

T.C.
FATİH ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

Doç. Dr. Doğan ÜNAL
ANABİLİM DALI BAŞKANI

ANTIÖKSİDANLARIN CEP TELEFONU İLE OLUŞTURULMUŞ TESTİKÜLER
APOPTOZİS VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ

Araş. Gör. Dr. Akif KOÇ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Doğan ÜNAL

Ankara – 2008

İÇİNDEKİLER

İçindekiler	ii
Kısaltmalar	v
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Cep telefonu teknolojisi	2
2.1.1 Tarihçe	2
2.1.2. Cep telefonu sistemlerinin çalışması	2
2.1.3. Elektromanyetik dalgalar	4
2.1.4. Radyasyon ve iyonlaşma	4
2.1.5. Elektromanyetik radyasyonun biyolojik etkileri ve SAR	5
2.2. Apoptozis	6
2.2.1. Terminoloji	6
2.2.2. Apoptozisin biyolojik süreçlerdeki rolü	6
2.2.3. Kaspazlar	7
2.2.4. Apoptozisin oluşumu	8
2.2.4.1. Ekstresek yolak	9
2.2.4.2. İntrensek yolak	10
2.2.4.3. Perforin/granzim yolağı	11
2.2.4.4. İnfaz yolağı	11
2.2.5. Apoptozis ve Nekroz	12
2.3. Oksidatif Stres	13
2.3.1. Serbest Radikaller	13
2.3.1.1. Reaktif Oksijen Türleri	15
A) Singlet Oksijen ($O_2^{\uparrow\downarrow}$)	16
B) Süperoksit Radikali (O_2^{\cdot})	16
C) Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	18
D) Hidroksil Radikali (HO^{\cdot})	18
E) Hipoklorik Asit (HOCl)	20
2.3.1.2. Reaktif Nitrojen Türleri (NO , NO^2 , NO^+ , NO^-)	20
2.3.1.3. Serbest Radikal Üretim Kaynakları	21
A) Endojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları	21
B) Ekzojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları	22

2.3.1.4. Serbest Radikallerin Vücuttaki Etkileri	23
A) Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri	23
a) Malondialdehit (MDA)	24
b) Glutasyon (GSH)	26
B) Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri	27
C) Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri	28
D) Serbest Radikallerin DNA' ya Etkileri	28
2.3.2. Antioksidan Savunma Sistemleri	28
2.3.2.1. Enzimatik Antioksidanlar	31
A) Süperoksit Dismutaz	31
B) Katalaz	31
C) Glutasyon Peroksidaz	31
D) Glutasyon-S-Transferazlar	32
E) Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz	32
2.3.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	33
A) Askorbik Asit (Vitamin C)	33
B) α -Tokoferol (Vitamin E)	33
C) Diğerleri	33
3. MATERYAL VE METOD	35
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	35
3.2. Deney Protokolü	35
3.3. Yöntemler	36
3.3.1. Testis dokularında SOD Tayini	36
3.3.1.1. Reaktifler	37
3.3.1.2. Ölçümün Yapılışı	37
3.3.1.3. Hesaplama	37
3.3.2. Testis dokularında Lowry yöntemi ile protein tayini	38
3.3.2.1. Reaktifler	38
3.3.2.2. Deneyin yapılışı	38
3.3.2.3. Hesaplama	38
3.3.3. Testis dokularında MDA Tayini	38
3.3.3.1. Reaktifler	38
3.3.3.2. Deneyin Yapılışı	38
3.3.4. Testis dokularında GSH-Px Tayini	39

3.3.4.1. Reaktifler	39
3.3.4.2. Homojenatın Hazırlanışı	39
3.3.4.3. GSH-Px Aktivitesinin Ölçümü	39
3.3.4.4. Deneyin Yapılışı	39
3.3.5. Testis dokularında katalaz Tayini	39
3.3.5.1. Reaktifler	39
3.3.5.2. Homojenatın Hazırlanışı	40
3.3.5.3. Deneyin Yapılışı	40
3.3.5.4. Hesaplama	40
3.3.6 Testis dokularındaki apoptotik hücrelerin tayini	40
3.4. İstatistiksel Analiz	41
4. BULGULAR	42
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ	53
ÖZET	54
SUMMARY	55
KAYNAKLAR	56
TEŞEKKÜR	58

