

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**



**APS İLE OPERE EDİLEN TAVŞANLARIN KAN  
VE KARACİĞER DOKULARINDAKİ SERBEST  
OKSİJEN RADİKALLERİ VE  
ANTIOKSİDAN ENZİM  
DÜZEYLERİNİN TAYİNİ**

**Sevinç ÇELİK  
Yüksek Lisans Tezi  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Temmuz - 2001**



APS İLE OPERE EDİLEN TAVŞANLARIN  
KAN VE KARACİĞER DOKULARINDAKİ  
SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN  
ANTİOKSİDAN ENZİMLERİN YOLUYLA TAYİNİ

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Sevinç Çelik

DUMLUPINAR ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisans Yönetmeliği Uyarınca

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

I. Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mustafa YÖNTEM

II. Danışman: Doç. Dr. Ramazan KAYAPINAR

Temmuz - 2001

109405

SEVİNÇ ÇELİK'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "APS İLE OPERE EDİLEN TAVŞANLARIN KAN VE KARACİĞER DOKULARINDAKİ SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ VE ANTIOKSİDAN ENZİM DÜZEYLERİNİN TAYİNİ" başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

18.09.2001

Üye:

Prof.Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN

Üye:

Prof. Dr. Yunus ERDOĞAN

Üye:

Doç.Dr. Hayri DAYIOĞLU

Üye:

Doç.Dr. Ramazan KAYAPINAR  
(II. Danışman)

Üye:

Yrd.Doç.Dr.Mustafa YÖNTEM  
(I. Danışman)

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 04/09/2001 gün ve 18. sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr. İ. Gökay EDİZ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

**APS İLE OPERE EDİLEN TAVŞANLARIN KAN VE KARACİĞER  
DOKUSUNDAKİ SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ VE ANTIOKSİDAN ENZİM  
DÜZEYLERİNİN TAYİNİ**

Sevinç ÇELİK

Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, 2001

I. Danışman: Yrd.Doç.Dr. Mustafa YÖNTEM

II. Danışman : Doç.Dr. Ramazan KAYAPINAR

**ÖZET**

Bu çalışma ortalama 1750 – 2500 gr. ağırlığında erkek tavşanlar (*Oryctolagus cuniculus*) kullanılarak; Argon Plazma Scalpel (APS) tekniğinin koter ve bistüri tekniklerine göre operasyon (0. gün), postoperasyon (3. gün) ve reoperasyon (7. gün) sırasında oluşan serbest radikal düzeylerini karşılaştırmak amacıyla gerçekleştirildi. SOD ve GSH-Px analizleri kinetik metotla, hemoglobin değeri oksihemoglobin metoduyla, protein analizi Lowry metoduyla, MDA düzeyleri ise TBA tekniği ile kan ve doku örneklerinde tayin edildi.

Bulgularımızda üçlü kıyaslama (Kruskal – Wallis testi) sonucunda plazma MDA reoperasyon; doku MDA reoperasyon; eritrosit SOD postoperasyon düzeyleri arasında istatistiki açıdan anlamlı fark bulundu ( $p < 0,05$ ). İkili kıyaslamada (Mann – Whitney U testi) plazma MDA reoperasyon koter-APS grupları arasında; doku MDA reoperasyon kontrol-APS ve koter-APS grupları arasında ve doku SOD reoperasyon koter-APS grupları arasında istatistiki açıdan anlamlı fark bulundu ( $p < 0,05$ ). Ancak eritrosit ve dokuda yapılan GSH-Px ölçümlerinde üçlü ve ikili kıyaslamalar sonucunda istatistiki açıdan anlamlı fark bulunmadı ( $p > 0,05$ ).

Sonuç olarak, APS ile yapılan operasyonlarda koter ve kontrol grubuna göre membran hasarının bir göstergesi olan lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA düzeyinin daha az olması sebebiyle ve SOD enzim aktivitesi düzeylerini göz önünde bulundurarak APS'nin koter'e göre daha az serbest radikal oluşturduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: APS, GSH-Px, SOD, MDA, Serbest Radikaller

**THE DETERMINATION OF ANTIOXIDAN ENZYME LEVELS AND  
RADICAL OF FREE OXYGEN ON BLOOD AND LIVER OF RABBITS THAT ARE  
OPERATED WITH APS**

Sevinç ÇELİK

Department of Biology Master Thesis, 2001

I. Supervisor : Yrd.Doç.Dr. Mustafa YÖNTEM

II. Supervisor : Doç.Dr. Ramazan KAYAPINAR

**SUMMARY**

In this study, free radicals during operation (0<sup>th</sup> day), postoperation (3<sup>th</sup> day) and reoperation (7<sup>th</sup> day) time in APS technique was compared to electrocoter and bistury techniques using male rabbits (*Orctolagus cuniculus*), weight 1750-2500gr. Kinetic method was used to analyze SOD and GSH-Px; oxyhemoglobin method was used to analyze hemoglobin value; Lowry method was used to analyze protein value; TBA technique was used to analyze MDA value in both blood and tissue samples.

In our conclusion, according to the results of the Kruskal – Wallis test values; on the 7<sup>th</sup> day plasma MDA, tissue MDA and on the 3<sup>rd</sup> day, SOD values and according to the results of the Mann – Whitney U tests values, on the 7<sup>th</sup> day plasma MDA between the control-APS groups and coter-APS groups and on the 7<sup>th</sup> day tissue SOD between the coter-APS groups values were found statistically different ( $p < 0,05$ )

However; bye these tests, in the erithrosid and tissue GSH-Px values were not found any differences statistically ( $p > 0,05$ ).

As a conclusion, it can be said that the APS operation technique makes more less free oxygen radicals, in contrast to the coter operation technique. Because of the revealed MDA, which signs the membrane damage, is one of the last product of lipid peroxydation and SOD enzymes low activity levels.

Keywords: APS, GSH-Px, SOD, MDA, Free Radical

## TEŞEKKÜR

Bu araştırmayı yapmama vesile olan ve tezimin yrtlmesinde bana yardımcı olan danışman hocalarım sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa YÖNTEM ve sayın Doç, Dr. Ramazan KAYAPINAR'a teşekkürü bir borç bilirim. Deneysel çalışmalarımı yaptığım Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalından sayın Uzman Doktor Ergün TEMİZ ve Cem İBİŐ'e; Biyokimya Anabilim Dalı ğretim üyelerinden sayın Yrd. Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK'a; Uzman Kimyager sayın Őentürk ÇİFTÇİ'ye ve tüm Merkez Biyokimya Laboratuvarı alışanlarına; TÜTFAB alışanlarına, Halk Sağlığı Anabilim Dalından sayın Doç. Dr. Faruk YORULMAZ'a ve sayın Doktor Hülya BEYZADEOğLU'na, Biyoistatistik Anabilim Dalından sayın Necdet SÜT'e ve yetişmem sırasında ekip olarak çalıştığım ve yardımlarını gördüğüm tüm çalışma arkadaşlarıma ve saygıdeğer hocalarıma; ayrıca İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalından sayın Doç Dr. Cem Perk'e ve ekibine; tez yazımı aşamasındaki yardımlarından dolayı Seramik Mühendisi zgr ÇINAR'a, Kimya Mühendisi Semiha MURAT'a, Bahadır ve Meriç SOYER'e; maddi ve manevi desteklerinden dolayı sayın Doç.Dr. Süreyya BEYZADEOğLU ve eşi Sabahat BEYZADEOğLU'na, sevgili aileme ve kardeşim Sevgi ÇELİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu projede Dumlupınar Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje No:16). Katkılarından dolayı DP Araştırma Fonu Başkanlığı'na ayrıca teşekkür ederim.

Sevinç ÇELİK

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	iv
SUMMARY .....	v
TEŞEKKÜR .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	Xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	Xiv
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Serbest Radikaller .....	3
2.2. Serbest Radikal Türleri .....	4
2.3. Serbest Radikallerin Oluşumları .....	6
2.3.1. Hücrede serbest radikallerin oluşum yerleri .....	8
2.3.2. Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri ...	11
2.3.2.1. Süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet}$ ) .....	11
2.3.2.2. Hidroksil radikali ( $^{\bullet}OH$ ) .....	12
2.3.2.3. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) .....	13
2.3.2.4. Singlet oksijen ( $O_2$ ) .....	14
2.3.2.5. Nitrik oksit ( $NO^{\bullet}$ ) .....	15
2.4. Serbest Radikallerin Kaynakları .....	16
2.4.1. Endojen kaynaklar .....	16
2.4.1.1. Mitokondrial ve mikrozomal elektron transport zinciri .....	16
2.4.1.2. Aktive fagositler (Respiratory burst) .....	17
2.4.1.3. Oksidatif stres yapıcı durumlar .....	19



## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4.1.4. <u>Endojenöz bileşiklerin otooksidasyonu</u> .....	21
2.4.1.5. <u>Araşidonik asit döngüsünün aktivasyonu</u> .....	22
2.4.1.6. <u>Enzimler ve proteinler</u> .....	22
2.4.1.7. <u>Peroksizomlar</u> .....	22
2.4.1.8. <u>Plazma membranı</u> .....	23
2.4.1.9. <u>Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri</u> .....	23
2.4.1.10. <u>Fiziksel egzersiz</u> .....	24
2.4.2. Eksojen kaynaklar .....	24
2.4.2.1. <u>Çevresel ajanlar</u> .....	24
2.4.2.2. <u>İyonize edici radyasyon</u> .....	25
2.4.2.3. <u>Antineoplastik ajanlar (antikanser ilaçlar)</u> .....	25
2.4.2.4. <u>Stres</u> .....	25
2.4.2.5. <u>Glutasyon tüketen ilaçlar</u> .....	26
2.4.3. Geçiş metalleri ve serbest radikal oluşumu .....	26
2.5. Serbest Radikallerin Etkileri .....	27
2.5.1. Makromoleküllere etkileri .....	27
2.5.1.1. <u>Membran lipidlerine etkileri (Lipid peroksidasyonu)</u> .....	27
2.5.1.2. <u>Proteinlere etkisi</u> .....	30
2.5.1.3. <u>Nükleik asitler ve DNA'ya etkileri</u> .....	31
2.5.1.4. <u>Karbonhidratlara etkileri</u> .....	32
2.5.2. Serbest radikallerin hücreye etkisi .....	33
2.5.2.1. <u>Ekstrasellüler boşluk</u> .....	33
2.5.2.2. <u>Biyomembranlar</u> .....	33
2.5.2.3. <u>Mitokondri</u> .....	34
2.5.2.4. <u>Çekirdek</u> .....	34
2.5.2.5. <u>Sitozol</u> .....	34
2.5.3. Serbest radikallerin dokuya etkileri .....	35

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.6. Serbest Radikaller İle İlgili Patolojik Durumlar .....	37
2.7. Antioksidan Savunma Sistemleri .....	38
2.7.1. Antioksidanların sınıflandırılması .....	40
2.7.2. Antioksidanların etki tipleri .....	42
2.7.2.1. <u>Toplayıcı etki</u> .....	42
2.7.2.2. <u>Bastırıcı etki</u> .....	42
2.7.2.3. <u>Zincir kırıcı etki</u> .....	42
2.7.2.4. <u>Onarıcı etki</u> .....	42
2.7.3. Antioksidan enzimler .....	43
2.7.3.1. <u>Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC.1.15.1.1.)</u> .....	43
2.7.3.2. <u>Glutatyon Peroksidaz (GSH – Px) (EC.1.11.1.9)</u> .....	44
2.8. Operasyon Amaçlı Kullanılan Alet Ve Cihazlar .....	46
2.8.1. Bistüriler .....	46
2.8.2. Kesici ve koagülatör lazerler .....	46
2.8.3. Elektrokoterler .....	46
2.8.3.1. <u>Monopolar koterler</u> .....	46
2.8.3.2. <u>Bipolar koterler</u> .....	47
2.8.4. Argon plazma operasyon cihazı (APS) .....	48
2.8.4.1. <u>Koagülasyon işlemleri</u> .....	48
2.8.4.2. <u>Doku buharlaştırma işlemleri</u> .....	48
2.8.4.3. <u>Kesme işlemleri</u> .....	49
3. MATERYAL VE METOD .....	50
3.1. Materyal .....	50
3.1.1. Kullanılan cihaz ve malzemeler .....	53
3.2. Metodlar .....	54
3.2.1. Malondialdehit (MDA) tayini .....	54
3.2.1.1. <u>Plazmada MDA tayini</u> .....	54

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
3.2.1.2. <u>Dokuda MDA tayini</u> .....	55
3.2.2. <u>Glutasyon peroksidaz (GSH - Px) tayini</u> .....	57
3.2.2.1. <u>Kitte bulunan çözeltiler</u> .....	57
3.2.2.2. <u>Deneyin yapılışı</u> .....	58
3.2.3. <u>Süperoksit dismutaz (SOD) tayini</u> .....	58
3.2.3.1. <u>Metodun prensibi</u> .....	58
3.2.3.2. <u>Kitte bulunan ayıraçlar</u> .....	59
3.2.3.3. <u>Deneyin yapılışı</u> .....	59
3.2.3.4. <u>Standartların hazırlanması</u> .....	60
3.2.4. <u>İstatistiki analizler</u> .....	61
4. <u>SONUÇLAR</u> .....	63
5. <u>TARTIŞMA</u> .....	78
5.1. <u>Metodların Tartışması</u> .....	78
5.2. <u>Bulguların Tartışması</u> .....	79
<u>KAYNAKLAR DİZİNİ</u> .....	82

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Oksijenin redüksiyonu esnasında oluşan ara ürünler .....	7
2.2. Serbest radikallerin hücrede oluşum yerleri .....	9
2.3. NO <sup>•</sup> ın özellikleri .....	15
2.4. Süperoksitin SOD ve nitrik oksit ile iki zincir reaksiyonu .....	16
2.5. Elektron transport zinciri ve ATP sentezleyen yapıları gösteren mitokondrinin yapısı (mt DNA = mitokondrial DNA; mt RNA = mitokondrial RNA) .....	17
2.6. Nötrofil fagositozu ve bakterinin fogolizozomda öldürülmesi için myeloperoksidaz sistemi .....	19
2.7. İskemik hücrede oluşan metabolik değişiklikler .....	21
2.8. Çok doymamış yağ asitlerinin lipit peroksidasyonu .....	29
2.9. •OH Radikalının DNA'ya etkileri .....	31
2.10. Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stres sonucu oluşan doku hasarı .....	35
2.11. Oksidatif stresin oluşturduğu hücre hasarı mekanizmaları .....	36
2.12. Poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) otooksidasyon devri ve antioksidan savunma basamakları I. Süperoksit Dismutaz II. Katalaz III. Glutatyon peroksidaz IV. Ürik asit, E vitamini V. Seruloplazmin VI., VII., VIII. E vitamini	39
2.13. Membranların korunmasında GSHPX, selenyum ve vitamin E ilişkisi .....	45
2.14 Argon Plazma Scalpel (APS) cihazı .....	49
3.1. Tavşanlara anestezi için intramuskular rompun enjeksiyonunu takiben ketamin enjeksiyonu... ..	51
3.2. Tavşanların karın ciltlerinin povidon iyodin ile temizlendikten sonra traş edilmesi .....	52
3.3. Postoperatif dönemde tavşanların kulak veninden kan örneğinin alınması .....	52
3.4. Kan ve doku örneklerinin analiz için hazırlanma aşamaları .....	53
4.1. Operasyon sırasında plazma MDA seviyelerini gösteren diyagram .....	70
4.2. Postoperasyonda (3. Gün) plazma MDA seviyelerini gösteren diyagram .....	70
4.3. Reoperasyon sırasında plazma MDA düzeylerini gösteren diyagram .....	71
4.4. Operasyon sırasında eritrosit SOD düzeylerini gösteren diyagram .....	71
4.5. Postoperasyonda (3. Gün) eritrosit SOD düzeylerini gösteren diyagram .....	72

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.6. Reoperasyon sırasında eritrosit SOD düzeylerini gösteren diyagram .....	72
4.7. Operasyon sırasında total kan GSH-Px düzeylerini gösteren diyagram .....	73
4.8. Postoperasyonda (3. Gün) total kan GSH-Px düzeylerini gösteren diyagram .....	73
4.9. Reoperasyon sırasında total kan GSH-Px düzeylerini gösteren diyagram .....	74
4.10. Operasyon sırasında doku MDA düzeylerini gösteren diyagram .....	74
4.11. Reoperasyon sırasında doku MDA düzeylerini gösteren diyagram .....	75
4.12. Operasyon sırasında doku SOD düzeylerini gösteren diyagram .....	75
4.13. Reoperasyon sırasında doku SOD düzeylerini gösteren diyagram .....	76
4.14. Operasyon sırasında doku GSH-Px düzeylerini gösteren diyagram .....	76
4.15. Reoperasyon sırasında doku GSH-Px düzeylerini gösteren diyagram .....	77

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Serbest radikal türleri .....	5
2.2. Enzimatik olmayan tepkimeler sonucunda oluşan serbest oksijen radikalleri .....	10
2.3. Enzimatik tepkimeler sonucunda oluşan serbest oksijen metabolitleri .....	10
2.4. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Metabolitlerinin Yarı Ömürleri .....	14
2.5. Serbest radikallerinin makromolekülleri etkileri .....	32
2.6. Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu doku hasarları .....	38
2.7. Antioksidanların çeşitli kriterlere göre sınıflandırılması .....	40
2.8. Endojen antioksidanların sınıflandırılması .....	41
2.9. Eksojen antioksidanların sınıflandırılması .....	41
3.1. Dokuda MDA analizi .....	56
4.1. Kruskal-Wallis Testine göre her üç grubun (kontrol, koter ve APS' nin) karşılaştırılması .....	64
4.2. Koter ve kontrol gruplarına ait plazma, MDA, eritrosit SOD, total kan, GSHPx değerleri .....	65
4.3. Koter ve kontrol gruplarına ait doku, MDA, SOD, GSHPx değerleri .....	65
4.4. APS ve Koter gruplarına ait plazma, MDA, eritrosit SOD, total kan, GSHPx değerleri .....	66
4.5. APS ve Koter gruplarına ait doku, MDA, SOD, GSHPx değerleri .....	66
4.6. APS ve kontrol gruplarına ait plazma, MDA, eritrosit SOD, total kan, GSHPx değerleri .....	67
4.7. APS ve kontrol gruplarına ait doku, MDA, SOD, GSHPx değerleri .....	67

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
444	
$e^-$	Elektron
$\cdot OH$	Hidroksil Radikali
$H_2O_2$	Hidrojen Peroksit
$O_2$	Singlet Oksijen
$NO\cdot$	Nitrik Oksit
$O_2^-$	Süperoksit Radikali
$\bar{x}$	Aritmetik Ortalama
Ss	Standart Sapma
Sh	Standart Hata
Ssd	Farkın Standart Hatası
N	Analiz Sayısı (Vaka Sayısı)
"t"	Kritik Oran
P	Probabilite (Önemlilik Derecesi)
r	Korelasyon Sayısı

### Kısaltmalar

ADP	Adenin Difosfat
APC	Argon Plazma Koagülasyon
APS	Argon Plazma Scalpel
AR – GE	Araştırma - Geliştirme
ASC	Argon Sprey Koagülasyon
ATP	Adenin Trifosfat
BHT	Bütül Hidroksi Toluen
DETAM	Deneysel Tıbbi Araştırma Merkezi
DNA	Deoksiribo Nükleik asit

EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetikasıit
GSH	Redükte Glutatyon
GSHPx	Glutatyon Peroksidaz
GSSG	Okside Glutatyon
MDA	Malondialdehit
MPO	Myeloperoksidaz Enzim Sistemi
NADPH	Nikotin Amid Adenin Dinükleotid Fosfat
PAF	Oksidan Uyarımlı Trombosit Aktivatörü
RNA	Rübonükleik Asit
RNS	Reaktif Azot Türleri
ROS, ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksid Dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik asit
TCA	Triklor asetikasıit
TEP	Tetraetoksipropan
TÜTFAB	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Birimi
PUFA	Poliansatüre Yağ Asitleri



## 1. GİRİŞ

Argon Plazma Scalpel (APS) bir diğer adıyla Argon Plazma Operasyon Cihazı İTÜ - KOSGEB Laboratuvarları'nda geliştirilen çok yeni bir medikal enstrüman olup, günümüz cerrahi uygulamalarında halen kullanılmakta olan kesici ve koagüle edici cihazların yaptığı işleri çok daha mükemmel bir şekilde yerine getirmektedir. Türkiye'de ilk kez cihaz ile ilgili cansız doku ve canlı doku (hayvan deneyleri) 1998 - 2000 yılları arasında Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi Rektörlüğü' nün AR - GE projesi olarak gerçekleştirilmiştir (Proje no: TÜAF 197). Ayrıca Marmara Üniversitesi, Nörolojik Bilimler Enstitüsü'nde yapılan hayvan deneylerinin patolojik çalışmalarından alınan sonuçlar umut verici olmuştur (Açıkgöz, vd., 2001; Gültekin, vd., 2000).

Serbest radikaller son yıllarda üzerinde en çok durulan ve en yoğun araştırmaların yapıldığı bir konudur. Serbest radikaller son yörüngelerinde bir veya daha fazla sayıda eşlenmemiş elektron içeren kısa ömürlü, reaktif atom veya moleküllerdir. Bu bileşikler normal metabolik olayların işleyişi esnasında (yükseltgenme - indirgenme reaksiyonlarının yan ürünü olarak) oluştuğu gibi, çeşitli dış etkenlerin (ilaçlar, diğer zararlı ve kimyasal maddelerin) etkisiyle de oluşmaktadırlar. Hücrenin tüm bileşenlerinde oluşabilme ve tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliğine sahiptirler (Repine, 1991; Haklar, 1999; Halliwel, 1984; Akkuş, 1995; Baştar, 1997; Alkan, 1997; Çevrim, 2000; Temiz, 2001).

Aerobik organizmaların yaşamlarını sürdürebilmeleri için organik moleküllerden enerji açığa çıkarmada moleküler oksijeni kullanma mecburiyetinde olmaları, bu canlıları, oksijenin toksik metabolik ürünleri ile birlikte yaşamak zorunda bırakmıştır. Zira aerobik metabolizması olan memelilerde başlıca serbest radikal kaynağının moleküler oksijenden türeyen serbest radikaller olduğu kabul edilmektedir. Çok kısa yaşam süreli, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif yapılı olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliğine sahiptirler (Aslan, vd., 1995; Repine, 1991; Baştar, 1997; Kahraman, 1998; Gökdoğan, 1998, Mehmetçik, 1994; Uysal, 1998; Southorn, 1988; Bast, et al., 1991; Şekeroğlu, 1997; Üzümlü, 2000).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan serbest radikallerdir ki serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallere ait iyonları ve hidroksil radikalidir. Son yıllarda serbest radikallerin yol açtığı hastalıklar ile ilgili araştırmalar önem kazanmıştır. Yapılan çalışmalarda

serbest radikallerin ve lipit peroksidlerinin yaşlanma, kanser, ateroskleroz, iskemi – reperfüzyon hasarı gibi pek çok hastalığın oluşumunda önemli rol oynadıkları kabul edilmektedir (Seven, vd., 1995; Tanakol, 1998; Bast, et al., 1991; Haklar, 1999; Üzüm, 2000; Halliwell, 1984).

Günümüzde cerrahi operasyonlarda kullanılan kesici ve koagüle edici aletler; bistüriler, elektrokoterler, kesici ve koagülatör lazerler, argon sprey koagülasyon cihazı, argon plazma operasyon cihazıdır. APS cihazının kullanım alanları; doku buharlaştırma, doku rezeksiyonu, doku koagülasyonu ve dokuların yüzeysel sterilizasyonudur. Yapılan ön çalışmaların patolojik incelemelerinde cihaz kullanılarak yapılan rezeksiyon ve koagülasyonlarda, canlı doku kaybının elektrokotere göre 1 / 100 oranında daha az olduğu ispatlanmıştır. Uygulama esnasında sağlam dokularda minimal hasar oluşturması cihazın önemli bir üstünlüğüdür. (Açıkgöz, vd., 2001; Yörük, vd., 2000; Gültekin, vd, 2000; Elmacı, vd, 1999; Tanrısever, 1996). Ayrıca APS' nin Amerika Birleşik Devletleri Patent Dairesi tarafında Ekim 2000'de başvurusu kabul edilmiştir (Patent no: 09 / 689,216).

Dumlupınar Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenen ve Trakya Üniversitesi ile koordineli bir şekilde gerçekleştirilen bu çalışmamızda APS ile ilgili operasyonların bir kısmı da İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı Kliniği'nde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda APS ile opere edilen tavşanların kan ve karaciğer dokularındaki serbest oksijen radikallerinin düzeylerinin, klasik bistüri ve elektrokotere göre, antioksidan enzimlerin ve lipit peroksidasyonunun ölçümü yoluyla farklılık oluşturup oluşturmadığının tespiti amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Serbest Radikaller

Bir atom, nötron ve protonlardan oluşan bir çekirdek ve çekirdeğin çevresinde dönen elektronlardan oluşur. Elektronlar, atom ve molekülleri içinde enerji seviyelerine göre orbital olarak bilinen yörüngelerde bulunurlar. Orbitalde her biri diğerinin fizikokimyasal reaksiyonlara girmesini engelleyen ; zıt spinlerde ( $\uparrow\downarrow$ ) hareket eden elektron çiftleri vardır. Bir orbitalde yalnız bir tane elektron bulunursa bu eşlenmemiş demektir. Serbest radikaller, son yörüngelerinde bir veya daha fazla sayıda eşlenmemiş elektron içeren kısa ömürlü, reaktif atom veya moleküllerdir. Serbest radikaller elektriksel olarak negatif yüklü, pozitif yüklü veya yüksüz olabilirler (Akkuş, 1995; Repine, 1991; Kahraman, 1998; Gökdoğan, 1998; Mehmetçik, 1994; Aslan, vd., 1995, Uysal, 1998; Baştar, 1997; Çevrim, 2000).

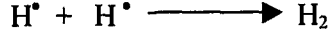
Bu bileşikler, organizmada normal metabolik olayların işleyişi sırasında oluştuğu gibi, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Çok kısa yaşam süreli, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif yapılı olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği göstermektedir. Eşlenmemiş elektron bu molekülleri oldukça reaktif hale getirir, etkileşime girdikleri molekülden ya bir elektron alır yada ona bir elektron verirler. Böylece etkileşime girdikleri molekülün yapısını bozarlar. Sonuçta radikal olmayan bir yapı (nonradikal), radikale dönüşebilmektedir (Mehmetçik, 1994; Yelkenci, 1996; Uysal, 1998; Baştar, 1997; Onat, vd.,1997; Bast, et al., 1991; Halliwell, 1994; McCord, 1993; Gökdoğan, 1998; Çevrim, 2000; Yazan, 1999; Haklar, 1999).

Halojen atomlar, oksijen metabolizması ara ürünleri olan oksijen türleri,  $Br^-$  ve  $Cl^-$  gibi tek atomlu yapılar,  $Na^+$ ,  $K^+$  gibi alkali metal atomları, bir orbitalinde tek elektron bulunduran  $NO^*$  ve  $NO_2^*$  gibi atom kombinasyonları radikaller olarak sınıflandırılmaktadır (Aslan, vd., 1995).

Ancak  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mo^{5+}$  gibi geçiş metallerinin de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat, reaksiyonları katalize ettiklerinden dolayı bu iyonlar serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (Akkuş, 1995; McCord, 1993; Aslan, vd., 1995; Kahraman, 1998; Kızılay, 1998).

İki radikal karşılaştığı zaman eşlenmemiş elektronlarını birleştirirler ve aralarında kovalent bağ oluşur. Eşlenmemiş elektronuyla hidrojen atomu bir radikaldir ve iki hidrojen

atomu diatomik hidrojen molekülü oluşturmak üzere kolayca birleşebilirler. Eşlenmemiş elektron, genel olarak sağ üst köşeye yazılan bir nokta ile gösterilir (Halliwell, 1991, 1994; Bast, et al., 1991; Kahraman, 1998; Akkuş, 1995; Willson, 1997).



## 2.2. Serbest Radikal Türleri

Aerobik metabolizması olan memelilerde başlıca serbest radikal kaynağının moleküler oksijenden türeyen serbest radikaller olduğu kabul edilmektedir. Aerobik organizmaların yaşamlarını sürdürebilmeleri için organik moleküllerden enerji açığa çıkarmada moleküler oksijeni kullanma mecburiyetinde olmaları, bu canlıları, oksijenin toksik metabolik ürünleri ile birlikte yaşamak zorunda bırakmıştır (Mehmetçik, 1994; Seçkin, 1988; Yelkenci, 1996; Uysal, 1998; Başaran, 1998; Kahraman, 1998; İşcan, vd., 1998; Aslan, vd., 1995).

1924’ de moleküler oksijenin eşlenmemiş elektronlar içerdiği saptanmıştır.  $\cdot \overset{\cdot}{O} \cdot$  olarak gösterilmesi uygun olan atomik oksijen molekülü eşlenmemiş iki elektrona sahiptir. Bunun için oksijen bazen bir “diradikal” olarak da değerlendirilir (Halliwell, 1984; Akkuş, 1995; Bast, et al., 1991; Kahraman, 1998; Çevrim, 2000). Bazı literatürlerde “diradikal” veya “dioksijen” şeklinde ifade edilmektedir (Aslan, vd., 1995). Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. Radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girer (Akkuş, 1995). Çünkü oksijenin son yörüngesindeki elektronların paralel spinlerde olması ( $\uparrow\uparrow$ )  $O_2$  molekülünün iki elektronu birden almasını ve kimyasal bağ oluşturabilmesini engeller. Bu nedenle oksijen molekülü çift yerine tek elektronu almayı benimsemektedir (Aslan, vd., 1995).

Oksijen tam olarak indirgendiği metabolik reaksiyonlarda son ürün olarak suya dönüşür. Oksijenin suya indirgenmesi sırasında, redüksiyonun ara basamaklarında metabolit olarak yüksek derecede reaktif ara ürünler açığa çıkar. Bu ara ürünlerin hepsi radikal olmadığı için “reaktif oksijen türleri” terimini kullanmak yerinde olur (Halliwell, 1984; Akkuş, 1995; Bast, et al., 1991; Aslan, vd., 1995; Uysal, 1998; Kahraman, 1998).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan serbest radikallerdir (Akkuş, 1995; Uysal, 1998; Kahraman, 1998). Fakat organizmada oksijen türevi serbest radikaller dışında daha az olarak karbon ve kükürt merkezli radikaller de oluşmaktadır

(Uysal, 1998; Kahraman, 1998). Diğer fizyolojik bir serbest radikal nitrik oksittir (Akkuş, 1995; Jain, et al, 1989). Nitrik oksit ( $\text{NO}^*$ ) bir radikal toplayıcısıdır. Süperoksit,  $\text{NO}^*$  ile reaksiyona girerek peroksinitrit ( $\text{ONOO}^*$ ) oluşturur. Peroksinitritin protein ve non protein sülfidrillerin oksidasyonu, lipid peroksidasyonu, mitokondriyal elektron zincirindeki bazı enzimlerin inhibisyonu ve DNA kırıkları oluşturucu etkisi bilinmektedir. Bundan dolayı  $\text{NO}^*$ , süperoksit toplayıcısı olarak değerlendirilir (Gökdoğan, 1998; Halliwell, 1994; Tecder – Ünal, 1998).

**Reaktif oksijen türleri (ROS)** : Oksijen radikallerini ve oksitleyici ajanları kolayca radikal haline dönüştüren, radikal olmayan oksijen bileşikleri içeren kompleks bir tanımdır. **Reaktif nitrojen türleri (RNS)** ise nitrik oksit ( $\text{NO}^*$ ), azot dioksit ( $\text{NO}_2^*$ ) ve radikal olmayan azot bileşikleri içeren kompleks bir tanımdır (Alkan, 1997) (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1.: Serbest radikal türleri (Alkan, 1997)

REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS)	
<u>Radikaller</u>	<u>Radikal Olmayanlar</u>
Süperoksit ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )	Hidrojenperoksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )
Hidroksit ( $\cdot\text{HO}$ )	Hipoklorik asit ( $\text{HOCl}$ )
Hidroperoksit ( $\text{HO}_2^*$ )	Ozon ( $\text{O}_3$ )
Peroksil ( $\text{ROO}^*$ )	Singlet Oksijen
Alkoksil ( $\text{RO}^*$ )	
REAKTİF AZOT TÜRLERİ (RNS)	
<u>Radikaller</u>	<u>Radikal Olmayanlar</u>
Nitrik oksit ( $\text{NO}^*$ )	Nitrosil ( $\text{NO}^-$ )
	Nitröz asit ( $\text{HNO}_2$ )
	Nitroksit ( $\text{NO}$ )
Nitrojen dioksit ( $\text{NO}_2^*$ )	Dinitrojen tetroksit ( $\text{N}_2\text{O}_4$ )
	Dinitrojen trioksit ( $\text{N}_2\text{O}_3$ )
	Peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ )
	Alkil peroksinitrit ( $\text{ROONO}$ )
	Nitril ( $\text{NO}_2^*$ )
	Peroksinitröz asit ( $\text{ONOOH}$ )

### 2.3. Serbest Radikallerin Oluşumları

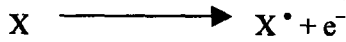
Serbest radikaller “oksidan moleküller” veya en doğru adlandırma ile “reaktif oksijen türleri”, hücrenin tüm fraksiyonlarında oluşabilme özelliğindedir. Hücrede zara bağlı veya serbest olarak bulunan değişik enzimlerin etkisi ile serbest radikal oluşmaktadır (Mehmetçik, 1994; Bast, et al., 1991; Uysal, 1998). Ayrıca enzimatik olmayan tepkimeler sonucu gerçekleşen otooksidasyon sırasında ve radyasyon, hava kirliliği, toksik kimyasallar, sitostatikler, sigara dumanı, pestisitlere maruz kalma gibi bir çok dış etkenler reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumuna neden olmaktadır (Onat, vd.,1997; Halliwell, 1991; Şekeroğlu, vd., 1997). Bu radikal oluşumu hücre tiplerine göre değişiklik göstermesine rağmen, tüm aerobik hücrelerde belirli düzeylerde radikal oluşmaktadır (Mehmetçik, 1994; Uysal, 1998, Çevrim, 2000).

