. Vitamin E (Tokoferol):**

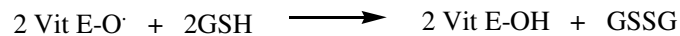
Vitamin E, tokoferol biyolojik etkisi taşıyan 8 farklı bileşiğin ortak ismidir. Bunlar  $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -ve  $\delta$ -tokoferol ile  $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -ve  $\delta$ -tokotrienoldür. D tokoferol biyolojik olarak en yüksek aktiviteye sahiptir. Diğer tokoferoller ve tokotrienoller ise daha az aktiviteye sahip iken gıdalarda daha bol olarak bulunmaktadır. Tokoferoller bir kromonal halka ile bir -fitil kuyruktan oluşur ve birbirlerinden bu kromonal halkada değişik sayı ve pozisyonlarda metil gruplarının bulunması ile ayrılmışlardır. Tokotrienoller yapı olarak  $\alpha$ -tokoferollere benzerler; fakat doymamış yapıda bir -fitil kuyruk takmaktadırlar. Antioksidan etkisi en fazla olanı da  $\alpha$ -tokoferoldür. Yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır [44, 83, 87, 92, 93].

En yüksek vitamin E konsantrasyonu, mitokondri ve mikrozoimler gibi membrandan zengin hücre kısımlarında bulunur. Çok güçlü bir antioksidan olan E vitamini, hücre membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkilerinden koruyan bir savunma elemanıdır. Bir molekül vitamin E, 100 molekül yağ asidinin peroksidasyonunu

önleyebilir. Vitamin E;  $O_2^{\cdot -}$ ,  $OH^{\cdot}$ , singlet  $O_2$ , lipit peroksil radikallerini ( $LOO^{\cdot}$ ) ve diğer radikalleri temizler. Lipit peroksil radikallerini yıkarak lipit peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırdığından yağlı fazlar için zincir kırıcı bir antioksidan olarak da bilinir [44, 83, 87, 92]:



Sonuçta oluşan stabil özellikteki tokoferoksil radikalinde kromonal halkada fazladan bir elektron vardır ve kendi kendine lipit peroksidasyonu başlatmak için yeterince reaktif değildir. Glukuronik asitle oksidasyona uğrayarak safra yolu ile atılır. E vitamini ve GSH-Px, serbest radikal etkisine karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. GSH-Px, oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırırken E vitamini sentezlerini engeller. Ayrıca GSH-Px'in yapısına katılan  $Se^{+2}$ 'un organizmadan kaybını önler ve enzimi aktif şekilde tutar. Onsan eritrositlerinin hidrojen peroksit ile *in vitro* ortamdaki hemolizi, E vitamini tarafından önlenir. E vitamini, okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce sulu fazlarda askorbik asit ve GSH tarafından yeniden indirgenebilir. Alternatif olarak iki  $\alpha$ -tokoferol radikali birleşerek stabil bir dimer oluşturur ya da tamamen okside olarak tokoferol quinon oluşturur [44, 83, 87, 93].



#### **2. 3. 2. 4. Vitamin A (Retinol) ve P-karoten:**

Karotenoidler, izoprenoid karbon iskeletine sahip lipitlerde çözünebilir antioksidanlardır. Membran ve lipoproteinlerde 20 farklı tipi görülse de bunlardan en önemlisi (3-karotendir. A vitamininin metabolik ön maddesi olan (3-karoten son derece güçlü singlet  $O_2$  temizleyicisi olup; ayrıca düşük oksijen basıncında  $\alpha$ -tokoferol gibi hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleriyle de doğrudan reaksiyona girerek, lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonunu kırabilir. Ayrıca karotenoidler A vitamini (retinol) prekürsörüdür. A vitamini, oksijen etkisi ile kolayca oksitlenir. Görme, üreme, büyüme, epitel hücre sağlığında rol oynar [44, 87].

#### **2. 3. 2. 5. Melatonin:**

Melatonin, pineal bez tarafından üretilen ana indolamin bileşiğidir. Lipofilik olması nedeniyle seruma göre safrada daha çok bulunur; safra kesesi ve ince barsağı oksidatif strese karşı korur.  $OH^{\cdot}$  radikalini temizleyen ve GSH sentezini uyaran çok güçlü bir antioksidandır.

Bunun yanı sıra SOD, GSH-Px ve GR enzimlerinin aktivitelerini de arttırmaktadır. OH<sup>·</sup> ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüşür. Bu radikal de O<sub>2</sub><sup>·-</sup> radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterir. Lipofilik olması nedeniyle hücrenin tüm organellerine ve birçok dokuya rahatça girerek antioksidan etkisini geniş bir alanda kolayca gösterir. Hücre çekirdeğine girebilmesi nedeniyle DNA'yi oksidatif hasara karşı korur. Melatonin çok yüksek dozlarda, uzun süreli kullanımında bile toksik bir etki göstermez ve prooksidan aktiviteye sahip değildir. Yaşlılıkta melatonin de azaldığı için yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı bazı hastalıkların patogeneğinde önemli rolü olabileceği bildirilmiştir. Sonuç olarak, melatoninin klinik açıdan etkili bir antioksidan ve antikanserojen olduğuna inanılmaktadır [94, 95].

#### **2. 3. 2. 6. Ürik asit:**

Pürin metabolizmasının son ürünü olan ürik asit, allantoine dönüşerek normal plazma konsantrasyonlarında lipit radikalleri dışında tüm serbest radikalleri temizler. Özellikle ozon gibi okside edici ajanlara karşı koruyucu etki sağlar. Demir ile stabil reaktif olmayan bileşikler oluşturarak ve C vitaminin oksidasyonunu engelleyici etkisi ile antioksidatif etki gösterir [44, 83].

#### **2. 3. 2. 7. Albümin:**

Albümin, yapısında bulunan 17 tiyol grubu aracılığıyla bakır iyonlarını sıkıca bağlar ve bakır bağımlı lipit peroksidasyonu ile OH<sup>·</sup> oluşumunu inhibe eder. Albümine bağlı bakır bazı oksidan oluşumlarda bulunabilirse de, oluşan radikaller biyolojik olarak önemsizdirler. Albümin aynı zamanda yapısındaki sisteinden dolayı etkin bir fagositik HOCl temizleyicisidir; bu özelliği kanda serbest yağ asitlerini taşıması açısından önemlidir. Albümine bağlı bilirübünün antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir. Özellikle yenidoğanlarda diğer zincir kırıcı antioksidanların olmaması nedeniyle hayati rolü vardır [44, 82, 83].

#### **2. 3. 2. 8. Sistein:**

O<sub>2</sub><sup>·-</sup> ve OH<sup>·</sup> radikallerinin temizleyicisidir [48, 83].

#### **2. 3. 2. 9. Bilirübin:**

“Hem” katabolizmasının sonucunda oluşan safra pigmenti bilirübünün, lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği ve OH<sup>·</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> radikallerinin temizleyicisi olduğu bilinmektedir [82, 83].



### **2.3.2.10. Seruloplazmin:**

Plazmada majör bakır içeren proteindir. Seruloplazmin, ferro-oksidad aktivitesi ile  $Fe^{+2}$ 'yi  $Fe^{+3}$ 'e okside eder. Böylece Fenton reaksiyonunu ve serbest radikal oluşumunu inhibe eder. Demir ve bakır bağımlı lipit peroksidasyonunu önleyici etki gösterir. Aynı zamanda bir akut faz reaktandır ve yangısal hadiselerde seviyesi artar [44, 82, 83].

### **2.3.2.11. Ferritin, transferrin ve laktoferrin:**

Ferritin dokulardaki, transferrin dolaşımdaki, laktoferrin lökositlerdeki serbest demiri bağlar ve serbest radikal oluşumunu önler [44, 82, 83].

### **2.3.2.12. Haptoglobin ve hemopeksin:**

Hemoglobin, gerek dekompozisyonla ortama demir vererek; gerekse doğrudan peroksitlerle etkileşerek lipit peroksidasyonunu uyarabilir. Haptoglobin hemoglobini, hemopeksin Hem'i bağlayarak, bu demir bileşiklerinin lipit peroksidasyonunu uyarmasını engeller [82, 83].

### **2.3.2.13. Mannitol:**

$OH\cdot$  radikalini temizleyici etki gösterir [82, 83].

### **2.3.2.14. Oksipurinol:**

Allopurinol metaboliti olup, doğrudan  $OH\cdot$  ve  $HOCl$  radikallerini azaltıcı etki gösterir [82, 83].

### **2.3.2.15. Probukol:**

Kan kolesterolünü düşürmede kullanılan bir ilaç olup, güçlü antioksidan özelliği vardır. Lipit peroksidasyon zincirini kırıcı özellik taşır [82, 83].

### **2.3.2.16. Desferroksamin (DFO):**

DFO,  $Fe^{+3}$ 'ü bağlar ve oluşan bu bileşikteki demirin indirgenmesi son derece zordur. Bu sayede demir serbest radikal oluşumuna katılamaz [15, 82].

### **2.3.2.17. Lipoik asit:**

Lipit peroksidasyonunu önler.  $OH\cdot$  ve singlet  $O_2$  toplayıcısıdır.  $H_2O_2$ 'yi indirger. Vitamin E tüketimine karşı koruyucudur [82, 83].

### **2. 3. 2. 18.Flavonoidler:**

Çay, şarap ile birçok meyve ve sebze de bulunan flavonoidler polifenolik antioksidanlardır. 4000'den fazla çeşidi bulunan flavonoidler; flavonoller (quersetin, kaimferol), flavanoller (kateOnler), flavonlar (apigenin) ve izoflavonlara (genistein) ayrılmışlardır. Epidemiyolojik çalışmalar flavonoid alımının koroner kalp rahatsızlıkları gibi çeşitli kronik hastalıkların insidensini azalttığını göstermiştir. Farklı mekanizmalarla lipit peroksidasyonunu engellerler [44, 82, 83].

### **2. 4. Oksidatif Stres**

Oksidatif stres (OS), pro-oksidan bileşiklerin oluşumuyla birlikte, yetersiz antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengenin oksidan bileşiklerin lehine artması sonucu ortaya çıkan doku hasarı olarak tanımlanmaktadır [96]. Pro-oksidanlar reaktif ürünler olup, reaktif nitrojen ürünleri (RNS) ve reaktif oksijen türleri (ROT) olarak iki gruba ayrılırlar. ROT; süperoksit radikalleri ( $O_2^{\cdot -}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), nitrik oksit (NO), peroksit radikalleri ( $ROO^{\cdot}$ ), hidroksil radikalleri ( $OH^{\cdot}$ ) ve hypoklorus radikallerini kapsar ve bunlar hücrede normal metabolik bir olayın ürünüdürler [97].

Oksidatif bileşiklerin oluşumu, fizyolojik şartlarda inflamasyon ve doku tamiri sürecinde önemli bir basamaktır. Bu oluşum doku iyileşmesi ve yeniden oluşumuna katkısı yanında malin hücrelere ve vücuda giren mikroorganizmalara karşı savunma mekanizmasının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. OS; ateroskleroz, hipertansiyon, nörodejeneratif değişiklikler, yaşlanma ve malinite gelişmesi ile ilişkisi bulunmuştur. Diğer taraftan, uygunsuz veya uyumsuz bir şekilde oksidatif süreç başlamasına, hücre ve doku hasarına neden olan üremi gibi bir takım kronik patolojik durumlar da söz konusu olabilir [98].

#### **2. 4. 1. Oksidatif Stres Belirteçleri**

Oksidanlar, yarı ömürleri saniyeler olan ve yüksek derecede tepkime veren reaktif bileşiklerdir. Bu nedenle, in vivo olarak değerlendirilmeleri uygun değildir. Aksine, oksiradikaller tarafından modifiye edilen lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitlerin yarı ömürleri saatlerden haftalara kadar değişen bir uzama gösterir. Bu durum, oksidatif stresin değerlendirilmesinde, bunların değerli belirteçler olmasına olanak sağlamaktadır [99]. OS ve antioksidan belirteçleri çizelge 2. 2'de gösterilmiştir.