KISALTMALAR

AI-1	Apoptotik indeks-1
AI-2	Apoptotik indeks-2
AIF	Apoptosis Inducing Factor
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
PBS	Phosphate-buffered saline
BSA	Bovine serum albumin
CAD	Caspase-Activated DNase
CAPE	Caffeic acid phenethyl ester
CAT	Katalaz
EMR	Electromagnetic radiation
EMF	Elektromanyetik alan
FADD	Fas-associated death domain
GSM	Mobil iletişim için küresel sistem
GSH	Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GST	Glutation S transferaz
HtrA2/Omi	High-temperature requirement
Hz	Hertz
ICAD	Inhibitor of CAD
LPO	Lipid peroksidasyonu
MAM	Hareketli Anahtarlama Merkezi
MDA	Malondialdehit
METS	Mitokondrial elektron transport sistemi
MHz	Megahertz
NBT	Nitrotetrazolium Blue
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitlerinin
RF	Radyo Frekans
ROS	Reaktif oksijen türleri
RNS	Reaktif nitrojen türleri
SAR	Specific Absorption Rate
Sit C	Sitokrom C
SOD	Süperoksid dismutaz

TBA

Tiyobarbitürik asit

TNF

Tümör nekroz faktör

Vit

Vitamin

XOD

Ksantin oksidaz

1. GİRİŞ

Son dönem teknolojilerinin günlük yaşamdaki etkileri belki de en çok mobil iletişimde hissedilmektedir. Nitekim GSM (Mobil iletişim için küresel sistem) Birliği web sayfası verilerine göre şu andaki cep telefonu kullanıcı sayısı 3.2 milyarı geçmiş durumdadır (1). Bununla birlikte Cep telefonu örneğinde olduğu gibi yeni teknolojiler, hayatı kolaylaştırırken diğer yandan bir takım sağlık sorunlarına da yol açabilmektedirler.

Günümüzde kullanılan birçok elektronik cihaz bir takım elektromanyetik dalgalar üretmekte ve böylece elektromanyetik alanlar oluşturmaktadır Dolayısıyla elektronik sistemlerin yoğunluğu dikkate alınırca günlük hayat aslında bu manyetik alanlar içinde sürdürülmektedir. Yoğun bir şekilde maruz kalınan bu elektromanyetik dalgalar ve bununla ilgili olarak cep telefonlarının biyolojik etkileri son zamanlarda bilimsel çalışmalara konu olmaya başlamıştır.

Nitekim standart cep telefonlarının elektromanyetik radyasyon ürettikleri ve bu nedenle vücutta çeşitli doku hücrelerinde oksidatif stresi ve apoptozisi arttırdıkları yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (2). Fakat elektromanyetik dalgaların testis üzerine olan etkilerini araştıran çalışmalar bulunmakla birlikte direk olarak cep telefonunun arama veya stand-by konumundayken testis dokusunda apoptozis veya oksidatif stres oluşturup oluşturmadığını araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (3, 4). Ayrıca birer antioksidan olan Vitamin E (Vit E) ve Vitamin C (Vit C)' nin bu etkileri ile oksidatif stres ve dolayısıyla apoptotik etkileri azalttıkları bilinmektedir (2). Dolayısıyla bilgilerimize göre ilk olarak bu çalışmada standart arama veya stand-by modundayken cep telefonlarının ürettikleri elektromanyetik dalgaların testis dokusunda apoptozisi arttırıp arttırmadığı, oksidatif stres oluşturup oluşturmadığı ve birer antioksidan olan Vit C ve Vit E' nin bu olası apoptozis ve oksidasyonu düzeltip düzeltmediği araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Cep telefonu teknolojisi

2.1.1 Tarihçe

Telefon, ilk olarak 1876'da Alexander Graham Bell tarafından keşfedilmiştir. 1973 yılında Motorola firmasında çalışan Martin Cooper ilk elde taşınabilir telefonu tasarlamış ve 3 Nisan 1973' te ilk olarak yine bu telefonla Bell laboratuvarlarının Araştırma bölümünün şefi ve aynı zamanda rakibi olan Joel Engel ile görüşmüştür. 10 yıl sonra Motorola firması tarafından bu ürün piyasaya uyarlanarak Motorola DynaTAC 8000X adıyla satışa sunulmuştur (5). Takip eden 7 yıl içinde ABD' de elde taşınabilir telefon kullanıcı sayısı 1,000,000' u aşmıştır (6).