Serbest radikaller, başlıca 3 yolla meydana gelirler ;

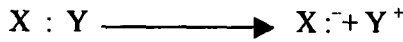
1. Normal kimyasal bağlar çoğunlukla 2 elektron ihtiva ettikleri için bir molekülü oluşturan kovalent bağın homolitik bölünmesi sonucu ortak elektronlardan her birinin ayrı parçada kalması ile meydana gelebilmektedir.



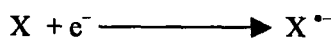
2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi veya molekülün heterolitik bölünmesi sonucu oluşabilmektedir.



Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomların birinde kalır ve çoğunlukla serbest radikaller değil iyonlar meydana gelir.



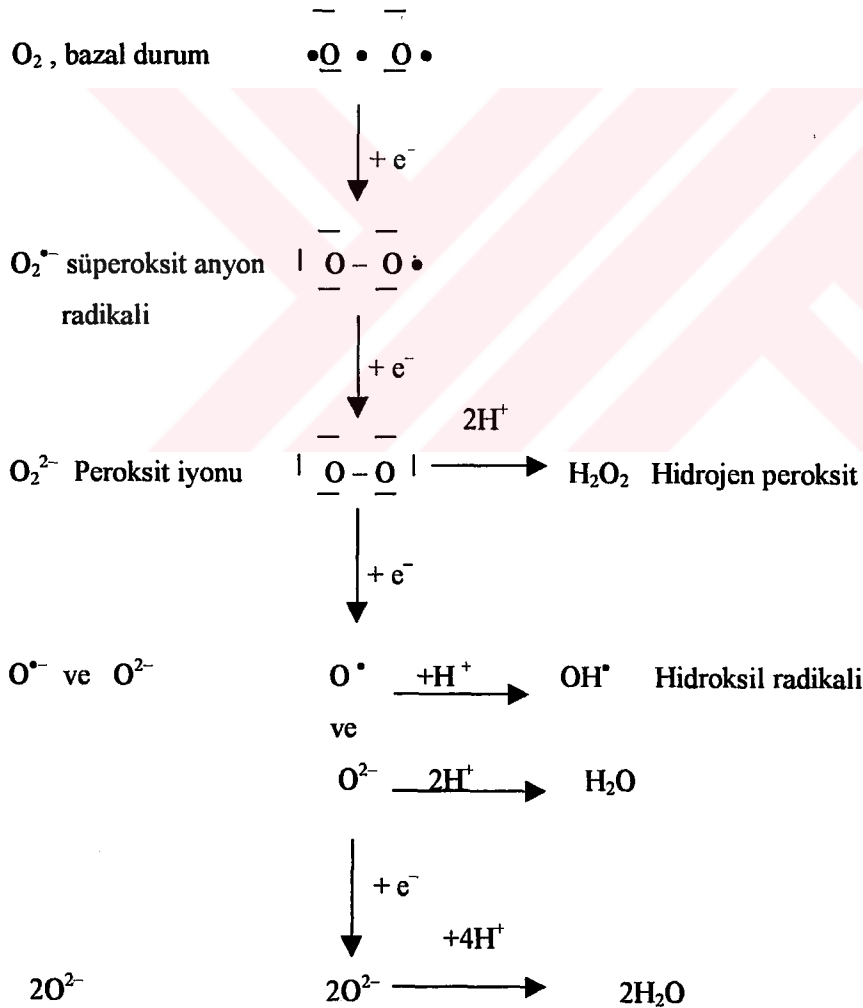
3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile elde edilebilmektedir (Akkuş, 1995; Onat, vd.,1997; Kızılay, 1998; Çevrim, 2000).



Negatif yüklü  $e^{-}$  sayısının çekirdekdeki proton sayısı ile eşit olmadığı için dayanıklı olmayan serbest radikaller,  $e^{-}$  konfigürasyonlarını pozitif yükü dengelemeleri gerektiğinden

çok reaktiftirler. Tek elektronunu bir başka moleküle verebilen bu radikaller, bir başka molekülden  $e^-$  (elektron) alarak elektron çifti oluşturabilmektedirler (Onat, vd., 1997; Aslan, vd., 1995).

Aerobik metabolizması olan memelilerde oksijenin suya indirgenmesi esnasında oluşan reaktif oksijen türleri sağlıklı durumlarda belli oranlarda canlılığın devamı için gerekli moleküllerdir (Mehmetçik, 1994; Bast, et al., 1991; Kahraman, 1998). Oksijenin suya indirgenmesi sırasında yer alan tek  $e^-$  taşınmaları sonucunda oluşan bu serbest radikaller süperoksit anyonu ve hidroksil radikalidir (Akkuş, 1995; Bast, et al., 1991; Seçkin, 1988; Yelkenci, 1996; McCord, 1993; Uysal, 1998; Başaran, 1998) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. : Oksijenin redüksiyonu esnasında oluşan ara ürünler



Şekil 2.1.'de oksijenin redüksiyonu esnasında oluşan ara ürünler gösterilmektedir. Oksijenin bir e<sup>-</sup> alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali oluşur. (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) Eğer iki e<sup>-</sup> transfer edilirse hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oluşur (Halliwell, 1984; Akkuş, 1995; Bast, et al., 1991; McCord, 1993; Kahraman, 1998). Süperoksitin bir e<sup>-</sup> alması sonucu peroksit oluşur ve peroksit molekülü de 2H<sup>+</sup> atomu ile birleşerek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' i meydana getirir. Ancak biyolojik sistemlerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' in asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler oluştuğu için bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak da bilinir (Akkuş, 1995; Bast, et al., 1991; Halliwell and Gutteridge, 1984; Fridovich, 1984).



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bir radikal değildir ancak membranlardan kolayca geçebilen, uzun ömürlü kuvvetli bir oksidan maddedir. İkidenden fazla e<sup>-</sup> alabilir ve oldukça sitotoksik olan ürünlere dönüşür. Ferro demir (Fe<sup>+2</sup>) hidrojen peroksitde 3. elektronunu transfer ederse O - O bağı kırılarak su ve OH<sup>•</sup> radikali oluşur (Akkuş, 1995; Bast, et al., 1991; McCord, 1993; Kahraman, 1998).

### 2.3.1. Hücrede serbest radikallerin oluşum yerleri

Şekil 2.2.' de görüldüğü gibi, serbest radikaller hücrenin tüm fraksiyonlarında oluşabilme özelliğindedirler. Bunlar;

- a) Mitokondirideki elektron transport zincir reaksiyonlarını,
- b) Endoplazmik retikulumdaki karma foksiyonlu oksidaz sistemini
- c) Ksantin oksidaz, dopamin β - hidroksilaz, urat oksidaz, D - amino oksidaz gibi enzimlerin etkinliğini ,
- d) Hücre zarına bağlı NADPH oksidaz, prostaglandin sentetaz ve lipoksijenazların faaliyetini,
- e) Peroksizomlarda ve lizozomlardaki metabolik olayları kapsamaktadır (Mehmetçik, 1994; Uysal, 1998; Yu, 1994; Kehrer, 1993).

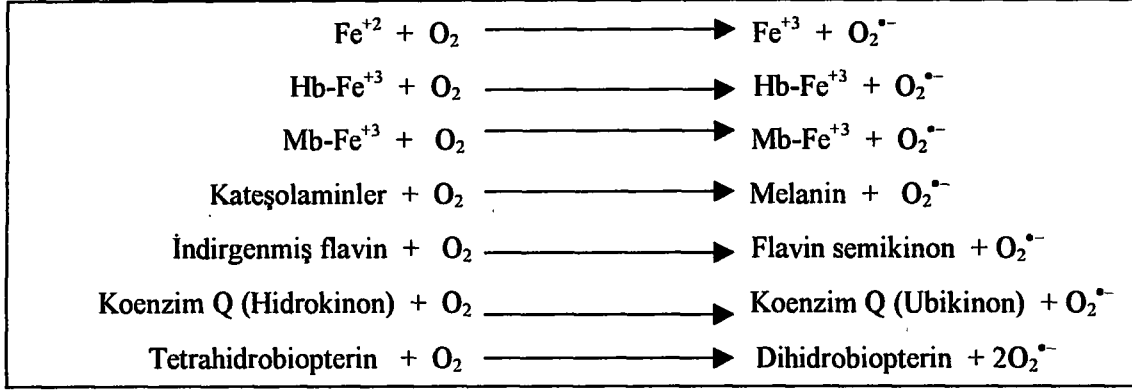


Serbest radikallerin katıldıkları reaksiyonlar enzimatik ve enzimatik olmayan kaynaklara bağlı olabilir. Enzimatik serbest radikal reaksiyonları arasında solunum zinciri fagositoz, prostoglandin sentezi ve sitokrom P<sub>450</sub> sisteminin çalışması sırasında oluşan reaksiyonlar sayılabilir. Oksijenlerin organik bileşiklerle, bakır veya demir katalizörlüğünde girdiği reaksiyonlar ise enzimatik olmayan serbest radikal reaksiyonlardır. (Çizelge 2.2.-2.3.). Bu reaksiyonlarda O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH<sup>\*</sup>, R<sup>\*</sup> ve RO<sub>2</sub><sup>\*</sup> gibi radikaller oluşmaktadır (Seçkin, 1988).

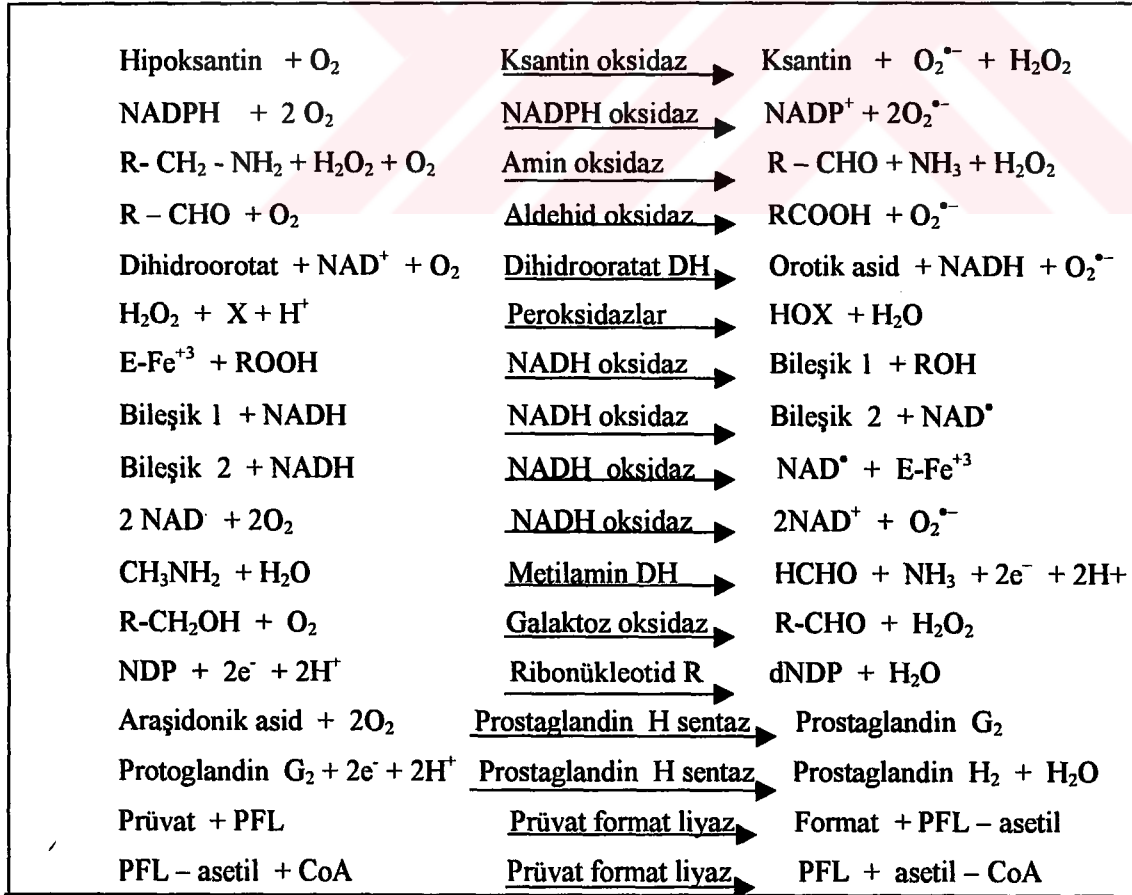


Şekil 2.2. Serbest radikallerin hücrede oluşum yerleri

Çizelge 2.2. Enzimatik olmayan tepkimeler sonucunda oluşan serbest oksijen radikalleri (Onat, vd.,1997).



Çizelge 2.3. Enzimatik tepkimeler sonucunda oluşan serbest oksijen metabolitleri (Onat, vd.,1997)

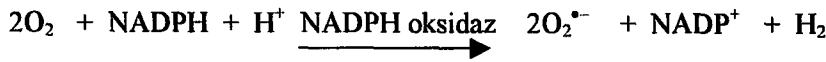


### 2.3.2. Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri

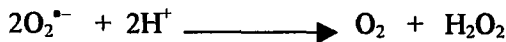
#### 2.3.2.1. Süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ )

Tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin tek bir elektron alarak indirgenmesiyle oluşan ilk ürün süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) radikalidir. Süperoksit radikali hem oksitleyici hem de redükleyici özelliğe sahip olmakla birlikte  $O_2^{\cdot-}$  radikalinin reaktivesi düşüktür. Ancak hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyici olması nedeniyle oldukça önemlidir (Akkuş, 1995; Alkan, 1997; Kahraman, 1998; Kızılay, 1998; Halliwell, 1984). Mitokondri, endoplazmik retikulum ve kloroplast gibi sellüler elektron transport zincirinin çeşitli komponentlerinden  $O_2$ ' e elektron sızması yoluyla oluşur. Aşırı solunumla,  $O_2$  tüketmesinin artması sonucu buna bağlı olarak sızan elektron ile orantılı olarak süperoksit üretim hızı da artar (Halliwell, 1984; Akkuş, 1995; Kahraman, 1998; Akyüz, vd., 1998).

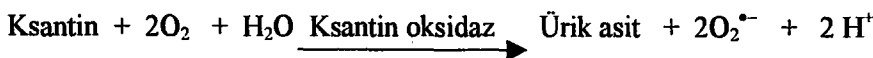
İnvio süperoksitin bir diğer kaynağı nötrofiller, monositler, makrofajlar, eozinofiller gibi fagositik hücrelerin solunumsal patlamasıdır. Bu hücrelerin en önemli fonksiyonu patojen mikroorganizmaların ortadan kaldırılmasıdır ve bu esnada hücrelerin oksijen kullanım hızı artar ve bu olay "respiratory burst" yani solunumsal patlama olarak tanımlanır (Halliwell, 1984; Akkuş, 1995; Babior, 1978; Balabanlı, vd., 1998; Çevrim, 2000; Ünalı, vd., 1989). Nötrofillerde süperoksit radikali üretimi plazma membranının dış yüzeyine yerleşmiş olan NADPH oksidaz aracılığı ile olur. Uygun bir stimulus ile fagositik hücre uyarıldıktan sonra NADPH oksidaz aktive olur. NADPH' tan iki  $e^-$  u alarak iki molekül oksijene aktarır. Böylece iki molekül süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) oluşur (Richard, 1984; Markert, et al., 1984; O'Brien, 1984).



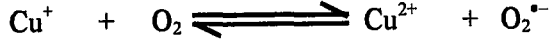
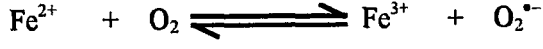
Solunumsal patlama esnasında oluşan  $O_2^{\cdot-}$  ' in çoğu fagositler tarafından bakterisidal bir ajan olan  $H_2O_2$  ' e dönüştürülür (Halliwell, 1984; Akkuş, 1995; McCord, 1993; Kahraman, 1998; Babior, 1978; Halliwell and Gutteridge, 1984; Fridovich, 1984; Ünalı, 1992).



Hücrelerde süperoksit anyon radikalının oluşumuna neden olan diğer bir enzim ksantin oksidaz (XO)'dır. Ksantin oksidaz enzimi ksantinün ürik aside dönüşümü esnasında süperoksit radikallerinin oluşumuna sebep olur (Akkuş, 1995; Baştar, 1997).



İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu da süperoksit meydana getirebilir.



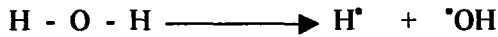
Bu reaksiyonlar geri dönüşümlüdür ve geri dönüşümlü redoks reaksiyonları olarak düşünülebilir (Akkuş, 1995; Kızılay, 1998).

Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde protonlanarak oksidan perhidroksit radikali ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ) oluşturur. Süperoksit ile perhidroksit birbiriyle reaksiyona girince, biri yükseltgenir diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda oksijen ve hidrojen peroksit oluşur (Akkuş, 1995; Kızılay, 1998).

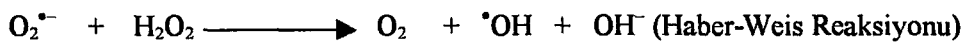
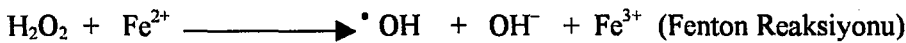
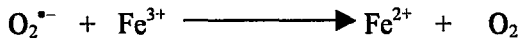


### 2.3.2.2. Hidroksil radikali ( $\bullet\text{OH}$ )

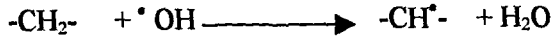
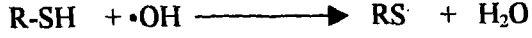
Hidroksil radikali, geçiş metallerinin varlığında hidrojen peroksidin indirgenmesiyle oluşan son derece reaktif bir radikaldir ve bu reaksiyon Fenton reaksiyonu olarak tanımlanır. Ayrıca Haber – Weis reaksiyonu ile yani hidrojen peroksidin süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucunda da meydana gelir. Haber - Weis reaksiyonu katalizörsüz çok yavaş olduğu halde  $\text{Fe}^{2+}$  katalizörlüğünde çok hızlı oluşur. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalmasıyla da oluşabilir (Akkuş, 1995; Alkan, 1997; Kahraman, 1998; Kızılay, 1998; Çevrim, 2000; Yu, 1994; Czopski, 1984).



Hidroksil radikalinin yarılanma ömrü oldukça kısadır. Çok reaktif olduğu için hemen yakın çevredeki moleküllerle etkileşime girer ve birçok zincir reaksiyonları başlatır.  $\bullet\text{OH}$  en aktif ve en toksik etkili olan serbest radikaldir. Hidroksil radikalinin son derece yüksek reaktivitesi vardır ki yapıldığı hücre bölümünden daha uzaktaki hücre bileşenleri ile difüzyona gerek kalmadan reaksiyona girer.



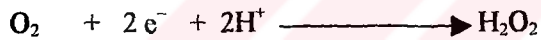
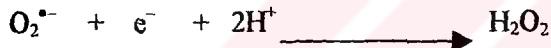
\*OH radikali tiyoller ve yağ asitleri gibi daha bir çok molekülden hidrojen atomları kopararak yeni radikallerin oluşumuna neden olur (Akkuş, 1995; Onat, vd.,1997; Halliwell, 1991; Bast, et al., 1991; Baştar, 1997; Kahraman, 1998; Lowry, et al., 1951).



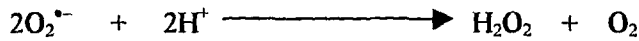
Radyasyon sonucu suyun hidrolizi ile oluştuğu bilinen hidroksil radikallerinin hidrojen peroksit meydana getirdiği yönünde araştırmacılar hemfikirdir. Hidroksil radikali DNA'nın pürin ve pirimidin bazları ile reaksiyona girerek DNA baz modifikasyonlarına yol açabilir (Halliwell, 1991; Kahraman, 1998; Akkuş, 1995; Ohkawa, et al., 1979; Yu, 1994).

### 2.3.2.3. Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 e<sup>-</sup> alması veya süperoksitin bir e<sup>-</sup> alması sonucu peroksit oluşur. Oluşan peroksit molekülü 2H<sup>+</sup> atomu ile birleşerek Hidrojen peroksiti (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) meydana getirir (Akkuş, 1995; Kahraman, 1998).



Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dolayı dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir.



Bu reaksiyon ya spontandır ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir, spontan olarak da pH 4,8' de en hızlıdır ve SOD tarafından ise bu reaksiyon geniş bir pH aralığında oluşmaktadır (Akkuş, 1995; Kızılay, 1998). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' in bir diğer önemli kaynağı ise peroksizomlardaki bazı oksidaz katalizli (D-amino asit oksidaz , glikolat oksidaz) reaksiyonlardır (Yenson, 1988).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içerisine girer ve hidroksil radikali oluşumuna yol açabileceğinden dolayı serbest radikal biyokimyasında önemli

rol oynayan bir oksidandır. Hidrojen peroksit süperoksit ile reaksiyona girerek , en reaktif ve zarar verici serbest radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir. Hidrojen peroksit mitokondrial membranlar, peroksizomal membranlar ve plazma membranından kolaylıkla diffüze olarak toksik etkilerini açığa çıktığı noktadan daha uzak yerlerdeki hücre bölümlerinde güçlü bir şekilde gösterebilir (Kavas, 1989).  $H_2O_2$  membranlardan çok kolay geçebilirken, diğer reaktif oksijen ürünleri geçebilecekleri bir anyon kanalı olmadıkça membranlardan çok yavaş geçebilirler. Eritrositler ve vasküler endotelial hücrelerin membranı ise böyle bir kanala sahiptir (Akkuş, 1995; Kahraman, 1998; Kızılay, 1998).

#### 2.3.2.4. Singlet oksijen ( $O_2$ )

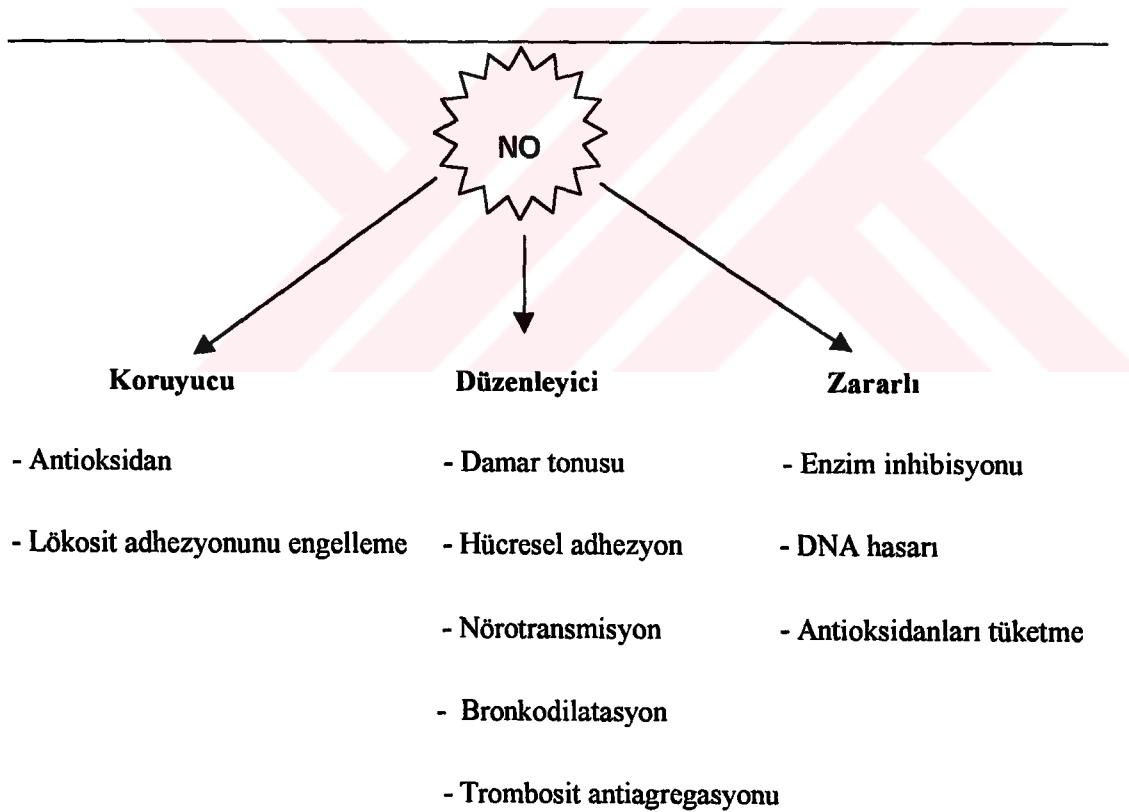
Singlet Oksijen, eşlenmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucunda meydana gelebildiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da neden olur. Oksijenin elektronlarından birisinin enerji alması sonucu bulunduğu orbitalden başka bir orbitale kendi spininin ters yönünde yer değiştirmesiyle oluşur. Delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır. Lökositlerden salınan myeloperoksidazın katalize ettiği reaksiyonda hipoklorit ( $HOCl^-$ ) oluşur. Hipokloritle  $H_2O_2$  arasındaki reaksiyonda da singlet oksijen meydana gelir Singlet oksijenin, kimyasal bir bileşikle etkileşimi sonucu kemiluminesans meydana gelir ve bunun ölçülmesi ile reaktif oksijen türlerinin direkt tayini yapılabilmektedir. (Akkuş, 1995; Kahraman, 1998; Kızılay, 1998; Çevrim, 2000; Lowry, et al., 1951). Organizmada metabolik olaylar sırasında üretilen reaktif oksijen türlerinin ve reaktif nitrojen türlerinin yarılanma ömürleri Çizelge 2.4.'te gösterilmiştir.(Sies, 1991; Kahraman, 1998; Yu, 1994)

Çizelge 2.4. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Metabolitlerinin Yarı Ömürleri

Türü	Sembolü	Yarı Ömür (Saniye, 37 °C)
Süperoksit	$O_2^{\cdot-}$	$1 \times 10^{-6}$ (spontane veya enzimatik)
Hidroksil	$\cdot OH$	$1 \times 10^{-9}$
Alkoksil	$RO\cdot$	$1 \times 10^{-6}$
Peroksil	$ROO\cdot$	$1 \times 10^{-2}$
Singlet Oksijen	$O_2$	$1 \times 10^{-6}$
Semikinon radikali	$O^{\cdot-}$	Günler
Nirtik oksit radikali	$NO\cdot$	$1 \times 10$
Peroksinitrit radikali	$ONOO\cdot$	0,05 – 1
Hidrojen peroksit	$H_2O_2$	Enzimatik

### 2.3.2. 5. Nitrik oksit (NO<sup>•</sup>)

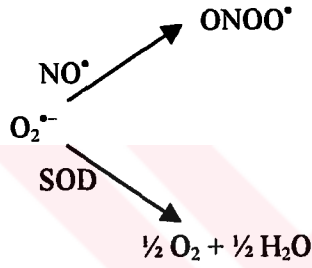
Nitrik oksitin hücresel düzeyde koruyucu etkileri olmasına rağmen, oksidatif stres altında süperoksit radikali ile reaksiyona girerek oluşan peroksinitrit ile hücre hasarına neden olabilmektedir. Çünkü nitrik oksit ve süperoksit radikallerinin birleşmesiyle oluşan peroksinitrit çok güçlü bir oksidandır. Bir çok biyolojik materyali direkt olarak etkilemesinin yanı sıra proteinlerdeki tirozini nitratlaştırarak birçok hastalığın patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır (Bartosz, 1996; Balabanlı, vd., 1998; Haklar, 1999; Yaman, vd., 1999; Özveri, 1999; Tecder – Ünal, 1998; Erbaş, 1998). Nitrik oksit vazomotor tonüsün sağlanmasının yanısıra inflamasyon yanıtlarında, homeostazisde, vasküler hücre büyümesinde de önemli rollere sahiptir (Erkoç, 1998; Türkozan, 1999). (Şekil 2.3.)



Şekil 2.3. NO' n özellikleri



Nitrik oksitin fizyolojik şartlarda süperoksit radikaliyle birleşmesi oldukça sınırlıdır. Çünkü oluşan süperoksit radikali hücrede yüksek konsantrasyonda bulunan SOD tarafından kolaylıkla ortadan kaldırılabilmektedir. Patolojik şartlarda ise hem nitrik oksit hem de süperoksit sentezi artmakta, oluşan süperoksit, süperoksit dismutaz enzimi tarafından yeterli bir şekilde yok edilemezse sonuç olarak peroksinitrit radikali de oluşmaktadır. (Amanvermez, vd., 1999; Bartosz, 1996; Balabanlı, vd., 1998) (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Süperoksitin SOD ve nitrik oksit ile iki zincir reaksiyonu

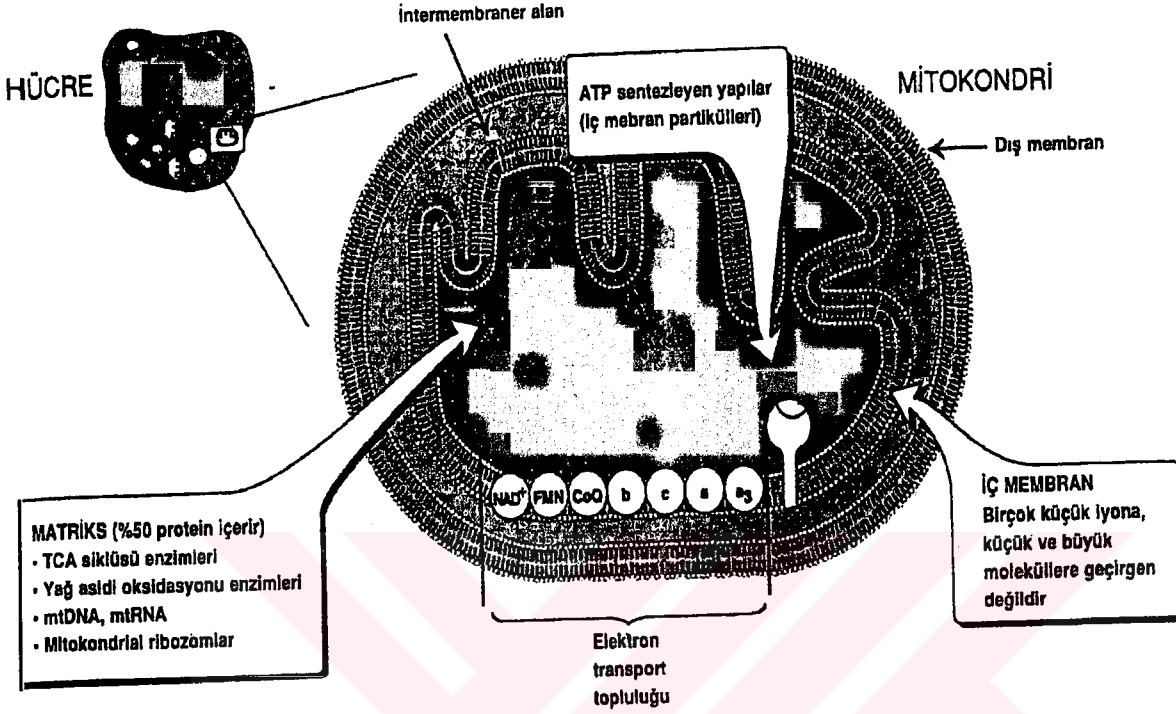
## 2.4. Serbest Radikallerin Kaynakları

### 2.4.1. Endojen kaynaklar

#### 2.4.1.1. Mitokondrial ve mikrozomal elektron transport zinciri

Elektron taşıyıcılar oksijene elektron sızdırabilirler. Mitokondriyal elektron transport zincirinden iki yerde  $e^-$  sızar; birincisi, NADH-dehidrogenaz basamağı, ikincisi ise koenzim Q yada ubikinon basamağıdır. Elektronların  $O_2$ ' e taşınmasında terminal sorumlu olan sitokrom oksidaz enzimi oksijenin % 98'ini harcayarak suya indirger. Oksijenin % 1 - 2'si ise süperokside indirgenebilir (Akkuş, 1995; McCord, 1993; Champe, vd., 1997; Kahraman, 1998; Gökdoğan, 1998; Kızılay, 1998) (Şekil 2.5).





Şekil 2.5. Elektron transport zinciri ve ATP sentezleyen yapıları gösteren mitokondrinin yapısı (mt DNA = mitokondrial DNA; mt RNA = mitokondrial RNA)

#### 2.4.1.2. Aktive fagositler (Respiratory burst)

Fagositik lökositler enfeksiyona karşı vücudun hücresel cevabını başlatan hücrelerdir. Nötrofiller ve monositler bakterilerin öldürülmesi için hem oksijen bağımlı hem de oksijen bağımsız mekanizmalar içerirler. Oksijen bağımlı mekanizmalar miyeloperoksidaz enzim sistemini (MPO) ve serbest oksijen radikallerinin üretimini sağlayan başka sistemleri içerirler. Oksijenden bağımsız sistem, fagolizozomda patojenlerin öldürülmesinde pH değişikliklerini ve lizozomal enzimleri kullanır. Bütününde, bu bakterisidal mekanizmaların en etkili MPO sistemidir (Akkuş, 1995; Sies, 1991; Champe, vd., 1997; Gökduman, 1998; Çevrim, 2000; Kılıçturgay, 2000; Ünalı, v.d, 1989; Balabanlı, 1998).