Lipit peroksidasyonunda; doymamış yağ acil kısımlarının peroksil radikal bağımlı zincirleme reaksiyonlarıyla, kararsız hidroperoksitler oluşur. Akrolein, malonidialdehid gibi

aldehidler, 4-hidroksinonenal veya tiobütirikasit reaktif maddeler, F2-izoprostanlar gibi küçük ve kararlı bileşiklere dönüşürler.

F2-izoprostanlar, araşidonik asit oksidasyonunun birincil ürünleridir, *in vivo* olarak, hücre membran fosfolipidlerinin serbest radikallerce etkilenmesinin dengeli bir belirteci olarak ortaya çıkabilirler [100]. Son zamanlarda yapılan çalımlarda; F2-izoprostanların, aynı yaş ve cinsiyette olan normal bireylerle kıyaslandığında, HD hastalarında 2-4 kat daha yüksek düzeylerde olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda, C-reaktif proteinle (CRP) de sıkı bir ilişkisinin olduğu ortaya konmuştur [101]. Bu ailenin uç reaktif elektrofillerinden bir diğleri ise izolevoglândinlerdir ve araşidonik asitin serbest radikaller tarafından oksidasyonu sonucunda oluşur. Bunlar F2-izoprostanlar gibi plazmada bulunmazlar. Eteri derecede reaktif olduklarından proteinlere bağılı olarak taşınırlar [102]. Ayrıca, ileri lipit oksidasyon son ürünlerindeki artış, oksidize düşük yoğunluklu lipoproteine (ok-LDL) karşı gelişen özgün antikorların varlığı, artmış OS'in gösterilmesi için yararlı belirteçler olarak gösterilebilir [100].

**Çizelge 2. 2.** Oksidatif stres ve antioksidan belirteçleri

<b>OKSİDATİF STRES BELİRTEÇLERİ</b>	<b>ANTİOKSİDAN BELİRTEÇLERİ</b>
<b>Lipit peroksidasyonu</b>	<b>Enzimatik</b>
Akrolein	Süperoksit dismutaz
Malondialdehid	Katalaz
4-hidroksinenal	Glutasyon peroksidaz
Tiyobarbutirik asit reaktif maddeler	<b>Enzimatik olmayan</b>
F2-izoprostanlar	Glutasyon
Eteri lipit oksidasyon ürünleri	Vitamin E
<b>Protein oksidasyonu</b>	Vitamin C
Eteri oksidasyon protein ürünleri	Ferritin
Karbonhidrat oksidasyonu	Transferin
Eteri glikasyon son ürünleri	Albümin
Nükleik asit oksidasyonu8-hidroksi-	2-deoksiguanozin

Proteinlerin proteolize dayanıklı olmasını sağlayan çapraz bağlar ve agregasyon ürünleri, oksidan bağımlı hasarda seçkin hedeflerdir. Bununla birlikte, protein oksidasyonunun belirteçlerini tespit etmek güçtür [103]. Oksidatif olarak değişime uğramış olan plazma proteinleri ve aminoasitleri, aynı zamanda *in vivo* olarak önemli birer OS biyokimyasal belirteçlerdir. Nispeten çoğu proteinlerin plazma yarı ömürlerinin uzun olması, protein ve aminoasit oksidasyonunun iyi tanımlanmış biyokimyasal yollarının olması, plazma lipitleri ile kıyaslandığında belirlenebilen daha spesifik OS yollarının bulunması; plazma proteinlerinin ve aminoasitlerinin daha kabul edilebilir örnekler olmasını sağlamıştır. Örneğin, proteinlerin aminoasitlerinin oluşturduğu zincirde aminoasil ucunun oksidasyonu, ilgi çeken bir oksidasyon reaksiyon belirteçidir. Tirozin artıklarının oksidasyonunun tespiti, özel oksidatif yolların son ürünlerinin ortaya konması açısından daha duyarlı ve daha özgündür. Tirozin artıklarının oksidasyona uğraması sonucu, sırasıyla hakim olan oksidasyon türlerinden hipoklorik asit, reaktif nitrojen türlerine veya hidroksil iyonu gibi serbest radikale bağlı olarak 3-klorotirozin, 3-nitrotirozin veya ditirozin oluşur. Bunlardan 3-klorotirozin, HD hastalarında daha yüksek düzeylerde saptanmıştır [102, 104].

Üremik hastalarda oksidasyona uğramış proteinler araştırılmış ve ileri oksidize protein ürünleri, olarak adlandırılan bu ürünler karakterize edilmiştir [105]. Eteri oksidize protein ürünleri monositlerin aktivasyon belirteçleri ile sıkı ilişki içerisinde olup inflamasyon mediyatörleri olarak yer alabilirler. Oksidasyona bağlı hasarın belirtisi olan, ditirozin ve ileri glikasyon son ürünü pentozidin plazma konsantrasyonu ile korelasyon gösterirler. Eteri oksidize protein ürünleri ile ileri glikasyon son ürünleri arasındaki güçlü bağların varlığı, ileri glikasyon son ürünlerinin varlığında, glikasyonla birlikte oksidasyonun olduğu karbonil stresi düşündürmektedir [103].

Sonuçta, oksidatif bileşikler nükleik asitle tepkimeye girerek mutageneze ve onkogeneze neden olmaktadır. KBY'li hastalarda, lökosit nükleik asitlerinin oksidatif hasara uğradıkları yeni ortaya konulmuştur. Lökosit DNA hasarını değerlendirmek amacı ile yüksek performanslı sıvı kromatografisinde 8-hidroksi-2-deoksiganin düzeyi araştırılmış ve KBY'de düzeyinin arttığı, SDBY'de ise daha yüksek düzeylerde olduğu belirlenmiştir [106].

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3. 1. Materyal

Bu çalışmamızda iki grup oluşturularak oksidatif stres belirteçleri çalışıldı. Birinci grup uzun süre kronik olarak arseniğe maruz kalmış kişilerden oluşturuldu. İkinci grup ise sigara ve alkol kullanmayan, belirgin bir sistemik hastalığı olmayan, son bir aydır hiçbir ilaç kullanmayan gönüllü kişilerden kontrol gurubu oluşturuldu.

Yapılan ön araştırmalar sonucunda Emet'in İğde köyü kronik arsenik maruziyeti bakımından alan olarak seçilmiş ve buranın kronik arsenik intoksikasyonunda en ileri düzeyde olduğu yapılan araştırmalarda (2001 yılında Çevre ve Orman Bakanlığının yaptırmış olduğu analiz sonucuna göre iğde köyü kuyu suyu arsenik miktarı 1.133mg/L) tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmalarda iğde köyünde yaşayan 33 adet denekten kan örnekleri alındı.

Kontrol grubu için üniversite öğrencilerinden seçilmiş 20 gönüllüden oluşturulmuştur.

Çalışmaya alınan kişilerden 5 mL venöz kan EDTA'lı ve düz polistrentüplere alındı. Numuneler en kısa zamanda plazmaları ayrılarak farklı effendorf tüplerine alınarak çalışma gününe kadar derin dondurucuda saklandı.

Her iki gruptan alınan plazma örneklerinde antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri ve lipit peroksidasyon seviyesini belirlemek amacıyla malondialdehit (MDA) düzeyleri belirtilen metotlara göre tesbit edildi.

#### 3. 1. 1. Kullanılan Kimyasallar :

Bakır Sülfat Penta Hidrat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma
Sodyum Sitrata	Sigma
Sodyum Karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Sigma
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma
Sodyum Wolframat Dihidrat ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma
Sodyum Molibdat Dihidrat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma
Fosforik Asit ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )	Merck
Hidroklorik Asit (HCl)	Merck

Lityum Sülfat ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ )	Sigma
Sodyum hidrojen Fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Sigma
SodyumDihidrojen Fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Sigma
Hidrojen Peroksit (% 30 v/v'lik $\text{H}_2\text{O}_2$ )	Merck
Potasyum Klorür (KCl)	Sigma
6-Hidroksi Dopamin (6-OHDA)	Sigma
Triklor Asetik Asit (TCA)	Sigma
Tiyobarbütirik Asit (TBA)	Sigma
Sığır serum albumin (BSA)	Sigma
Malondialdehit bis (1, 1, 3, 3, tetraetoksi propan)	Sigma

### 3. 1. 2. Kullanılan cihazlar :

U.V. Spektrofotometresi (Shimadzu U.V. mini 1240)

Santrifüj (Hettich D- 78522)

Elektronik terazi Ohaus (AR 2140)

Karıştırıcı ve ısıtıcı (Heipolph MR 3001)

Otomatik pipetler (Biotic Proline)

### 3. 1. 3. Kullanılan çözeltiler :

1) Fosfat tamponu(pH:7; 50mM) hazırlamak için; 4,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve 2,72g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  tartılıp suda çözüldü ve hacmi damıtık su ile 1 L'ye tamamlandı.

2)  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisi hazırlamak için; %30 v/v'lik  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisinden 0,2 mL alınarak 100 mL'lik ölçülü balona konuldu ve fosfat tamponu ile hacim 100 mL'ye tamamlandı. Bu karışımın 240 nm'deki absorbansı 0,45-0,50 arasında olmalıdır.

3) 1 mM KCl çözeltisi (0,01 M HCl içeren) (6-OHDA'in çözücüsü): 0,0149 g KCl suda çözüldü ve 0,176 mL derişik HCl (% 35'lik,  $d=1,184$  g/mL) ilave edildi, hacmi suyla 200 mL'ye tamamlanır.

4) 0,01 M 6-OHDA çözeltisi (SOD aktivite tayini için kullanılan çözelti): 0,005 g 6-OHDA 2 mL 1 mM'lık KCl çözeltisinde çözülür. KCl çözeltisi, azot gazıyla doyurulur.

5) 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu (SOD aktivite tayini için kullanılan tampon): 1 tablet PBS suda çözülerek hacmi 40 mL'ye tamamlanır.

6) %10'luk Triklor Asetik Asit (TCA): 10 g TCA tartılarak 100 mL'lik balonjojeye alındı ve 100 mL distile su içinde çözdürüldü.

7) % 0.675'lik Thiobarbitrik Asit (TBA): 0.675 g TBA tartılarak 100 mL'lik balonjojeye konuldu ve 100 mL distile su içerisinde çözdürüldü.

8) A Reaktifi: 0.5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ve 1 g sodyum sitrat 100 mL bidistile suda çözülür.

9) B Reaktifi: 20 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ve 4 g NaOH 1 L bidistile suda çözülür.

10) C Reaktifi: 50 mL B çözeltisine 1 mL A çözeltisi ilave edilir (Taze hazırlanmalıdır).

11) D Reaktifi (Phenol-Folin-Ciocalteu reaktifi): 1500 mL'lik bir balona 100 g  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 25 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 700 mL bidistile su, 50 mL % 85  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ve 100 mL HCl konulur. 10 saat geri soğutucu altında yavaşça ısıtılır. Soğuduktan sonra üzerine 100 g  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , 50 mL bidistile su ve 5 damla brom ilave edilir. 15 dk kaynatılarak bromun fazlası uçurulur. Bu kaynatma geri soğutucusuz olarak yapılır. Muhteviyat soğutulur ve 1 L'lik balonjoje aktarılır. Distile su ile 1 litreye tamamlanır. Koyu renkli şişede muhafaza edilir. Uygun şartlarda reaktifin rengi sarıdır. Yeşil renk, reaktifin bozulduğunu gösterir. Kullanılacağı zaman 1 mL D reaktifinden alınıp, üzerine 1 mL bidistile su ilave edilir (1/1).

12) BSA standart çözeltisi (10 g/L): 100 mg BSA bidistile suda çözülerek 10 mL'ye tamamlandı. Diğer standartlar bu çözeltiden seyreltilerek hazırlandı.