2.1.2. Cep telefonu sistemlerinin çalışması

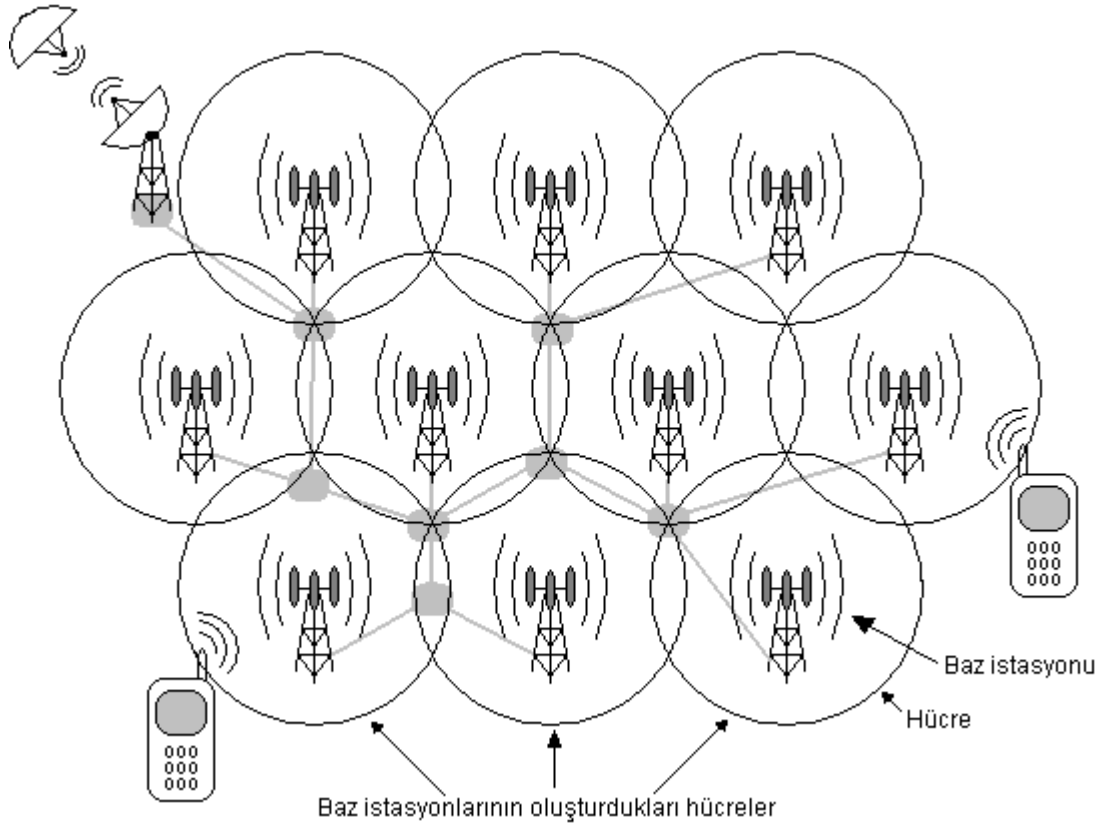
Cep telefonu, basitçe bir radyo vericisi ve alıcısının birlikte tek bir elektronik cihaz üzerinde birleştirilmiş şekli olarak düşünülebilir. Cep telefonu yer istasyonu ile elektromanyetik dalgalar üreterek bağlantı kurmaktadır.