Fagositik lökositler çözünebilir ya da partiküler bir stimulusla uyarıldıktan sonra lizozomal komponentleri dışarı vermeye başlarlar ve reaktif oksijen türlerinin oluşumuyla

birlikte, mitokondri dışındaki oksijen tüketiminde bir patlama ("respiratory burst") gösterirler. Bu olayda fagosite edilmiş bakteri solunumsal patlama (respiratory burst) ürünlerinin toksik etkileriyle öldürülür. Bu oksidan ürünler süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve halid oksidasyon ürünleridir (Akkuş, 1995; Gökdoğan, 1998; Bayındır, 1998) (Şekil 2.6)

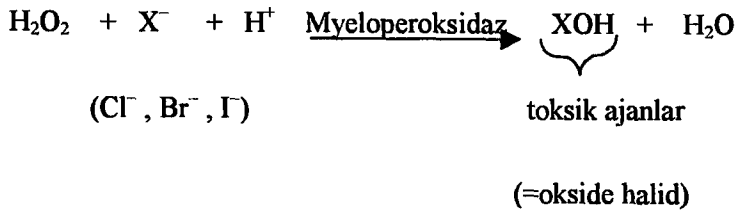
Aktive fagositler reaktif oksijen ürünlerini oluşturarak endotel hasarına neden olurlar (Bayındır, 1998; Moldow, 1984; Ward, 1991).

Solunumsal patlamadan sorumlu enzim NADPH oksidazdır. Bu bir ekto enzim olup, plazma membranının dış yüzeyinde bulunur. Fagositik vakuol oluşturmak için plazma membranı invagine olduğunda, enzim iç tarafta kalır ve vakuoler boşluktaki oksijene etki eder (Akkuş, 1995; Gökdoğan, 1998; Babior, 1978) (Şekil 3.5.).

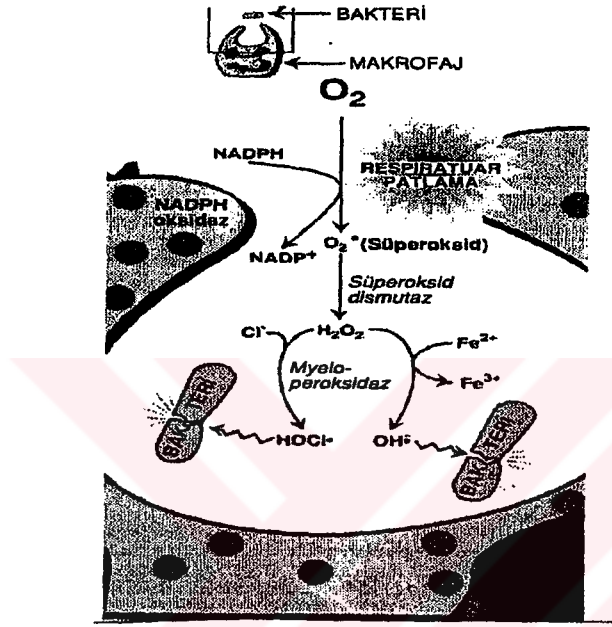


Süperoksit, fagositler tarafından bakterisidal bir ajan olan  $H_2O_2$ 'e dönüştürülür. Süperoksitin sınırlı reaktivitesine rağmen geçiş metalleri iyon komplekslerini indirgeyebilmesi ya da okside edebilmesi, metallerle ligandlar oluşturabilmesi, organik substratları okside edebilmesi ve perhidroksil radikaline protonlanabilmesi bu radikalin fagosit aracılığı ile olan sitotoksistide önemli rol oynamasına sebep olur (Akkuş, 1995; Babior, 1978).

Myeloperoksidaz enzimi  $H_2O_2$  varlığında, florür dışındaki halidlerin (klorür, iyodür, bromür) oksidasyonunu katalizler ve okside halid meydana gelir (Akkuş, 1995).



Myeloperoksidaz enzimi yokluğunda süperoksit radikali, hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek hidroksil radikali ve singlet oksijen oluşturur ki, her ikisi de organizma için zararlıdır (Akkuş, 1995; Champe, vd., 1997; Gökdoğan, 1998) (Şekil 2.7.)



Şekil 2.6. Nötrofil fagositozu ve bakterinin fagolizozomda öldürülmesi için myeloperoksidaz sistemi.

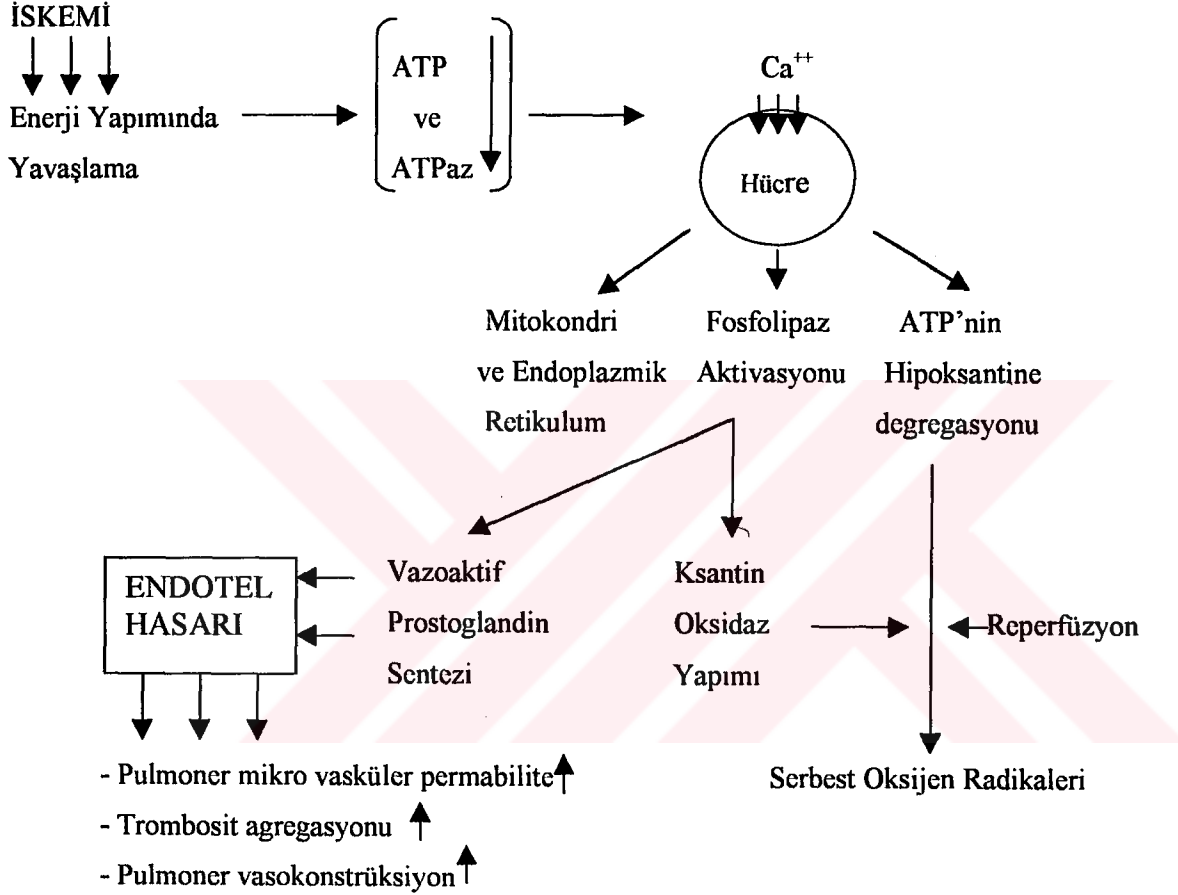
#### 2.4.1.3. Oksidatif stres yapıcı durumlar

Oksidatif stres yapıcı durumlar; iskemi, travma, intoksikasyon vb. olaylardır. **İskemi – reperfüzyon**; iskemi bir bölgenin geçici olarak kansız kalmasıdır ki oksijenin bozulmuş metabolizmasını simgeler. İskemik dokular hipoksik ve hatta anoksik olabilirler (McCord, 1985). İskemi sonrasında dokunun tekrar kanlanmasıyla (reperfüzyon) dokuya gelen oksijenin dokuda oksijen türevi serbest radikallere dönüştüğü bilinmektedir. Reperfüzyon esnasında ortaya çıkan başlıca reaktif oksijen metabolitleri süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve hidrojen peroksittir (Tuncer, vd., 1998; Kızılay, 1998; Erşahin, 1998; Benli, 1998; Gökdoğan, 1998; Akkuş, 1995).

Serbest radikaller reperfüzyonun ilk birkaç dakikasında hücreler arası sıvıda ve damar duvarı içinde oluşmaktadır ki nötrofillerden çok endotelden salınırlar. Ayrıca endotel hücresinin tek başına iskemi / reperfüzyon (İ / R) sonrasında reaktif oksijen türlerini üretebildiği ve bunların hücre hasara yol açtığı gösterilmiştir. Radikallerin etkisiyle hücre membran yapısının bozulması endotele lökosit ve makrofaj adezyonunu artırarak iki olaya neden olmaktadır. NADPH oksidan aktivitenin artması ile serbest radikal oluşumunun artması ve endotelden bazı medyatörlerin (PAF, komplemen ve bunun gibi) salınmasıdır. İskemi reperfüzyon sırasında oksidan uyarımlı trombosit aktivatörü (PAF) gibi faktörler lenfositleri uyarırlar, hücre içi kalsiyumun ve protein kinaz enziminin seviyesi artar ve bunların hücre içi seviyelerinin artışı ise ksantin dehidrogenazın (XD = Tip D), ksantin oksidaza (XO = Tip O) dönüşümünü artırır. Oluşan ksantin oksidaz  $NAD^+$  yerine reperfüzyonla tekrar ortama ulaşan moleküler oksijeni elektron alıcısı olarak kullanarak süperoksit oluşumunu katalizler. Bu şekilde oluşan süperoksit, süperoksit dismutaz enziminin etkisiyle hidrojen peroksite dönüşürken aynı zamanda nitrik oksit ile de birleşerek peroksinitrit oluşturur. İskemi esnasında hücre içi kalsiyum girişinin artması endojen fosfolipazların artmasına ve hücre membran bütünlüğünün bozulmasına neden olur. Bu olaylar sonucu oluşan doku hasarı organdan organa farklılık gösterir. Miyokarda iskemi / reperfüzyon hasarını belirlemede reaktif oksijen radikallerinin önemi kesinlik kazanmıştır (Ambrosio, et al., 1991; Ferrari, et al., 1991; Sözmen, vd., 1998; McCord, 1985; Benli, 1998; Yu, 1994; Erşahin, 1998; Kapkaç, vd., 1996; Seven, vd., 1995 ).

Hücre zedelenmesinin en sık nedeni hipoksidir, hipoksinin en sık nedeni ise iskemidir. İskemi geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz hücre hasarına neden olabilir. İskemi esnasında oluşan hipoksida ilk zarar gören yer hücrenin aerobik solunumudur, aerobik metabolizma hızla anaerobik metobolizmaya dönüşür. Hipoksik hücrede mitokondrideki oksidatif fosforilasyonun engellenmesi örnek olarak gösterilebilir. Hücrede protonlar inorganik fosfatlar birikir, hücre içi sodyum potasyum ATP'az pompasının bozulmasına neden olur. Hücre içine  $Ca^{+2}$ ,  $Na^+$  ve  $Cl^-$  girişi artar,  $K^+$  iyonu azalır, böylece hipoksi hücre içi  $Na^+$  birikimine ve hücrede potasyumun dışarı atılımına neden olarak akut hücre hasarı oluşturur. Hemen ardından granüllü endoplazmik retikulumdan ribozomların ayrılması ortaya çıkar. Eğer hipoksi devam ederse zar geçirgenliği artar ve mitokondri fonksiyonları azalır. Oluşan bu değişikliklerin tümü geri dönüşümlü hücre zedelenmesinde görülen olaylardır. Hücreye oksijen girmeye başlayınca oluşan değişiklikler normale döner. Eğer iskemi sürerse geri dönüşümsüz hücre zedelenmesine neden olur. Geri dönüşümsüz hücre zedelenmesinde karakteristik iki olay vardır. Birincisi, mitokondrinin reperfüzyon ve reoksijenasyonuna rağmen fonksiyon bozukluğudur, ikincisi ise membran hasarıdır. Membran hasarının oluşmasında ROT' nin rolü vardır ki bunu da iskemik

dokuda kan akımı düzeltildikten sonra reperfüzyon hasarına neden olarak yaparlar. Reperfüzyon meydana gelmezse öldürücü iskemik zedelenme oluşur, fakat toksik serbest oksijen radikalleri görülmez. İskemik hücrede oluşan metabolik değişiklikler şekil 2.7.'de özetlenmiştir (Kılıç, 2000; Temiz, 2001; Bedirhan, vd., 1993; Şener, 1998).



Şekil 2.7. İskemik hücrede oluşan metabolik değişiklikler

#### 2.4.1.4. Endojenöz bileşiklerin otooksidasyonu

Çözünabilir özelliği olan ve nötral sıvı ortamda oksidasyon – redüksiyon reaksiyonlarına girebilen hücre komponentlerinin pek çoğu intraselüler olarak serbest radikal açığa çıkarırlar. Bunlar arasında tioller hidrokinonlar, filavinler, terahidro proteinler ve katekolaminler bulunur. Bu maddeler oksijenin redüksiyonunu sağlarken pirimer olarak süperoksit radikallerinin oluşmasına neden olurlar. Streste katekolamin düzeyi artar. Katekolaminler ve monosakkaritler gibi moleküllerin otooksidasyonunun endojen stres katkıda bulunduğu dair kanıtlar artmaktadır. Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal

kaynağıdır. Bu olay stresin hastalıkların patogenezindeki rolünün serbest radikal üretimiyle ilgili olabileceğini göstermesi bakımından önemlidir. Antibiyotikler gibi küçük moleküllerin otooksidasyonu da intrasellüler kaynaklarıdır (Akkuş, 1995; Sies, 1991; Gökdoğan, 1998; Kızılay, 1998; Kavas, 1989).

#### **2.4.1.5. Araşidonik asit döngüsünün aktivasyonu**

Araşidonik asit metabolizması reaktif oksijen türlerinin üretildiği önemli bir kavşaktır. Fagositoz ROT türlerinin üretildiği önemli bir kavşaktır. Fagositoz hücrelerinin uyarılması, membransel siklooksijenaz, fosfolipaz ve protein kinaz enzimlerinin aktivasyona ve plazma membranında arşidonik asit salınımına sebep olur. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu ise serbest radikalleri açığa çıkarır. Araşidonik asit döngüsü PLA<sub>2</sub> ile aktive edilir ve lipid peroksidasyonu süreci başlatılır (Akkuş, 1995; Aslan, vd., 1995; Champe, vd., 1997; Gökdoğan, 1998; Kızılay, 1998)

Lipidlerden arşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine “enzimatik lipid peroksidasyonu” diğer radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonuna “non-enzimatik lipid peroksidasyonu” adı verilmektedir (Akkuş, 1995; Kahraman, 1998).

#### **2.4.1.6. Enzimler ve proteinler**

Birçok enzim katalitik siklusları sırasında, serbest radikallerin oluşmasını sağlarlar. Bunlardan üzerinde en çok durulanı ksantin oksidaz olup, oksijenin hidrojen peroksit reaksiyonu sırasında süperoksit radikalinin oluşmasını sağlar. İn vivo iskemi, ksantin oksidazı dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüştürürken süperoksit radikalinin açığa çıkmasını sağlar. Serbest radikal oluşturan diğer enzimler flavoprotein dehidrogenaz, triptofan dioksijenaz, NADPH oksidaz, aldehyd oksidaz, amino asit oksidaz gibi enzimlerdir. Ayrıca, hemoglobin, sitokrom P<sub>450</sub> ve sitokrom b<sub>5</sub> radikal oluşumuna sebep olurlar (Akkuş, 1995; Kavas, 1989; Çevrim, 2000; Sümer, 1993).

#### **2.4.1.7. Peroksizomlar**

Oksidazların yüksek konsantrasyonlarda bulunmalarından dolayı hücresel hidrojen peroksit kaynağıdır. Bu yapılar D – aminoasit oksidaz, ürat oksidaz, L – alfa – hidroksiasit

oksidaz ve yağ asidi açıl KoA oksidazdan çok zengindirler. Bu enzimler ise  $H_2O_2$  açığa çıkarıcı özelliğe sahiptirler (Kavas, 1989).

#### **2.4.1.8. Plazma membranı**

Pek çok nedenden ötürü plazma membranı, serbest radikal reaksiyonları için önemli bir yerdir. Ekstrasellüler olarak açığa çıkan serbest radikaller, hücrenin diğer bölümleriyle reaksiyona girebilmek için öncelikle plazma membranını geçmelidirler ya da toksik reaksiyonlarını membranda başlatmalıdırlar. Membran yapısında yer alan fosfolipitler, glikolipitler, gliseridler, steroller gibi doymamış yağ asitleri ve kolay okside olabilen amino asitleri içeren trans membran proteinleri serbest radikallerin zararlı etkilerine açıktırlar. Ayrıca serbest radikallerin başlattığı lipid peroksidasyonu ya da yapısal öneme sahip proteinlerin oksidasyonu, membran iyon geçirgenliğinin bozulmasına ve sekresyon fonksiyonlarında kayıplara ve hücre içi metabolik olayların inhibisyonuna yol açabilir (Kavas, 1989; Çevrim, 2000; Akkuş, 1995).

Plazma membranında bulunan lipoksijenaz, prostoglandin sentetaz, fagositlerde NADPH oksidaz, lipid peroksidasyonu serbest radikallerin kaynaklarıdır. Fagositoz esnasında, oksijen kullanımı arttığından oksijenden süperoksit dolayısıyla hidrojen peroksit açığa çıkışı da artar. Bu nedenle fagositik hücrelerin plazma membranları NADPH oksidazın aracılık ettiği serbest radikal üretiminde önemli bir kaynaktır. Lipoksijenaz ve siklooksijenaz gibi mikrozomal ve plazma membranına bağlı olan enzimlerin predominant substratı olan araşidonik asidin biyolojik olarak etkili ürünlere (prostoglandinler, lökotrienler, tromboksanlar) dönüşümü sırasında serbest radikaller meydana gelirler (Kavas, 1989; Çevrim, 2000; Aslan, vd., 1995; Akkuş, 1995).

#### **2.4.1.9. Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri**

Endoplazmik retikulum ve nükleer membranlarda bulunan sitokrom  $P_{450}$  ve sitokrom  $b_5$  elektron transfer reaksiyonları ile polar olmayan bileşikleri hidroksil türevlere dönüştüren karmaşık fonksiyonlu oksidazlardır. Bir hem proteini olan  $P_{450}$  ve  $b_5$  bir çok endojen bileşiğin (örneğin katekolaminler, doymamış yağ asitleri gibi) ve ksenobiyotiğin hidroksilasyonunu katalize eder. Sitokrom redüktazlar sitokrom  $P_{450}$  ve  $b_5$ 'in aracılık ettiği hidrojen peroksit ve süperoksitin olduğu otooksidasyon reaksiyonlarında elektron temininde görevlidirler.



Mikrozomal ve nükleer membran sitokromları direkt olarak bir elektron transferiyle peroksisitokrom kompleksi veya süperoksitin ayrıştırılması suretiyle hidrojen peroksit oluştururlar (Akkuş, 1995; Çevrim, 2000).

#### **2.4.1.10. Fiziksel egzersiz**

Fiziksel aktivite, şiddet ve süresiyle bağımlı olarak metabolik süreçleri ve oksijen tüketimini arttırarak daha fazla serbest radikal oluşumuna sebep olabilir. Serbest radikallerdeki artış, antioksidan savunma kapasitesini aşarak lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu harekete geçirir. Lipid peroksidasyonu da fiziksel yorgunluğa sebep olacak düzeydeki egzersizde kas dokusunda harabiyet oluşturur. Egzersizin antioksidanlar ve lipid peroksidasyonuna etkisi bir çok çalışmada tartışılmıştır ve bir genelleme yapacak olursak akut egzersiz, lipid peroksidasyonunda artışa, düzenli egzersiz ise antioksidan statüsünde pozitif bir değişmeye yol açmaktadır (Yenson, 1988; Çolakoğlu, 1998; Aslan, vd., 1996; Akyüz, 1998).

#### **2.4.2. Eksojen kaynaklar**

##### **2.4.2.1. Çevresel ajanlar**

Hava kirliliğine yol açan fotokimyasal maddeler, pestisitler, asbestler, solventler, anestezipler, aromatik hidrokarbonlar, aşırı oksijen konsantrasyonu ve sigara dumanı serbest radikallerin oluşumuna neden olan çevresel ajanlardır (Dalaman, 1998; Çevrim, 2000; Akkuş, 1995; Uysal 1998; Gökdoğan, 1998).

Aşırı oksijen konsantrasyonu (hiperoksi); Hiperoksi, oksijen için  $K_M$ 'i yüksek olan enzim sistemlerini aktive eder ve bazı enzimler oksijen radikallerini üretirler (Kızılay, 1998; Küçükaya, 1997).

Sigara dumanı; Kimyasal ve organik maddelerin yanmasıyla açığa çıkan özel maddelerin radikallerin olası kaynakları veya taşıyıcıları olduğu ileri sürülmektedir. Sigara dumanı, akciğerlere alınan başlıca yanmış organik materyaldir ve bilinen birçok oksidan madde içermektedir. Sigaranın yan etkisinin, bazı biyolojik maddelere yaptığı hasar sonucu geliştiğine inanılmaktadır. Sigaranın neden olduğu oksidatif hasarın ise hem sigara dumanında bulunan



oksidanlar hem de sigara dumanıyla uyarılan fagositik hücrelerden reaktif oksijen türlerinin salınımı sonucu oluştuğu düşünülmektedir (Alkan, 1997; Gökdoğan, 1998; Macnee, et al., 1991; Aslan, vd., 1995).

#### **2.4.2.2. İyonize edici radyasyon**

İyonize edici radyasyonun suyu hidroliz ederek serbest radikal oluşturduğu yönünde araştırmacılar hem fikirdir. X ve Y ışınları parçacıklı radyasyon (elektron, nötron, proton, alfa ve beta parçacıkları) OH ve H gibi radikallerin oluşumuna neden olurlar (Balabanlı, vd., 1998; Sies, 1991; Gökdoğan, 1998; İnal, 1998). İnsanlar günlük yaşamlarında sürekli olarak karsinojenlere maruz kalırlar. Fiziksel karsinojenlerden biri olan solar radyasyonun solar spektrumunda bulunan UVA yeryüzüne ulaşan güneş ışınlarının büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. UV ışınlarının uyardığı oksidatif hasardan süperoksit, hidroksil ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin sorumlu olduğu tespit edilmiştir. Deri dokusu poliansatüre yağ asitlerinden zengin içeriği oksijen ve UV ışınları ile sürekli ilişkide olması sebebiyle meydana gelen ROT'nin oluşturduğu hasara açık önemli bir dokudur. Reaktif oksijen türleri deride infeksiyon, ısı, UV ışınları ile oluşur. Deriden sonra diğer dokular etkilenmektedir (Kahraman, 1998; Gürbüz, 1998, Çevrim, 2000, Yazan, 1999).

#### **2.4.2.3. Antineoplastik ajanlar (antikanser ilaçlar)**

Antibiyotiklerin yapılarındaki guinoit grupları, bağlı metaller ve adriamisin, doksorubisin, nitrofrantoin gibi antineoplastik ajanlar oksijen radikallerini oluşturacak aktiviteye sahiptirler. Sitotoksik yan etkileri bu ilaçların oksijeni süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerine indirgemesine bağlıdır (Uysal, 1998; Çevrim, 2000, Aslan, vd., 1995).

#### **2.4.2.4. Stres**

Strese bağlı gelişen hücre hasarında oksijen türevi radikal oluşumundaki artışın önemli bir etken olduğu benimsenmektedir. Bununla birlikte tam olarak stresin hangi mekanizmalarla serbest radikal oluşturduğu bilinmemektedir. Bununla ilgili değişik hipotezler (streste katekolamin salgısının artması, ksantin oksidazın aktiflenmesi ve hipoksi ) ileri sürülmektedir. Streste katekolamin düzeyi artar ve katekolaminlerin oksidasyonu ise süperoksit radikal oluşumunu arttırmaktadır. Ayrıca hidroksil radikali oluşumuna yol açan araşidonat

metabolizmasını da uyarmaktadır. Bunun yanı sıra oksijen kaynağı ile oksijene duyulan ihtiyaç arasındaki, dengesizliğe yol açan katekolaminler, mitokondride sitokrom oksidazdan serbest radikal kaçacağına da yol açmaktadırlar. Bu faktörlerin streste oksidan baskının artmasına yol açtığı kabul edilmektedir (Yelkenci, 1996; Akkuş, 1995)..

#### 2.4.2.5. Glutasyon tüketen ilaçlar

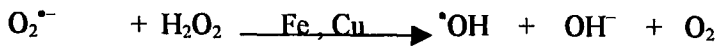
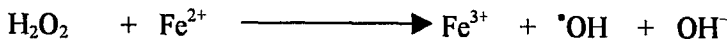
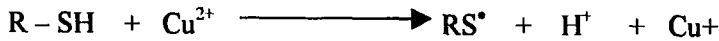
Glutasyon tüketen ilaçlara asetaminofen, kokain örnek verilebilir (Uysal, 1998).

#### 2.4.3. Geçiş Metalleri ve Serbest Radikal Oluşumu

Geçiş metalleri, özellikle, demir ve bakır, fizyolojik şartlarda çeşitli oksidasyon basamaklarında rol oynarlar. Oksidasyon esnasında  $e^-$  alışverişi yükseltgenme indirgenme reaksiyonlarıyla olur.



Geçiş metalleri bu özelliklerinden dolayı serbest radikal reaksiyonlarını hızlandırır ve katalizör vazifesi görürler. Bu tip maddelere oksidan stres yapan (oksidan stressor) maddeler denilir. Tiyollerden thio Haber – Weis ve Fenton reaksiyonları ile  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve  $\text{O}_2^{\bullet-}$  den  $\text{OH}^-$  sentezini katalizler.



$\text{Mn}^{2+}$  in  $\text{O}_2^{\bullet-}$  tarafından oksidasyonu  $\text{Mn}^{3+}$  veya Mn-oksijen komplekslerinin oluşumunu sağlar ki bu kompleksler  $\text{O}_2^{\bullet-}$  'den çok daha oksitleyicidirler (Akkuş, 1995).

Demir, fenton reaksiyonu yoluyla en güçlü radikal olan hidroksil radikallerin oluşmasını sağlarken, stabil lipid hidroperoksitlerinin peroksi ve alkoksi radikallerine dönüşümünü hızlandırır. Benzer etki bakırın geçirdiği indirgen transizyon metallerinin otoksidasyon reaksiyonlarında da görülmektedir.  $\text{Cu}^+ + \text{O}_2^{\bullet-} \longrightarrow \text{Cu}^{++} + \text{O}_2^{\bullet-}$  Metal

iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki asıl önemi lipid reaksiyonlarındaki etkileridir. Çoklu doymamış yağ asitleri membran lipidlerinde bulunur ve bunlar peroksidasyona duyarlıdır. Geçiş metalleri lipid peroksidasyonunu başlatmaktan ziyade sentezlenen lipid hidroperoksitlerinin parçalanmasını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu katalize ederler. Böylece daha az zararlı olan radikalleri daha zararlı hale getirmiş olurlar (Akkuş, 1995; Seymen, vd., 1999).

Bakırın diğer önemli bir fonksiyonu hücreleri lipid peroksidasyonundan koruyan SOD enziminin yapısında yer almasıdır. Serbest bakır organizmada hücre membranları üzerine prooksidan olarak rol oynamaktadır.

Bir başka eser element olan  $Zn^{2+}$  birçok enzimin işlevinde görev almaktadır. SOD enziminin yapısında bakır-çinko vardır. Plazmada serbest halde bulunan  $Zn^{2+}$ , hücrelerde membran stabilizatörü olarak fonksiyon görmektedir. Çeşitli biyolojik moleküllere bağlanarak demir ve bakırın bağlanmasını, dolayısıyla da oksidatif hasarı önlemektedir. Bu nedenle  $Zn^{2+}$  antiperoksidatif etkiye sahip bir element olarak tanımlanmaktadır (Seymen, vd., 1999; Onat, vd., 1997; Aslan, vd., 1995).

## 2.5. Serbest Radikallerin Etkileri

### 2.5.1. Makromoleküllere etkileri

#### 2.5.1.1. Membran lipidlerine etkileri (Lipid peroksidasyonu)

Serbest radikallerin biyolojik sistemlerdeki zararlı etkileri çeşitlidir. Biyomoleküllerin serbest radikallere karşı en hassas olanları lipidlerdir. Membran lipidlerindeki doymamış yağ asitlerinin reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu hücre zarlarında sıklıkla görülen bir olay olup birçok hastalık ve klinik durumun patogenezinde etkilidir (Halliwell, 1991; Yenson, 1988; Kahraman, 1998; Kızılay, 1998; Porter, 1984).

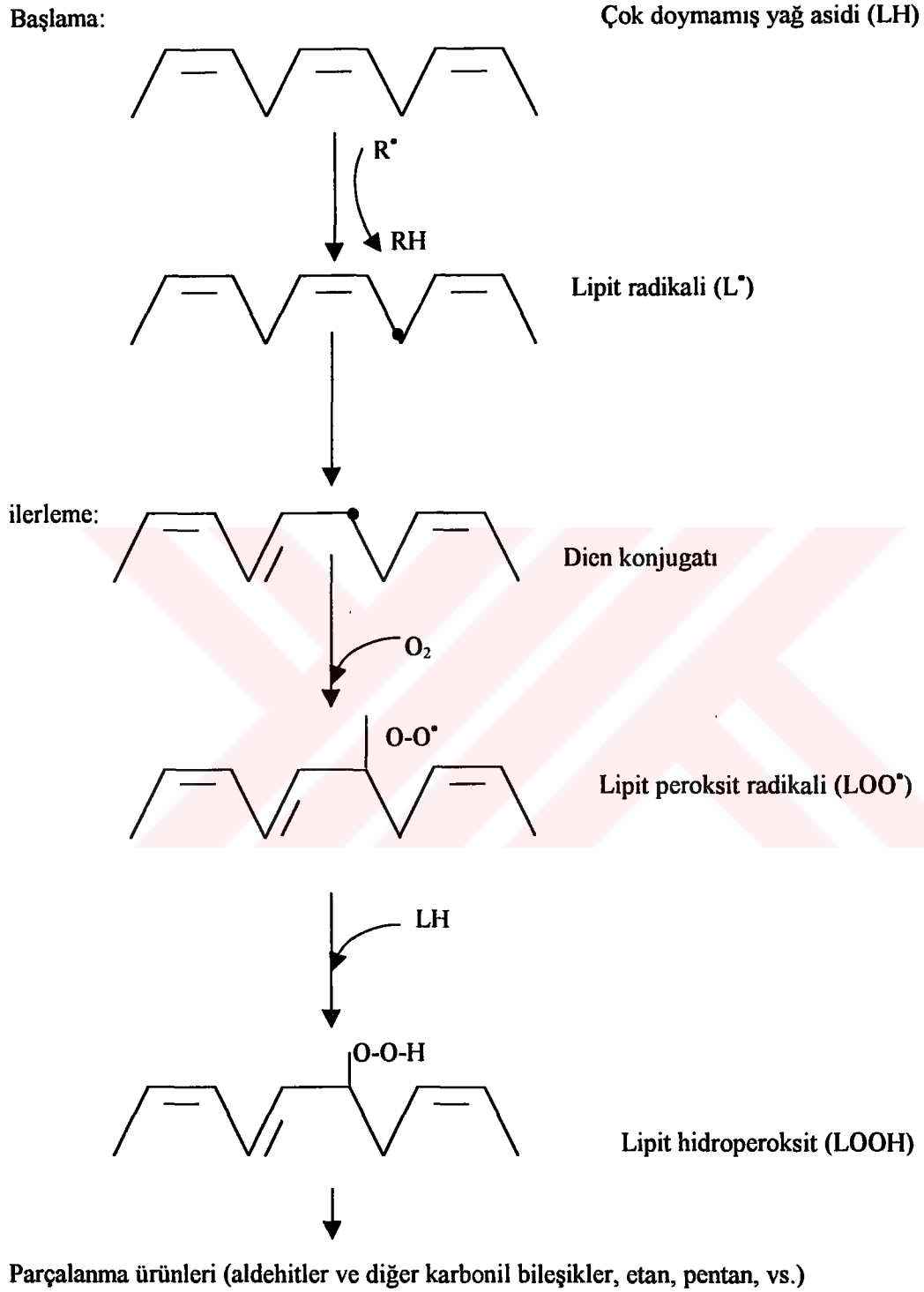
Bu kimyasal olay; organizmada oluşan kuvvetli oksitleyici bir radikalın zarların yapısında bulunan çok doymamış yağ asidi zincirindeki  $\alpha$  - metilen gruplarından bir hidrojen ( $H^+$ ) atomunun uzaklaştırılmasıyla başlamaktadır. Bu serbest radikalın hidroksil radikali veya süperoksit radikali olduğu kabul edilmektedir. Bununla beraber, lipid peroksidasyonunun

uyarılmasında asıl etkili radikalın hidroksil radikali olduğu benimsenmektedir. Bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır (Mehmetçik, 1994; Yu, 1994; Southhorn, et al., 1988). Oluşan bu lipit radikali ( $L^*$ ) dayanaksız bir bileşik olup, molekül içi çift bağ aktarılması (rezonans) sonucunda dien konjugatlara dönüşmektedir. Daha sonra, lipid radikalının moleküler oksijenle etkinleşmesi sonucu lipid peroksit radikali ( $LOO^*$ ) meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri de zar yapısındaki diğer çok doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumunu sağlamakta ve kendileri de yeni radikallerin oluşumu esnasında açığa çıkan  $H^+$  atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine ( $LOOH$ ) dönüşmektedirler (Şekil 2.8). Böylece reaksiyon oto-katalik bir şekilde devam eder ya da toplayıcı reaksiyonlarla sonlandırılır (Mehmetçik, 1994; Seçkin, 1988; Yu, 1994; Southhorn, et al., 1988; Ohkawa, et al., 1979; Akkuş, 1995; Cheeseman, 1993).