13) Malondialdehit bis (1, 1, 3, 3, tetraetoksi propan) standart çözeltisi.

### 3. 2. Metot

#### 3. 2. 1. Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçme Yöntemi

Bu yöntem, 240 nm dalga boyunda hidrojen peroksidin ( $H_2O_2$ ) verdiği absorbans değerinin katalaz enzimi aktivitesi sebebiyle zaman içerisinde azalma göstermesi ve bu azalmanın spektrofotometrik olarak izlenmesi temeline dayanır [107].  $H_2O_2$ 'in spektrofotometrik olarak 240nm dalga boyunda absorbansındaki düşmenin 1 dakika(AA/t dakika) izlenmesi ile katalaz aktivitesi belirlenir. Deney, Çizelge 3. 1.'de belirtilen sıra takip edilerek yapılır.

**Çizelge 3. 1.** Katalaz (CAT) aktivitesi ölçme yöntemi

	Deney	Tanık deney
Fosfat tamponu	---	0,01mL
$H_2O_2$ çözeltisi	3,00mL	3,00mL
Numune(Homojenat)	0,01mL	---

Deney ve tanık deney çözeltilerinin absorbanslarındaki değişim (AA / t dakika), damıtık suya karşı 240 nm dalga boyunda 1 dakika boyunca spektrofotometrik olarak izlenerek okunur.

Katalaz aktivitesi hesaplanması :

Bir dakika sonundaki absorbans değişimleri arasındaki fark( $\Delta A / t$  dakika),  $H_2O_2$ 'nin molar absorpsiyon katsayısı ( $\epsilon$ ) ve 10  $\mu$ L numune alınarak yapılan deneylerde katalaz aktivitesi aşağıdaki bağıntıyla hesaplandı.

$$H_2O_2 \text{ 'in molar absorpsiyon katsayısı} (\epsilon_{H_2O_2}) = 40,98 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{CAT akt.} = ((\Delta A_D / t \text{ dakika}) - (\Delta A_{\text{tanıkD}} / t \text{ dakika})) \times (1 / \epsilon_{H_2O_2}) \times (1 / \epsilon) \times (V_T / V_{Nm})$$

$$\text{CAT akt.} = (\Delta A / t \text{ dakika}) \times (1 / 0,04098 \text{ L} / \text{mmol.cm}) \times (1/\text{cm}) \times (3,01 \text{ mL} / 0,01 \text{ mL})$$

$$\text{CAT aktivitesi} = (\Delta A / t \text{ dakika}) \times 7345 (\mu\text{mol/mL.dakika})$$

$\mu\text{mol/dakika} = \text{EÜ}$  olduğundan;

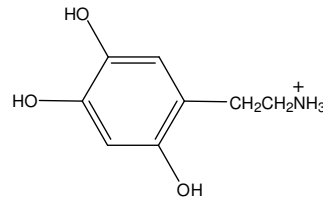
$$\text{CAT(EÜ/mL)} = (\Delta A / t \text{ dakika}) \times 7345$$



$$\text{CAT(EÜ/mg protein)} = ((\text{AA} / \text{t dakika}) \times 7345) / \text{Protein derişimi(mg/mL)}$$

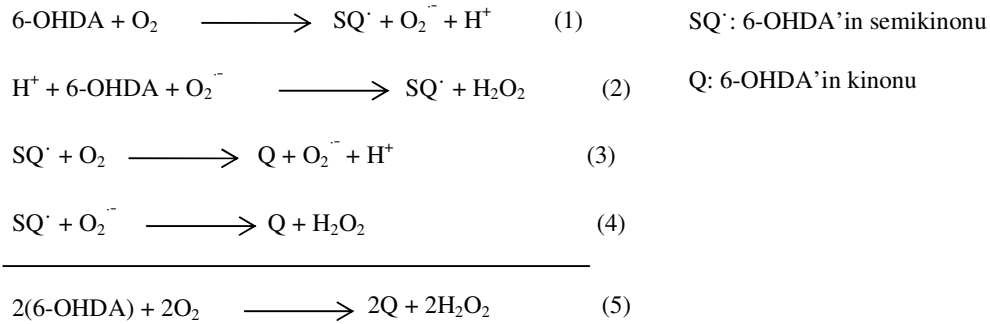
### 3. 2. 2. SOD Aktivite Tayini

Aktivite tayin metodu, 6-hidroksidopaminin (6-OHDA) otooksidasyonuna, SOD'nin inhibisyon etkisinin spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır [108, 109, 110, 111]. SOD için 1 E.Ü., “bir dakikada, 6-OHDA'in otooksidasyon başlangıç hızını % 50 azaltan enzim miktarı” olarak kabul edilmiş ve spektrofotometrik ölçümler 490 nm'de oksidasyonun 60. saniyesine kadar yapılır. Çünkü 60. saniyeye kadar otooksidasyon hızının eğimi sabittir.



6-Hidroksidopamin

6-OHDA'in otooksidasyon reaksiyonu aşağıdaki şekildedir.



6-OHDA ile oksijen arasında yukarıdaki şekilde bir yükseltgenme-indirgenme (redoks) reaksiyonu olur. Bu reaksiyon sonucunda, 6-OHDA'in semikinonu, süperoksit anyonu ve proton meydana gelir (1). Bu reaksiyonun ürünlerinden süperoksit anyonu ve proton, 6-OHDA ile reaksiyona girerek semikinon (6-OHDA'in yükseltgenmesi ile oluşur) ve hidrojen peroksit (süperoksitin indirgenmesi ile oluşur) oluşumuna sebep olurlar (2). Daha sonra semikinon da oksijen ile reaksiyona girerek kinona yükseltgenir ve oksijen süperoksit anyonuna indirgenir (3). Bu sırada oluşan süperoksit, semikinonları kinona yükseltgerken hidrojen peroksite indirgenir. Reaksiyonlardan da görüleceği gibi 6-OHDA'in oksijen ile yükseltgenmesi sırasında oluşan süperoksit anyonu (1 ve 3) yükseltgenme olayının devamına katkıda bulunmakta (2 ve

4) ve böylece reaksiyonu hızlandırmaktadır. Reaksiyon ortamında SOD mevcut olması durumunda süperoksit anyonu uzaklaştırılacağı için, süperoksitten gelen reaksiyon hızına etki ortadan kalkacak ve reaksiyon hızı azalacaktır. Bu azalma oranının, reaksiyonda oluşan oksidasyon ürünlerinin 490 nm’de absorbans vermeleri nedeni ile takip edilebilmekte ve enzim ünitesi (E.Ü.) tanımı yapılabilmektedir.

**Çizelge 3. 2.** 50 µL’lik numune hacmi göz önünde bulundurularak hazırlanmış SOD aktivitesi ölçüm prosedürü:

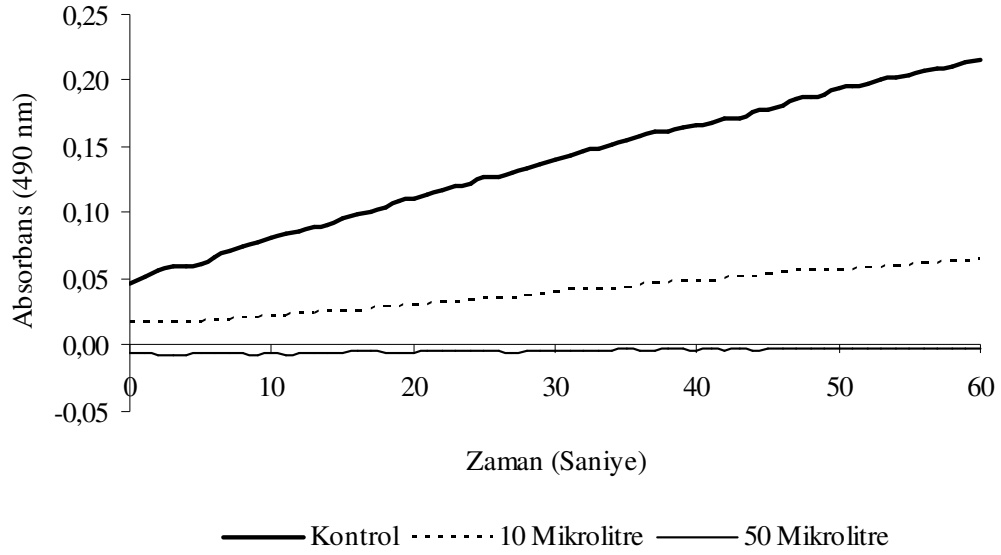
	Kör Küveti	Numune
0,05 M fosfat tamponu (pH 7,4)	670 µL	670 µL
Numune	50 µL	50 µL
Oksijen gazı uzaklaştırılmış 1mM KCl çözeltisi (0,01 M HCl içeriyor)	30 µL	-
0,01 M 6-OHDA çözeltisi ilavesi		30 µL
Toplam	750 µL	750 µL

Kontrolde (6-OHDA’in otooksidasyonu) numune yerine fosfat tamponu (0,05 M, pH 7,4) kullanılır. Numune miktarının azaltılması gerektiği durumlarda azaltılan numune miktarı kadar tampon çözelti küvetlere ilave edilir.

Önek hesaplama :

Örnekte, 6-OHDA otooksidasyona bırakıldığında, 60. saniye sonunda 0,17 birimlik bir absorbans farkı oluşmaktadır. Bunun % 50’si 0,085 birimdir. E.Ü. tanımına göre, 0,085 birimlik absorbans azalmasına sebep olacak enzim miktarı 1 E.Ü.’dir. 10 µL numunenin mevcudiyetinde ise absorbans artış hızında (reaksiyon hızı) azalma olmuştur ve  $\Delta A$  0,047 birimdir. Bu durumda aktivite aşağıdaki gibi hesaplanmıştır [112].

Aktivite (E.Ü.)= $(0,17-0,047)/(0,17/2)=1,45$  E.Ü. Yani 10 µL numunede 1,45 E.Ü. vardır.



Şekil 3. 1. SOD inhibisyon grafiği

### 3. 2. 3. Plazma MDA analizi

MDA, aerobik şartlarda TBA ile 90°C’de inkübasyonu sonucu pembe renkli kompleks oluşturur. Bu kompleksin absorbansı spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda okunur [113].

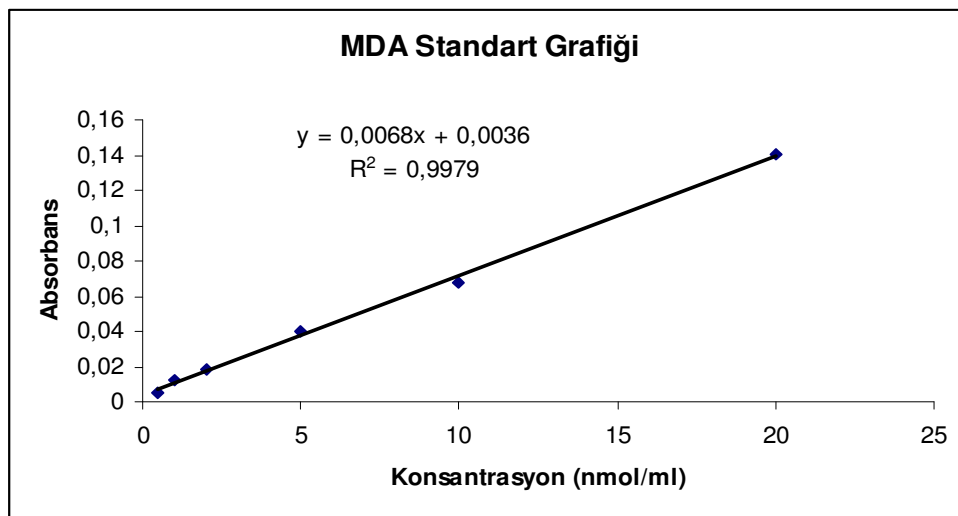
Her deney tüpüne 2.5 mL % 10’luk TCA üzerine de 0.5 mL plazma konuldu. Vorteksle karıştırıldıktan sonra, tüpün ağzı kapatılıp 90°C’ deki su banyosunda 15 dakika bekletildi (Çizelge 3. 3.). Su banyosundan alınan tüpler, buz içerisinde 15 dakika bekletildikten sonra, oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edildi.