İki cep telefonu yan yana dursalar dahi birbirleriyle doğrudan iletişim kuramazlar. Aradaki iletişim genellikle yüksek yerlere (ev çatıları, direkler, vb.) yerleştirilmiş olan ve hücrel haberleşme sistemlerinde merkezi istasyonlar olarak görev yapan "baz istasyonları" aracılığı ile yapılmaktadır (7, 8). Baz istasyonları olmadan cep telefonları iletişim sağlayamazlar. İletişim hizmeti verilecek alanı kapsayan baz istasyonları, bal peteğine benzetilebilecek ağ yapısındaki birçok hücrenin merkezlerine yerleştirilmiş alıcı-verici antenli sistemlerden oluşmaktadır. Haberleşmenin yapılacağı alan "hücre" denilen küçük alanlara bölünmüştür. Her hücrenin merkezinde bir baz istasyonu bulunur ve bu hücreler birleşerek bir iletişim ağı oluştururlar. Herhangi bir cep telefonundan gelen çağrı isteğinin ilgili kullanıcıya ulaştırılması bu ağ yapısı tarafından gerçekleştirilir. Baz istasyonları, Hareketli Anahtarlama Merkezleriyle (MAM) ve MAM' lar birbiriyle ya kablo ya da yönlü radyolinklerle bağlıdır (Şekil 1). Cep telefonları ile baz istasyonları arasındaki iletişim, elektromanyetik dalgalar yoluyla gerçekleştirilmektedir. Hücrel yapı sayesinde aynı anda daha çok kullanıcı haberleşebilir. Baz istasyonlarının sebep olduğu toplam elektromanyetik enerji sabit bir değerde değildir; kullanıcı yoğunluğuna göre değişir (8). Baz istasyonu konuşmayı sabit bir kablo üzerinden ya da yönlendirilmiş elektromanyetik dalga demeti halinde (yönlü radyolinklerde) MAM' lara ulaştırır. Konuşma oradan, "Cep telefon sistem sunucusunun" ana bilgisayarına iletilir. Bu bilgisayar, tüm cep telefonları, nerede olduklarını bildiğinden, konuşmayı alıcı cep

telefonunun bulunduğu en yakın baz istasyonuna yollar. Bu şekilde alıcının cep telefonuna ulaşır. İletişim bu yolla sağlanmış olur (7).

Mobil telefon, arama sırasında en yüksek çıkış gücü ile baz istasyonuna ulaşmaya çalışır. Baz istasyonu ile bağlantı kurulduktan sonra çıkış gücü haberleşme sağlanabilecek en ekonomik seviyeye düşer. GSM sistemlerinde mobil telefonlar ve baz istasyonu arasında karşılıklı iletişim olması gerekir. Bundan dolayı baz istasyonu ve mobil telefon arasındaki uzaklık arttıkça, iletişimin sağlanabilmesi için hem kulanın hem de mobil telefonların çıkış güçlerinin artırılması gerekir. İletişimin hücreli yapı kullanılmadan şehir dışına kurulan bir kule ile sağlanacağı bir yapıda, kuleye yakın mesafelerde ve kuleye uzak olan mobil telefonlarda çok yüksek elektromanyetik alan seviyeleri oluşur. Mobil telefonlar için 900 MHz' de en yüksek çıkış gücü 2 W, 1800 MHz' de 1 W' ır.

Cep telefonundan yayılan mikro dalga ışınları 400-1780 megahertz (MHz) frekans aralığında daha iyi çalışır. Türkiye' de kullanılan hücreli haberleşme sistemleri GSM900 ve DCS1800' dür. GSM900' ün çalışma frekans bandı 880-960 MHz, DCS1800' ün frekans bandı ise 1710-1880 MHz' dir (8).



Şekil 1. Baz istasyonları hücreli ağ yapısı ve cep telefonu ile etkileşim

2.1.3. Elektromanyetik dalgalar

Elektromanyetik dalgalar, birçok doğal ve insan yapımı kaynaklar tarafından yayılabilmektedir. Radyo Frekans (RF) bölgesinde yer alan elektromanyetik dalgalar iletişimde, radyo ve televizyon yayınlarında kullanılmaktadır. Teknolojideki gelişmelerin bir sonucu olarak elektromanyetik dalgaların kullanımı her geçen gün artmakta ve bundan dolayı elektromanyetik dalgalara olan maruziyet artmaktadır.