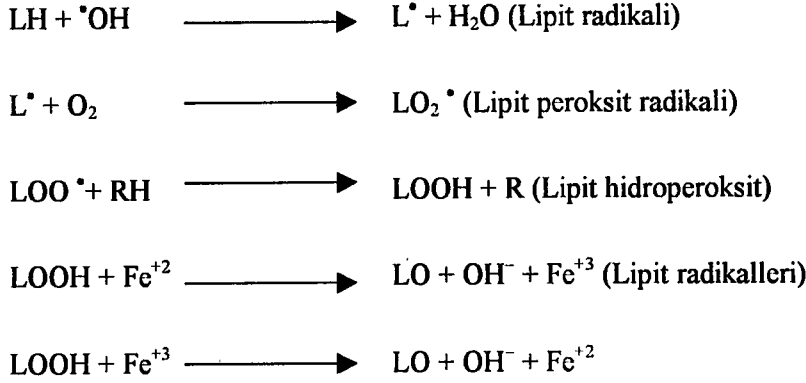
Lipid peroksidasyonu, lipit hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile sona ermektedir. Bu bileşiklerden birisi olan Malondialdehit miktarı tiyobarbitürik asit testi (TBA) ile ölçülmektedir. Bu yöntem lipit peroksit düzeylerinin belirlenmesinde en sık kullanılan yöntemlerden birisidir. Bunun yanısıra, peroksidasyon esnasında oluşan dien konjugatlarının ölçümü de, *in vivo* lipid hidroperoksitlerinin düzeyini yansıtması açısından giderek önem kazanmaktadır. Lipid peroksitlerinin parçalanması ile oluşan etan, bütan, pentan gibi gazların tayini de son yıllarda lipid peroksidasyon göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Mehmetçik, 1994; Seçkin, 1988; Yu, 1994; Southhorn, et al., 1988; Cathcart, et al., 1984; Draper, et al., 1990; Jain, et al., 1989).

Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Bu reaksiyon sonucunda; zarların lipit yapısındaki değişiklikler nedeni ile zar işlevinin bozulması, oluşan serbest radikallerin enzimlere ve diğer hücre bileşenlerine etkisi, son ürün olan aldehitlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına, birçok hastalığa neden olmakta ve doku hasarı meydana gelmektedir (Akkuş, 1995; Seçkin, 1988; Yu, 1994; Yelkenci, 1996).

Peroksidasyonla oluşan malondialdehid, membran komponentlerinin çapraz bağlanması ve polimerizasyonuna neden olur. Bu da iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi membran özelliklerini değiştirir. Bu durum ise malondialdehidin niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklamaktadır (Akkuş, 1995).



Şekil 2.8. Çok doymamış yağ asitlerinin lipit peroksidasyonu (Yelkenci, 1996; Uysal, 1988; Başaran, 1998).



### 2.5.1.2. Proteinlere etkisi

Proteinler serbest radikallere karşı lipidlerden daha az hassastırlar. Etkilenme dereceleri de amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Bunun sonucunda doymamış bağ veya sülfür içeren amino asitlerden (triptofan, fenil alanin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller oluşur. Proteinlerin tiyol gruplarının oksidasyonu; enzim fonksiyonunda kayıp, membrandan iyon veya metabolit transportu ile kontraktıl fonksiyonlarda bozulma meydana gelmesine neden olur. Bunun sonucunda yapıları bozulan proteinler normal fonksiyonları yerine getiremezler. Hemoglobinin yapısında bulunan hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin  $\text{O}_2^{\cdot-}$  veya  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile reaksiyonu sonucu methemoglobin oluşur (Akkuş, 1995; Kahraman, 1998; Gökdoğan, 1998; Kızılay, 1998).

Proteinlerde oluşan yapısal değişiklikler üçe ayrılır:

- 1) Aminoasitlerin modifikasyonu,
- 2) Proteinlerin fragmentasyonu,
- 3) Proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmalar (Gökdoğan, 1998; Kızılay, 1998).

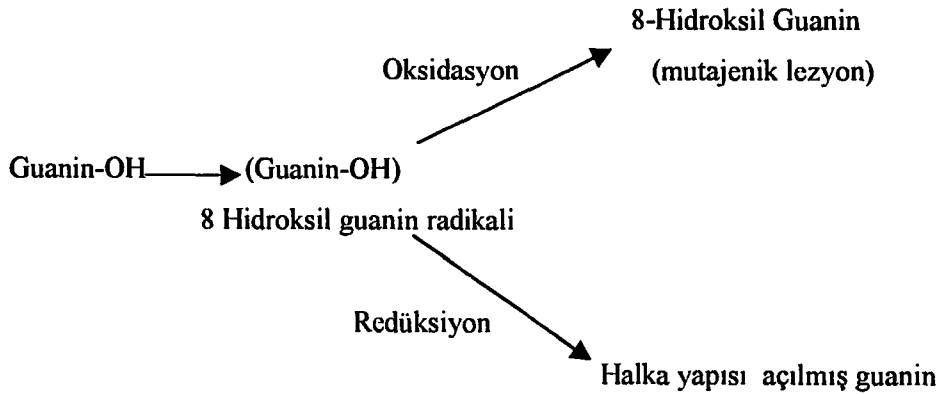
Proteinin temel yapısındaki değişme antijenitesindeki değişmeye ve proteolize hassasiyete yol açabilir. Radikaller membran proteinleri ile reaksiyona girerlerse enzimler, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarını bozarlar (Kızılay, 1998).

### 2.5.1.3. Nükleik asitler ve DNA'ya etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali başta olmak üzere serbest radikaller tek zincir kırılmaları ile DNA-Protein çapraz bağları oluştururlar. DNA polimerazı inhibe ederler. Sitotoksisite, nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Serbest radikallerin etkilerine özellikle primidinler hassastırlar. DNA ipliklerinin kopması, çift sarmalın ayrılması sonucu hücrede mutasyonlar ve ölüm gelişebilir (Akköse, 1998; Baştar, 1997; Gökdoğan, 1998; Cochrane, 1991; Çevrim, 2000).

Aktive olmuş nötröfillerden kaynaklanan  $H_2O_2$  membranlardan kolayca geçer ve hücre çekirdeğini ulaşıarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu sebeple DNA, serbest radikallerden kolayca zarar görebilir bir hedeftir (Akkuş, 1995).

Oksidatif stresten en çok etkilenen bazlar DNA'daki guanin ve sitozindir. Doksigenozindeki 8 numaralı karbona bir oksijen atomunun bağlanması 8 - Hidroksiguanozin oluşturur. Bu bileşik fizyolojik pH'da 8-Oxoguanozine dönüşür ki bu da DNA'da anormal baz dizilişine ve böylece mutasyonlara neden olur (Şekil 2.9) (Akkuş, 1995; Halliwell, 1994, Yu, 1994).



Şekil 2.9.  $\cdot OH$  Radikalinin DNA'ya etkileri

Guanindeki halka yapısının açılması DNA replikasyonunu durdurur ve böylece bu bileşiğin DNA'yı tamir edici enzimler tarafından ortadan kaldırılması yeni hatalara neden olur. Serbest radikaller redoks reaksiyonlarını başlatıklarından dolayı oksidatif stres bazı genlerin

aktifleşmesine neden olur. Böylece bu serbest radikaller onkogenleri aktive ederek hücre çoğalmasını artırır (Akkuş, 1995).

#### 2.5.1.4. Karbonhidratlara etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve oksoaldehitler meydana gelirler. Bunlar diyabet, sigara içimiyle ilgili kronik hastalıklar gibi patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. İnflamatuvar eklem hastalığında bir mukopolisakkarit olan hiyaluronik asidin sinoviyal sıvıda artmış olan hidrojen peroksit ve süperoksit radikali ile parçalandığı gösterilmiştir. Gözün vitröz sıvısında da bol miktarda hiyaluronik asit bulunur. Bununda PML (Polimorfonükleer lökosit)'lerden salınan hidrojen peroksit ve superoksidin oksidatif hasarı sonucu parçalanması katarakt oluşumuna katkıda bulunur (Akkuş, 1995; Gökdoğan, 1998; Kızlay, 1998; Kahraman, 1998; Çevrim, 2000).

Oksoaldehitler DNA-RNA ve proteinlere bağlanabilme ile aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar. Serbest radikallerin makromoleküllere etkileri çizelge 2.5'te gösterilmiştir. (Akkuş, 1995; Southorn, 1988).

Çizelge 2.5. Serbest radikallerinin makromolekülleri etkileri (Alkan, 1997; Southorn, et al., 1988).

Makro Moleküller	Etkileri
Lipidler	Plazma membranları ve organellerde çok doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu
Proteinler	Sülfhidril içeren enzimlerinin oksidasyonu, enzimlerin inaktivasyonu
Karbonhidratlar	Polisakkarit depolimerizasyonu
Nükleik asitler	DNA sarmallarının bölünmesi



## 2.5.2. Serbest radikallerin hücreye etkisi

Serbest radikallerin etkileri sonucu hücre bölümlerinde değişik hasarlar ortaya çıkmaktadır. Bunlar;

### 2.5.2.1. Ekstrasellüler boşluk

Serbest radikaller, inflamatuvar cevabı ve ardından gelen doku harabiyetini modüle etmede önemli bir rol oynarlar. İnflamatuvar (iltihap) hücre kaynaklı serbest radikallerin oluşturduğu harabiyetten en çok etkilenen ekstrasellüler doku komponentleri kollojen ve hiyaluronik asittir. İnflamatuvar eklem hastalıklarında sinoviyal sıvıya geçen polimorfonükleer lökositlerden ekstra sellüler sıvıya salınan süperoksit ve hidrojen peroksit buradaki hiyaluronik asidi parçalar. Gözün vitröz sıvısındaki hiyaluronik asidin oksidatif hasar sonucu parçalanması katarakt oluşumuna katkıda bulunur (Tanakol, 1998; Kavas, 1989; Onat, vd., 1997).

Kollojen süperoksit radikalinin jelasyonu engellemesi sonucu tahrip olur. SOD enzimi kollojeni süperoksit radikalinin jelasyonu inhibe edici etkisinden korur. Eklemde, sinoviyal sıvının viskozitesini sağlayan hiyaluronik asit ise süperoksit radikali tarafından depolimerize edilebilir; radikalleri yok edici enzimler söz konusu depolimerizasyona engel olurlar. Ekstra sellüler sıvılar çok az miktarda SOD içerdiğinden indirgenmiş oksijen türevlerinin eser miktarları bile burada büyük hasara yol açabilir (Kavas, 1989; Çevrim 2000).

### 2.5.2.2. Biyomembranlar

Biyomembranlardaki yağ asitlerinin peroksidasyonu ve kükürt içeren proteinlerin oksidasyonu sonucu membran geçirgenliği ve kırılabilirliğinin artmasına bağlı olarak membran enzimlerinin aktivitesi azalmakta ve hücreye kalsiyum girişi artmaktadır. Hücre içi kalsiyum miktarının artması, fosfolipaz aktivitesi ile fosfolipid kaybında artış, membran geçirgenliğinde değişiklik ve membran potansiyel kaybına bağlı toksik etkinin çoğalması, proteaz aktivasyonu ile proteolitik etkinin şiddetlenmesi, DNA kırılmalarının oluşumu gibi pek çok hasar yapıcı olayı başlatmaktadır (Onat, vd.,1997).

### 2.5.2.3. Mitokondri

Oksidatif stres durumunda savunma sistemleri yetersiz kalmakta ve mitokondride hasar oluşmaktadır. Serbest radikallerin bu etkilerinin, özellikle mitokondri ve mikrozom gibi hücre organellerinde daha belirgin olduğu gösterilmiştir. Memelilerde oksijenin % 90'nın kullanıldığı organel mitokondridir. Bu nedenle mitokondri oksijen kaynaklı radikallere ve bunların katıldığı reaksiyonlara çok açıktır. Bu reaksiyonların yol açtığı değişiklikler, nükleer ve mitokondri DNA'larının zarar görmesine ve bu nedenle mitokondrinin kendini yenileme kapasitesinin kaybolmasına yol açabilir. Bu hasar sonucunda özellikle mitokondri iç zarı elemanlarının yapı ve fonksiyonlarının bozulması ile enerji sisteminin etkilenmesine bağlı olarak mitokondride ATP kullanımında artma ve ATP sentezinde azalma ile hücredeki ATP düzeyi hızla düşmektedir. Buna bağlı olarak da hücrede glutasyon ve NADPH gibi maddelerin sentezi zayıflamaktadır. Bu değişiklikler mitokondriden superoksit anyonu çıkışının artmasına sebep olmaktadır. Bu şekilde mitokondride oluşan hasarın yol açtığı zararlar onarılma hızından çok yüksek olduğu için, organel giderek fonksiyonunu kaybetmekte ve yaş pigmenti haline dönüşebilmektedir (Onat, vd.,1997; Seçkin, 1988; Yu, 1994).

### 2.5.2.4. Çekirdek

Serbest radikaller özellikle malondialdehit hücre çekirdeğinde başlıca DNA ile tepkimeye girmekte ve nükleikasit yapısındaki baz değişimleri ile DNA zincir kopması sonucu kromozomal yapıda değişiklikler oluşturarak sitotoksisteye sebep olmaktadır. Sonuçta mutajenik ve karsinojenik etkiler görülmektedir (Onat, vd.,1997; Kavas, 1989).

### 2.5.2.5. Sitozol

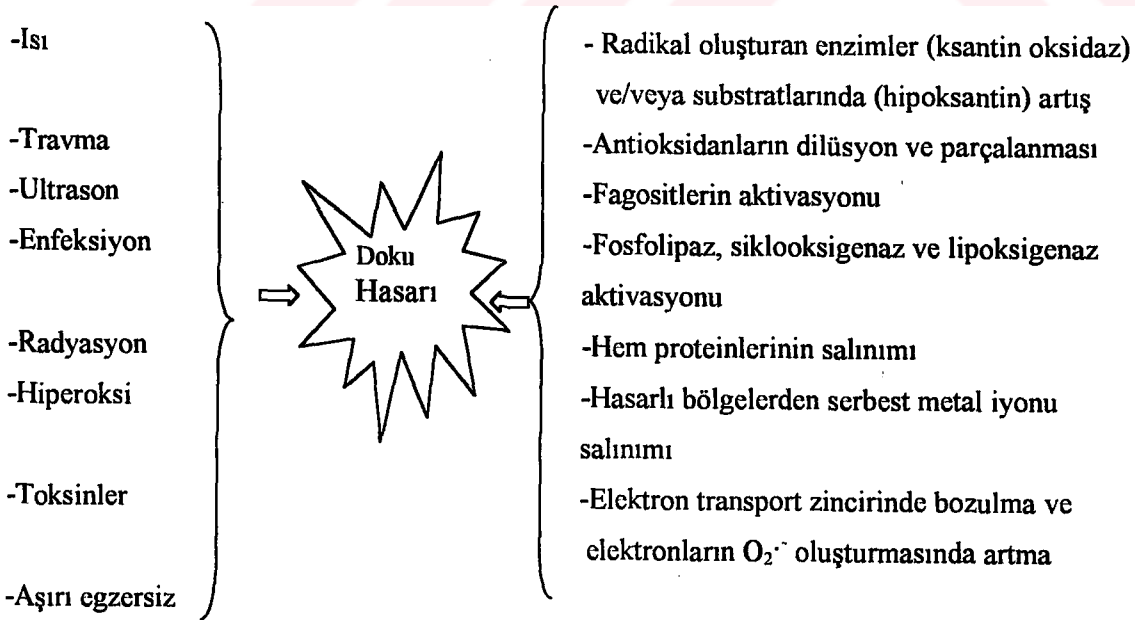
Sitoplazmada bulunan sitozol proteinleri, sitoplazmik serbest radikallerin etkisiyle değişime uğrarlar. Hemoproteinlerin geniş bir spektrumunu oksijen türevi serbest radikallere karşı hassastırlar ve kolaylıkla harap edilebilirler. Örneğin oksihemoglobin, süperoksit radikallerinin veya hidrojen peroksitin demirle reaksiyonu sonucu methemoglobine dönüşür. Önemli sitoplazmik bir diğer hemoprotein olan katalaz da süperoksit radikali tarafından inhibe edilir. Birçok katalitik sitozolik enzimler süperoksit ve hidroksil radikali ve özellikle de hidrojen peroksit oluşumuna sebep olurlar (Onat, vd., 1997; Kavas, 1989).

### 2.5.3. Serbest radikallerin dokuya etkileri

Serbest radikallerin hücre ve dokularda yol açtığı zararları şöyle özetleyebiliriz

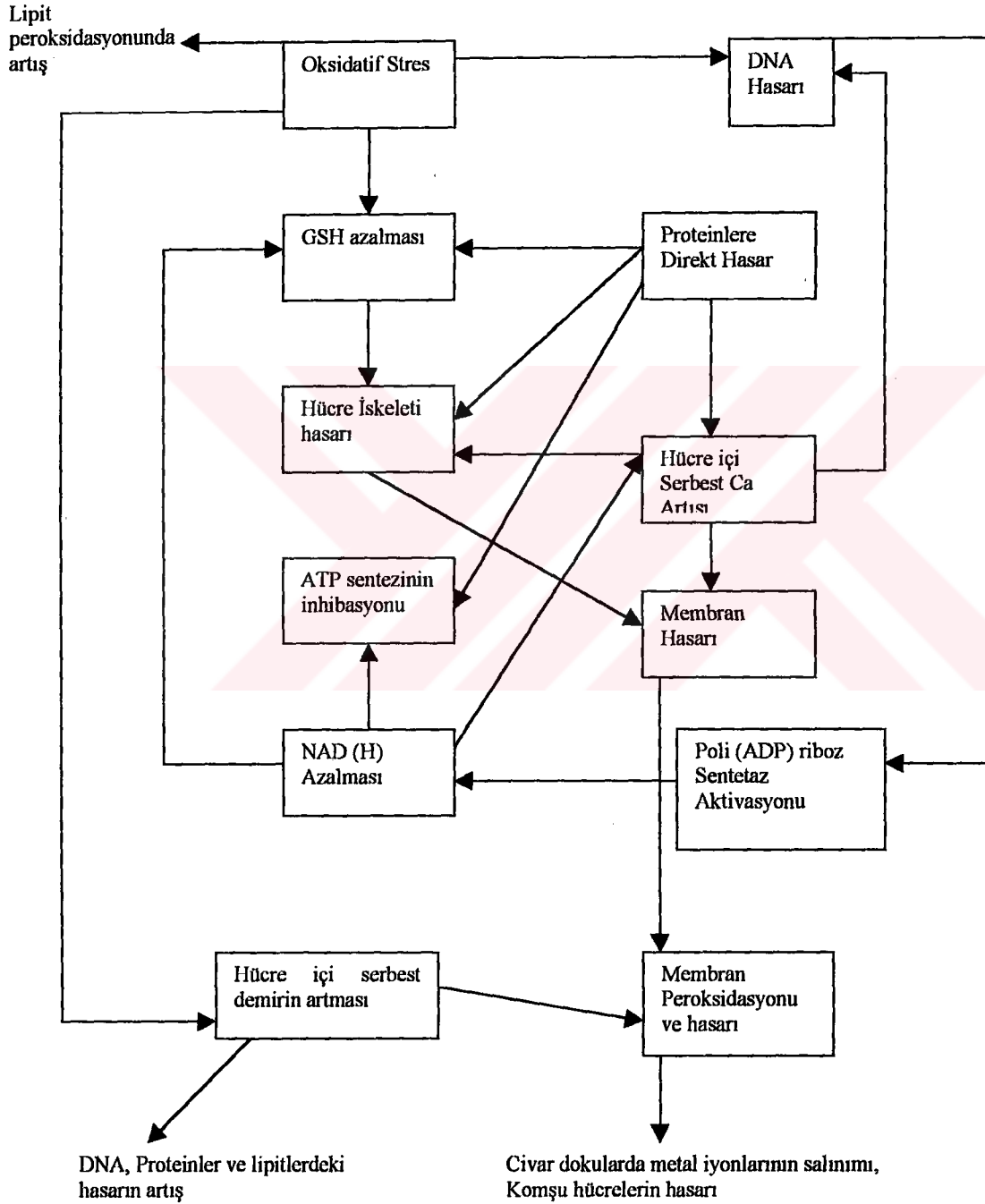
- 1- DNA'nın tahrip olması,
- 2- Nükleotit yapıli koenzimlerin yıkımı
- 3- Tiollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiol/disüfit oranının değişmesi,
- 4- Protein ve lipidlere kovalan bağlanması
- 5- Mukopolisakkaridlerin yıkımı,
- 6- Enzim aktivitelerinde ve lipid metabolizmasındaki değişiklikler
- 7- Proteinlerin tahrip olması ve "turnover"nin artması
- 8- Lipit peroksidasyonu, zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi
- 9- Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması
- 10- Seroid ve yaş pigmenti denilen bazı maddelerin birikimi
- 11- Kollojen ve elastin gibi uzun ömürlü bileşiklerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozulması kapillerde atrofik değişikliklerin oluşması (Mehmetçik, 1994; Seçkin, 1988; Uysal, 1998; Temiz, 2001; Yelkenci, 1996; Kehrer, 1993).

Oksidatif stres sonucu şekil 2.10.'de görüldüğü gibi çeşitli dokularda hasar oluşmaktadır.



Şekil 2.10. Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stres sonucu oluşan doku hasarı (Onat, vd.,1997).

Serbest oksijen radikallerinin fazla oluşumu veya antioksidan korunma ve onarım mekanizmaları yetersizliği sonucunda oksidatif stres gelişebilir bunu geriye dönüşümlü veya dönüşümü olmayan hücre hasarı izler (Şekil 2.11.) (Halliwell, 1991; Köleoğlu, 1998).



Şekil 2.11. Oksidatif stresin oluşturduğu hücre hasarı mekanizmaları (Halliwell, 1991).

## 2.6. Serbest Radikaller İle İlgili Patolojik Durumlar

Son zamanlarda serbest radikallerin yol açtığı hastalıklarla ilgili araştırmalar önem kazanmıştır. Serbest radikaller, hayat boyunca hem endojen hem de eksojen kaynaklardan oluşurlar. Organizmada serbest radikallerin zararlı etkilerini ortaya koymadan etkisizleştirilmesini sağlayan güçlü savunma sistemleri vardır. Serbest radikallerin oluşum hızı ile etkisizleştirilme hızı dengede olduğu müddetçe, organizma bu bileşiklerden etkilenmemektedir. Buna karşılık savunma azalır veya bu bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa, bu denge bozulmakta ve serbest radikallere bağlı zararlı etkililer ortaya çıkmaktadır (Uysal, 1998; Tanakol, 1998).

Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu organ ve / veya dokularda hasar meydana getirirler (Çizelge 2.6.). Bundan dolayı yaşlanma, diabet ve diabet komplikasyonlarının gelişimi, akciğer hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, parkinson, hipertansiyon, kas distrofileri, behçet hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları, karaciğer hastalıkları, inflamasyon, iskemi – reperfüzyon hasarı, böbrek hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar, gastrointestinal hastalıklar gibi bir çok hastalığın oluşumunda serbest radikallerin etkisi çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Halliwell, 1984; Noda, et al., 1997; Seçkin, 1988; Tanakol, 1998; O'Brien, et. al., 1997; Buettner, 1999; Brody, 1988; Uysal, 1998; Mehmetçik, 1994; Yalçın, 1998; Köleoğlu; 1998; Sözmene, 1993). Bu hastalıkların organ ve/veya dokuda oluşturduğu membran hasarı lipid peroksidasyonunu uyarır. Membranların yapı ve fonksiyonları bozulur ve oluşan lipid peroksidleri belirli bir konsantrasyondan sonra dolaşıma geçip plazmadaki lipid peroksid seviyesini arttırırlar. Kan lipid peroksid düzeyi membran hasarının, hastalığın ciddiyetinin ve seyrinin bir göstergesidir (Seven, vd., 1995).

Hayvan hücre membranları lipid peroksidasyonunun güçlü bir engelleyicisi olan tokoferol (E vitamini) içerir. Seruloplazmin ve glutatyon peroksidaz gibi proteinler muhtemelen canlı ortamdaki bu gelişmeye karşı korunmaya yardım eder (Halliwell, 1984).

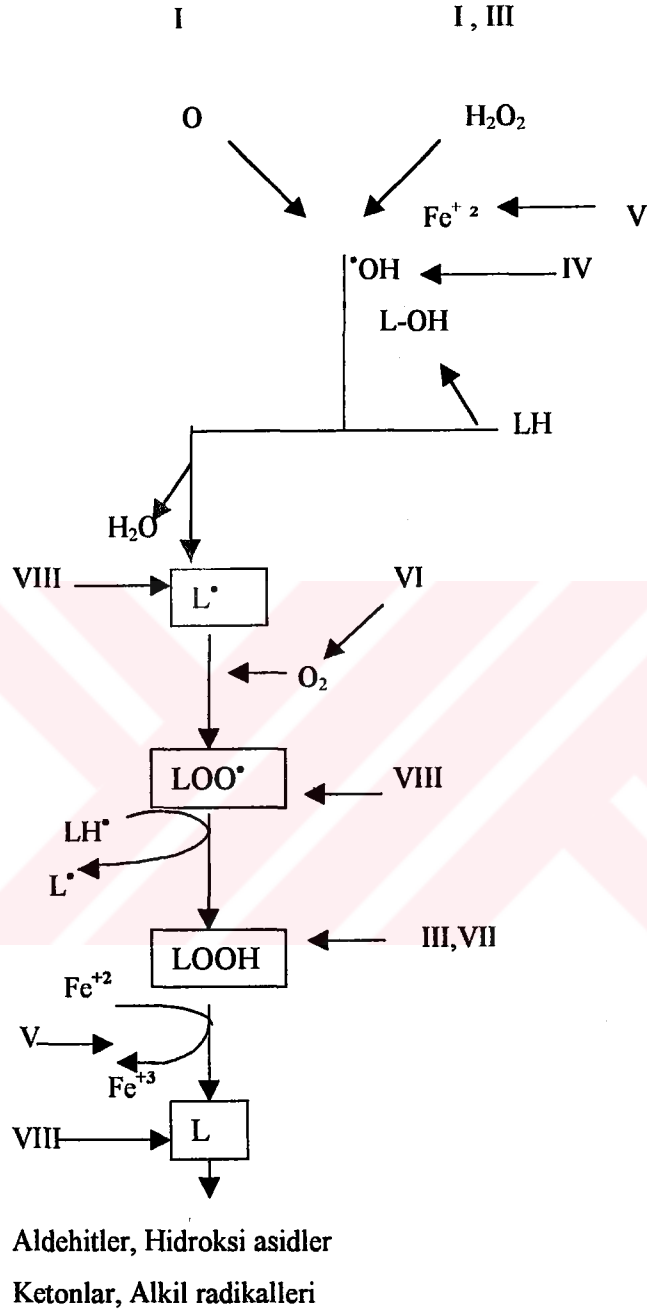
Çizelge 2.6. Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu doku hasarları  
(Onat, vd.,1997)

Hiperoksijenasyon Sendromları	İskemi/reperfüzyon sendromları	İnflamatuvar Hastalıklar	Toksik doku hasarı	Diğerleri
Akciğerde oksijen toksisitesi, retrolental fibroplazi	Miyokard enfarktüsü kardiopulmoner bypass, organ transplantasyonu, mide mukozasında hasar (stres ülseri), barsak iskemisi, nekrotizan enterokolit, şok sonrası karaciğer yetmezliği, beyin iskemisi, akut renal tubuler nekroz, serbest flep transferleri(deri)	Nötrofil fagositosisi, artrit, inflamatuvar kemik hastalıkları, bağ doku hastalıkları, immun yetmezlikler	Aspirasyon pnömonisi, pankreatit, özofajit	Yaşlanma dolaşım şoku, periferik ödem, kanser, amiloidoz, arterioskleroz, diabetes mellitus

## 2.7. Antioksidan Savunma Sistemleri

Hücrelerde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği oksidatif hasarı önleyen veya kısmen azaltan mekanizmalar bulunmaktadır. Bunlar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler. Antioksidanlar hücrelerin hem sıvı hem de membran kısmında bulunabilirler (Onat, vd.,1997; Akkuş, 1995; Gökdoğan, 1998; Paglia, et al., 1967; Balcı 1994).

Antioksidanlar, lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu engelleyerek ve reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanların lipid peroksidasyonundaki etkileri şekil 2.12’de gösterilmiştir (Akkuş, 1995; Paglia, et al., 1967; Yelkenci, 1996; Mehmetçik, 1994; Southorn, 1988; Baştar, 1997).



Şekil 2.12. Poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) otooksidasyon devri ve antioksidan savunma basamakları I. Süperoksit Dismutaz II. Katalaz III. Glutatyon peroksidaz IV. Ürik asit, E vitamini V. Seruloplazmin VI., VII., VIII. E vitamini

Başlangıçta antioksidanlar lipid peroksidasyonunu engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Günümüzde ise antioksidanların tanımı lipidlerin yanı sıra nükleik asitler, proteinler ve karbonhidratlar gibi diğer hedef molekülleri koruyucu etkilerini de içerecek şekilde genişletilmiştir. Bu tanımla bağlantılı olarak antioksidanların etkileri farklı şekillerde olabilmektedir. Bunlar;

- 1- Reaktif oksijen türlerinin enzimsel reaksiyonlar aracılığıyla ve doğrudan temizlenmesi,
- 2- Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun baskılama yoluyla engellenmesi,
- 3- Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi,
- 4- Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesi (Yalçın, 1998; Temiz, 2001; Üzüm, 2000).

### 2.7.1. Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olmak üzere başlıca 2 ana gruba ayrılabilir gibi çeşitli kriterlere göre çizelge 2.7, 2.8 ve 2.9'da ki gibi sınıflandırılabilirler (Akkuş, 1995; Yalçın, 1998; Gökdoğan, 1998; Paglia, et al., 1967; Kızılay, 1998).

Çizelge 2.7. Antioksidanların çeşitli kriterlere göre sınıflandırılması

Yapılarına göre	Kaynaklarına göre	Çözünürlüklerine göre	Yerleşimlerine göre
Enzimler	Endojen antioksidanlar	Suda çözünenler	Hücre içinde bulunanlar
Enzim olmayan proteinler, küçük moleküller	Eksojen antioksidanlar	Lipitlerde çözünenler	Plazma ve diğer ekstraselüler sıvılarda bulunanlar



Çizelge 2.8. Endojen antioksidanların sınıflandırılması

Enzimler	Enzim olmayanlar		
	Lipit fazda bulunanlar	Sıvı fazda bulunanlar	
Süperoksit Dismutaz	$\alpha$ -Tokoferol (E – vitamini)	Askorbik asit	Miyogloblin
Glutasyon Peroksidaz	B-Karoten	Melatonin	Hemogloblin
Glutasyon - S- Transferaz		Ürat	Ferritin
Katalaz		Sistein	Albümin
Mitokondriyal sitokrom oksidaz		Seruloplazmin	Metionin
Hidroperoksidaz (Katalaz, Peroksidazlar)		Transferrin	Bilirubin
		Laktoferrin	Glutasyon

Çizelge 2.9. Eksojen antioksidanların sınıflandırılması

FONKSİYONLARI	ANTIOKSİDANLAR					
Ksantin oksidaz inhibitörleri	Allopürinol	Folik asit	Oksipurinol	Pterin aldehit		
NADPH oksidaz inhibitörleri	Adenozin	Lokal anestezipler	Kalsiyum kanal blokerleri	Nonsteroid	Antienflamutuar ilaçlar	
Rekombinant süperoksit dismutaz						
Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları	Mannitol	DMSO	Albumin			
Demir redoks döngüsünün inhibitörleri	Serüloplazmin	Desferroksamin				
Nötrofil adezyon inhibitörleri						
Soya fasülyesi inhibitörleri	Ksantin DH					
Sitokinler	TNF	İnterlökin – 1				
Barbitüratlar						
Demir şelatörleri						
Endojen antioksidan aktiviteyi arttıran maddeler	Ebselen	Asetil sistein				

## 2.7.2. Antioksidanların etki tipleri

Antioksidanların etkileri 4 gruba ayrılabilir. Bunlar;

### 2.7.2.1. Toplayıcı etki

Serbest radikalleri etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir. Antioksidan enzimler, trakeobronşial mukus ve küçük moleküller bu tip etkiler gösterirler. Buna örnek, SOD, GSH-Px, Ferritin, seruloplazmin (Akkuş, 1995; Gökdoğan, 1998; Paglia, et al., 1967).