2 mL süpernatant alınarak başka tüpe aktarıldı ve üzerine % 0.675’lik TBA’dan 1 mL ilave edilerek, 90°C’deki su banyosunda 15 dakika bekletildi. Örnekler tekrar buz dolu kap içerisinde 15 dakika bekletildikten sonra, oda sıcaklığına gelmesinin ardından spektrofotometrede 532 nm’de kör tüpüne karşı absorbansları okundu. Kör tüpü hazırlanırken, deney başlangıcındaki plazma yerine 0.5 mL distile su alınıp diğer işlemlerin aynısı uygulandı.

**Çizelge 3. 3.** Plazmada MDA Analizinin Yapılışı.

	<b>Kör</b>	<b>Örnek</b>
% 10'luk TCA	2.5 mL	2.5 mL
Plazma		0.5 mL
Distile su	0.5 mL	
90°C su banyosunda 15 dakika bekletildi.		
15 dakika buz içerisinde bekletildi.		
Süpernatant	2 mL	2 mL
% 0.675'lik TBA	1 mL	1 mL
90°C su banyosunda 15 dakika bekletildi. 15 dakika buz içerisinde bekletildi.		

Standart olarak malondialdehit bis (1, 1, 3, 3, tetraetoksi propan) kullanıldı. Plazma yerine 0.5 mL hazırlanan standartlar eklenerek diğer işlemlerin aynısı uygulandı. Elde edilen sonuçlara göre konsantrasyon – absorbens grafiği elde edildi. Numunelerin konsantrasyon değerleri bu grafik göz önünde bulundurularak hesaplandı.

**Şekil 3. 2.** MDA standart grafiği

### 3. 2. 4. Total Protein Tayini

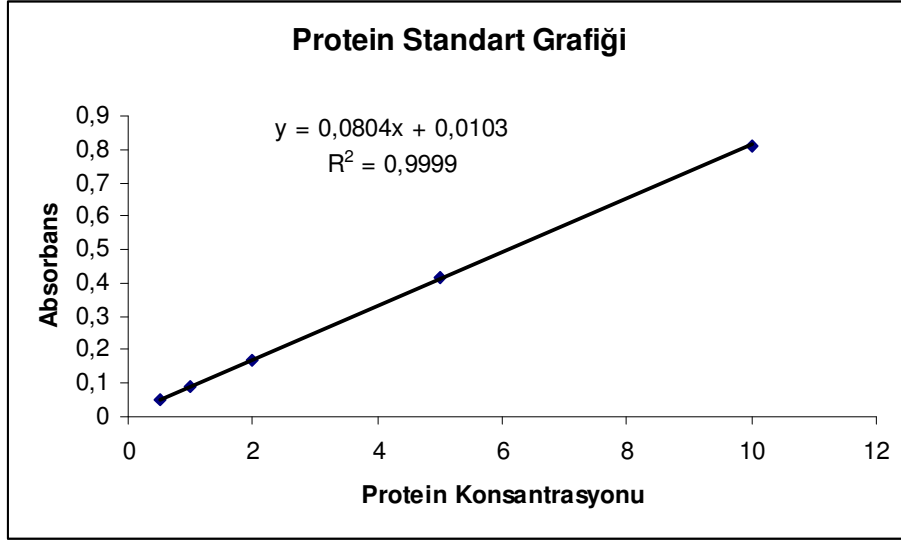
Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşur. Bu kompleks fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini redükler ve koyu mavi bir renk oluşur. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır [114]. Folin reaktifinin ilavesinde şu önemli kaideye dikkat etmek gerekir ki bu reaktif yalnız asidik ortamda dayanıklıdır. Tarif edilen bu redüklenme ise pH 10'da gerçekleşmektedir. Bundan dolayı folin reaktifi alkali bakır-protein çözeltisine hemen ilave edilmeli ve derhal şiddetle karıştırılmalıdır. Bu suretle fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifi parçalanmadan önce indirgenme olayı gerçekleşir.

**Çizelge 3. 4.** Total protein ölçümünde işlem basamakları

	Kör	Numune	Standart
Numune (µL)	—	10	10
Su(µL)	500	490	490
C Reaktifi (mL)	2.5	2.5	2.5
Tüpler vortekslenir ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.			
D Reaktifi (mL)	0.25	0.25	0.25

Tüplerin ağızları parafilm ile kapatılarak 25 °C'da 20-30 dakika beklenir ve 700 nm'de distile suya karşı okunur [114].

Standart çözelti olarak sığır serum albümin (BSA) kullanıldı. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartların absorbanlarına göre protein standart grafiği elde edildi.



**Şekil 3. 3.** Protein standart grafiği

Hesaplama, standart grafiğinden numunelerin konsantrasyonları belirlendi.

### 3. 2. 5. İstatistiksel Analiz

Elde edilen bulgular istatistiki olarak değerlendirilerek, aritmetik ortalamaları (X) ve standart sapmaları (SD) bulundu. Gruplar arasındaki farkın karşılaştırılmasında ANOVA (tek yönlü varyans analizi) testi yapıldı. Değişkenler arasındaki ilişki ise Pearson korelasyon analizi ile değerlendirildi ve anlamlılık sınırı olarak  $p < 0,05$  kabul edildi. Bu istatistiki işlemler Prism 3.03 paket programı ile gerçekleştirildi.

#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda kontrol ve kronik olarak arseniğe maruz kalmış kişiler olmak üzere iki grup oluşturuldu. Bu iki grupta oksidatif stres belirteçlerinden lipit peroksidasyon düzeyi belirlenmesi için MDA değerleri ile oksidatif enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) belirtilen metotlara göre çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2. de gösterilmiştir.

**Çizelge 4. 1.** Kronik olarak arseniğe maruz kalan kişilerin MDA, CAT, SOD değerleri

Hasta no	MDA (nmol/ml)	CAT (U/mg)	SOD (U/mg)
1	3,288	8,071	0,238
2	3,577	6,988	0,268
3	3,058	11,282	0,402
4	3,75	9,423	0,428
5	3,173	7,395	0,381
6	2,942	7,608	0,499
7	2,827	11,337	0,391
8	2,712	7,230	0,361
9	2,019	7,096	0,353
10	7,038	10,954	0,423
11	3,115	4,179	0,306
12	2,365	10,899	0,454
13	3,865	13,983	0,408
14	3,923	10,040	0,340
15	2,596	12,007	0,385
16	3,462	6,372	0,306

**Çizelge 4. 1.** Kronik olarak arseniğe maruz kalan kişilerin MDA, CAT, SOD değerleri (devamı)

17	2,165	8,716	0,399
18	2,077	13,290	0,398
19	2,365	9,534	0,451
20	6,461	7,490	0,411
21	1,558	5,805	0,279
22	4,154	7,928	0,331
23	3,115	6,113	0,369
24	2,942	10,194	0,342
25	3,000	12,110	0,450
26	2,596	7,683	0,326
27	3,058	7,388	0,372
28	2,480	5,636	0,315
29	4,327	8,393	0,336
30	3,173	7,708	0,396
31	3,115	5,713	0,319
32	7,326	9,011	0,307
33	3,231	14,018	0,340



Çizelge 4. 2. Kontrol grubu MDA, CAT, SOD değerleri

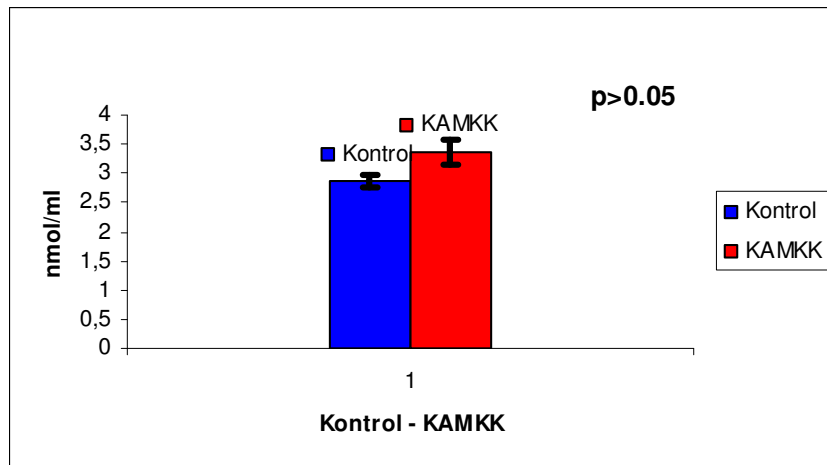
Hasta no	MDA (nmol/ml)	CAT (U/mg)	SOD (U/mg)
1	3,32	17,259	0,576
2	3,6	17,764	0,609
3	2,28	11,683	0,582
4	3,04	10,346	0,538
5	2,72	13,513	0,695
6	3	11,337	0,447
7	1,84	10,339	0,601
8	2,84	9,568	0,659
9	3,52	13,681	0,629
10	2,56	9,533	0,439
11	3,07	12,538	0,608
12	2,92	10,602	0,546
13	2,67	13,236	0,672
14	2,51	12,807	0,437
15	2,69	13,542	0,567
16	3,05	10,684	0,613
17	3,18	11,564	0,486
18	2,46	16,534	0,61
19	3,23	10,642	0,542
20	2,72	12,812	0,564

Çizelge 4. 1. ve Çizelge 4. 2.'deki değerlere göre her iki grubun ortalama ve standart sapma değerleri hesaplandı. Kontrol grubu ortalama ve standart sapma değerleri MDA ( $2.861 \pm 0.09492$ ), CAT ( $12.50 \pm 0.5401$ ) ve SOD ( $0.5710 \pm 0.01658$ ) olarak hesaplandı. Kronik olarak arseniğe maruz kalmış kişilerin ortalama ve standart sapma değerleri MDA ( $3.359 \pm 0.2280$ ), CAT ( $8.836 \pm 0.4397$ ) ve SOD ( $0.3662 \pm 0.01026$ ) olarak hesaplandı.

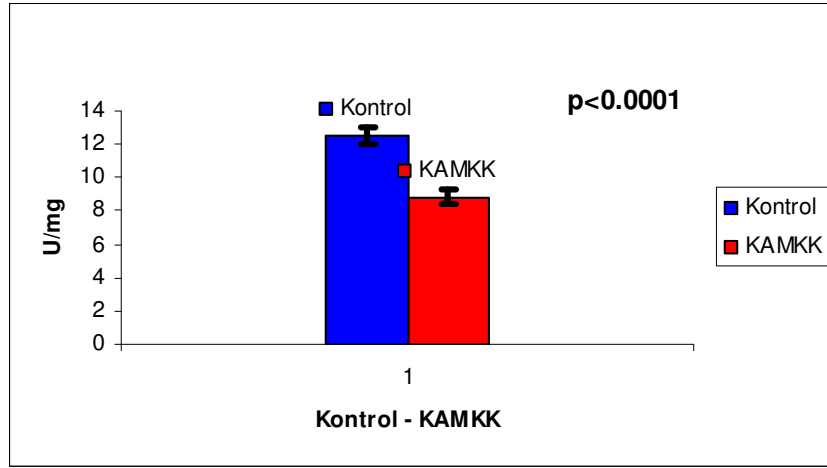
**Çizelge 4. 3.** Gruplar arasında değerlerin karşılaştırılması

	Kontrol (n = 20) Ortalama + S.D.	KAMKK (n = 33) Ortalama + S.D.	p
MDA	$2.861 \pm 0.09492$	$3.359 \pm 0.2280$	$>0,05$
CAT	$12.50 \pm 0.5401$	$8.836 \pm 0.4397$	$<0,0001$
SOD	$0.5710 \pm 0.01658$	$0.3662 \pm 0.01026$	$<0,0001$

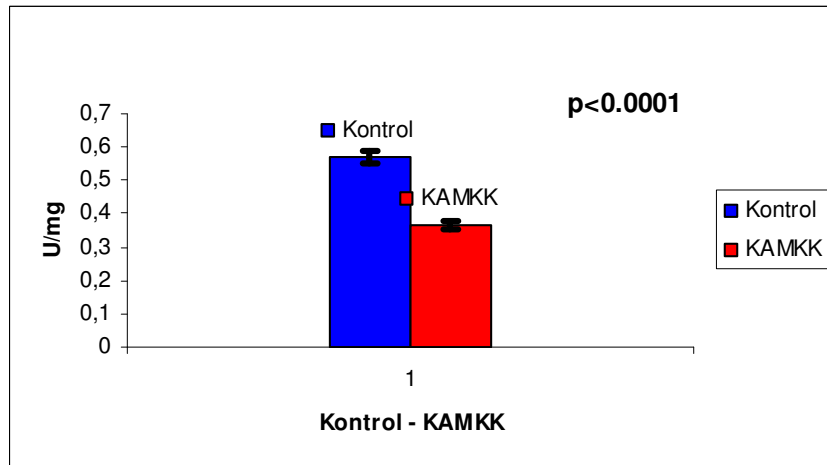
Yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında değerler karşılaştırılarak iki grup arasındaki ilişki tespit edilmiştir. Kronik arseniğe maruz kalan kişilerin MDA düzeyleri arttığı fakat istatistiksel olarak anlamlı ( $p>0,05$ ) bir ilişki olmadığı tespit edildi. Bunu yanında antioksidan enzimlerden katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,0001$ ) olarak azaldıkları bulundu.