Frekans, elektromanyetik dalgaların saniyede yaptığı salınım sayısı yani elektromanyetik dalgaların tekrarlama sıklığıdır ve birimi Hertz (Hz)' dir (8). 1 Hz saniyede bir salınım; 1 kilohertz (kHz) saniyede 10^3 Hz; 1 MHz saniyede 10^6 Hz; 1 gigahertz (GHz) saniyede bir milyar Hz ya da 10^9 Hz' dir. Elektromanyetik dalgaların bir salınımda aldıkları yola dalga boyu denir. Dalga boyunun birimi mesafe birimleridir.

Elektromanyetik dalgalar binaların içine girebilirler. Bütün cisimler elektriksel iletkenliklerine bağlı olarak elektromanyetik dalgaları yansıtma ya da geçirme özelliğine sahiptir. Elektromanyetik dalgalar, bina duvarından geçerken havada yayılmalarına göre enerjilerinin daha büyük bir kısmını kaybederek zayıflayarak ilerlerler.

Bir noktadaki elektromanyetik enerji miktarı, kaynağından olan uzaklığa, kaynağın etkin çıkış gücüne ve yayılım ortamına bağlıdır.

2.1.4. Radyasyon ve iyonlaşma

Radyasyon (ışınım) genel anlamda enerjinin uzayda dalgalar ya da tanecikler (fotonlar) halinde yayılmasıdır. Isı, ışık ve radyo dalgaları günlük yaşamdan bildiğimiz ışıma yoluyla yayılma örnekleridir.

İyonlaşma, atomlardan ve moleküllerden elektron koparılmasıdır. Enerji yüklü fotonlardan oluşan elektromanyetik dalgalar, çarptıkları cisimlerden elektron kopararak onların iyonlaşmalarına yol açabilirler. Yüksek frekanslı ve dolayısıyla yüksek enerjili olan x-ışınları ve gama ışınları iyonlaştırıcı radyasyonlardır. Daha düşük frekanslı yani düşük enerjili elektromanyetik dalgalar (RF gibi) ise iyonlaştırıcı olmayan radyasyon olarak adlandırılırlar. Mobil iletişim sistemlerinin neden oldukları ışıma, iyonlaştırıcı olmayan radyasyon bölgesi içinde yer almaktadır (8). İyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyon bölgelerinin frekanslara göre dağılımı, kaynakları ve bunların vücutta bilinen etkileri Tablo 1' de gösterilmiştir.

Tablo 1. Elektromanyetik spektrum. İyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyon bölgelerinin frekanslara göre dağılımı, kaynakları ve bunların vücutta bilinen etkileri (9).

İYONİZE OLMAYAN RADYASYON					İYONİZE RADYASYON					
RADYO FREKANSLARI VE MİKRODALGALAR					Kızıl Ötesi	Mor Ötesi	X-GAMA IŞINLARI			
Frekans Aralıkları	Çok Çok Düşük Frekanslar	Düşük Frekanslar	Radyo Frekansları	Mikro Dalgalar			Yumuşak X ışınları	Sert X ışınları	Gama ışınları	
Tipik Uygulamalar (Kaynaklar)	Taşıma, Dağıtma, İç tesisat, Endüstride kullanılan cihazlar	Denizcilik Haberleşme Cihazları	Haberleşme Cihazları	Haberleşme Cihazları, Radar, Fırın	Flüoresan Lambalar	Görünür Işık	Flüoresan Lambalar	Medikal	Nükleer	Patlama
Bilinen Etkiler	Kan hastalıkları, Lösemi, Kanseri, Hücre büyümesi, Embriyo etkileri	Merkezi Sinir Sistemi Etkileri, İmmün sistem etkileri, Hücre zarı etkileri	Katarakt, Doğumsal zararlar, Merkezi sinir sistemi	Katarakt, Düşük, Doğumsal zararlar, Genetik hasar	Katarakt	Göz yorulması ve Göz gerilmesi	Deri kanseri, Katarakt	Kanser, Genetik hasar, Erken doğum		

2.1.5. Elektromanyetik radyasyonun biyolojik etkileri ve SAR

Özgül Soğurma Hızı SAR (Specific Absorption Rate), elektromanyetik enerjinin vücut dokuları tarafından soğurulma hızıdır. Birimi W/kg' dır. Bugüne dek yapılan araştırmalar insan vücudunun bir derecelik sıcaklık artışını düzenleyemediğini ve bir takım sorunlara neden olabildiğini göstermektedir. İnsan vücudunda bir derece sıcaklık artışı için bir kilogram doku başına 4 W güç soğurulması gerekmektedir. İnsanların genel yaşam alanlarında bu değerın 50' de biri olan 0.08 W/kg SAR sınır değeri olarak kabul edilmiştir.