### 2.7.2.2. Bastırıcı etki

Oksidantlarla etkileşip, onlara bir hidrojen aktararak aktivitesini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya bastırıcı etki denir. Vitaminler, trimetazidin, flavonoidler ve antosiyanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler. Örn: A,E,C vitaminleri, mannitol (Akkuş, 1995; Gökdoğan, 1998; Paglia, et al., 1967; Kızılay, 1998).

### 2.7.2.3. Zincir kırıcı etki

Zincirleme olarak devam eden reaksiyonların belli yerlerinde kırarak, radikallerin fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir. Örn.: Hemoglobin, seruloplazmin, ürikasit, bilirubin, albumin, bazı vitaminler ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler (Akkuş, 1995; Gökdoğan, 1998; Paglia, et al., 1967).

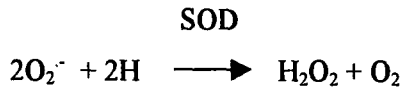
### 2.7.2.4. Onarıcı etki

Bu grupta DNA tamir enzimleri, metionin, sülfoksid redüktaz sayılabilir (Gökdoğan, 1998; Çevrim, 2000).

### 2.7.3. Antioksidan enzimler

#### 2.7.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC.1.15.1.1.)

İlk kez 1968 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır. Süperoksit dismutaz aerobik metabolik reaksiyonlar esnasında oluşan süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Hücresel bölmelerde süperoksit düzeylerini kontrol etmede, direkt oksidatif hasara karşı hücreleri korumada anahtar role sahip bir enzimdir (Sun, et al., 1988; Halliwell, 1994; Kızılay, 1998; Üzüm, 2000; Kahraman, 1998; Flohe, et al., 1984; Gaetani, et al., 1997; Fridovich, 1984; McCord, 1985).



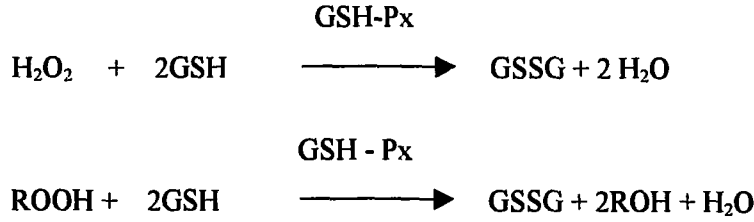
SOD enziminin hepsi metalloprotein yapısında olan dört izoenzimi bulunmaktadır. Cu – Zn SOD ökaryotik hücrelerin sitoplazması ve kloroplastlarında, Mn – SOD prokaryotlarda ve ökaryotik hücrelerin mitokondirisinde, Fe – SOD prokaryotlarda, EC – SOD (ekstrasellüler SOD) plazmada ve çeşitli dokuların ekstrasellüler sıvısında bulunmaktadır. Ekstrasellüler SOD, hücre zarı ve kollajene bağlanarak nötrofil ve diğer hücrelerden salınan süperoksitleri kontrol eder (Başaran, 1998; Kızılay, 1998). EC – SOD ve Cu – Zn SOD' un prostetik grupları benzemesine rağmen, aminoasit dizilişleri, antijenik özellikleri ve kromozomal yerleşimleri farklıdır.

SOD, fagosite edilmiş bakterilerin hücre içinde öldürülmesinde de önemli rol oynar. Bu nedenden dolayı SOD granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde ise granülositlerden daha fazla miktarda SOD bulunmaktadır. SOD enzim aktivitesi oksidatif stresin yoğunluğuna göre düzenlenmektedir. Oksijen kullanımı yüksek olan dokularda ise SOD aktivitesi fazladır. Buna karşılık ekstrasellüler SOD aktivitesi çok düşüktür (Yu, 1994; Üzüm, 2000, Gökdoğan, 1998; Kahraman, 1998, Başaran, 1998, Çevrim, 2000, Akkuş, 1995, ).

SOD enziminin fizyolojik önemi; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumak ve böylece lipid peroksidasyonunun başlamasını engellemektir (Üzüm, 2000; Mehmetçik, 1994).

### 2.7.3.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH - Px) (EC.1.11.1.9)

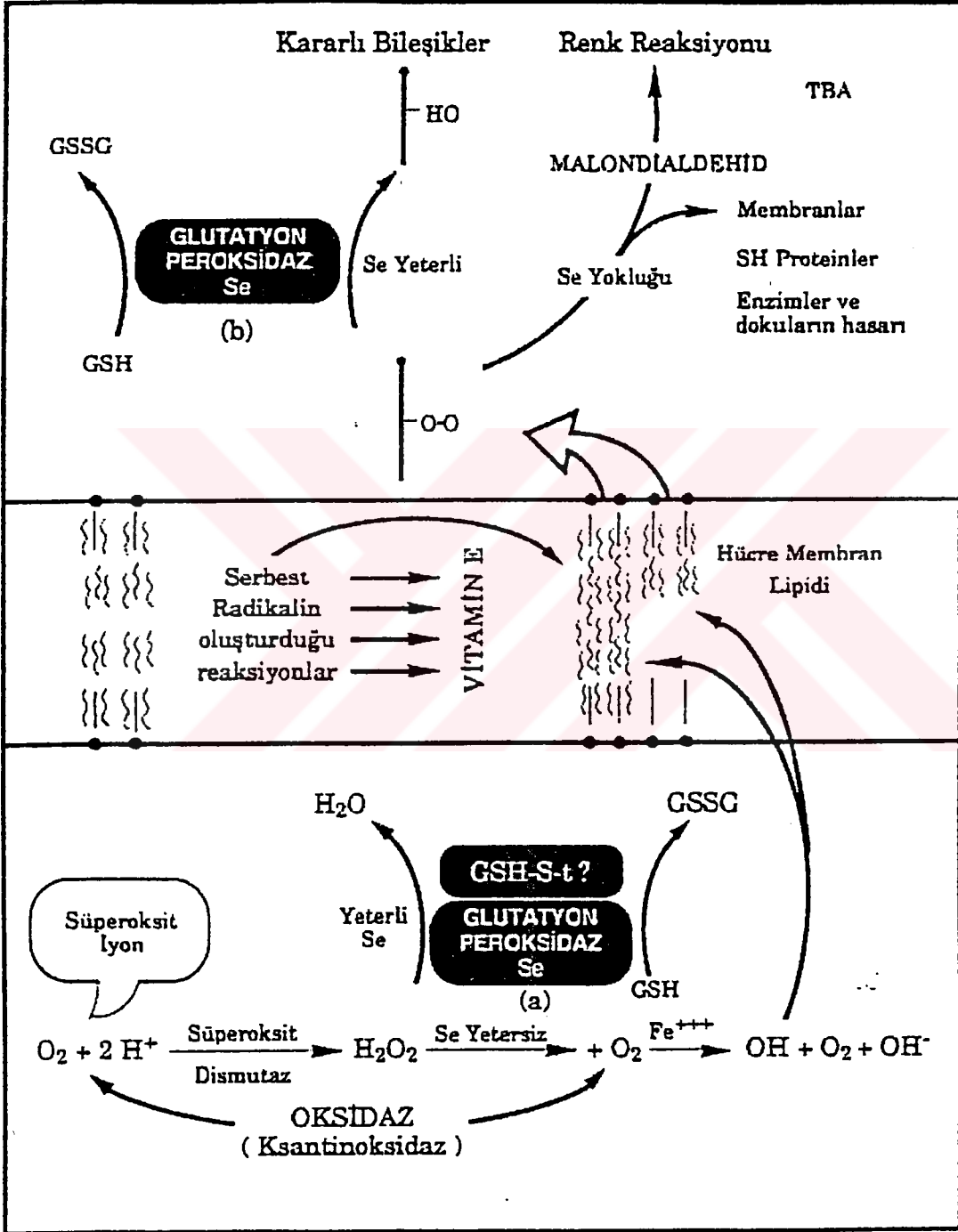
Tetramerik yapıda dört selenyum atom içeren sitozolde yerleşik bir enzim olan glutasyon peroksidaz (GSH - Px), hem hidrojen peroksidin hem de organik hidrojen peroksitlerin aşağıdaki reaksiyonlarını katalizleyerek indirgenmesini sağlar.



Bu reaksiyonlarda glutasyon (GSH) hidrojen verici olarak görev yapmakta ve hidrojen peroksit ile lipid hidroperoksitleri alkole indirgenirken kendisi oksitlenmiş şekline (GSSG) dönüşmektedir. Oluşan okside glutasyon ise NADPH bağımlı glutasyon redüktaz tarafından tekrar glutasyona indirgenmektedir (Yu, 1994; McCord, 1993; Halliwell, 1991; Paglia, et al., 1967).

Hücrelerde GSH- Px enzimlerinin dört tipi tanımlanmıştır; selenyuma bağımlı GSH - Px, fosfolipit hidroperoksit GSH - Px, plazma glutasyon peroksidazı, selenyumdan bağımsız GSH - Px. Glutasyon peroksidaz başlıca sitozolde bulunmakla birlikte mitokondride de bulunmaktadır. Bu enzimin selenyuma bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Selenyuma bağlı GSH - Px hem hidrojen peroksidi hem de organik hidroperoksitleri metabolize etmektedir. Karaciğer, akciğer, kalp ve beyinde, az miktarda da iskelet kısmında bulunan selenyuma bağımlı GSH - Px sitezolda ve mitokondri matriksinde yer alır. Selenyumdan bağımsız GSH - Px sadece organik peroksitleri indirgemektedir.

GSH - Px sadece lipid peroksidasyonunun başlamasını değil, aynı zamanda peroksidasyon sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerini metabolize ederek lipid peroksidasyonunun ilerlemesini de önlemektedir. Ayrıca GSH - Px'in fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Solunum patlamasını takiben hidrojen peroksitin salınımının arttığı gösterilmiştir. GSH - Px eritrositlerde oksidan stress karşı en etkili antioksidandır (Şekil 2.13). GSH - Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksitin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (Alkan, 1997; Mehmetçik, 1994, Southorn, et al., 1998, Başaran, 1998; Kızılay, 1998; Yu, 1994; Yöntem, 1993).



Şekil 2.13. Membranların korunmasında GSHPX, selenyum ve vitamin E ilişkisi

## 2.8. Operasyon Amaçlı Kullanılan Alet Ve Cihazlar

Argon Plazma Scalpel günümüzde cerrahi uygulamalarda kullanılmakta olan kesici ve koagüle edici cihazların yaptığı işi daha mükemmel bir şekilde yerine getiren, ABD Patent Dairesi tarafından Ekim 2000'de başvurusu kabul edilen (Patent no: 09 / 689,216) yeni bir cihazdır.

### 2.8.1. Bistüriler

Operasyonlarda kesici olarak, genelde bistüriler kullanılmaktadır. Amaç keskin bir metalle dokuyu keserken, kanamayı sınırlamaktır.

### 2.8.2. Kesici ve koagülatör lazerler

Homojenize edilmiş foton demetini kullanılan lazerler ile kesme, doku buharlaştırma, koagülasyon yapmak mümkündür. Ancak doku kesme ve buharlaştırma amacıyla yüksek enerjili lazer kullanılır ki en büyük risk dokudaki penetrasyon derinliğinin yeteri kadar kontrol edilememesidir. Ayrıca hastanın alt dokularına zarar verme riski ötesinde, ameliyat ekibine de zarar verme riski oldukça yüksek olduğu için kullanımı sınırlı olarak sürdürülmektedir. En başarılı örneği ise göz gibi fotona uygun yapıya sahip olan bir organda kullanımudur (Gültekin, vd., 2000; Açıköz, vd., 2001; Tanrısever, 1996)

### 2.8.3. Elektrokoterler

Monopolar ve bipolar koterler olarak iki gruba ayrılır.

#### 2.8.3.1. Monopolar koterler

Kesici ve koagülatör olarak kullanılırlar. Bir alternatif gerilim, tek kutup üzerinden kanama bölgesine uzaktan uygulanır. Uygulanan gerilim sivri uç etkisiyle, havadaki oksijen ve azot moleküllerinden elektron koparıp onları iyonize ederek bölgeyi iletken hale getirir. Sonuçta bölgede çoğunluğu elektronlardan ve az miktarda da iyonlardan oluşan bir akım oluşur. Akımın dönüş yolu, hastanın altına yerleştirilen metalik bir ağ üzerinden sağlanır.

Metalik ağ geniş bir yüzeye yayıldığı için, hastanın dokuları içerisinde geçen akım yoğunluğu uygulama noktasından uzaklaştıkça küçülür. Dolayısıyla doku yakma etkisi ve koagülasyon, akımın yoğun olduğu uygulama noktası etrafında gerçekleşir. Cihazda iyon ve elektron başına düşen enerji ise düşük düzeydedir.

**Argon Plazma Koagülasyon (APC) cihazı:** Monopolar koterin revizyonu ile elde edilmiş bir cihazdır. Gerilim uygulanan elektrodun etrafındaki boru içinden argon gazı geçirilerek uygulama noktasındaki hava molekülleri yerine, argon gazı yerleştirilmesi sağlanır. Böylece ark bölgesinde iyonize edilen malzeme, azot ve oksijen molekülleri değil argon atomları olmaktadır. Tanecik başına düşen enerjinin az olması nedeniyle toplam enerjinin artırılması için, uygulama süresinin uzun tutulması ve akım miktarının artırılması gerekmektedir. Bu ise; operasyon bölgesinde ölü dokunun artması ve 3 – 5 mm. derinliğindeki dokunun ölmesi (devitalize edilmesi) ile sonuçlanmaktadır (Tanrıseven, 1996; Gültekin, vd., 2000).

### **2.8.3.2. Bipolar koterler**

Koagülatör ve kesici olarak kullanılırlar. Hastadan bir akım geçirmek söz konusu olmadığından, akım şiddeti ve metalik kitle istendiği kadar artırılabilir. Böylece elde edilen yüksek enerjiyle dokular kesilebilir. Metalik sıcaklık 1000 °C'nin üstünde olabilir. Kesme işlemi sırasında canlı doku üzerinde önemli miktarda karbonlaşma ve ölü doku oluşur. Kesme işlemi sırasında kanama olduğu için, daha sonra koterin koagülasyon ucuyla kanamanın durdurulması gerekir.

**Argon Sprey Koagülasyon (ASC) Cihazı :** Bipolar koterin revizyonu ile elde edilmiştir. APC cihazındaki duruma benzer şekilde bu sefer tungsten uç, bir boru içine yerleştirilir ve içinden argon gazı geçirilir. Sıcak metalin yanından geçerken gazın sıcaklığı birkaç yüz derece santigrata erişir ve kanayan dokuya uygulandığında yarayı dağıtarak kanamayı durdurur. Dokulara aktarılan ısı enerjisi gaz atomları ile sağlanmaktadır. Bu ise yumuşak bir enerji aktarımıdır. Ancak bu yöntemle doku kesmek mümkün değildir. Yüksek miktarda gaz aktarıldığından ve uzun süren dağıtma işlemi esnasında önemli miktarda ölü doku oluşturması söz konusudur.

#### 2.8.4. Argon plazma scalpel cihazı (APS)

APS cihazı yukarıdaki yöntemlerden tamamen farklı bir yöntemi kullanmaktadır. APS'nin çalışma prensibi kinetik enerji verilerek yüksek sıcaklığa çıkartılmış argon gazı atomlarının kontrollü şekilde dokulara uygulanması ve termik enerjilerini dokulara aktarması işlemine dayanmaktadır. Böylece dokulara aktarılan kuantum enerjisi maddesel olarak atom boyutlarında olmaktadır. Bu amaçla bir plazma hücresi içerisine üflenen argon gazı iki elektrot arasına uygulanan gerilim ile kısmen iyonize edilir. Elektrotlar arasında uygulanan bir gerilimin oluşturduğu elektriksel alanla, argon atomları hücre içindeki kapalı hacimde enerjilendirilirken, çarpışmalarla iyonize olmayan argon atomları da enerjilendirilirler. Böylece kinetik olarak enerjilendirilmiş olan argon gazı atomları, uygulama kaleminin ucundaki kanaldan püskürtülerek dokulara uygulanır.

Cihazın uygulama esnasında sağlam dokularla diğer yöntemlere göre minimal hasar oluşturması önemli bir üstünlüğüdür. Kullanım alanları; doku buharlaştırma, doku koagülasyonu, doku rezeksiyonu ve dokuların yüzeysel siterilizasyonudur (Gültekin, vd., 2000; Özçoban, vd., 2001; Tanrısever, 1996).

##### 2.8.4.1. Koagülasyon işlemleri

Yüksek enerjili atomlardan oluşan bir ışın demeti (hüzme), kanayan bölgeye uygulandığında, foton demetinin önündeki hava akımı kanamayı üfleyerek açar. Yüksek enerjili atomlar ana dokuya erişince, dokunun üst moleküllerini buharlaştırırken alttaki molekülleri de birbirine bağlayarak koagülasyonu sağlar. Bu işlemle yüksek enerjili atomlarla çok kısa sürede koagülasyon sağlandığından bipolar koterdeki gibi kitlesel enerji aktarımı söz konusu olmadığı için çevre dokulara verilen zarar minimum düzeydedir. Oluşan 0,1 mm. kalınlığındaki ölü doku ile kanama durdurulur. Büyük kanamalarda diğer tüm cihazlarla koagülasyon yapılırken elde edilen ölü doku ve karbonlaşma oranı çok daha yüksek boyutlardadır.

##### 2.8.4.2. Doku buharlaştırma işlemleri

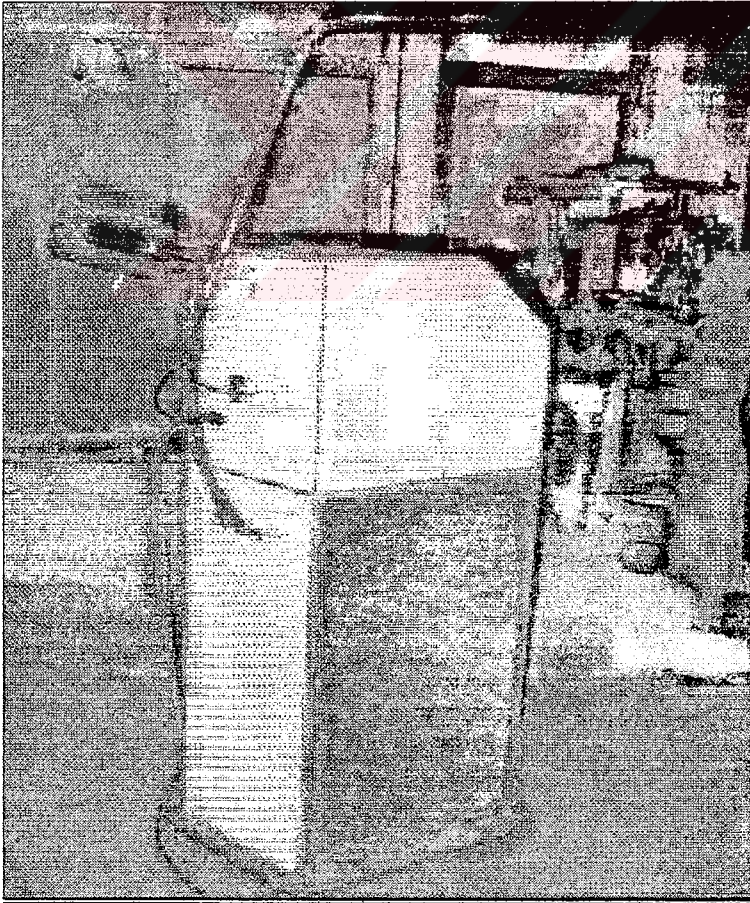
Aynı bölge üzerinde, cihaz yüksek enerji ile daha uzun süre tutulduğunda büyük bir doku kitlesinin buharlaştırılması mümkün olmaktadır. Böylece istenmeyen dokular buharlaştırma ile yok edilmektedir. Cihazın bu özelliği lazer hariç hiçbir alette yoktur. Lazerde



ise dezavantaj derinlik kontrolünün olmamasıdır. Bu nedenle lazerin kullanılma alanı azdır. APC ile kanser vakaları üzerinde yapılan çalışmalardan görüleceği gibi, kanserli dokunun 4 – 5 mm. derinliğinde devitalize edilmesi tercih edilmektedir. Ancak canlı doku üzerinde, ölü dokunun kalması istenmeyen zehirleyici bir faktördür. Buna karşılık APS cihazı, dokuyu devitalize ederken onu buharlaştırarak ortadan kaldırır. Bu da aletin bir diğer avantajıdır.

#### 2.8.4.3. Kesme işlemleri

Cihazdan çıkan ışın demeti dokuya bir çizgi üzerinde uygulanırsa, çizgisel boyutta bir buharlaştırma ile doku kesilmektedir. Geride kalan ölü doku miktarı yine 0,1 mm. boyutlarındadır. Ancak bu işlem esnasında kanama oluşmaz. Yapılan tüm kesme ve buharlaştırma işlemleri kansız olarak gerçekleştirildiği için, kanserli vakalarda bu işlemler esnasında metastaz riski de oluşmaz (Özçoban, 2001; Gültekin, vd., 2000)(Şekil 2.14).



Şekil 2.14 Argon Plazma Scalpel (APS) cihazı

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

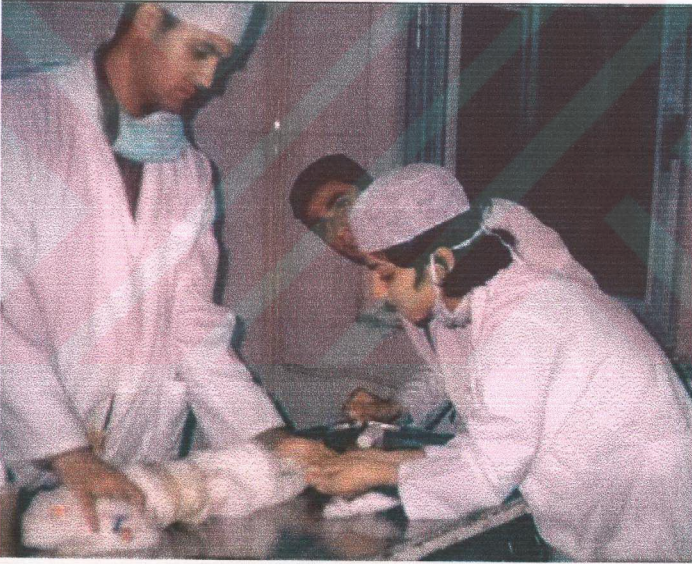
Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıbbi Araştırma Merkezi (DETAM)' den temin edilen 1750-2500 gr arasında değişen *Orctolagus cuniculus* cinsi tavşanlar kullanıldı. Çalışma boyunca tavşanlar Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Birimi (TÜTFAB)'nde çinko kafeslerde ve kafes başına bir tavşan düşecek şekilde, yem ve su alımları serbest bırakılarak muhafaza edildiler. Operasyona girecek olan hayvanlar bir gece öncesinden (12 saat) aç bırakıldılar. Anestezi için intramusküler (i.m) 10 mg/kg rompun (Xylasine) enjeksiyonunu takiben yine i.m 35 mg/kg ketamin (Ketalar) uygulandı (Perk, vd., 2000) (Şekil 3.1.).

Tavşanlarımız kontrol koter ve APS grubu olmak üzere üç gruba ayrıldı:

- 1- Kontrol grubu: Laparotomi + bistüri ile rezeksiyon: Cerrahi operasyon esnasında laparotomi'yi takiben karaciğer sağ lop laterel kısmından bistüri ile rezeksiyon (kanama durdurularak dokunun alınması) yapıldı.
- 2- Koter grubu: Laparotomi + koterle rezeksiyon
- 3- APS grubu: Laparotomi + APS ile rezeksiyon.

Çalışmamızda kullandığımız tavşanların karın ciltleri povidon iodine ile temizlendikten sonra şekil 3.2.'de görüldüğü gibi tıraş edilerek orta hat laparotomisi (karnın yarılarak içine girilmesi) ile karaciğer sağ lop lateral kısmından; araştırma grubunda koter ve Argon Plasma Scalpel (APS) ile kontrol grubunda ise klasik yöntemle (bistüri) 2 cm<sup>3</sup>'lük rezeksiyon yapıldı. Alınan karaciğer dokusu serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra analizler yapılncaya kadar -70 °C'de saklandı. Cerrahi operasyon esnasında her üç grupta da biyokimyasal tetkikler için venacava inferior'dan yaklaşık 3 cc kadar heparinize kan alındı. Aynı zamanda kontrol ve araştırma grubumuza ait tavşanlardan post operatif (operasyon sonrası) 3. günde kulak veninden 3 cc heparinize kan alındı (şekil 3.3.). İlk operasyondan sonraki 7. günde yapılan reoperasyonda (2. Operasyon) ilk operasyonda rezeksiyon yapılan karaciğer dokusundan yine 2 cm<sup>3</sup>'lük doku örneği ve venacava inferior'dan heparinize kan örnekleri alındı. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvar'ında GSH-Px çalışılmak üzere heparinize total kandan 300 mikron endrof tüplere konularak muhafazaya alındıktan sonra geri kalan kan

3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi (Şekil 3.4.). MDA çalışılmak üzere plazmaları ayrılarak  $-70^{\circ}\text{C}$  dipfirizde saklandı. Eritrositler serum fizyolojik ile üç kez yıkanarak eritrosit paketi hazırlandı ve süperoksit dismutaz (SOD) çalışılmak üzere  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de korundu. Yine tavşan karaciğer doku örnekleri uygun tamponlar kullanılarak homojenize edildi. Homojenatlar 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen süpernatandan GSH-Px, SOD ve MDA analizleri çalışıldı. Hemogloblin tayini Drapkin Yöntemi ile, protein tayini ise Lowry Yöntemi ile yapıldı (Lowry, et al., 1951).



Şekil 3.1. Tavşanlara anestezi için intramuskular rompun enjeksiyonunu takiben ketamin enjeksiyonu

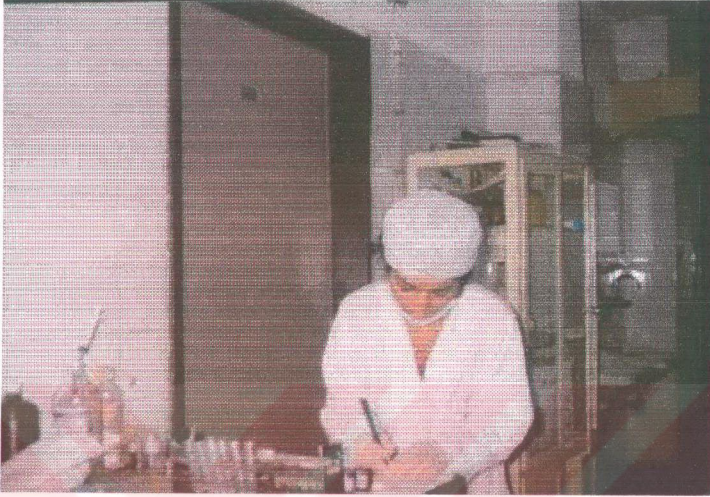




Şekil 3.2. Tavşanların karın ciitlerinin povidon iyodin ile temizlendikten sonra traş edilmesi



Şekil 3.3. Postoperatif dönemde tavşanların kulak veninden kan örneğinin alınması



Şekil 3.4. Kan ve doku örneklerinin analiz için hazırlanma aşamaları

### 3.1.1. Kullanılan cihaz ve malzemeler

1. UV 1208 – Vis Spektrofotometre, Shimadzu, Japonya
2. Santrifüj: Megafuge Hearaus Chist marka, Almanya
3. Derin dondurucu : Uğur soğutucu, Türkiye
4. Ayarlanabilir otomatik pipetler, Oxford, İrlanda
5. Karıştırıcı: Türkiye
6. Muhtelif boyutlarda cam ve spektrofotometrik tüpler, Türkiye
7. Sodyum klorür, sodyum karbonat, sodyum hidroksit, fenol ayırıcı, asetik asit, potasyum klorür sarf malzemeler, Merck, Almanya

8. Bütül hidroksi toluen, triklorasetikasit, etilendiamin tetra asetikasit (EDTA), tiyobarbitürik asit, sodyum dodesilsülfat, asetik asit, butonol pridin, 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP), Sigma, Amerika
9. Enjektörler (2'lik, 5'lik ve 10'luk enjektör), Türkiye
10. Bistüriler
11. Elektrokoter
12. APS cihazı
13. Radox Ransel SOD Kiti
14. Radox Ransod GSHPx Kiti

## 3.2. Metodlar

### 3.2.1. Malondialdehit (MDA) tayini

#### 3.2.1.1. Plazmada MDA tayini

Lipid peroksidasyonunun bir son ürünü olan MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek 532 nm'de absorbans veren renkli bir kompleks oluşturur. Plazmada MDA tayini tiyobarbitürik asit (TBA) reaktivitesi yöntemi kullanılarak yapıldı. (Slater, 1984).

MDA tayininde kullanılan çözeltiler:

1. Fosfat tamponu ile tamponlanmış serum fizyolojik: 8.1 g NaCl, 2.302 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 0.194 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartılıp bir miktar distile suda eritilir ve son hacim ise saf su ile litreye tamamlanarak, pH 7.4'e ayarlanır.

2. %0.88'lik BHT çözeltisi : 88 mg BHT (bütül hidroksi toluen) tartılıp, 10 ml mutlak alkol içinde eritilir.

3. %30'luk TCA çözeltisi: 30 g TCA (triklor asetikasit) tartılıp bir miktar distile suda eritilir ve son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

4. 0,1 M. EDTA (H<sub>4</sub>Y) çözeltisi: 37.224 g EDTA- Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O (Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Y2H<sub>2</sub>O) tartılıp distile su ile 1 litreye tamamlanır.

5. %1'lik TBA çözeltisi: 1 g TBA tartılıp, 100 ml 0.05 N NaOH içinde eritilir.

6. 0,05 N. NaOH çözeltisi: 2 g NaOH tartılır bir miktar suda eritilir ve son hacim saf su ile 1 litreye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı : 0.2 ml plazma üzerine 0.8 ml fosfat tamponu eklenir ve üzerine 0.025 ml BHT, 0.5 ml TCA eklenir. Tüpler vorteksle karıştırılır ve 2 saat inkübe edilir. İnkübasyondan sonra 2000 devir/dk da 15 dk santrifüj edilir üstteki süpernatantdan 1 ml alınarak başka bir tüpe aktarılır. Üzerine 0.075 ml 0.1 M'lık EDTA ve 0.25 ml %1'lik TBA ilave edilir. Tüpler vorteksle karıştırılır ve kaynar su banyosunda 15 dk bekletilir. Çeşme suyu altında soğutulduktan sonra spektrofotometrede 532 nm'deki absorbansları okunur. Elde edilen sonuçlar MDA-TBA kompleksinin 532 nm'deki ekstinksiyon katsayısından yararlanılarak nmol/ml cinsinden değerleri bulunur.

Hesaplanması:

MDA'nın 532 nm'de  $\epsilon$  katsayısı:  $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  dir.

a= Ekstinksiyon katsayısı

b= Işık yolu

C= Konsantrasyon

A=Absorbans

$A = a \times b \times c$

$C = A / a \times b$

$C(\text{nmol/ml}) = A \times 64.76$

### 3.2.1.2. Dokuda MDA Tayini

Dokuda MDA ölçümü Ohkawa ve arkadaşlarının MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asitle oluşturduğu rengin 532 nm'de absorbansının ölçülmesi prensibine dayanan metod uygulandı (Ohkawa, et al., 1979).

Karaciğer dokuları MDA düzeylerinin ölçümü için 0.15M KCl tamponunda %10'luk homojenat olacak şekilde, buz içerisinde bulunan Potter-Elvehjem tipi cam homojenizatör kullanılarak soğuk KCl tamponu ile homojenize edildi. Homejenizatlar 4000rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantlar örnek olarak kullanıldı.

**Ayıraçlar:**

1. %8'lik SDS (sodyum dodesilsülfat) çözeltisi: 8 gr. SDS tartılıp, son hacim 100 ml'ye tamamlanır.
2. %0.8'lik TBA çözeltisi: 0,8 gr. TBA tartılıp, son hacim saf su ile 100 ml.'ye tamamlanır.
3. %20'lik asetik asit çözeltisi: 20 ml. asetik asit alınarak, 100 ml.'ye tamamlanır.
4. Butanol/piridin (15:1) çözeltisi: 15 birim butanole karşılık 1 birim piridin alınarak karıştırılır.
5. Çalışma standartı: 10  $\mu$ mol / ml 1,1,3,3-tetraoksipropan (TEP)

Doku MDA analizi aşağıdaki çizelge 3.1.'de görüldüğü gibi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.1. Dokuda MDA analizi

Ayıraçlar	Kör	Std	Numune
Su	0,2ml	-	-
Örnek	-	-	0,2 ml
TEP	-	0,2 ml	-
SDS	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Asetik asit	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
TBA	1,5ml	1,5 ml	1,5 ml
Saf su	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml
İnkübasyon	Kaynar su banyosunda 1 saat		
Soğutma	Çeşme suyu ile		
Su	1 ml	1 ml	1 ml
Butanol / piridin	5 ml	5 ml	5 ml
Santrifüj	4000 x g, 10 dk üstteki organik faz alınır		
Okuma	532 nm'de köre karşı yapılır		

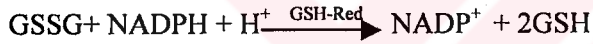
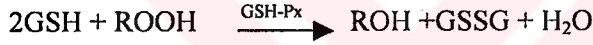


Hesaplanması: MDA'nın 532 nm'deki ekstinksiyon katsayısı ( $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi.

$$C(\text{nmol/mg}) = A \times 320.05$$

### 3.2.2. Glutasyon peroksidaz (GSH - Px) tayini

GSH-Px tayini UV metodla çalışan Randox marka ticari kit kullanılarak yapıldı. Deneyin prensibi Paglia ve Valentine'nin metoduna dayanmaktadır (Randox, 1997; Paglia, et al., 1967). Glutasyon peroksidaz, kümen hidroperoksit ile glutasyonun oksidasyonunu katalize eder. Okside glutasyon (GSSG) glutasyon redüktaz (GSH-Red) ve NADPH varlığında hemen redükte forma dönüşür ve NADPH NADP<sup>+</sup> ye okside olur. NADPH miktarında meydana gelen azalma 340 nm' de 1 cm'lik ışık yoluna sahip küvetler kullanılarak ölçüm havaya karşı yapılır.