**Şekil 4. 1.** Kontrol ve KAMKK grubu MDA düzeyi Ortalama ve standart sapma değerleri.



Şekil 4. 1. Kontrol ve KAMKK grubu CAT düzeyi Ortalama ve standart sapma değerleri.



Şekil 4. 1. Kontrol ve KAMKK grubu SOD düzeyi Ortalama ve standart sapma değerleri.

## 5. TARTIŞMA

Arsenik azot ailesinden metalloid özellik gösteren bir elementtir [115]. Kokusuz ve renksiz olan arsenik gastrointestinal sistem, solunum sisteminden ve parenteral yollardan absorbe olur. İnorganik arseniğin gastrointestinal absorpsiyon hızı çok yüksektir. En fazla absorpsiyon ince bağırsaktan olur. Sütteki kazein absorpsiyonunu azaltır. Solunum yoluyla alınan arsenik %80 sistemik absorpsiyonla sonuçlanır. Arseniğin cilt tarafından sistemik absorpsiyonu çok fazla değildir. Akut alımda en fazla dağılım karaciğer ve böbrekte olur, daha sonra beyindedir. Ufak dozda kronik maruziyette sistemin içeren proteinlerce zengin olan saç, tırnak ve ciltte birikir. Kronik birikme akciğerde olur. Plasentaya kolayca geçerek fetusta birikebilir [116].

Arsenik ile kontamine olmuş su ile insanları ve hayvanları toksik olarak etkilemektedir. Bu sorun; Arjantin, Bangladeş, Hindistan, Tayvan, Tayland, Meksika ve birçok dünya ülkesini içine alan bir coğrafyada görülmüştür [117].

Kronik arsenik zehirlenmesi ise yavaş yavaş güçten düşme, ishal ya da kabızlık, ciltte tümör gelişimi gösterebilen pullanma ve renk değişikliği, felç ve bilinç bulanıklığıyla ortaya çıkan sinir sistemi bozukluğu, yağ dokusunda bozulma, kansızlık ve tırnaklarda tipik çizgiler belirmesiyle tanınabilir. Arseniğin biyolojik olarak izlenmesi akut ya da kronik arsenik maruziyetinin tanımlanmasında gereklidir. Arsenik başlıca idrarla atılır. İdrardaki total arsenik konsantrasyonu genellikle yakın zamanda arseniğe maruziyetin bir göstergesidir. İnorganik arseniğin insanlardaki yarı ömrü dört gündür [115].

Kaliforniya ve Nevada da arsenik içeren suların tüketildiği bölgelerde yapılan araştırmalarda alınan arsenik konsantrasyonlarının yaklaşık  $\frac{3}{4}$ 'ünün idrarla atıldığı saptanmıştır. Absorbe olan organik ve inorganik arseniğin kandaki yarılanma ömrü çok kısadır. Kan oral arsenik maruziyetinde kimyasal analizler için uygun bir biyolojik materyal değildir. Saç ve tırnak vücudun diğer dokularıyla kıyaslandığında arsenik konsantrasyonunun en yüksek olduğu bölgelerdir. Bunun nedeni bu bölgelerin trivalent arsenikle kolayca bağlanabilen sülfidril (SH) grupları içeren keratine zengin olmasıdır. Saç daha çok inorganik arsenik maruziyetinin ölçülmesinde kullanılır. Saçın biyolojik materyal olarak kullanılmasının dezavantaj olduğu durumlar saçın hava, su, sabun ve şampuanlardan etkilenecek arsenik konsantrasyonlarının değişmesidir. Tırnaklar günde yaklaşık 0,12 mm büyüdüğünden tek doz arseniğe maruziyetten 100 gün sonra bile tırnakta arsenik bulunabilir. Arseniğin anne sütüne geçerek bebek üzerinde ciddi toksik etki yapabileceği belirtilmektedir. Arsenik içeren tozların solunması arseniğin burun mukoza membranlarını etkileyerek nazal septumu delmesiyle sonuçlanır [115, 116]

Kronik zehirlenme belirtileri iştahsızlık, genel zafiyet, kusma, dişetlerinde kanama, dişetlerinde siyah çizgi, dermatit, hiperkeratozis, şiddetli deri döküntüsü, kolik, nefeste sarımsak kokusu, el ve ayak tırnaklarında açık lekeler en belirgin özelliklerdir. Kronik arsenik maruziyeti ile cilt kanseri arasında bağlantı olduğu görülmüştür. Altı ile 26 yıl arası fowler solüsyonu verilerek tedavi edilen 262 hastanın % 40'ında keratoz ve % 8'inde cilt kanseri olduğu saptanmıştır. İçme suyunda yüksek oranda arsenik bulunan Arjantin'in Girdaba Bölgesi'nde yapılan araştırmada herkeste keratodermo bulunmuştur. Ayrıca hastaların büyük bir kısmında hiperhidrozis ve pigment anormallikleri görülmüştür. Özellikle güneş almayan gövde üzerinde 1-10 mm çaplı ve birbiriyle birleşme eğilimli siyah lekeler görülmüştür. Gövdede pigment irregülasyonu ve keratoz kronik arsenik maruziyetinin en önemli göstergesidir. Çalıştığı dönemde yıllarca arseniğe maruz kalmış 16 endüstri işçisinde yapılan araştırmada 9 psodermal lökomelanodermi, 7 cilt kanseri ya da intraepidermal karsinom, 8 akciğer kanseri olduğu görülmüştür [115].

Tavsiye edilen güvenlik limiti yetişkinlerde 15 µg/kg (vücut ağırlığı/hafta) dır [9,10]. Çözünebilen inorganik arsenik bileşikleri kuvvetli zehir olduklarından yüksek dozlarda emilimi, sindirim sistemi semptomlarına, kardiyovasküler ve sinir sistemi fonksiyonlarında bozukluklara ve sonuçta ölüme sebebiyet vermektedir. İçme suyundaki arseniğin ( $\leq 50$  µg As/l) uzun süreli etkileşimi sonucunda deri, akciğer ve böbrek kanserine yakalanma riski çok yüksek olup aynı zamanda deri görüntüsünün değişimi görülmektedir. Mesleki arsenik alınımı büyük oranda soluma yoluyla olup genelde akciğer kanseri ile sonuçlanmaktadır [118]

İnorganik arsenik bileşikleri ağız yoluyla alındıklarında mukozaları aşındırıcı etkilidir. Emildikten sonra oksidatif stresi artırır, hücre sinyal iletimini bozar ve bazı enzimleri baskılar. Arsenat (As+5) ve arsenit (As+3)'in karsinojen etkisi tanımlanmıştır [119].

Arseniğin kronik olarak artışı kromozom ve genler üzerinde negatif değişimlere neden olmaktadır [120]. Epidemiyolojik çalışmalar, mesleki etkenlerden asbest, radon, nikel, arsenik ve silikanın akciğer kanseri riskini arttıran etkenler olduğunu ve bu maruziyetlerin her birinin sigara ile sinerjistik etki gösterip akciğer kanseri riskini çok önemli derecede artırdığını göstermiştir [121].

Bangladeş'te içme suyuna arsenik karıştığı için ileride 25 milyon kişinin kanser, 900 bin kişinin deri kanseri olacağı tahmin edilmektedir ve bunların da pek çoğu çocuktur [122].

Mesane kanserinin artezyen kuyularından çok miktarda arsenik alımıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Benzer endemik mesane kanseri olguları içme suyunda yüksek oranda arsenik içeren diğer bölgelerde de izlenmiştir [119].

Arsenik serebellum ve serebral hemisferlerde lipid peroksidasyonu artırırken, glutasyon konsantrasyonunu, SOD ve katalaz aktivitelerini düşürmüştür ve bu oksidatif stresin göstergesidir [123].

Metal iyonları, süperoksit anyonları ve  $H_2O_2$  ile biyolojik sistemlerde hidroksil serbest radikali ve metal-oksijen kompleksleri gibi çok reaktif türleri üretmek için reaksiyona girerler ve sonuçta oksidatif DNA hasarı oluşur. Kimyasal karsinogenezde, metallerin aracılık ettiği oksidatif DNA hasarı önemli rol oynar [124, 125].

Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır. Çoğu olayda serbest radikal üretimi, pato-mekanizmanın bir parçasıdır ve pek çok ksenobiyotiğin toksisitesi, serbest radikal üretimi ile ilgilidir. Kadmiyum, kurşun ve arsenik gibi bazı çevre kirleticilere uzun süre mesleki maruz kalmalar, oksidatif strese neden olabilir ki bu, biyolojik sistemlerdeki istenmeyen etkilerin altında yatan bir mekanizmadır [126, 127].

Prooksidan - antioksidan dengesinin prooksidan lehine değişimi oksidatif stres olarak bilinmektedir [18]. Metabolizma esnasında oluşan oksidanlar, metabolik reaksiyonları ve belirli işlemleri etkileyerek klinik belirtilere neden olurlar [128]. Oksidanların direkt etkileri, hücre membranında ve DNA gibi diğer hücresel komponentlerde oluşturduğu peroksidatif değişikliklerdir. Ayrıca oksidanların kanser patojenezi üzerine direkt etkilerinden de söz edilmektedir. Canlı sistemlerdeki hücreler, oksidanların toksik etkilerine karşı enzimatik ve non-enzimatik savunma sistemleri içerirler. Enzimatik savunma sistemleri esas olarak süperoksit dismutaz, GSH-Px ve katalaz enzimlerinden oluşur [129,130].

Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir [131]. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, süperoksit grubuna ( $O_2^-$ ) bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığında hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan  $H_2O_2$ , dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutasyon peroksidaz (GPx)

gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır[132, 133].

Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), katalaz ve GSH-Px tarafından su ve moleküler oksijene dönüştürülerek metabolize edilmektedir [134]. Katalaz; kanser, diabet, katarakt, ateroskleroz, iskemik-reperfüzyon hasarı, artrit, nörodejeneratif hastalıklar, beslenme yetersizliği ve yaşlanmayı içine alan pek çok patolojik şartlarda ortaya çıkan oksidatif strese karşı savunmada antioksidan sistemin öncelikli bir enzimidir [135].