Özgül soğurma hızının doğrudan ölçülmesi hemen hemen olanaksızdır. Bundan dolayı, sınır değerlerin belirlenmesinde kolay ölçülebilen ve/veya gözlemlenebilen parametreler kullanılmaktadır. Bu parametreler, elektrik alan şiddeti, manyetik alan şiddeti ve güç yoğunluğudur.

RF elektromanyetik dalgalarının foton enerjileri, atomları ve molekülleri iyonlaştıracak düzeyde değildir. Elektromanyetik radyasyonun göreceli olarak düşük frekanslı biçimleri olan görünen ışık, kızılötesi radyasyon ve RF dalgalar iyonlaştırıcı olmayan radyasyona örnektir. İyonlaştırıcı olmayan elektromanyetik dalgaların etkisinde kalma sonucunda canlılarda iki tür etki oluşabilir: Isıl etkiler ve ısıl olmayan etkiler.

Isıl etkiler, vücut tarafından soğurulan elektromanyetik enerjinin ısıya dönüşmesi ve vücut sıcaklığını arttırması olarak tanımlanır. Sıcaklık artışı, ısının kan dolaşımı ile atılarak dengelenmesine dek sürer. Cep telefonları gibi RF dalga kaynaklarının sebep olabileceği sıcaklık artışı gerçekte çok düşüktür ve büyük olasılıkla vücudun normal mekanizmaları ile kolayca etkisizleştirilebilir. Elektromanyetik radyasyonun ısıtma yönünden insan vücudunda en etkili olduğu bölgeler başka bölgelerden farklı olarak fazla ısıyı dağıtacak

kan akışı olmamasından dolayı gözler ve testislerdir. Ancak mobil telefon ve baz istasyonları antenleri tarafından yayılan güç, bu tür bir ısınmaya neden olmayacak denli düşüktür.

Isıl olmayan etkilere bağlı olarak RF dalgaların etkili olduğu iddia edilen bozukluk ve hastalıklar arasında beyin aktivitelerinde değişiklikler, uyku bozuklukları, dikkat bozuklukları, baş ağrıları bulunmaktadır.

Yüksek enerjili iyonlaştırıcı elektromanyetik dalgalar, DNA ve genetik malzemeyi kapsayan biyolojik dokuda hasara yol açabilen moleküler değişikliklere yol açabilirler (8).

2.2. Apoptozis

2.2.1. Terminoloji

Apoptozis Yunanca kökenli bir kelime olup, apo (ayrı) ve ptozis (düşen) kelimelerinin birleşmesinden oluşmuştur. “Son baharda yaprak dökümü” anlamına gelmektedir (13, 14). Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. adlı araştırmacılar tarafından kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (10). Literatürde “programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı” apoptozisle eş anlamlı olarak kullanılmıştır (10, 12).

2.2.2. Apoptozisin biyolojik süreçlerdeki rolü

Apoptozis birçok biyolojik süreçte etkin rol oynamaktadır. Dokuların gelişmesi, yaşlanması ve kanama kontrolünün sağlanmasında olduğu gibi, normal dokulardaki hücre topluluklarının korunması sürecinde de meydana gelmektedir (11). Deri, barsak epitel, kan hücreleri gibi hücre yenilenmesinin hızlı olduğu dokularda yaşlanan hücreler apoptozisle ortadan kaldırılırlar. Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde; fetusun implantasyonundan organogenezise kadar tüm gelişim sürecinde apoptozis rol alır. Embriyolojik süreçte; parmak aralarındaki zarın, sinir sisteminde istenmeyen nöronların ortadan kaldırılmasında apoptozis rol oynar. Erişkinde hormona bağlı involüsyonda; örneğin, menstrüel siklusta endometriyal hücre yıkımı, menapozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin küçülmesinde apoptozis görülür. Bağışıklık sistemi hücrelerinin seçiminde de apoptozis önemli rol oynamaktadır. Apoptozisin en klasik örneği sayılan yenidoğan timusunun involüsyonu sonucunda T lenfositlerin yaklaşık % 98’i seleksiyona uğramaktadır. B hücrelerinde ise apoptozisin baskılandığı belirtilmektedir. Bunun fizyolojik önemi, B lenfositlerinin duyarlı olduğu uyarılarla yeniden karşılaşması durumunda hazır bulunmasını sağlamaktır (14). Ayrıca zararlı ajanların veya hastalıkların yaptığı hücre hasarlarına veya immun reaksiyonlara yanıtta da rol almaktadır (15).