#### 3.2.2.1. Kitte bulunan çözeltiler

1. Kumen Hydroperoxide: Kumen hidroperoxitten 10 µl alınır ve 10 ml distile su ile hızlıca çalkalayarak taze günlük olarak hazırlanır.

2. Seyreltme ajanı (Dilüent): Liyofilize Dilüent (4 numaralı flakon) üzerine 200 ml distile su eklenerek hazırlanır.

3. Tampon: Fosfat tamponu 0.05 ml/L, pH 7.2

4. Reaktif: (Glutasyon, glutasyon redüktaz, NADPH.) 10 ml. tampon ilave edilir.

Drapkin solüsyonu: Hassas terazide 1 gr. sodyum bikorbonat, 0.2 gr. potasyum ferrisiyanid, 0.052 gr. potasyum siyanid tartılıp, distile su ile 1 litreye tamamlandı.

### 3.2.2.2. Denevin Yapılışı

Karaciğer dokuları soğuk 0.05 M fosfat tamponunda ve buz içerisinde bulunan homojenizatör ile homojenize edildi. %10'luk karaciğer doku homojenatları 4000 devirde 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant örnek olarak alındı.

**Numune:** Heparinize total kan ve doku süpernatantı.

50 µl heparinize total kan üzerine 1 ml dilüsyon çözeltisi ilave edilip, 5 dk'lık inkübasyondan sonra üzerine 1ml drabkin çözeltisi eklenerek vortekste karıştırılır. Dokuda ise doku süpernatantından 50µl alınır ve üzerine 2 ml dilüsyon çözeltisinden eklenerek 5 dk'lık inkübasyondan sonra vortekste karıştırıldı. Analiz aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

	Numune (Hemolizat)	Numune Körü
Dilue hemolizat	20 µl	-
Distile su	-	20 µl
Reaktif	1 ml	1 ml
Cumen hidroksid	40 µl	40 µl

Karıştırılıp 37 °C'de birer dakika ara ile 3 defa 340 nm'de absorbans değerleri okundu.

Hesaplanması:  $\Delta A/dk \times 8412 = U/L$  cinsinden hesaplanan glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi dilüsyon katsayısı olan 41 ile çarpıldıktan sonra Hb'ne bölünerek Ü/gHb cinsinden değeri hesaplandı. Dokuda ise U/mg protein olarak ifade edildi.

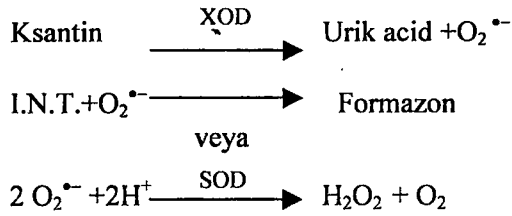
### 3.2.3. Süperoksit dismutaz (SOD) tayini

Bu çalışmada eritrosit SOD ölçümü Randox'un RANSOD marka ticari kit kullanılarak gerçekleştirildi (Randox, 1997; Flohe, et al., 1984).

#### 3.2.3.1. Metodun prensibi

SOD enzimi süperoksit radikalinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e dismutasyon reaksiyonunu kataliz eder (Flohe, et al., 1984). Bu metodun prensibi ksantin ve ksantin oksidazın süperoksit oluşturarak INT ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan kırmızı renkli formazon boyasının 505 nm dalga boyunda

1 cm'lik ışık yoluna sahip küvetlerde havaya karşı ölçüm yapılması esasına dayanmaktadır. SOD enzim aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyon derecesine göre hesaplanır.



### 3.2.3.2. Kitte bulunan ayıraçlar

1. Mixed Substrat: Ksantin Oksidaz, 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyl tetrazolium chloride (I.N.T): Bir flakon mixed substrat 20 ml. buffer ile çözülür.
2. Buffer: Kit içinde pH 10,2 olacak şekilde hazırlanmış olarak bulunan tampon.
3. Ksantin oksidaz: 1 flakon ksantin oksidaza 10 ml. redistile su ilave edilerek hazırlanır.
4. Standart: 1 flakon standarda 10 ml. redistile su ilave edilerek hazırlanır.

### 3.2.3.3. Deneğin Yapılışı

Heparinli tüpe alınmış total kandan 0.5 ml alınıp 10 dk 3000 rpm'de santrifüj edilerek üstteki plazma atıldı, daha sonra eritrositler 4 kez 3 ml % 0.9 NaCl çözeltisi ile yıkandı ve her seferinde 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.

Yıkanmış eritrosit süspansiyonu, soğuk redistile su ile 2 ml olacak şekilde tamamlanıp karışım +4 °C'de 15 dk bekletildi. Elde edilen lizatlar 0.01 mmol/l fosfat tamponu ile (pH=7.0) % inhibisyon, % 30-60 arasına düşecek şekilde dilüe edildi.

Dokular özel önlemler olmadan homojenize edildiği zaman dehidrojenaz hızlı bir şekilde oksidaz enzimine dönüşebilir. Bu yüzden karaciğer dokuları homojenize edilirken homojenizasyon buz içinde soğuk tamponda yapıldı. Böylece bu dönüşüm engellenmiş oldu. Doku süpernatantından

alınarak soğuk redistile su ile son hacim 2 ml olacak şekilde tamamlanarak vortekste karıştırıldı ve diğer işlemler eritrosit süspansiyonlarında olduğu gibi gerçekleştirildi.

### 3.2.3.4. Standartların Hazırlanması

Standart eğri için standart solüsyonların hazırlanışı kit prosedürüne göre yapıldı. Standart 6 flakonu olan 4 numaralı flakon 10 ml redistile su ile sulandırılır. Bundan 5 ml alınır, üzerine 5 ml "sample diluent" eklenir. S5 elde edilir.

S 6 = Dilüe edilmemiş standart

S5 = 5ml S6 +5 ml sample dilüent

S4 = 5ml S5 + 5 ml sample dilüent

S3 = 5ml S4 + 5 ml sample dilüent

S2 = 5ml S3 + 6 ml sample dilüent

S1 = Sample dilüent'in kendisidir.

Deneyin yapılışı:

	Çalışma Körü	Standart	Seyreltilmiş Örnek
<b>Numune</b>	-	-	0,05 ml
<b>Standart</b>	-	0,05 ml	-
<b>Fosfat tamponu</b>	0,05 ml	-	-
<b>Substrat karışımı</b>	1,7 ml	1,7 ml	1,7 ml
Küvetler iyice altüst edilerek karıştırıldı			
<b>Ksantin oksidaz</b>	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml

Küvetler vortekste karıştırıldı ve 505 nm'de 30 sn sonra havaya karşı ilk absorbansı okundu ( $A_1$ ). Bundan 3dk sonra ise 2. absorbansları okundu ( $A_2$ ). Aynı işlemler standartlar içinde yapıldı.

Önce aşağıdaki formülden % inhibisyonlar hesaplandı

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - [(\Delta A \text{ numune} / \Delta A \text{ standart}) / \Delta A \text{ çalışma körü}] \times 100$$

SOD standartlarının konsantrasyonlarına karşılık % inhibisyonları hesaplanarak çizilen standart grafiğinde, elde edilen numune inhibisyonu işaretlenerek konsantrasyonları bulundu daha sonra okunan değerler her bir örneğin kendi dilüsyon katsayısı ile çarpılarak eritrositler için hemoglobine bölünmüş Ü/gr Hb dokuda ise proteine bölünerek U/mg protein cinsinden aktiviteleri tayin edildi.

### 3.2.4. İstatistikî analizler

Sonuçların istatistikî olarak değerlendirilmesinde aşağıdaki formüllerden yararlanıldı. Ayrıca kaleidagraph ve SPSS paket programı kullanılarak Mann – Whitney U testi ve Kruskal Wallis testi uygulanarak istatistikî analizler gerçekleştirildi (Kocaçalışkan, 2000; Özdamar, 1999; Düzgüneş, vd., 1983).

Aritmetik ortalama:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{N}$$

Standard sapma : Ss (SD)

$$Ss = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}}{N-1}}$$

Standart hata : Sh (SE)

$$Sh = \frac{Ss}{\sqrt{N}}$$

Farkın standart hatası : Ssd

$$Ssd = \sqrt{(Sh_1)^2 + (Sh_2)^2}$$

“t” değeri :

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{Ssd}$$

- $\Sigma$  : Toplama işareti
- N : Analiz sayısı ( Vaka sayısı )
- $\chi =$  : Ortalamaya girecek sonuçların herbiri
- $\Sigma x$  : Ortalamaya girecek sonuçların toplamı
- $\Sigma x^2$  : Sonuçların karelerinin toplamı
- $(\Sigma x)^2$  : Sonuçların toplamlarının karesi
- $\bar{\chi}_1$  : Araştırmaya alınan birinci grubun ortalaması
- $\bar{\chi}_2$  : Araştırmaya alınan ikinci grubun ortalaması
- Sh<sub>1</sub> : Birinci grubun standart hatası
- Sh<sub>2</sub> : İkinci grubun standart hatası
- (N + N) - 2 : Serbestlik decesi
- “t” : Kritik oran
- P : Probabilite (Önemlilik derecesi) diye adlandırılır. “t” değerleri hesaplandıktan sonar önemlilik derecesi (P), t cetvelinden bulundu.”

#### 4. SONUÇLAR

Ortalama ağırlıkları 1750 – 2500 gr. arasında olan İstanbul Üniversitesi, DETAM'dan temin ettiğimiz *Orctolagus cuniculus* türü tavşanlar APS, koter ve bistüri ile opere edilip; operasyon esnasında, operasyon sonrası üçüncü günde ve bir hafta sonra gerçekleştirilen ikinci operasyon sırasındaki karaciğer dokusu ve kan örneklerinde GSHPx, SOD enzimleri ile lipit peroksidasyon göstergesi olan MDA tainleri gerçekleştirildi. Bütün parametrelerin karşılaştırılması istatistiki olarak Mann – Whitney U testi, Kruskal Wallis testi, eşleştirilmiş t testi ve bağımsız gruplarda t testi ile korelasyon testi uygulandı. Analizlerimizin toplu sonuçları çizelge 4.1., 4.2., 4.3., 4.4., 4.5., 4.6. ve 4.7.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1, 4.2, 4.6, ve şekil 4.1, 4.2 ve 4.3'de görüldüğü gibi üçlü kıyaslamada plazma MDA ölçümlerinde reoperasyonda gruplar arasında istatistiksel yönden anlamlı fark bulundu ( $p<0,05$ ); yapılan ikili kıyaslamalarda ise koter-APS arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p<0,05$ ).

Çizelge 4.1, 4.3, 4.7 ve şekil 4.10 ve 4.11'de görüldüğü gibi doku MDA bakımından reoperasyonda gruplar arasında istatistiksel yönden anlamlı fark bulundu ( $p<0,05$ ). İkili kıyaslamalarda ise kontrol - APS ve koter - APS arasında istatistiksel bakımından anlamlı fark bulunurken ( $p<0,05$ ), kontrol-koter arasında ise fark bulunmadı ( $p>0,05$ ).

Çizelge 4.1, 4.2, 4.4, 4.6 ve şekil 4.4, 4.5 ve 4.6 da görüldüğü gibi üçlü kıyaslamalarda; Eritrosit SOD ölçümlerinden postoperasyon ve reoperasyonda istatistiksel bakımdan anlamlı fark bulundu ( $p<0,05$ ). İkili kıyaslamalarda; postoperasyonda koter-APS ve kontrol-APS arasında anlamlı fark bulundu ( $p<0,05$ ).

Çizelge 4.1, 4.3, 4.5, 4.7 ve şekil 4.12, 4.13 de görüldüğü gibi; üçlü kıyaslamalarda doku SOD ölçümlerinde reoperasyonda anlamlı fark bulunmazken ( $p>0,05$ ); ikili kıyaslamalarda ise koter-APS arasında fark bulundu ( $p<0,05$ ).

Çizelge 4.1, 4.2, 4.4, 4.6 ve şekil 4.7, 4.8 ve 4.9 da total kan GSH-Px değerleri ve çizelge 4.1, 4.3, 4.5, 4.7 ve şekil 4.14 ve 4.15 doku GSH-Px değerlerinde her iki analizde de istatistiksel bakımdan anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Çizelge 4.1. Kruskal-Wallis testine göre her üç grubun (kontrol, koter ve APS'nin) karşılaştırılması

Parametreler	Birimler	Gruplar	N	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SE$	P		
Plazma MDA	nmol / ml	Operasyon	Kontrol	3	3,173 ± 0,233	3,173 ± 0,135	P > 0,05	
			Koter	6	3,443 ± 1,207	3,443 ± 0,493		
			APS	19	2,842 ± 0,988	2,842 ± 0,23		
		Postoperasyon	Kontrol	3	3,281 ± 0,615	3,281 ± 0,355	P > 0,05	
			Koter	6	3,518 ± 1,200	3,518 ± 0,490		
			APS	19	3,019 ± 0,905	3,019 ± 0,207		
		Reoperasyon	Kontrol	3	3,194 ± 0,527	3,194 ± 0,30	P < 0,05*	
			Koter	6	3,248 ± 0,445	3,248 ± 0,18		
			APS	19	2,600 ± 0,471	2,600 ± 0,11		
Doku MDA	nmol / mg	Operasyon	Kontrol	3	4,902 ± 1,724	4,902 ± 1,634	P > 0,05	
			Koter	6	11,950 ± 9,839	11,950 ± 1,991		
			APS	18	8,785 ± 9,114	8,785 ± 0,488		
	protein	Reoperasyon	Kontrol	3	7,702 ± 1,422	7,702 ± 2,567	P < 0,05*	
			Koter	6	8,000 ± 4,350	8,000 ± 1,333		
			APS	13	3,291 ± 2,032	3,291 ± 0,912		
Eritrosit SOD	U / gHb	Operasyon	Kontrol	3	9124,75 ± 7327,50	9124,75 ± 4230,517	P > 0,05	
			Koter	6	1725,24 ± 1325,73	1725,24 ± 541,228		
			APS	12	2032,39 ± 1840,09	2032,39 ± 531,189		
		Postoperasyon	Kontrol	3	3044,57 ± 676,29	3044,57 ± 390,454	P < 0,05*	
			Koter	6	6037,87 ± 5970,405	6037,87 ± 1006,31		
			APS	12	1346,54 ± 964,18	1346,54 ± 278,335		
		Reoperasyon	Kontrol	3	1617,57 ± 806,73	1617,57 ± 465,765	P > 0,05	
			Koter	6	5211,47 ± 8992,16	5211,47 ± 3671,035		
			APS	12	3414,76 ± 3940,87	3414,76 ± 1137,631		
Doku SOD	nmol / mg	Operasyon	Kontrol	3	23,72 ± 33,49	23,72 ± 13,67	P > 0,05	
			Koter	6	16,505 ± 23,817	16,505 ± 2,750		
			APS	14	6,682 ± 2,421	6,682 ± 0,477		
		protein	Reoperasyon	Kontrol	3	5,85 ± 3,27	5,85 ± 3,37	P > 0,05
				Koter	6	20,527 ± 27,347	20,527 ± 3,421	
				APS	13	6,16 ± 6,85	6,16 ± 1,68	



Total Kan GSHP x	U / gHb	Operasyon	Kontrol	3	108,656 ± 48,413	108,656 ± 27,493	P > 0,05
			Koter	6	201,382 ± 152,062	201,382 ± 62,08	
			APS	11	177,332 ± 112,384	177,332 ± 33,89	
		Postoperasyon	Kontrol	3	127,207 ± 78,042	127,207 ± 45,06	P > 0,05
			Koter	6	200,152 ± 167,966	200,152 ± 68,57	
			APS	8	132,859 ± 172,572	132,859 ± 61,01	
		Reoperasyon	Kontrol	3	233,638 ± 104,884	233,638 ± 60,55	P > 0,05
			Koter	6	116,681 ± 79,112	116,681 ± 32,30	
			APS	12	122,056 ± 63,393	122,056 ± 18,30	
Doku GSHP x	U / mg protein	Operasyon	Kontrol	3	1,276 ± 0,712	1,276 ± 0,41	P > 0,05
			Koter	6	1,425 ± 0,496	1,425 ± 0,202	
			APS	14	2,712 ± 3,892	2,712 ± 1,04	
		Reoperasyon	Kontrol	3	1,107 ± 0,484	1,107 ± 0,28	P > 0,05
			Koter	6	0,759 ± 0,909	0,759 ± 0,37	
			APS	12	2,711 ± 5,242	2,711 ± 1,51	

Çizelge 4.2. Koter ve kontrol gruplarına ait plazma, MDA, eritrosit SOD, total kan, GSHPx değerleri

Parametreler	Birimler	Gruplar	n	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm Sh$	P
Plazma MDA (operasyon)	nmol / ml	Koter	6	3,443 ± 1,207	3,443 ± 0,493	P > 0,05
		Kontrol	3	3,173 ± 0,233	3,173 ± 0,135	
Plazma MDA (postoperasyon)	nmol / ml	Koter	6	3,518 ± 1,200	3,518 ± 0,490	P > 0,05
		Kontrol	3	3,28 ± 0,615	3,28 ± 0,355	
Plazma MDA (reoperasyon)	nmol / ml	Koter	6	3,248 ± 0,445	3,248 ± 0,18	P > 0,05
		Kontrol	3	3,194 ± 0,527	3,194 ± 0,30	
Eritrosit SOD (operasyon)	U / gHb	Koter	6	1725,237 ± 1325,733	1725,237 ± 541,228	P > 0,05
		Kontrol	3	9124,742 ± 7327,469	9124,742 ± 4230,517	
Eritrosit SOD (postoperasyon)	U / gHb	Koter	6	6037,874 ± 5970,405	6037,874 ± 2437,408	P > 0,05
		Kontrol	3	3044,570 ± 676,285	3044,570 ± 390,454	
Eritrosit SOD (reoperasyon)	U / gHb	Koter	6	5211,472 ± 8992,164	5211,472 ± 3671,035	P > 0,05
		Kontrol	3	1617,568 ± 806,729	1617,568 ± 465,765	
Total Kan GSHP x (operasyon)	U / gHb	Koter	6	201,382 ± 152,062	201,382 ± 62,08	P > 0,05
		Kontrol	3	108,656 ± 48,413	108,656 ± 27,493	
Total Kan GSHP x (postoperasyon)	U / gHb	Koter	6	200,152 ± 167,966	200,152 ± 68,57	P > 0,05
		Kontrol	3	127,207 ± 78,042	127,207 ± 45,06	
Total Kan GSHP x (reoperasyon)	U / gHb	Koter	6	116,681 ± 79,112	116,681 ± 32,30	P > 0,05
		Kontrol	3	233,638 ± 104,884	233,638 ± 60,55	

Çizelge 4.3. Koter ve kontrol gruplarına ait doku, MDA, SOD, GSHPx değerleri

Parametreler	Birimler	Gruplar	n	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm Sh$	P
Doku MDA (operasyon)	nmol / mg Protein	Koter	6	11,952 ± 9,841	11,952 ± 4,017	P > 0,05
		Kontrol	3	4,902 ± 1,724	4,902 ± 0,996	
Doku MDA (reoperasyon)	nmol / mg Protein	Koter	6	8,000 ± 4,350	8,000 ± 1,776	P > 0,05
		Kontrol	3	7,704 ± 1,423	7,704 ± 0,821	
Doku SOD (operasyon)	U / mg protein	Koter	6	16,505 ± 23,817	16,505 ± 9,723	P > 0,05
		Kontrol	3	23,72 ± 33,489	23,72 ± 19,335	
Doku SOD (reoperasyon)	U / mg protein	Koter	6	20,527 ± 27,347	20,527 ± 3,421	P > 0,05
		Kontrol	3	5,85 ± 3,27	2,790 ± 0,93	
Doku GSHP x (operasyon)	U / mg protein	Koter	6	1,425 ± 0,496	1,425 ± 0,202	P > 0,05
		Kontrol	3	1,276 ± 0,712	1,276 ± 0,41	
Doku GSHP x (reoperasyon)	U / mg protein	Koter	6	0,759 ± 0,909	0,759 ± 0,37	P > 0,05
		Kontrol	3	1,107 ± 0,484	1,107 ± 0,28	

Çizelge 4.4. APS ve Koter gruplarına ait plazma, MDA, eritrosit SOD, total kan, GSHPx değerleri

Parametreler	Birimler	Gruplar	n	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm Sh$	P
Plazma MDA (operasyon)	nmol / ml	Koter	6	3,443 ± 1,207	3,443 ± 0,493	P > 0,05
		APS	19	2,842 ± 0,988	2,842 ± 0,23	
Plazma MDA (postoperasyon)	nmol / ml	Koter	6	3,518 ± 1,200	3,518 ± 0,490	P > 0,05
		APS	19	3,019 ± 0,905	3,019 ± 0,207	
Plazma MDA (reoperasyon)	nmol / ml	Koter	6	3,248 ± 0,445	3,248 ± 0,18	P < 0,05 *
		APS	19	2,600 ± 0,471	2,600 ± 0,11	
Eritrosit SOD (operasyon)	U / gHb	Koter	6	1725,237 ± 1325,733	1725,237 ± 541,228	P > 0,05
		APS	12	2032,385 ± 1840,093	2032,385 ± 531,189	
Eritrosit SOD (postoperasyon)	U / gHb	Koter	6	6037,874 ± 5970,405	6037,874 ± 2437,408	P < 0,05 *
		APS	12	1346,542 ± 964,180	1346,542 ± 278,335	
Eritrosit SOD (reoperasyon)	U / gHb	Koter	6	5211,472 ± 8992,164	5211,472 ± 3671,035	P > 0,05
		APS	12	3414,762 ± 3940,869	3414,762 ± 1137,631	
Total Kan GSHP x (operasyon)	U / gHb	Koter	6	201,382 ± 152,062	201,382 ± 62,08	P > 0,05
		APS	11	177,332 ± 112,384	177,332 ± 33,89	
Total Kan GSHP x (postoperasyon)	U / gHb	Koter	6	200,152 ± 167,966	200,152 ± 68,57	P > 0,05
		APS	8	132,859 ± 172,572	132,859 ± 61,01	
Total Kan GSHP x (reoperasyon)	U / gHb	Koter	6	116,681 ± 79,112	116,681 ± 32,30	P > 0,05
		APS	12	122,056 ± 63,393	122,056 ± 18,30	

Çizelge 4.5. APS ve Koter gruplarına ait doku, MDA, SOD, GSHPx değerleri

Parametreler	Birimler	Gruplar	n	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm Sh$	P
Doku MDA (operasyon)	nmol / mg Protein	Koter	6	11,952 ± 9,841	11,952 ± 4,017	P > 0,05
		APS	18	8,786 ± 9,116	8,786 ± 2,148	
Doku MDA (reoperasyon)	nmol / mg Protein	Koter	6	8,000 ± 4,350	8,000 ± 1,776	P < 0,05 *
		APS	13	3,291 ± 2,031	3,291 ± 0,563	
Doku SOD (operasyon)	U / mg protein	Koter	6	16,505 ± 23,817	16,505 ± 9,723	P > 0,05
		APS	14	6,682 ± 2,421	6,682 ± 0,647	
Doku SOD (reoperasyon)	U / mg protein	Koter	6	20,527 ± 27,347	20,527 ± 3,421	P < 0,05*
		APS	13	6,16 ± 6,85	6,049 ± 0,465	
Doku GSHP x (operasyon)	U / mg protein	Koter	6	1,425 ± 0,496	1,425 ± 0,202	P > 0,05
		APS	14	2,712 ± 3,892	2,712 ± 1,04	
Doku GSHP x (reoperasyon)	U / mg protein	Koter	6	0,759 ± 0,909	0,759 ± 0,37	P > 0,05
		APS	12	2,711 ± 5,242	2,711 ± 1,51	

Çizelge 4.6. APS ve kontrol gruplarına ait plazma, MDA, eritrosit SOD, total kan, GSHPx değerleri

Çizelge 4.6. APS ve kontrol gruplarına ait plazma, MDA, eritrosit SOD, total kan, GSHPx değerleri

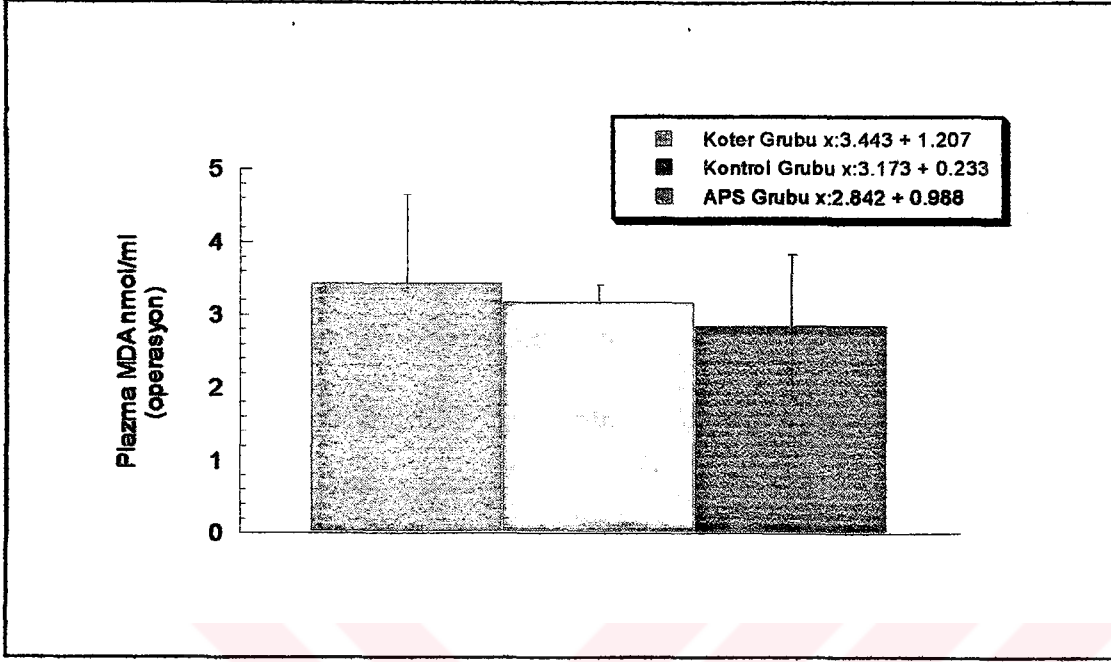
Parametreler	Birimler	Gruplar	n	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm Sh$	P
Plazma MDA (operasyon)	nmol / ml	Kontrol	3	3,173 ± 0,233	3,173 ± 0,135	P > 0,05
		APS	19	2,842 ± 0,988	2,842 ± 0,23	
Plazma MDA (postoperasyon)	nmol / ml	Kontrol	3	3,28 ± 0,615	3,28 ± 0,355	P > 0,05
		APS	19	3,019 ± 0,905	3,019 ± 0,207	
Plazma MDA (reoperasyon)	nmol / ml	Kontrol	3	3,194 ± 0,527	3,194 ± 0,30	P > 0,05
		APS	19	2,600 ± 0,471	2,600 ± 0,11	
Eritrosit SOD (operasyon)	U / gHb	Kontrol	3	9124,742 ± 7327,469	9124,742 ± 4230,517	P > 0,05
		APS	12	2032,385 ± 1840,093	2032,385 ± 531,189	
Eritrosit SOD (postoperasyon)	U / gHb	Kontrol	3	3044,570 ± 676,285	3044,570 ± 390,454	P < 0,05 *
		APS	12	1346,542 ± 964,180	1346,542 ± 278,335	
Eritrosit SOD (reoperasyon)	U / gHb	Kontrol	3	1617,568 ± 806,729	1617,568 ± 465,765	P > 0,05
		APS	12	3414,762 ± 3940,869	3414,762 ± 1137,631	
Total Kan GSHP x (operasyon)	U / gHb	Kontrol	3	108,656 ± 48,413	108,656 ± 27,493	P > 0,05
		APS	11	177,332 ± 112,384	177,332 ± 33,89	
Total Kan GSHP x (postoperasyon)	U / gHb	Kontrol	3	127,207 ± 78,042	127,207 ± 45,06	P > 0,05
		APS	8	132,859 ± 172,572	132,859 ± 61,01	
Total Kan GSHP x (reoperasyon)	U / gHb	Kontrol	3	233,638 ± 104,884	233,638 ± 60,55	P > 0,05
		APS	12	122,056 ± 63,293	122,056 ± 18,30	

Çizelge 4.7. APS ve kontrol gruplarına ait doku, MDA, SOD, GSHPx değerleri

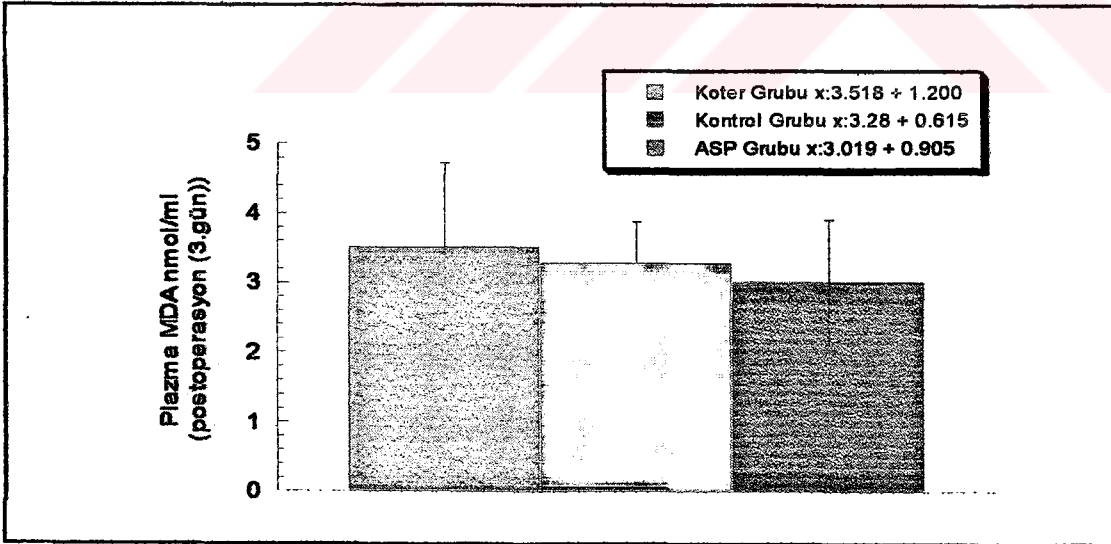
Parametreler	Birimler	Gruplar	n	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm Sh$	P
Doku MDA (operasyon)	nmol / mg Protein	Kontrol	3	4,902 ± 1,724	4,902 ± 0,996	P > 0,05
		APS	18	8,786 ± 9,116	8,786 ± 2,148	
Doku MDA (reoperasyon)	nmol / ml protein	Kontrol	3	7,704 ± 1,423	7,704 ± 0,821	P < 0,05 *
		APS	13	3,291 ± 2,031	3,291 ± 0,563	
Doku SOD (operasyon)	U / mg protein	Kontrol	3	23,72 ± 33,489	23,72 ± 19,335	P > 0,05
		APS	14	6,682 ± 2,421	6,682 ± 0,647	
Doku SOD (reoperasyon)	U / mg protein	Kontrol	3	5,85 ± 3,27	2,790 ± 0,93	P > 0,05
		APS	13	6,16 ± 6,85	6,049 ± 0,465	
Doku GSHP x (operasyon)	U / mg protein	Kontrol	3	1,276 ± 0,712	1,276 ± 0,41	P > 0,05
		APS	14	2,712 ± 3,892	2,712 ± 1,04	
Doku GSHP x (reoperasyon)	U / mg protein	Kontrol	3	1,107 ± 0,484	1,107 ± 0,28	P > 0,05
		APS	12	2,711 ± 5,242	2,711 ± 1,51	

Yine yapmış olduğumuz korelasyon analizlerinde APS ile yapılan reoperasyon, doku SOD ve GSH-Px değerleri arasında pozitif bir korelasyon bulunurken ( $r=0.751$ ;  $p<0,005$ ); reoperasyon kontrol grubunda plazma MDA ile GSH-Px değerleri arasında negatif bir korelasyon ( $r= -1$ ;  $p<0,008$ ); koter grubu postoperasyon plazma SOD ile GSH-Px arasında yapılan korelasyon hesaplamasında negatif bir ilişki ( $r= -0.862$ ;  $p<0.027$ ); postoperasyon APS grubu plazma SOD ile MDA arasında ise pozitif bir korelasyon tespit edildi ( $r= 0.601$ ;  $p<0.03$ ).