Süperoksit gruplarının hızlı bir şekilde oluşturduğu singlet oksijen, hücre zarlarının fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluşturur. Lipid peroksitler, indirgenmiş glutasyona (GSH) bağımlı selenyumlu bir enzim olan GS-peroksidaz tarafından lipid alkollere çevrilerek inaktive edilse de, gerek süperoksit gruplarıyla fazla miktarda lipid peroksitlerin şekillendirilmesi ve gerek selenyum eksikliği ve gerekse ortamdaki GSH'nın tükenmesine neden olabilen dietilmaleat, dioksin gibi maddelerin bulunması, lipid hidroperoksitlerinden serbest lipid grupların oluşmasına yol açar. Serbest lipid grupları da, ayrıca doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olur. Lipid hidroperoksitlerin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehidler ya hücre düzeyinde metabolize olurlar ya da başlangıçtaki etki alanlarında diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarak sekonder bozuklukların da göstergesi olabilirler. Beyin, oksidatif hasara en duyarlı bölgedir. Serbest radikaller, santral sinir sisteminin patolojik durumlarının pek çoğunda, direkt olarak doku hasarı meydana getirirler. Serbest oksijen türleri, ekzitotoksisite, metabolik disfonksiyon ve kalsiyumun intraselüler hemostazisinde bozulma gibi çoğul mekanizmalarla doku hasarı meydana getirirler [133, 136, 137, 138].

Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehid (MDA) dir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir [132, 139, 140, 141]

Organizmadaki aşırı serbest radikal üretimi, özellikle hücre membranlarındaki lipidleri etkileyerek lipid peroksidasyonuna neden olur. Ayrıca proteinler, karbohidratlar ve DNA da

serbest radikallere hedef olur. Lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA, kimyasal olarak aktif bir moleküldür, çevre hücre ve dokulara kolayca difuze olarak moleküler düzeyde, özellikle proteinler üzerinde zararlı etkiler gösterebilir [142].

Hücre membranının peroksidasyon hasarının ölçüsü olan lipit peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyi ve antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz ve katalaz ve glutatyon peroksidaz dolaylı olarak hücredeki prooksidasyon ve oksidasyona etki etmektedir [143].

Arseniğe maruz bırakılan ratlarda, ratların kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucu pankreatik dokuda NO düzeyinin, MDA ve  $\text{OH}^-$  radikalinin anlamlı olarak ve antioksidan enzimlerden SOD ve CAT aktiviteleri ile hücrede antioksidan etkili olan glutatyonun bu hayvanlarda azaldığı yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir [144].

Bandopadhyay ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, arseniğe maruz bırakılan hayvanlarda kontrol grubuna göre  $\text{OH}^-$  radikalinin %128 arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar oksidatif hasara sebep olan  $\text{OH}^-$  radikalinin arseniğin etkisi ile oksidatif stres meydana getirdiği söylenebilir. Aynı zamanda  $\text{OH}^-$  radikali sonucu  $\text{O}_2^-$  ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  radikallerinin artarak hücre hasarına yol açtığı rapor edilmiştir [145].

Özgüner ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, arseniğe maruz kalan grupların MDA düzeyinin %82 arttığı belirlenmiştir. Bu çalışma göstermiştir ki, oral olarak belirli dozlarda alınan arsenik hayvansal hücrelerde oksidatif hasarı artırıcı etkiye sahiptir [146].

Arseniğe maruz bırakılan hayvanlarda, SOD aktivitesinin %55, CAT aktivitesinin de %53 azaldığı gözlenmiştir [146]. Mukherjee ve arkadaşlarının daha önce yaptıkları çalışmalarda da antioksidan enzimlerdeki aktivitelerin düşüşünün gözlemlenmesi bulunan sonuçları pekiştirmiştir. Bu çalışmalarda, arsenik etkisine maruz kalan hayvanların pankreas adacıklarında antioksidan enzimlerin aktivitelerini yitirmesiyle oksidatif stresin arttığı belirlenmiştir [147].

Reaktif oksijen türlerine karşı ilk defans hattı olan antioksidan enzimler; CAT, SOD ve glutatyon peroksidaz'dır. Dokuda meydana gelen oksidatif strese bunların aktiviteleri artış göstermektedir [148].

Nandi ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ratlar 12 hafta süre ile arseniğe maruz bırakılarak kan, karaciğer, ve böbreklerden numune alınarak arsenik miktarları alınarak bu numunelerdeki arsenik miktarları belirlenmiştir. Arsenik miktarlarının süre içinde düzenli bir artış olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında bu dokulardaki lipid peroksidasyonunun anlamlı olarak arttığı süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerinin başlangıçta tüm dokularda anlamlı olarak arttığı ilerleyen zamanlarda ise bu enzim aktivitelerinin azaldığı belirlenmiştir. Bu



bilgilere dayanarak, düşük ve kısa periyotlarda verilen dozlarda arseniğin antioksidan defansı artırdığı tespit edilmiştir [149].

Arsenik maruziyetini zamana bağlı olarak lipit peroksidasyon düzeyi süperoksit dismutaz ve katalaz aktiviteleri anlamlı olarak değişmektedir. Zamanla eritrositlerde lipit peroksidasyon düzeyi arttığı ve süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesinin başlangıçta arttığı fakat 12. haftadan sonra enzim düzeylerinin anlamlı olarak düştüğü gözlenmiştir [149].

Süperoksit dismutaz ve katalaz hücre defansında ksenobiyotiklerin etkisi boyunca serbest radikal üretimini durdurmakta iki temel unsurdur [150]. Arsenik potansiyeli sonucu hücrede katalaz ve süperoksit dismutaz sentezlenmesini aktive eder [151].

Arseniğin oksidatif hasarınının oluşum mekanizmasını serbest radikallerin artışı ve antioksidan enzimlerin inhibisyonu ile açıklamak mümkündür [152, 153].

Lee ve Ho'nun yapmış olduğu çalışmayla, insan fibroblast hücre kültürünün sodyum arsenit ile tedavisi boyunca glutatyon, hemooksijenaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerinin yükseldiği, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinin azaldığını rapor etmişlerdir [154].

Maruziyet süresi sonunda ratlarda arsenik intoksikasyonu sonucu süperoksit dismutaz ve katalazın anlamlı olarak azaldığı, LPO'nun anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir [155].

Tüm literatür bilgilerine ile uyumlu olarak, yapılan çalışmada kronik olarak arseniğe maruz kalan insanlarda, kontrol grubuna göre, antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin % 36 ve katalaz (CAT) aktivitesinin % 30 azaldığı ve hücre hasarının bir ölçüsü olan lipit peroksidasyon ürünü malondialdehit (MDA) düzeylerinin % 18 arttığı tesbit edilmiştir. MDA düzeyindeki artışın istatistiksel olarak ( $p>0,05$ ) anlamlı bulunmamasına karşın antioksidan enzimlerden SOD ve CAT aktivitelerinin azalmanın ise istatistiksel olarak ( $p<0,001$ ) anlamlı olduğu görülmüştür.

Yapmış olduğumuz çalışmada kronik olarak arseniğe uzun süre maruz kala kişilerde süperoksit dismutaz ve katalaz enzim aktivitelerindeki azalmanın arseniğin oluşturduğu DNA hasarı ile bu enzimlerin sentezlenmesinde ve aktivitelerini göstermesinde inhibisyona uğradıklarını düşünebiliriz. Arseniğin oksidasyon basamakları sırasında oluşan serbest radikallerin, hem DNA üzerinde oluşturdukları hasar hem de disülfid bağlarını oluşturarak proteinlere yaptıkları etki göz önüne alındığında katalaz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin aktivitelerindeki azalma açıklanabilir.

MDA düzeyindeki artışın genel sebebi, inorganik arseniğin vücut metabolizması ile organik arseniğe dönüştürülmesi sırasında oluşan serbest radikallerin artması ile açıklanabilir. Serbest radikallerin etki mekanizmalarından biri de lipitler üzerinde lipit peroksidasyonudur. Lipit peroksidasyon ürünü olan MDA farklı dokularda farklı derecelerde artış gösterir. Arsenik daha çok karaciğer, böbrek, deri ve mukoza dokularında etkili olduğu için yapılan çalışmalarda bu dokulardaki lipit peroksidasyon seviyesi daha fazla bulunmuştur. Yapmış olduğumuz çalışmada MDA düzeyi plazmada araştırılmış ve plazmadaki MDA artışının istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmamıştır.

Sonuç olarak, kronik olarak arseniğe maruz kalma insanlar üzerinde olumsuz etkiler bırakmaktadır. Organizmaya alınan inorganik arseniğin, organik arseniğe dönüştürülerek vücuttan atılımı sırasında oksidasyon basamaklarında oluşan serbest radikallerin, lipit peroksidasyon ürünü olan MDA arttırdığı ve antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerini azalttığı tespit edilmiştir. Serbest radikallerin artışı ve antioksidan sistemdeki enzimlerin inhibisyonu sonucu oksidatif stres oluşmaktadır.

### KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Yılmaz, O., Ekici O. K., 2005, “Van Yöresinde İçme Sularında Arsenikle Kirlenme Düzeyleri”.
- [2] Tchounwou P. B., Patlolla A. K. and Centeno J. A., 2003 “Carcinogenic and systemic health effects associated with arsenic exposure”.
- [3] Mazumder D. N., Das Gupta J., Chakraborty A. K., Chatterjee A., Das D. and Chakraborty D., 1992, “Environmental pollution and chronic arsenicosis in South Calcutta”.
- [4] WHO, 1990, Arsenic. Environmental Health Criteria. 18. World Health Organization, Genova.
- [5] Türk Standartları Enstitüsü (1984) : Ankara, UDK 662. 6, 543 p.
- [6] Gıda Maddelerinin ve Umumi Sağlığı İlgilendiren Eşya ve Levazımın Hususi Vasıflarını Gösteren Tüzüğün Bazı Maddelerinin Değiştirilmesi ve Bu Tüzüğe Bir Madde Eklenmesine Dair Tüzük, 1970, Başbakanlık Basımevi, Ankara.
- [7] Prof. Ladislav Valko M., Valkoa, C. J., Rhodesb, J., Moncola, M., Izakovica and M. Mazura, 2006, “Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer” .
- [8] Hopenhayn, C., Ferrecio, C., Browning, S. R., Huang, B., Peralta C., and Gibb, H., 2003, “Arsenic exposure from drinking water and birth weight”.
- [9] WHO, 1990, Environmental Health Criteria for Arsenic and Arsenic compounds.
- [10] Osweiler G. D., Carson T. L., Buck W. B. and VanGelder G. A., 1985, Clinical and Diagnostic Veterinary Toxicology. 3rd Edit., Kendall-Hunt Publishing Comp, USA.
- [11] Xia Y. and Liu J., 2004, An overview on chronic arsenism via drinking water in PR China.
- [12] Smith A. H. and Smith M. M., 2004, Arsenic drinking water regulations in developing countries with extensive exposure.
- [13] Gonsebatt M. E., Vega L., Montero R., Garcia-Vargas G., Del Razo L. M., Albores A., Cebrian M. E. and Ostrosky-Wegman P., 1994, “Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water.”
- [14] Tsuji J. S., Benson R., Schoof R. A. and Hook G. C., 2004, “Health effect levels for risk assessment of childhood exposure to arsenic”.
- [15] Akkuş, İ., 1995, "Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri", Mimoza Yayınları, Konya.
- [16] Brent, J. A. and Rumack, B. H. 1993. Role of free radicals in toxic hepatic injury. I. Free radical biochemistry. Clin. Toxicol. 31(1)-139-171 p.

### **KAYNAKLAR DİZİNİ(Devam)**

- [17] Halliwell, B. 1991, Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.* 91: 14-22 p.
- [18] Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. and Cross, C. 1992. Free Radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 119(6), 598-620 p.
- [19] Trush, M. A. and Kensler, T. W., 1991,. An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 10: 201-9 p.
- [20] Soyda, R. A., 1990, Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *Free Radic Biol Med.* 4: 2587-97 p.
- [21] Stampfer, M. J., Osborn, J. A. and Jaraki, M., 1993, Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest*; 91: 308-318 p.
- [22] Wyllie, A. H. and Duvall, E., 1992, Cell injury and death. in: McGee JO'D, Isaacson PG, Wright NA. *Oxford Textbook of Pathology*. New York: Oxford University Press. 141-193 p.
- [23] De zwart, L. L., Meerman, J. H., Commandeur, J. N., Vermeulen, N. P., 1999 Jan., Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med.* 26(1-2):202-26 p.
- [24] Ivanova, L. A., Talakin, Iun., Korshun, M. N. and Savchenko, MV., 1991, Nov. The comparative toxicity of inorganic mercury compounds for a cell culture and the whole organism. *Gig Sanit. Russian*, 11: 66-7 p.
- [25] Nita, D., Al., Viorica Nita, St., Spulber, M., Moldovan, Daniela, Paula Popa and Ana-Maria Agrean, 2001, L. Zagrean Department of Physiology, Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion - a biochemical study in rat "Carol Davila" University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, Romania Received; Accepted: June 18.
- [26] Hinder, R. A. and Stein, H. J. 1991, Oxygen derived free radicals. *Arch. Surg.* 126: 104-105 p.
- [27] Kaneko, J. J., Harwey, J. W. and Brust, M. L., 1980, *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 3rd Ed., London, Academic Press. Inc Ltd.
- [28] Zima, T., Crkovska, J., Merta, M., Stipek, S., Nemecek, K. and Tesar, V., 1995, Activity of the Antioxidant Enzymes, Glutathione Peroxidase, on Autosomal Dominant 54 polycystic kidney disease patient. *Biochemical Molecular Biology International*, 35(4), 699-704 p.
- [29] Halliwell, B. and Grootveld, M., 1989, Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biochemical systems: deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation. *Methods Biochem. Anal.* 33: 59-90 p.

### KAYNAKLAR DİZİNİ(Devam)

- [30] Meister, A., 1994, Glutathione Ascorbate and cellcycle regulation FEBBS letters. 1-4 p.
- [31] Southorn, P., and Powis G.,1988, Free radical in medecine I. Chemical nature and bidological reactions. J. Mayo Clin. Proc., 63 (3): 381 – 8 p.
- [32] DizdaroCLu M., 1999, Mechansms of Oxidative DNA Damage; Lesion and Their Measurement. Kluwer Academic/Plenum Publihers. 302: 67-87 p.
- [33] DizdaroCLu M., 1993, Chemical Determination of Free Radical-Induced damage to DNA. J Free Radical Biology & Medicine. 61(3): 225-242 p.
- [34] Wetberg A. B., Weitzman S. A. and Clarck E. P., 1985, Effetcs on antioxidants on antioxidant induce: sister chromatid Exchange formation. J. Clin. Cnvest. 75(3):35 – 7 p.
- [35] Slater T. F., 1984, Free radical mechanismin tissue injury. J. Biochem; 222: 1-15 p.
- [36] Tappel A. L. and Dillard J. C., 1981, Cnvivo lipid peroxidation measurement via exhaled pentane and protection by vitamin E. J. Federation proceedings 40(3), 174-8 p.
- [37] Gutteridge, J. M. C. 1995, Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. J. Clin Chem. 42(6):18-19 p.
- [38] Moncada, S., Palmer. R. M. J. and Higs E. A.. 1991, Nitric oxide. Physiology, patophysiology, and pharmacology. J. Pharmacol Review; 43(29): 109-37 p.
- [39] Lancaster, J., 1990, Nitric oxide, principles and and actions. Copyright by Academic Press. Inc. California/USA.
- [40] Knowles R. G. and Moncada S., 1994, Nitric oxide synthase in mammals. J. Biochem. 298(12):249-58 p.
- [41] Marletta M. A., 1993, Nitric oxide synthase structure and mechanism. J. Biol. Chem. 268(7): 123-5 p.
- [42] Myatt L, Rosenfield RB, Eis ALW. Nitrotyrosine residues in placenta: Evidence of peroxinitrite formation and action. J. Hypertension 1996; 28(21): 488-93 p.
- [43] Wlodek L., 2002, Beneficial and harmful effects of thiols. Pol. J Pharmacol 54: 215-223 p.
- [44] Young I. S. and Woodside J. V., 2001, Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol 54: 176-186 p.
- [45] Girotti, A. W., 1998, Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J Lipid Res 39: 1529-1542 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ(Devam)**

- [46] Fang YZ, Yang S, Wu G. (2002). Free Radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18: 872-879.
- [47] Pryor WA, Porter NA. (1990). Suggested mechanism for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biol Med* 8: 541-543.
- [48] Baker D. H, and Czarnecki-Maulden G. L., 1987, Pharmacologic role of cysteine in ameliorating or exacerbating mineral toxicities. *J Nutr* 117: 1003-1010 p.
- [49] De Grey A. D., 2002, HO<sub>2</sub><sup>-</sup>: the forgotten radical. *DNA Celi Biol* 21: 251-257.
- [50] Freeman B. A. and Crapo, J. D., 1982, Biology of Disease, free radicals and tissue injury. *Lab Invest*; 47: 412-426 p.
- [51] Kehrer J. P., 1993, Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 23: 21-48 p.
- [52] Egan, R. W., Paxton, J. and Kuehl, F. A., 1976, Mechanism for irreversible self-deactivation of prostaglandin synthetase. *J Biol Chem* 251:7329-7335 p.
- [53] Weiss S. J. and LoBuglio, A. F., 1982, Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest* 47: 5-18 p.
- [54] Halliwell B. and Gutteridge J. M. C., 1999, *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. New York: Oxford.
- [55] Goepfert A. R., 1995 Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol*, 25: 25-65 p.
- [56] Balagopalakrishna, C., 1996 Production of O<sub>2</sub> from hemoglobin-bound O<sub>2</sub> under hypoxic conditions. *Biochemistry-US* 35: 6393-6398 p.
- [57] Brantley, R. E., 1993, The mechanism of autoxidation of myoglobin. *J Biol Chem* 268: 6995-7010 p.
- [58] Turrens, J. F., 1997, Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep*; 17: 3-8 p.
- [59] Hayakawa, M., Hattori, K., Sugiyama, S. and Ozawa, T., 1992, Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts. *Biochem Biophys Res Commun*, 189: 979-985 p.
- [60] Shigenaga, M. K., 1994, Oxidative damage and mitochondrial decay in ageing. *Proc Natl Acad Sci*, 91: 10771-10778 p.
- [61] Imlay, J. A., 1995, A metabolic enzyme that rapidly produces O<sub>2</sub>, fumarate reductase of *E. Coli*. *J Biol Chem*, 270: 19767-19777 p.

### **KAYNAKLAR DİZİNİ(Devam)**

- [62] Masters, C. and Holmes, R., 1977, Peroxisomes: new aspects of celi physiology and biochemistry. *Physiol Rev.* 57: 816-882 p.
- [63] Noshiro, M., Narada, N. and Omura, T., 1980, Immunochemical study on the route of electron transfer from NADH and NADPH to cytochrome P450 of liver microsomes. *J Biochem*, 88: 1521-1535 p.
- [64] Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., 1984, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 219: 1-14 p.
- [65] Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., 1990, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Methods Enzymol.* 280: 1-85 p.
- [66] Kappus H., 1987, A survey of Chemicals inducing lipid peroxidation in biological systems. *Chem Phys Lipids*; 45: 105-115 p.
- [67] Marks, D. B., Marks, A. D. and Smith, C. M., Oxygen metabolism and toxicity, *Basic Medical biochemistry: A Clinical Approach*, VWilliams & VWilkins Yüksek Lisans tezi
- [68] Wood, E. S. and Simith, C. A., 1991, "Moleculer and Cell Biochemistry", Chapman & Hail, Hong Kong
- [69] Onat, T., Emerk, K. ve Sözman, E.Y., 2002, "İnsan Biyokimyası", Palme Yayıncılık, Ankara
- [70] Augustin, W., Wiswedel, I., Noack, H., Reinheckel, T. and Reichelt, O., 1997, "Role of endogenous antioxidants in the defence against functional damage and lipid peroxidation in rat liver mitochondria", *Molecular and cellular biochemistry*, Vol. 174, 199-205 p.
- [71] Şimşek, F., 1999, "Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipid peroksidasyonu", *Türkiye Klinikleri J Pediatr*, 8, 1, 42-47 s.
- [72] Boyd, R. F., 1988, "General Microbiology", Second edition, Times Mirror/Mosby College Publishing, Missouri, ABD
- [73] Burney, S., Tamir, S., Gal, A. and Tannenbaum, S. R., 1997, "A mechanistic analysis of nitric oxide-induced cellular toxicity", *Nitric Oxide*, Vol. 1, 130-144 p.
- [74] Bhagavan, N. V., 2002, "Medical Biochemistry", Harcourt Academic Press, Kanada
- [75] Berg, J. M., Tymoczko, J. L. and Stryer, L., 2002, "Biochemistry", W. H. Freeman and Co., New York
- [76] Hazman, Ö., 2006, Sabit ve artan dozlarda eroin verilerek bağımlılık oluşturulan ratlarda, nalokson ile meydana getirilen akut yoksunluk durumundaki oksidatif stresin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi

### KAYNAKLAR DİZİNİ(Devam)

- [77] Spiteller, G., 2001, "Peroxidation of lineoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases", *Mechanisms of Ageing and Development*, Vol.122, 617-657 p.
- [78] Köylü, A. A., 2003, "Çeşitli Kanser Türlerinde Lipid Peroksidasyonu, Antioksidan Enzimler ve Bunların Tümör Belirteçleri ile Olan İlişkileri", *Uzmanlık Tezi*, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Şanlıurfa
- [79] Yılmaz, S. and Ozan, T. S., 2003, "Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve bazı enzim aktiviteleri arasındaki ilişki", *Türk Biyokimya Dergisi*, 28(4), Sayfa: 252-256 s.
- [80] Dündar, Y. and Aslan, R., 2000, "Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar", *Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları*, Afyon
- [81] Yağın, A. S., (1998). *Antioksidanlar*. Klinik gelişim 11: 342-346 p.
- [82] Mayes, P., 2000, *Abiologic Oxidation*. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. (editors). *Harper's Biochemistry*. 25. Baskı. Stamford: Appleton & Lange. 130-137 p.
- [83] Nordberg, J. and Arner, E. S., 2001, *Reactive oxygen species, antioxidants and mammalian thiorodoxin systems*. *Free Radical Biol Med* 31: 1287-1312 p.
- [84] Horton, H. R., Moran, L. A., Ochs, R. S., Rawn, J. D. and Scrimgeour, K.G., 1996, "Principles of Biochemistry", *Second Edition*, Prentice Hall Inc., USA
- [85] Karabulut, A. B., 2001, "Hepatit B'li Hastalarda Eritrosit ve Lenfosit Antioksidan Enzimler, Nitrik Oksit Düzeyleri ve Plazma Stokinleri", *Doktora Tezi*, inönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya
- [86] Stryer, L., 1995, "Biochemistry", *Fourth Edition*, W.H. Freeman and Company, New York, USA
- [87] Seven, A. and Candan, G. 1996, *Antioksidan savunma sistemleri*. *Cerrahpaşa J Med* 1996; 27: 41-50 s.
- [88] Arner, E. S. J. and Holmgren, A., 2000, *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase*. *Eur. J. Biochem*. 267: 6102-6109.
- [89] Charles, H. W., Arscott, L. D., Muller, S., Lennon, B. W., Ludwig, M. L., Wang, P. F., et al. 2000, *Thioredoxin reductase: Two modes of catalysis have evolved*. *Eur J Biochem* 267: 6110-6117 p.
- [90] Rinaldi, R., Eliasson, E., Swedmark, S. and Morgenstern, R., 2002, *Reactive intermediates and the dynamics of glutathione transferases*. *Drug Metab Dispos* 30: 1053-1058 p.
- [91] May, J. M., 1999, *Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane?* *Faseb J*. 13: 995-1006 p.