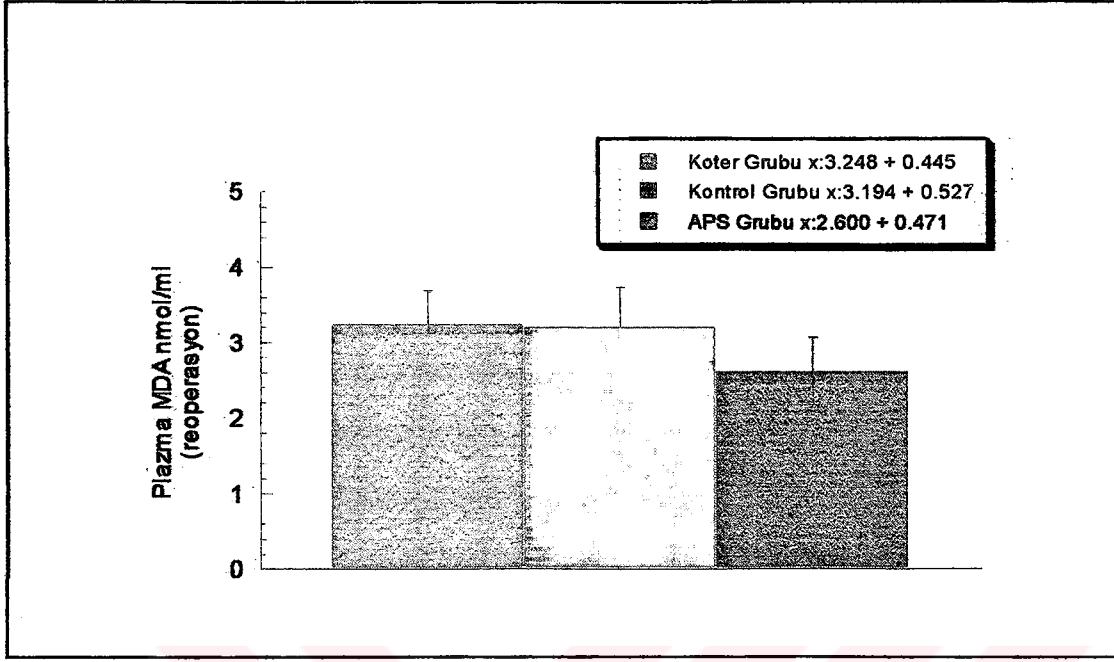




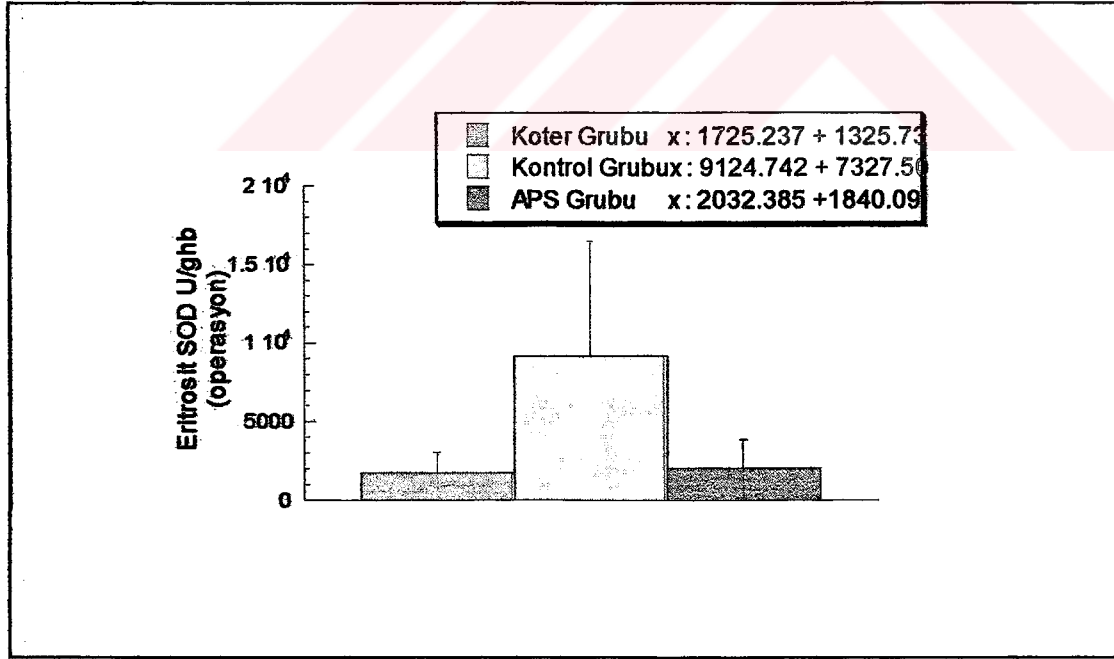
Şekil 4.1. Operasyon sırasında plazma MDA seviyelerini gösteren diyagram



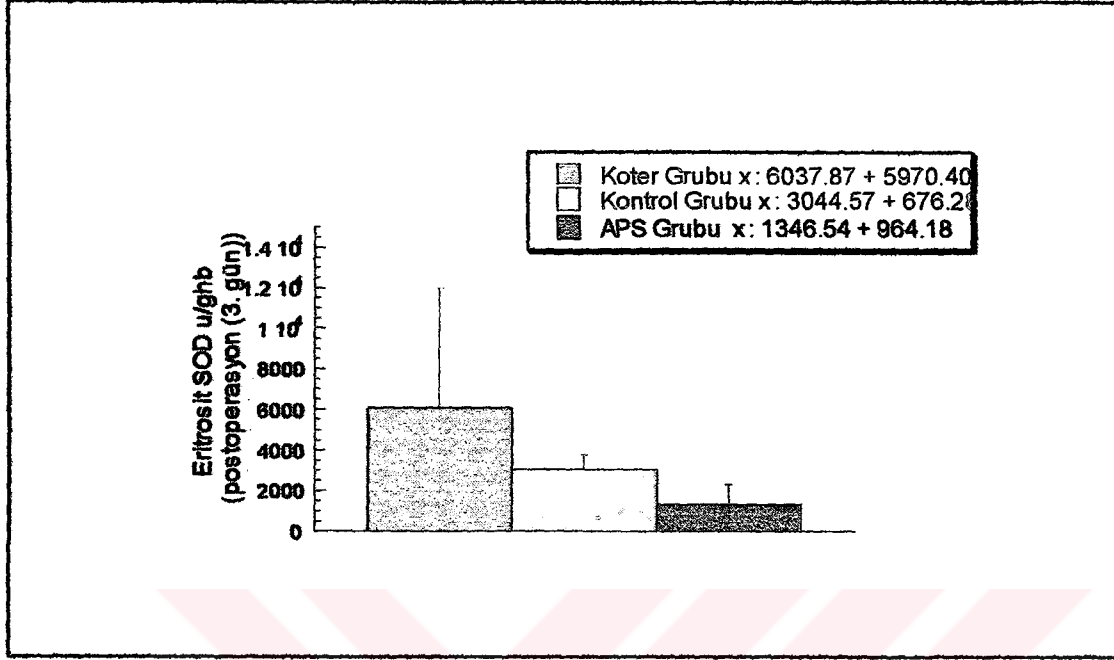
Şekil 4.2. Postoperasyonda (3. Gün) plazma MDA seviyelerini gösteren diyagram



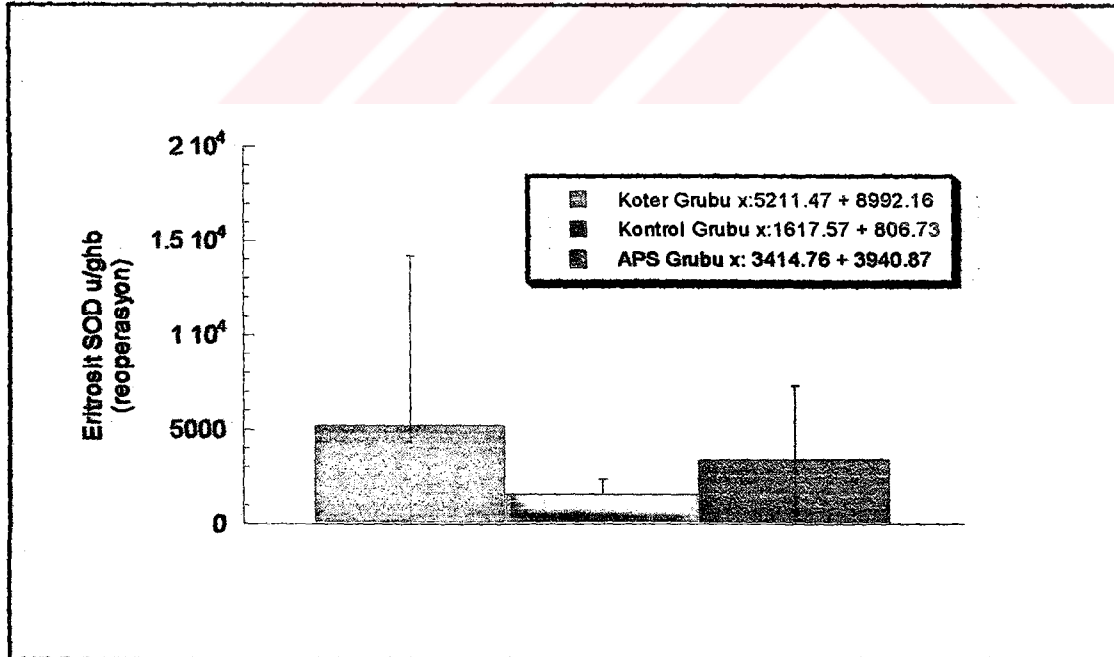
Şekil 4.3. Reoperasyon sırasında plazma MDA düzeylerini gösteren diyagram



Şekil 4.4. Operasyon sırasında eritrosit SOD düzeylerini gösteren diyagram

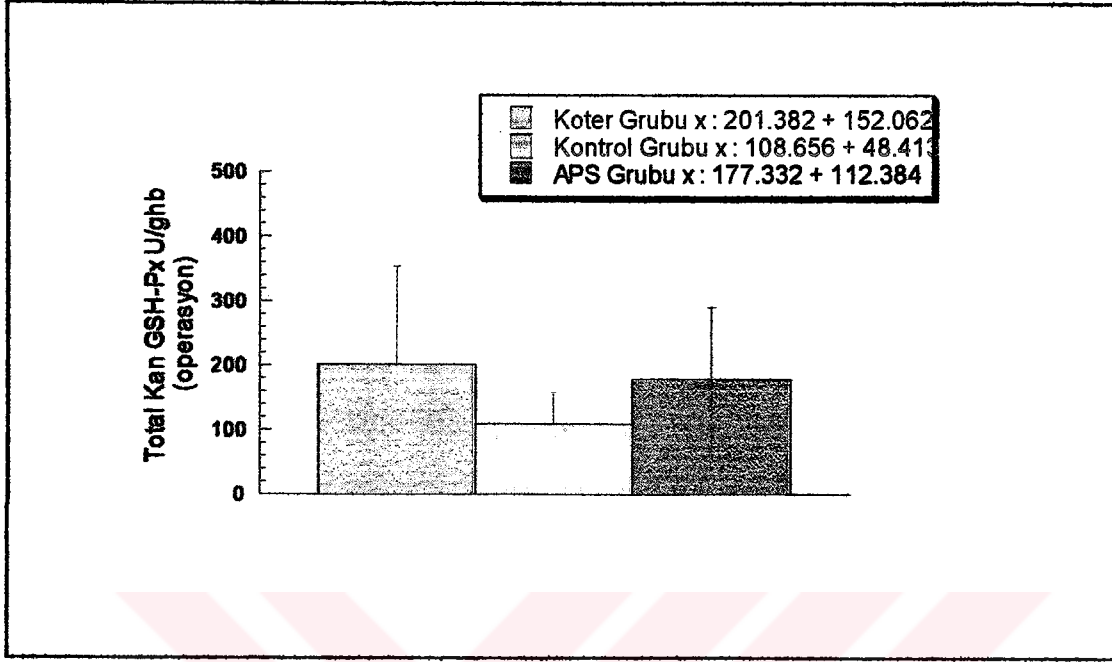


Şekil 4.5. Postoperasyonda (3. Gün) eritrosit SOD düzeylerini gösteren diyagram

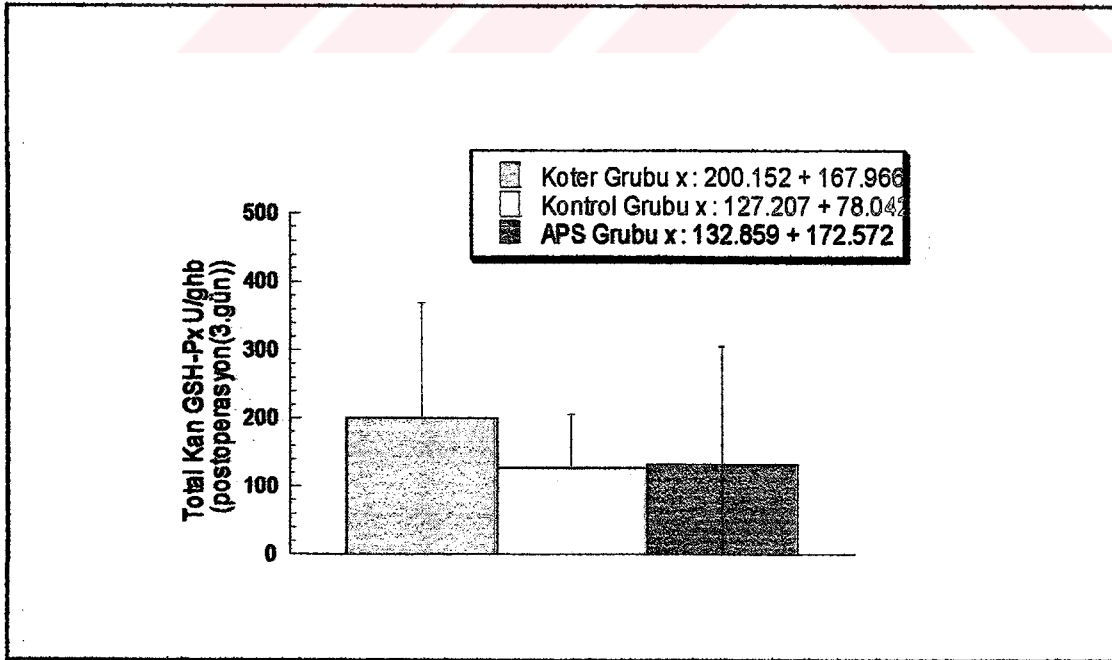


Şekil 4.6. Reoperasyon sırasında eritrosit SOD düzeylerini gösteren diyagram

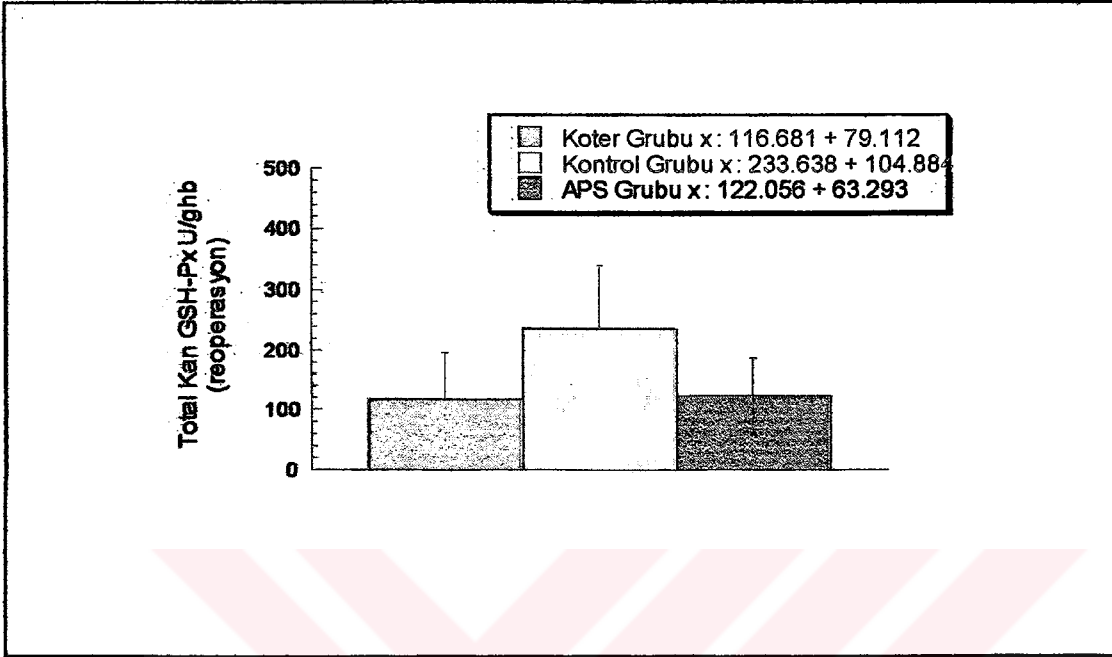




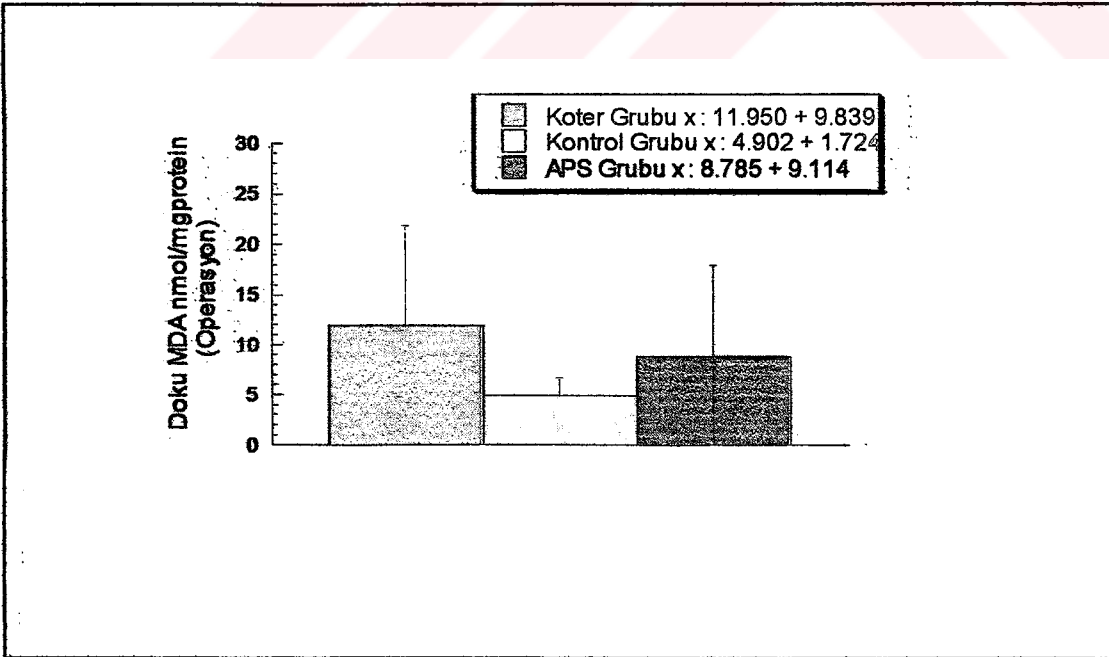
Şekil 4.7. Operasyon sırasında total kan GSH-Px düzeylerini gösteren diyagram



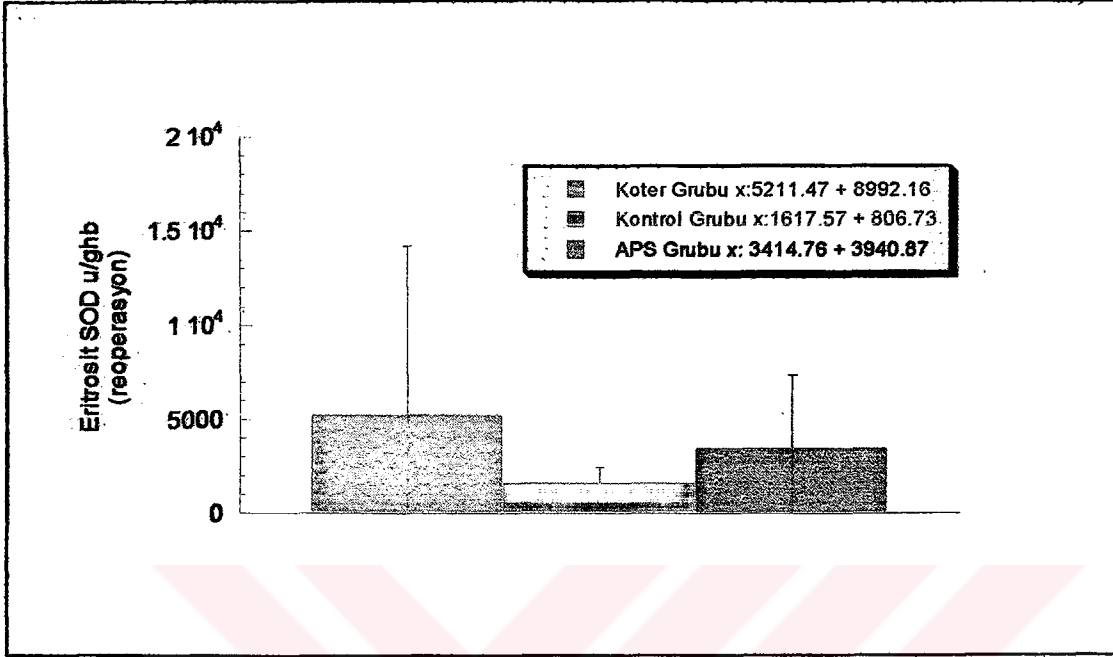
Şekil 4.8. Postoperasyonda (3. Gün) total kan GSH-Px düzeylerini gösteren diyagram



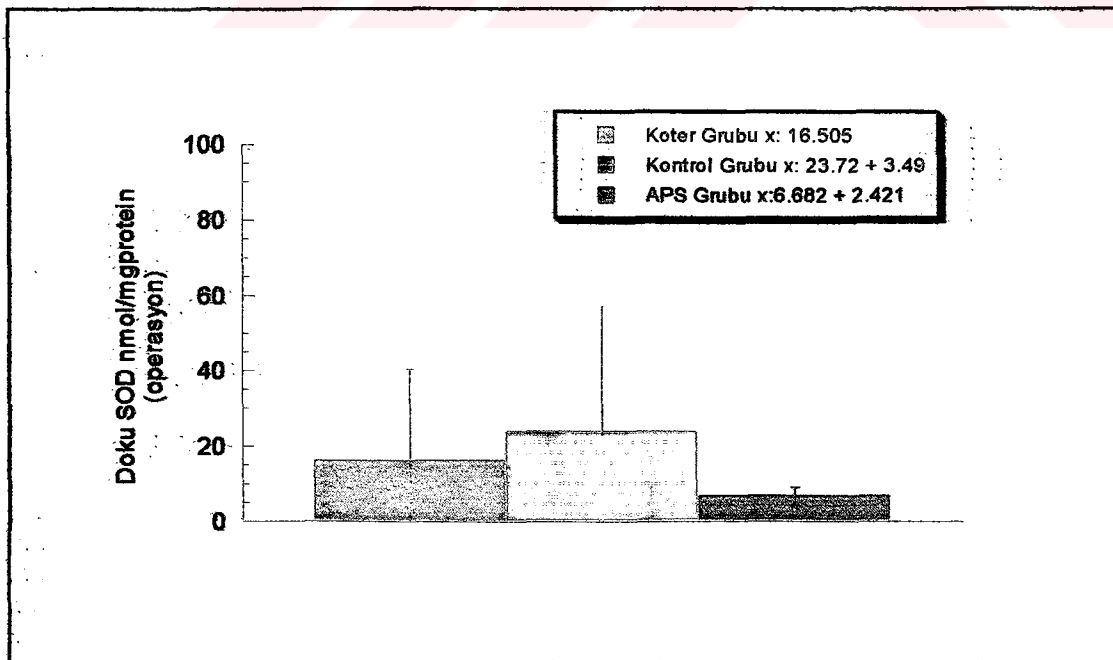
Şekil 4.9. Reoperasyon sırasında total kan GSH-Px düzeylerini gösteren diyagram



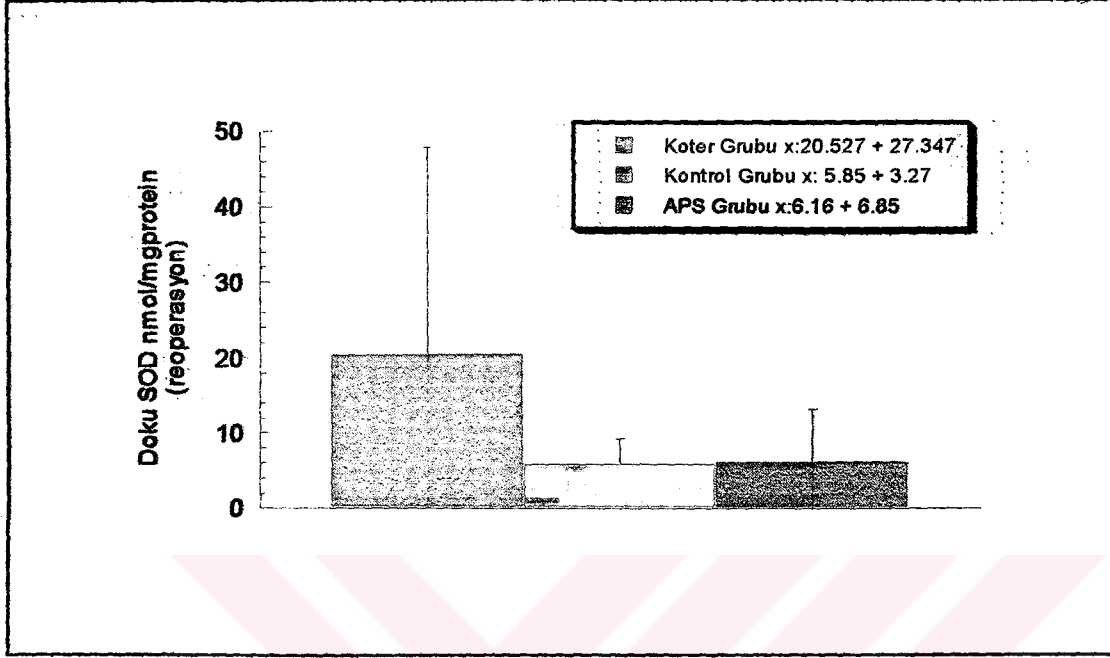
Şekil 4.10. Operasyon sırasında doku MDA düzeylerini gösteren diyagram



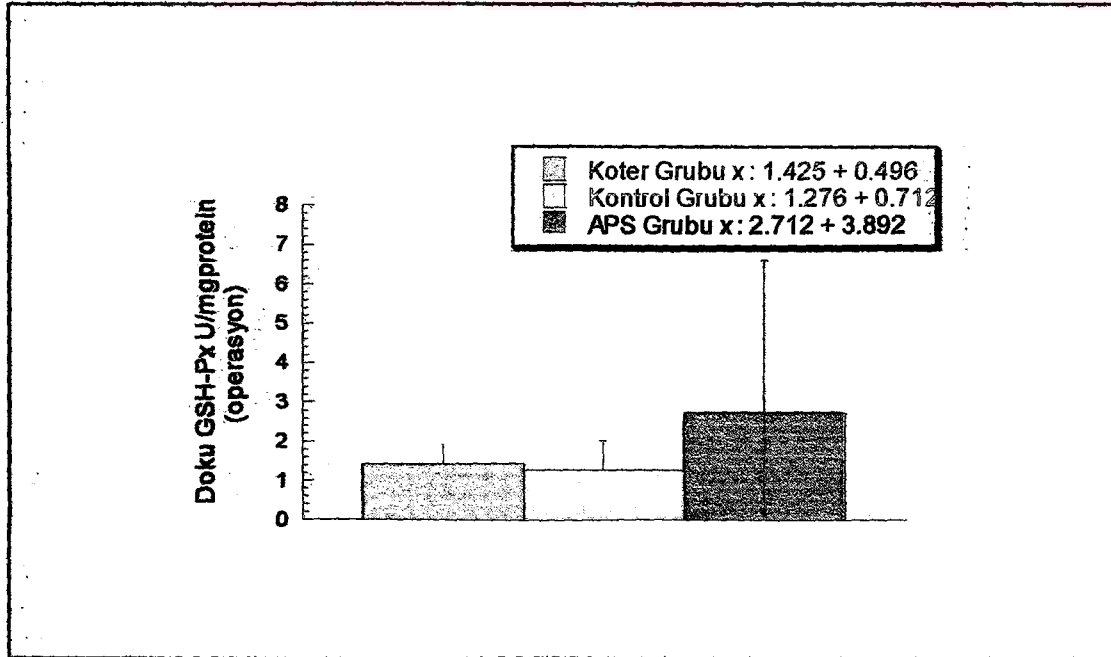
Şekil 4.11. Reoperasyon sırasında doku MDA düzeylerini gösteren diyagram



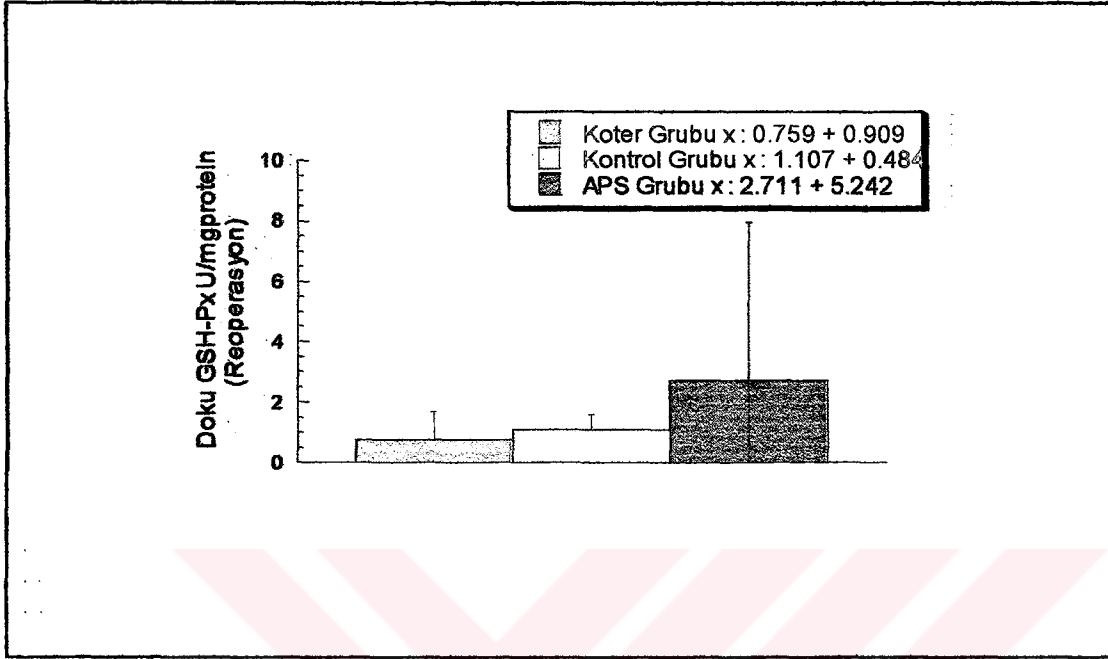
Şekil 4.12. Operasyon sırasında doku SOD düzeylerini gösteren diyagram



Şekil 4.13. Reoperasyon sırasında doku SOD düzeylerini gösteren diyagram



Şekil 4.14 Operasyon sırasında doku GSH-Px düzeylerini gösteren diyagram



Şekil 4.15. Reoperasyon sırasında doku GSH-Px düzeylerini gösteren diyagram

Her üç deneme grubumuza ait elde ettiğimiz analiz sonuçları arasında istatistiki açıdan bir korelasyon olup olmadığını belirlemek amacıyla SPSS paket programında korelasyon hesaplaması gerçekleştirildi. Bu hesaplamamız sonucunda şekil 4.16.'da görüldüğü gibi APS ile yapılan reoperasyon anında, dokuda ölçülen SOD ve GSH – Px değerleri arasında pozitif bir korelasyon bulunurken ( $r=0,751$ ;  $p < 0,005$ ); kontrol grubunda reoperasyon plazma MDA ile total kan GSH – Px değerleri arasında (şekil 4.17.) negatif bir korelasyon ( $r=-1$ ;  $p<0,008$ ) tespit edildi. Koter grubu postoperasyon eritrosit SOD ile total kan GSH – Px arasında yapılan korelasyon hesaplamasında ise (şekil 4.18) negatif bir ilişki bulunurken ( $r=-0,862$ ;  $p<0,027$ ); APS grubu postoperasyon plazma SOD ile MDA arasında ise (şekil 4.19) pozitif bir korelasyon tespit edildi ( $r=0,601$ ;  $p<0,03$ ).

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Metodların Tartışması

Son zamanlarda serbest radikallerin yol açtığı hastalıklarla ilgili araştırmalar önem kazanmıştır. Serbest radikaller yaşam boyunca hem endojen hemde eksojen kaynaklardan oluşurlar ve organizmada serbest radikallerin zararlı etkilerini ortaya koymadan, etkisizleştirilmesini sağlayan güçlü antioksidan savunma sistemleri vardır. Serbest radikallerin oluşum hızıyla etkisizleştirme hızı dengede olduğu sürece organizma bu bileşiklerden etkilenmemektedir. Buna karşılık antioksidan savunma azalır veya bu bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa bu denge bozulmakta ve serbest radikallere bağlı zararlı etkiler ortaya çıkmaktadır. Çeşitli klinik, epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar serbest radikal ve lipit peroksidasyonu ile karsinogenez, yaşlanma, akciğer hastalıkları, diabet ve diabet komplikasyonları gibi hastalıklar arasında bir ilişki bulunduğunu göstermektedir (Uysal, 1998; Tanakol, 1998; Kızılay, 1998; Mehmetçik, 1994; Seven, 1995 ).

Serbest radikalleri doğrudan ölçmek zordur. Onun için bunların yerine oksidasyon ürünleri ölçülür. Bu ürünlerden en çok ölçüleni ise MDA'dır. MDA ise en hassas şekilde HPLC ile ölçülür. Ayrıca manuel metodlarla da MDA ölçülebilmektedir. En hassas ölçüm HPLC ile olmakta birlikte bu teknik pahalı bir sistem olduğundan bunun yerine çoğunlukla manuel metodla MDA tayini tercih edilir (Slater, 1994; Draper, et al., 1990; Jain et al., 1989; Ohkawa, 1979; Başaran, 1998; Gökdoğan, 1998; Akkuş, 1995)

Lipit peroksidasyonunun tayini için en yaygın kullanılan tiyobarbitürik asit testi ve konjuge dien'lerin ölçümüdür. Tiyobarbitürik asit testi lipit peroksidasyonu sırasında oluşan çeşitli peroksitlerin ve doymamış aldehydlerin düzeylerini ölçmektedir. Bu bileşikler asitle ısıtıldığı zaman MDA vererek ayrışırlar. Oluşan MDA ise TBA ile 532 nm'de absorpsiyon veren bir ürün oluşturur. MDA gerek invivo gerekse doku süspansiyonlarında aldehyd oksidazlar tarafından kolayca metabolize olabilirler. Bunun yanı sıra bu bileşik doku komponentleri ile reaksiyona girerek çapraz bağlanmış pigmentler oluşturmakta ve bu yolla hücre içi konsantrasyonu azalmaktadır. Bu nedenle invivo MDA konsantrasyon'u zardaki peroksidasyon olaylarının tam olarak yansımaları sayılmamaktadır. Biz de çalışmamızda lipit peroksidasyonunun seviyesini göstermek amacıyla çoğu araştırmacıların yaptığı gibi TBA reaktivitesi yoluyla plazma MDA ölçümünü (Slater, 1994; Draper, et al., 1990; Jain et al., 1989;

Gökdoğan, 1998), doku MDA seviyesinin ölçümünü ise Okawa yöntemine göre gerçekleştirdik.(Okawa, 1979).

GSH bitki ve hayvan hücrelerinde sentezlenen bir tiripeptit olup çok çeşitli hücresel fonksiyonlarda görevlidir. Bu fonksiyonların başında reaktif oksijen ana ürünlerinin ve serbest radikallerin organizmadaki yıkıcı etkilerinin önlenmesi gelir. Kansere, yaşlanma, kardiyovasküler hastalıklar ve HIV enfeksiyonundaki bağışıklık bozukluklarına karşılık GSH koruyucu bir faktör olabilir. Bütün memeli hücreleri GSH sentezleyebilmelerine rağmen plazma GSH'ın başlıca kaynağı karaciğerdir (Emir, 1999).

GSH konsantrasyonlarındaki değişimin ölçümü biyolojik sistemlerdeki oksidatif stresin bir göstergesidir. Çünkü GSH stabil bir molekül olmayıp çeşitli ajanlar ile oksitlenebildiği gibi kendi kendine de oksitlenerek GSSG formuna dönüşebilir. Bundan dolayı ideal GSH tayin yöntemi, GSH oranını doğru olarak gösterebilmelidir. Bu yöntemler başlıca enzimatik, kromatografik, flovsitometrik ve elektroforetik olarak özetlenebilir. Elektroforetik, kromatografik (HPLC) ve flovsitometrik teknikler hassas olmakla birlikte fazla miktarda cihaz donanımına ihtiyaç göstermesinden dolayı biz çalışmamızda diğer metodlara göre yapılmasının kolay oluşu sonuçların güvenilir olmasından dolayı birçok araştırmacının tercih ettiği gibi enzimatik hazır kit kullanarak GSH-Px tayinini gerçekleştirdik (Emir, 1999; Pagli et.al, 1967; Başaran, 1998; Gökdoğan, 1998).

SOD tayini immünolojik metodlar ve enzimatik metodlar kullanılarak gerçekleştirilebilir (Sun et al., 1988; Flohe et al.,1984). İmmünolojik metod pahalı olduğundan dolayı biz de diğer araştırmacılar gibi enzimatik hazır kit kullanarak SOD tayinini gerçekleştirdik (Flohe et al., 1984).

## 5.2. Bulguların Tartışması

Günümüzde belirttiğimiz gibi cerrahi operasyonlarda daha çok koter ve bistüri teknikleri kullanılmaktadır. APS tekniği ise henüz geniş bir kullanım alanına sahip olmasa da beyin ve göğüs cerrahisinde bazı bilim adamları tarafından (Elmacı, 1997; Yörük, 2000; Tanrısever, 1996) tercih edilen bir metoddur.

Koter ve bistüri teknikleri ile cerrahi operasyon yapıldığında lokal olarak operasyon bölgesinde iskemi gelişebilmekte buna bağlı olarak da serbest radikal üretiminin arttığı bilinmektedir. İskeminin organ ve dokuda oluşturduğu membran hasarı lipid peroksidasyonunu

uyarır. Membranların yapı ve fonksiyonları bozularak oluşan lipid peroksidleri belli bir konsantrasyondan sonra dolaşıma geçip plazmadaki lipid peroksit ve serbest radikal seviyesini arttırmaları (Seven, 1995) APS tekniğinde ise diğer iki tekniğe göre minimum düzeyde hasar meydana geldiği (Gültekin, vd., 2000; Özçoban, vd., 2001; Perk, vd., 2000) çeşitli araştırmacılar tarafından iddia edilmektedir. Çünkü APS tekniği ile lokal olarak sadece kesimin yapıldığı bölgede koagülasyon gerçekleştirip daha altta bulunan dokulara bir zarar verilmediği ve kesim esnasında oluşan ölü hücre atıklarının cihaz tarafından evaporasyonla uzaklaştırılabildiği bilinmektedir. Biz çalışmalarımızı bistüri, koter ve APS teknikleri ile opere edilen tavşanlarda operasyon, post ve reoperasyon sırasında, elde ettiğimiz kan ve doku örneklerinde ki MDA, SOD ve GSH-Px analizlerini yaparak gerçekleştirdik. Yapmış olduğumuz literatür çalışmalarında konumuzla ilgili doğrudan bu cihaz kullanılarak yapılmış bir çalışmaya rastlamadık.

Yapmış olduğumuz çalışmada her üç grubun Kruskal Wallis testine göre yapılan üçlü kıyaslamalarda plazma MDA reoperasyon; doku MDA reoperasyon; eritrosit SOD postoperasyon düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı fark bulundu ( $p < 0,05$ ). Mann-Whitney U testine göre yapılan ikili kıyaslamalarda plazma MDA reoperasyon koter-APS grupları arasında; doku MDA reoperasyon kontrol-APS ve koter-APS grupları arasında; eritrosit SOD postoperasyon koter-APS ve kontrol-APS grupları arasında; doku SOD reoperasyon koter-APS grupları arasında istatistiksel bakımdan anlamlı fark bulundu ( $p < 0,05$ ). Eritrosit ve dokuda yapılan GSH-Px' in tüm ölçümlerinde üçlü ve ikili kıyaslamalarda ise istatistiki açıdan anlamlı fark bulunmadı ( $P > 0,05$ ).

İncelenen parametreler bakımından her üç operasyon yöntemi karşılaştırıldığında; yapılan ölçümlerde eritrosit SOD enzim aktivitesi düzeylerine göre koter ve APS ile yapılan operasyonlar kıyaslandığında, APS'nin koter'e göre daha az serbest radikal oluşturduğu; plazma ve doku MDA düzeylerinde yapılan ölçümlere göre APS' nin koter ve klasik yöntemle göre MDA düzeyi daha düşük olması nedeniyle yine APS'nin daha az serbest radikal oluşturduğunu söyleyebiliriz. Doku SOD enzim aktivitesi düzeyleri üç grup arasında kıyaslandığında her üç grup arasında istatistiki açıdan önemli bir fark olmamakla birlikte, operasyon ve reoperasyon zamanındaki ölçümlerde SOD enzim aktivitesi koter grubunda APS grubuna göre daha yüksek olup reoperasyon koter-APS arasında yapılan ikili kıyaslamada istatistiki bakımdan önemli fark bulundu. Doku SOD enzim aktivitesi koter grubunda operasyon zamanında kontrol grubundan düşük, reoperasyon zamanında ise kontrol grubundan yüksek bulundu fakat yapılan ikili kıyaslamalara göre istatistiki açıdan koter-kontrol grubu arasında önemli bir fark bulunmadı.



Sonuç olarak APS grubunda, koter ve kontrol grubuna göre membran hasarının bir göstergesi olan lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden MDA düzeyinin daha az olması sebebiyle ve SOD enzim aktivitesi düzeyleri bakımından koter'e göre daha az serbest radikal oluşturduğunu söyleyebiliriz.

APS ile opere edilmiş tavşanlarda çalışmış olduğumuz analizlere ilaveten katalaz, konjuge dien, ferritin, vitamin C, vitamin A, vitamin E, albümin, serüloplazmin gibi analizlerin daha büyük bir popülasyon da araştırılmasının uygun olacağı düşüncesindeyiz.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Açıkgöz, S. D., Pekgöz, M., Yüzbaşıoğlu, G., Gültekin, Ö., Gökırmak, T. N., Paralı, S., Çelik, S., Tanrısever, E. ve Perk., C., 2001, Argon plazma (APS) teknolojisinin deneysel ve klinik ilk uygulamaları, İstanbul Üniv., Veteriner Fak., III. Ulusal Veteriner Hekimliği Öğrencileri araştırma Kongresi, Bildiri Özetleri, 2. s.
- Akköse, A. ve Ömer, B., 1998, Fiziksel kansinojenlere bağlı primer DNA hasar tayini, Klinik Gelişim, 11, 404-406.
- Akkuş, İ., 1995, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Mimoza Yayınları, 5. Sağlık Dizisi, 157 s.
- Akyüz, F., İnal, M. ve Turgut, A., 1998, Yüzücülerde aerobik ve anaerobik metabolizmanın serbest radikaller üzerine etkisi, Klinik Değişim, 11, 409-411.
- Alkan, G., 1997, Sigara kullanımı ile trombosit oksidatif hasarı arasındaki ilişki, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, 69 s.
- Amanvermez, R., Gönlüşen, L., Boşnak, M., Dervişoğlu, A., Özkan, K. ve Çelik, C., 1999, Deneysel pnömoperitoneum modelinde farklı basınç ve farklı sürelerde doku lipid peroksidasyon, glutatyon ve total tiol düzeyleri, Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği II. Ulusal Kongre Kitapçığı, 14. s.
- Ambrosio, G. and Chiariello, M., 1991, Myocardial reperfusion injury: mechanisms and management – a review, The American Journal of Medicine, 91, 86-88.
- Aslan, R., Şekeroğlu, R. ve Bayıroğlu, F., 1995, Serbest radikal türlerinin membran lipid peroksidasyonuna etkileri ve hücrel antioksidan savunma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2, 137-142.
- Aslan, R. ve Şekeroğlu, R., 1996, Fiziksel egzersize bağlı lipid peroksidasyonunda antioksidanların önemi, Türkiye Tıp Dergisi, 3(4), 271-274.
- Babior, B. M., 1978, Oxygen – dependent microbial killing by phagocytes, The New England, Journal of Medicine, 298(12), 659-668.
- Balabanlı, B., Türközkan, N., Polat, M. ve Akmansu, M., 1998, Radyasyonun oluşturduğu serbest radikal aracılıklı karaciğer harabiyetinin nitrik oksit oluşumu yoluyla incelenmesi, Klinik Gelişim, 11, 402-403.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Balabanlı, S., Sancak, B., Balabanlı, B. ve Türközkan, N., 1998, Kobaylarda radyasyonun nötrofil nitrat düzeyi ve myeloperoksidaz aktivitesi üzerine etkisi ve A vitaminin koruyucu rolü, Klinik Gelişim, 11, 454-455.
- Balcı, M., Akyol, Ö., Zengin, N. ve Kural, G., 1994, Antioxidant enyzme status in alloxan-Diabetic rat lenses, Turkish Journal of Medical Research, 12 (1), 1-4.
- Bartosz, G., 1996, Peroxynitrite, mediator of the toxic action of nitric oxide, Acta Biochimica Polonica, 43 (4), 645-660.
- Bast, A., Haenen, G.R.M.M. and Doelman, C.J.A., 1991, Oxidant and antioksidant stace of the art, American Journal of Medicine, 91 (3C), 2-12.
- Başaran, C., 1998, Valproik asitin karaciğerde glutatyon, lipit peroksid düzeyleri ve antioksidan sistem üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, İst. Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, 50 s.
- Baştar, İ., 1997, Streptozotosin uygulamasıyla oluşturulan deneysel diabette oksidatif stresin rolü, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 53 s.
- Bayındır, O., 1988, Septik şokta reaktif oksijen ürünleri ve NO<sup>•</sup>, Klinik Gelişim, 11, 369-372.
- Bedirhan, M. A., Karaanlıoğlu, B., Okar, İ., Kayapınar, R., Demirel, T., Canbaz, S. ve Karadeniz, A., 1993, İskemik akciğerlerin korunmasında nitrendipinin rolü, Atatürk Üniversitesi Tıp Bülteni, 25 (3), 461-470.
- Benli, F., Moini, H., Yüksel, ., Haklar, G., Yalçın, A. Ş. ve Bilsel, S., 1998, 17 β – estradiolün endotel hücrelerinde anoksi / reoksijenasyon sonrası üretilen süperoksid radikali oluşumu üzerine etkisi, Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği II. Ulusal Kongre Kitapçığı, s14
- Brody, J.E., 1988, The dark side of oksijen, New York Times April 26.
- Buettner, G.R., 1999, What is free radical biology, Virtual Hospital Department of Radiology, [http:// www. vh. org./welcome/UIHC/UIHC MeolDeps/ Rad. Research/ Fradbio.html](http://www.vh.org/welcome/UIHC/UIHC%20MeolDeps/Rad.Research/Fradbio.html).

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Burçak, G., 1998, İleri Glikasyon reaksiyonları yaşlanma ve diabetes mellitusun komplikasyonları, Klinik Gelişim, 11, 381-388.
- Catchcart, R., Schwiers, E. and Ames, B. N., 1984, Detection of picamole levels of lipid Hydroperoxides using a dichloro fluorescein, Fluorescent Assay, Methods in Enzymology, 105, 352 – 358.
- Cochrane, C.G., 1991, Cellular injury by oxidants, Am, J., Med, 91 (3C), 23-29.
- Champe, P.C. and Harvey, R.A.: 1997, Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya, (Çev. A. Tokullugil, M. Dirican ve E. Ulukaya), Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti, İstanbul, İkinci Baskı, 33-34 s.
- Czopski, G., 1984, Reaction of OH, Methods in Enzymology, 105, 209 – 215.
- Çevrim, Esra, 2000, Sigara içenlerde antioksidan enzimler, ferritin ve hemoglobin düzeylerinin değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 105 s.
- Çolakoğlu, S. ve Kırkalı, G., 1998, Egzersizde E vitamini desteğinin oksidan stres ve dayanıklılık üzerine etkileri, Klinik Gelişim, 11, 412-415.
- Dalaman, G., 1998, Sürekli ayaktan periton diyalizi hastalarında peritonit erken tanısı için reaktif oksijen türlerinin kemilüminesans yöntemi ile ölçümü, Uzmanlık Tezi, Marmara Üniv., Tıp Fak., Biyokimya Anabilim Dalı, 207 B No'lu tezi, 86 s.
- Draper, H. H. and Hodley, M., 1990, Malondialdehid determination as index lipid peroxidation, Methods in Enzymology, 186, 121 – 131.
- Düzgüneş, O., Kesici, V. ve Gürbüz, F., 1983, İstatistik metotları I, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, 36 s.
- Elmacı, İ., 1999, Bipolar koagülasyon ve argon plazma koagülasyon sistemlerinin sıçan beyinde kullanılmasının oluşturduğu etkilerin karşılaştırılması, Proje Eki, Marmara Üniversitesi, Nörolojik Bilimler Enstitüsü (NBE), 21 s.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Emir, M., 1999, Kromotografi ve spektrofotometre kullanılarak yapılan glutatyon ölçüm yöntemlerinin karşılaştırılması, Uzmanlık tezi, İstanbul Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 38 s.
- Erbaş, D., 1998, Nitrik oksit: fizyolojik önemi ve çeşitli hastalıklardaki rolü, Klinik Gelişim, 11, 376 – 380.
- Erkoç, D., 1998, Nitrik oksit, fizyolojik önemi ve çeşitli hastalıklardaki rolü, Klinik Gelişim, 11, 376-380.
- Erşahin Ç. H., 1998, Tavşan iskemi /reperfüzyon modelinde silazoprilin endotelin – 1 ve serbest radikaller üzerine olan etkisi, Uzmanlık tezi, Marmara Üniv., Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, 203 B No'lu tez, 54 s.
- Ferrari, R., Ceconi, C., Curello, S., Cargnoni, A., Alfieri, O., Pardini, A., Marzollo, P. and Visioli, O., 1991, Oxygen free radicals and myocardial damage: protective role of thiol-containing agents, The American Journal of Medicine, 91, 95-105.
- Flohe, L. and Otting, F., 1984, Superoxide dismutase assay, Methods in Enzymology, 105, 93 – 104.
- Fridovich, J. M., 1985, Oxygen – derived free radicals in postischemic tissue injury, The New England Journal of Medicine, 312 (3), 159 – 163.
- Gaetani, P., Cafe, C., Rodriguez, R., Baena, Y., Tancioni, F., Torri, C., Tartara, F. and Marzatico, F., 1997, Superoxide dismutase activity in cisternal cerebrospinal after aneurysmal subarachnoid haemorrhage, Acta Neurochirurgica, 139, 1033-1037.
- Glutathione Peroxidase, 1997, Enymatic Uv. Method Randox Laboratories Limited, Cat. No. / Kat. Nr. SD.
- Gökdoğan, A., 1998, Sigara içenlerde antioksidan savunma sistemindeki değişimler, Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Ana Bilim Dalı, 53 s.
- Gültekin, Ö., Pekgöz, M., Gökırmak, N, Paralı, S., Yüzbaşıoğlu, G., Tanrısever, E. ve Perk, C., 2000, Tümör cerrahisinde yeni bir boyut, argon plazma scalpel (APS), İstanbul Üniv., Veteriner Fak., II. Ulusal Veteriner Hekimliği Öğrencileri Araştırma Kongresi, 50 s.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gürbüz, O., 1998, Antioksidanların dermatolojide kullanımı, serbest radikallerin deride oluşan fotohasardaki rolleri ve antioksidanların koruyucu amaçlı kullanımları, Klinik Gelişim 11, 373-375.
- Haklar, G., 1999, Süperoksit radikali, nitrikoksit ve peroksinitrit'in hasar oluşturucu mekanizmalardaki rolleri, Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği II. Ulusal Kongre Kitapçığı, 4. s.
- Halliwell, B., 1984, Oxygen radicals; a common sense look at their nature and medical importance, Medical Biology, 62, 71-77.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1984, Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy, The Lancet, 73, 1396- 1397.
- Halliwell, B. and Gutteridge, M.C., 1984, Role of iron in oxygen radical reactions, Methods in Enzimology, 105, 47 – 56., The Lancet, 73, 1396- 1397.
- Halliwell, B., 1991, Reactive oxygen species in living systems, The American Journal of Medicine, 91(3C), 14-21.
- Halliwell, B., 1994, Free radicals, antioxidants and human disease, curiosity cause, of consequence?, The Lancet, 44(10).
- İnal, M. E., 1998, Radyasyona bağlı serbest radikal hasarı, yaşlanmada biyolojik cevap ve antioksidanların koruyucu etkileri, Klinik Gelişim, 11, 389-391.
- İşcan, M. ve Çoban, T., 1998, Normal ve neoplastik meme dokusunda antioksidan enzimler, Klinik Gelişim, 11,392-395.
- Jain, S. K., McVie, R., Duett, J. and Herbst, J.J., 1989, Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes, Diabetes, 38, 1539 – 1543.
- Kahraman, A., 1998, Ultraviyole A (UVA) ışığının oluşturduğu oksidatif stres üzerine quersetinin koruyucu rolü, Doktora Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, 69 s.
- Kapkaç, M., Işık, S. A., Ersin, S. ve Akyıldız, M., 1996, Deneysel böbrek iskemi-reperfüzyon hasarında E vitamini ve Egb 761'in koruyuculuğu, SSK Tepecik Hast. Dergisi, 6 (3), 143-151.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

Kavas, G., 1989, Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri, Türkiye Klinikleri, 9 (1), 1-8.

Kehrer, P.J., 1993, Free radicals as mediators of tissue injury and disease, Critical Reviews in Toxicology, 23 (1), 21-48.

Kılıç, H., 2000, Patoloji, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd., 388 s.

Kılınçturgay, K., 2000, İmmünoloji, . Baskı, 417 s.

Kızılay, H., 1998, 5 - fluourasil' in serbest oksijen radikalleri üzerine olan etkisi ve antioksidan enzim aktivitelerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, 60 s.

Kocaçalışkan, İ, 2001, Biyoistatistik, 90 s.

Köleoğlu, E., 1998, Serbest radikal reaksiyonlarının kanserdeki rolü, Klinik Gelişim, 11, 358-364.

Küçükkaya, B., 1997, Glutamat / NMDA eksitoksisitesi ile serbest radikall oluşumu arasındaki ilişkinin invitro ve exvivo incelenmesi, Uzmanlık Tezi, Marmara Üniversitesi, Tıp Fak., Biyokimya Anabilim Dalı 148 B No'lu tez, 69 s.

Lowry, O. H., Rosenburg, R. and Rammahally, J., 1959, Protein measurement with the folin reagent, J. Biol. Chem., 193, 265 – 275.

Macnee, W., Bridgeman, M. M. E., Marsden, M., Drost, E., Lanman, S., Selby, C. and Donaldson, K., 1991, The effects of N-acetylcysteine and glutathione on smoke-induced changes in lung phagocytes and epithelial cells, The Amerikan Journal of Medicine, 91, 60-66.

Markert, M., Andrews, P. C. and Babior, B. M., 1984, Measurement of  $O_2^-$  production by human Neutrophils, the preparation and assay of NADPH oxidase – containing particles from human neutrophils, Methods in Enzymology, 105, 358 – 365.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- McCord, J.M., 1993, Human disease, free radicals and the oxidant / antioksidant balance, J.M., Clin. Biochem, 26, 351-357.
- Mehmetçik, G., 1994, Hiperkolesterolemik kişilerde serum lipit peroksitleri ve antioksidan sistem, Doktora Tezi, İst., Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 56 s.
- Moldow, C. F., 1984, Endothelial culture, Jacobs, H. S., Neutrophil or enzyme generation of free radicals, In Vitro Methods for the Study of Endothelial Injury, 105, 378 – 386.
- Noda, Y., Mori, A. and Packer, L., 1997, Gliclazide scavenges hydroxyl, superoxide and nitric oxide radicals: an esr study, Molecular Pathology and Pharmacology, 96 (2), 115 – 124.
- O'Brien, P. J., 1984, Superoxide production, Methods in Enzymology, 105, 370 – 378.
- O'Brien, R. C. and Luo, M., 1997, The effects of gliclazide and other sulfonylureas on low-density lipoprotein oxidation in vitro, Metabolism, 46 (1), 22-25.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K., 1979, Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, Analytical Biochemistry, 95, 351-358.
- Onat, T. ve Emerk, K., 1997, Temel biyokimya, 2. Baskı, İstanbul.
- Özdamar, K., 1999, SPSS ile biyoistatistik, Kaan Kitabevi, Eskişehir.
- Özveri, E. S., Yüksel, M., Eren, F., Haklar, G., Yalçın, A. S., Aktan, A. Ö., 1999, Kolorektal ve meme kanserinde reaktif oksijen türleri ve nitrik oksidin önemi, Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği II. Ulusal Kongre Kitapçığı, 31. s.
- Paglia, D. and Valentine, W. N., 1967, Studies on the quantitative analysis of glutathion peroxidase, J. Lab. & Clin. Med., 70 (1), 158 – 159.
- Perk, C., Tanrısever, E., Kaval, A., Gültekin, Ö., Pekgöz, M., Gökırmak, T. N., Yüzbaşıoğlu, G. ve Paralı, S., 2000, Plazma Scalpel cihazının veteriner tümör cerrahisine adaptasyonu için yapılan deneysel çalışmalar, İst. Üniv., Veteriner Fak., Cerrahi Anabilim Dalı, 50 s.



### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- McCord, J.M., 1993, Human disease, free radicals and the oxidant / antioksidant balance, J.M., Clin. Biochem, 26, 351-357.
- Mehmetçik, G., 1994, Hiperkolesterolemik kişilerde serum lipit peroksitleri ve antioksidan sistem, Doktora Tezi, İst., Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 56 s.
- Moldow, C. F., 1984, Endothelial culture, Jacobs, H. S., Neutrophil or enzyme generation of free radicals, In Vitro Methods for the Study of Endothelial Injury, 105, 378 – 386.
- Noda, Y., Mori, A. and Packer, L., 1997, Gliclazide scavenges hydroxyl, superoxide and nitric oxide radicals: an esr study, Molecular Pathology and Pharmacology, 96 (2), 115 – 124.
- O'Brien, P. J., 1984, Superoxide production, Methods in Enzymology, 105, 370 – 378.
- O'Brien, R. C. and Luo, M., 1997, The effects of gliclazide and other sulfonylureas on low-density lipoprotein oxidation in vitro, Metabolism, 46 (1), 22-25.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K., 1979, Assay for lipid peroksidin animal tissues by thiobarbituric acid reaction, Analytical Biochemistry, 95, 351-358.
- Onat, T. ve Emerk, K., 1997, Temel biyokimya, 2. Baskı, İstanbul.
- Özdamar, K., 1999, SPSS ile biyoistatistik, Kaan Kitabevi, Eskişehir.
- Özveri, E. S., Yüksel, M., Eren, F., Haklar, G., Yalçın, A. S., Aktan, A. Ö., 1999, Kolorektal ve meme kanserinde reaktif oksijen türleri ve nitrik oksidin önemi, Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği II. Ulusal Kongre Kitapçığı, 31. s.
- Paglia, D. and Valentine, W. N., 1967, Studies on the quantitative anaf glutathion peroxidase, J. Lab. & Clin. Med., 70 (1), 158 – 159.
- Perk, C., Tanrısever, E., Kaval, A., Gültekin, Ö., Pekgöz, M., Gökırmak, T. N., Yüzbaşıoğlu, G. ve Paralı, S., 2000, Plazma Scalpel cihazının veteriner tümör cerrahisine adaptasyonu için yapılan deneysel çalışmalar, İst. Üniv., Veteriner Fak., Cerrahi Anabilim Dalı, 50 s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Perk, C. ve Gülanber, E., 2001, Anesteziyoloji ve reaminasyon ders notları, İst. Üniv., Vet. Fak. Teknik :Yayınları.
- Porter, N. A., 1984, Chemistry of lipid peroxidation, Methods in Enzymology, 105, 273 – 282.
- Randox Ürün Rpaoru, 1994, Randox Laboratories Ltd, United Kingtom, 1 – 16 p.
- Repine, J.E., 1991, Oxidant- antioxidant balance, some observations from studies of ischemia – reperfusion in isolated perfused rat hearts, AM. J. Of Med., 91 (3C), 45-53.
- Richard, B., Johnston, J. R., 1984, Measurement of  $O_2^-$  secreted by monocytes and macrophages, Methodsy in Enzymology, 105, 365 – 369.
- Slater, T. F., 1884, Over view of methods used for detecting lipid peroxidation, Method in Enzymology, 105, 283 – 293.
- Seçkin, S., 1988, Yaşlanma ve lipit peroksidasyonu arasındaki ilişkinin farelerin karaciğerinde incelenmesi, Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı, 37 s.
- Seven, A. ve Candan, G., 1995, Radikal ve lipid peroksid düzeyini arttıran etkenler, Biyokimya Dergisi, xx(4), 43-56.
- Seymen, H. O., Mengi. M. ve Özçelik, D., 1999, Demir yüklemesinin plazma bakır ve çinko düzeylerine etkisi, Cerrahpaşa Tıp Dergisi, 30(2), 155-158.
- Sies, H., 1991, Oxidative Stres, From basic research to clinical application, Am., J. Med, 91 (3C), 31-36.
- Southorn, P. A. and Powis, G., 1988, Free radicals, in Medicine I Chemical Nature and Biologic Reactions, Mayo Clin Proc., 63, 381-389.
- Sözmen, E. Y., Onat, T., Tanyalçın, T. ve Erlaçın, S., 1993, Eritrositer antioksidan enzimlerde yaşa bağlı değişiklikler, Biyokimya Dergisi, 3, 83-89.
- Sun, Y., Oberley, L. W. and Li, Y., 1988, A simple method for cilinical assay of superoxide dismutase, Clin. Chem., 24 (3), 497 – 500.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Sümer, E. Y. ve Onat, T., 1993, Eritrositer antioksidan enzimlerde yaşa bağlı değişiklikler, *Biyokimya Dergisi*, XVIII (3), 83-89.

Süperokside dismutase, 1997, Randox Cat No. / Kat. Nr. SD 125.

Şekeroğlu, R. ve Aslan, R., 1997, Sigara kullananlarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan Aktivite, *Tüberküloz ve Toraks*, 45(2), 105-109.

Şekeroğlu, R., Aslan, R., Tarakçıoğlu, M., Özbay, B., Köylü, H. ve Algün, E., 1997, Sigara, ferritin, oksidatif stres, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya ABD*, 5 s.

Şener, G., Güran, M., Satıroğlu, H. İ., Topaloğlu, Ü. ve Uysal, M., 1998, İntestinal iskemi reperfüzyon hasarında PGtz'nin etkileri, *Klinik Gelişim*, 11, 451 – 453 s.

Tanakol, R., 1998, Antioksidan vitaminler hastalıkta ve sağlıkta önemleri, *Klinik Gelişim*, 11, 347-357.

Tecder - Ünal, M., Demiryürek, A. T., Çakıcı, İ. ve Kızılcık, İ., 1998, Peroksinitritin anesteziye sıçanlarda aritmojenik etkisi, *Klinik Gelişim*, 11, 431-433.

Temiz, E., 2001, Dimetilsülfoksit ve metilprednizolonun deneysel karaciğer sıcak iskemisinde Koruyucu etkisinin değerlendirilmesinde elektron mikroskopi ve hepatobiliyer sintigrafisinin karşılaştırılması, *Uzmanlık Tezi, Trakya Üniv, Tıp Fak. Genel Cerrahi Anabilim Dalı*, 48 s.

Tuncer, M., Kılınç, K., Pehlivanoglu, B., Balkancı, D. ve Duman, O., 1998, Deneysel öz beyin iskemi - reperfüzyon hasarında melatoninin antioksidan etkisi, *Klinik Gelişim*, 11, 423 – 425.

Türkozan, N., Balabanlı, B., Ünlü, A., Yaman, H., Karabıçak, U., Erbatak, A. ve Kutluay, T., 1999, Peroksinitritin invivo şartlarda 3-nitrotirozin oluşumuna ve plazma antioksidanları üzerine etkisinin incelenmesi, *Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği II. Ulusal Kongre Kitapçığı*, 16 s.

Uysal, M., 1998, Serbest radikallerin lipid peroksidleri, organizmada prooksidan - antioksidan dengelyi etkileyen koşullar, *Klinik Gelişim*, 11, 336-341.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ünaldı, M., Akkuş, İ., Aköz, M., Gürbilek, M., Yöntem, M., ve Değer, O., 1992, İnsan nötrofil çözünebilir NADH oksidaz enziminin bazı özellikleri, S. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi, 8 (4), 579-582.
- Üzüm, A., 2000, Diyaliz hastalarında E vitamini tedavisinin anemi, lipid peroksidasyonu ve lipid profili üzerine etkileri, Uzmanlık Tezi, Trakya Üniv., Tıp Fak., İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Nefroloji Bilim Dalı, Edirne, 48 s.
- Willson, R., 1997, Free radicals, URL <http://www.brunel.ac.uk/~bcst.lwl/info.htm>
- Yalçın, A.S., 1998, Antioxidanlar, Klinik Gelişim, 342-346 s.
- Yaman, H., Ünlü, A., Karabıçak, U., Çimen, B., Balabanlı, B., Erbil, K. ve Türközkan, N., 1999, İn vivo ve invitro olarak plazmada peroksinitrit harabiyetinin 3-nitrotirozin ölçümüyle gösterilmesi, Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği II. Ulusal Kongre Kitapçığı, 15. s.
- Yazan, Y., 1999, Cilt yaşlanmasında serbest radikaller ve kozmetolojide antioksidanların kullanımı, Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği II. Ulusal Kongre Kitapçığı 26. s.
- Yelkenci, F., 1996, Stresin çeşitli dokularda glutatyon, glutatyonla ilgili enzimler ve lipid peroksidasyonu üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Ana Bilim Dalı, 44 s.
- Yenson, M., 1988, İnsan biyokimyası, Beta Yayınları, İst. 6. Baskı, 897 s.
- Yöntem, M., 1993, Orta derecede alkol alımının eritrosit metabolizması üzerine olan etkilerinin araştırılması, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, 75 s.
- Yörük, Y., Mehmet, R. ve Köse, S., 2000, Argon plazma skalpelin akciğer reaksiyonlarında kullanımı, hayvan modeli, Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı, AR – GE Proje No: TÜAF 197.
- Yu, B.P., 1994, Cellular defens against damage from, Physiological Reviews, 74 (1), 139-162.