### KAYNAKLAR DİZİNİ(Devam)

- [92] Burton, G. W., 1994, Vitamin E: molecular and biological function. *Pro Nutr Sco* 53: 251-262 p.
- [93] Meram, O., Köylüoğlu, O. ve Tarakçıoğlu, E., 2001, E vitamini ve klinik önemi, *İbni Sina Tıp Dergisi*. 6: 1-5 s.
- [94] Reiter, R. J, Tan, D. X, Gitto, E., Sainz, R. M, Mayo, J. C and Leon J, et al, 2004, Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. *Pol. J Pharmacol*. 56: 159-170 p.
- [95] Barlas, A., Çevik, H., Arbak, S., Bangir, D., Şener, G. and Yeğen, C., 2004, Melatonin protects against pancreaticobiliary inflammation and associated remote organ injury in rats: role of neutrophils. *J Pineal Res* 37: 267-275 p.
- [96] Sies, H., 1997, Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82: 291-295 p.
- [97] Annuk, M., Zilmer, M. and Fellsröm, B., 2003, Endothelium-dependent vasodilation and oxidative stress in chronic renal failure: Impact on cardiovascular disease. *Kidney Int* 63 (84); 50-53 p.
- [98] Handelman, G. J., 2000, Evaluation of oxidant stress in dialysis patients. *Blood Purif*, 18(4): 343-349 p.
- [99] Pryor, W. A., 1986, Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Annu Rev Physiol* 48: 657-667 p.
- [100] Canaud, B., Cristol, J. P. and Morena, M., 1999, Imbalance of oxidants and antioxidants in haemodialysis patients. *Blood Purif*, 17:99-106 p.
- [101] Hizler, T. A., Morrovy, J. D. and Roberts, L. J., 2002, Plasma F2 isoprostane levels are elevated in chronic hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 2002; 58(3): 190-7 p.
- [102] Himmelfarb, J., Stenvinkel, P., Hizler, T. A. and Hakim, RM., 2002, The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney int*. Vol 62: 1524-38 p.
- [103] Locatelli, F., Canaud, B., Eckard, K. U., Stenvinkel, P., Wanner, C. and Zocalli, C., 2003, Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant*, 18: 1272-1280 p.
- [104] Heinecke, J. W., Hsu, F. F., Crovvey, J. R., Hazen, S. L., Leeuvenburgh, C., Mueller, D. M., Rasmussen, J. E., 1999, Detecting oxidative modification of biomolecules with isotope dilution mass spectrometry: Sensitive and quantitative assays of oxidized aminoacids in proteins and tissues. *Methods Enzymol, Türk J.*; 300: 124-144 p.
- [105] Witko-Sarsat, V., Nguyen-Khoa, T., Jungers, P. and Drueke, T. B., 1996, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney In*, 49: 1304-1313 p.

### KAYNAKLAR DİZİNİ(Devam)

- [106] Tarng, D. C., Huang, T. P., Wei, Y. H., Liu, T. Y., Chen, H. W., Wen Chen, T. and Yang, W. C., 2000, 8-Hydroxy-29-deoxyguanosine of leukocyte DNA as a marker of oxidative stress in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*, 36: 934-944 p.
- [107] Aebi, H., 1984, Catalase in vitro. *Method Enzymol* 105: 121-126 p.
- [108] Heikkila, R. E. and Cabbat, F., 1976, A sensitive assay for superoxide dismutase based on the autoxidation of 6-hydroxydopamine. *Analytical Biochemistry*, 75, 356-362 p.
- [109] Crosti, N., Servidei, T., Bajer J. and Serra A., 1987. Modification of 6-hydroxydopamine technique for the correct determination of superoxide dismutase. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 25, 265-266 p.
- [110] Tarhan, L., Tüzmen, M.N., 2000, Some properties of Cu, Zn-superoxide dismutase from sheep erythrocyte. *Turkish Journal of Chemistry*, 24, 109-116 p.
- [111] Aydemir, T., Tarhan, L., 2001, Purification and partial characterization of superoxide dismutase from chicken erythrocytes. *Turkish Journal of Chemistry*, 24, 451-459 p.
- [112] Mavi, A., 2005, İnsan eritrosit ve lökositlerinden süperoksit dismutaz enziminin saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora tezi. 66-68
- [113] Draper, H. H. and Hadley, M., 1990, Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Method Enzymol*. 180: 421-431 p.
- [114] Lowry, O., Rosenbraugh, N., Farr, L. and Randall, R., 1951, Protein measurement with theophilin-phenol reagent. *J Biol Chem*, 183:265-275 p.
- [115] Smitt P.H., Hopenhayn Rich C., Bates M.N., Goeden H.M. Hertz Picciotto I. Duggan J.M., Wood R. (1992) Canser risks for arsenic in drinking water. *Environ. Health Pers.*97: p. 256-267.
- [116] Maes D. Pate D.B. (1977). The absorpsition of arsenic in to single human head hairs. *J. Foren Sci.* 22. p. 89-94.
- [117] Tchounwou, P. B., Wilson, B.and Ishaque, A (1999). Important considerations in the development of public health advisories for arsenic and arsenic containing compounds in drinking water. *Rev. Environ. Health* 14, 211–219 p.
- [118] ATSDR, (2000). "Toxicological Profile for Arsenic".
- [119] Moore LE, Smith AH, Hopenhayn-Rich C, et al: Disease in bladder cell micronucleus prevalence after intervention to lower the concentration of arsenic in drinking water. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6: 1051.

### KAYNAKLAR DİZİNİ(Devam)

- [120] World Health Organization, Geneva, 1996 “Trace Elements in Human Nutrition and Health”.
- [121] Jarup L, Pershagen G. Arsenic exposure, smoking, and lung cancer in smelter workers: a case-control study. *Am J Epidemiol* 1991;134: 545-551.
- [122] Carpenter DO ve ark. Environmental Threats to the Health of Children: The Asian Perspective. *Environ Health Perspect* 2000; 108.
- [123] Rao MV, Avani G, (2004) : Arsenic induced free radical toxicity in brain of mice. *Indian J. Exp. Biol.*, 42: 495-498.
- [124] Kawanishi S, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S, (2002) : The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radical Biol. Med.*, 32: 822-832.
- [125] Urani C, Crippa S, Camatini M, (1998) : Cellular and molecular responses of metal-induced toxicity. *Toxicol. Lett.*, suppl. 1: 195.
- [126] Abdollahi M, Bahreini-Moghadam A, Emmami B, Fooladian F, Zafarriet K, (2003) : Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 135: 331-336.
- [127] Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A, (2004) : Pesticides and oxidative stress : a review. *Med. Sci. Monit.*, 10: 141-147.
- [128] Tsai KJ, Hung IJ, Chow CK, Stern A, Chao SS, Chiu DT. Impaired production of nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide in glucose 6-phosphatedehydrogenase deficient granulocytes. *FEBS Lett* 1998; 436: 411-4.
- [129] Ramotar D, Belanger E, Brodeur I, Masson JY, Drobetsky EA. A yeast homologue of the human phosphotyrosyl phosphatase activator PTPA is implicated in protection against oxidative DNA damage induced by the model carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *J Biol Chem* 1998; 273: 21489, 96.
- [130] Oesch F. Metabolism of carcinogens, possibilities for modulation. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1984;55: 15-33
- [131] Cochran CG, (1991) : Cellular injury by oxidants. *Am. J. Med.*, 92: 235-305.
- [132] Kalender S., Kalender Y., Ögütçü A., Uzunhisarcıklı M., Durak D., Açıkgöz F., (2002) : Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats : the protective effect of vitamin E. *Toxicology*, 202: 227-235.
- [133] Kaya S., Pirinçci , Bilgili A., (1998) : Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. *Medisan Yayın Serisi*: 35, Ankara, s. 222, 232, 273, 276, 355.
- [134] Portakal O, Ozkaya O, Inal ME, Bozan M, Sayek I. (2000) Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients. *Clin Biochem.* 33, 279-284.

### KAYNAKLAR DİZİNİ(Devam)

- [135] Kumaraguruparan R, Subapriya R, Viswanathan Nagini S. (2002) Antioxidant profile in the circulation of patients with fibroadenoma and adenocarcinoma of the breast. *Clin Biochem.* 35, p. 275-279.
- [136] Facchinetti F, Dawson VL, Dawson TM, (1998) : Free radicals as mediators of neuronal injury. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 18: p. 667-682.
- [137] Güven A, Erginsoy S, Kaya N, (2003) : Kazlarda karbon tetraklorür zehirlenmesinin biyokimyasal ve patolojik parametrelere etkisi. *Kafkas Ü. Vet. Fak. Derg.*, 9: s. 131-136.
- [138] Mates JM, (2000) : Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153: p. 83-104.
- [139] Niki E, (1987) : Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phy. Lipids*, 44: p. 227-253.
- [140] Placer CA, Cushman LL, Johnson BC, (1990) : Estimation of product of lipid peroxidation (Malondy Dialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem.*, 16: p. 259-264.
- [141] Porter NA, (1984) : Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, 105: p. 273-283.
- [142] Parantainen J., Vapaatalo H., Hokkanen E. (1986). Clinical aspects of prostaglandins and leukotrienes in migraine. *Cephalalgia*.6 Suppl 4: p. 95-101.
- [143] Cini, M., Fariello, R. Y., Bianchetti, A. and Moretti, A. (1994). Studies on lipid peroxidation in the rat brain. *Neurochem. Res.* 19, 283–288.
- [144] Mukherjee, S., Das, D., Mukherjee, M., Das, A. S., Mitra C., (2006). Synergistic effect of folic acid and vitamin B12 in ameliorating arsenic-induced oxidative damage in pancreatic tissue of rat. *Journal of Nutritional Biochemistry* 17, 319–327.
- [145] Bandopadhyay U, Das D, Banerjee RK. (1999). Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci*;77(5):658– 66.
- [146] Ozguner MF, Delibas N, Tahan V, Koyu A, Koylu H. (1999). Effects of industrial noise on the blood levels of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and malondialdehyde. *Eastern J Med*;4 (1):13– 5.
- [147] Mukherjee S, Das D, Darbar S, Mukherjee M, Das A. S., Mitra C. (2004). Arsenic trioxide generates oxidative stress and islet cell toxicity in rabbit. *Curr Sci*;86(6):854– 7
- [148] Sivaprasad R, Nagaraj M, Varalakshmi P. (2004). Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. *J Nutr Biochem*;15(1):18– 23.

**KAYNAKLAR DİZİNİ(Devam)**

- [149] Nandi, D., Patra, R.C., Swarup, D., (2006) : Oxidative stress indices and Plasma biochemical parameters during oral exposure to arsenic in rats, Food and Chemical Toxicology,
- [150] Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutri. Rev.* 52, 253-265.
- [151] Bartoz, G. (1990) Erythrocytes membrane changes during ageing in vitro. In: J. R. Hariss (Ed). *Blood cell Biochemistry.Vol-1: Erythroid cells*, Plenum press, New York, p-45
- [152] Ramos, O., Carrizales, L., Yanez, L., Mejia, J., Batres, L., Ortiz, D. and Barriga, F. (1995). Arsenic increased lipid peroxidation in rat tissues by a mechanism independent of glutathione levels. *Environ. Health Perspect.* 103, 85-88.
- [153] Liu, S. X., Athar, M., Lippai, I., Waldren, C., Hei, T. K. (2001). Induction of oxyradicals by arsenic: implication for mechanism of genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 1643-48.
- [154] Lee, T. C. and Ho, I. C. (1995). Modulation of cellular antioxidant defense activities by sodiumarsinite in human fibroblasts. *Arch. Toxicol.* 69, 498-504.
- [155] Maiti, S. and Chatterjee, A. K. (2000). Differential response of cellular antioxidant mechanism of liver and kidney to arsenic exposure and its relation to dietary protein deficiency. *Env. Toxicol. Pharmacol.* 8, 227-35.