Apoptozisin bir dokuda uygunsuz bir şekilde az veya yetersiz meydana gelmesiyle birçok nörodejeneratif hastalık, iskemik hasar, otoimmün hastalık ve kanser tipi meydana gelebilmektedir (Tablo 2) (11).

Tablo 2. Hastalıklarda apoptozisin rolü (14)

Apoptozisin artmasıyla ilgili hastalıklar	Apoptozisin azalmasıyla ilgili hastalıklar
1.Nörodejenaratif bozukluklar Alzheimer hastalığı Amiyotrofik lateral skleroz Creutzfeld-Jakob hastalığı Huntington hastalığı Parkinson hastalığı <i>Retinitis pigmentosa</i> Spinal muskular atrofi	1.Kanser Blastom Karsinom Lösemi Lenfoma Malign gliom Sarkom Seminom
2.Hematolojik bozukluklar Aplastik anemi Fanconi anemisi Hodgkin hastalığı Myelodisplastik sendromlar <i>Polycythemia vera</i>	2.Premalign hastalıklar <i>Ataxia telangiectasia</i> Paroksimal nocturnal hemoglobinüri Myelodisplastik sendromlar <i>Xeroderma pigmentosum</i>
3.Otoimmün bozukluklar Fulminant hepatit Graft-versus-host hastalığı Hashimoto tiroiditis İnsüline bağımlı diyabet Multipli skleroz Romatoid artrit Skleroderma Sjögren sendromu	3.Otoimmün bozukluklar Otoimmün lemfoproliferatif sendrom (tip I ve II) Sistemik lupus erythematosus
4.İskemik yaralanma İskemi ve reperfüzyon Böbrek enfarktüsü Miyokardial enfarktüs İnme	4.Ateroskleroz 5.Metabolik bozukluklar Niemann-Pick hastalığı Osteoporozis Wilson hastalığı
5.Toksinlere bağlı hastalıklar Alkole bağlı hepatit Pulmonar fibrozis Sepsis	6.Viral enfeksiyonlar <i>Adenoviruses</i> <i>Baculoviruses</i> <i>Epstein-Barr Virus</i> <i>Herpesviruses</i> <i>Poxviruses</i>
6.Bakteriyel ve viral enfeksiyon Kazanılmış immün yetersizlik sendromu (AIDS) Ebola virüsü <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i>	Prematür ve fizyolojik yaşlanmada apoptozis Down sendromu Erken yaşlanma (<i>Progeria</i>) <i>Xeroderma pigmentosum</i>
7.Diğerleri Travmatik spinal kord yaralanması Tümör karşı-atağı (immün ayrıcalık)	

2.2.3. Kaspazlar

Kaspazlar, sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağımlıdır. Hücrede inaktif (zimojen) olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktive ederler. Böylece bir kaskad şeklinde işlerler. Apoptoziste hücreyi parçalayan yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan etkenler “effectors” olarak bilinirler.

Kaspazlar; Kaspaz-1 (ICE), Kaspaz-2 (ICH-1, Nedd-2), Kaspaz-3 (CPP32, Apopain, Yama), Kaspaz-4 (ICH-2, TX, ICER_{II}), Kaspaz-5 (ICER_I, TY), Kaspaz-6 (Mch2), Kaspaz-7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1), Kaspaz-8 (FLICE, Mch5, MACH), Kaspaz-9

(Mch6, ICE-LAP6), Kaspaz-10 (Mch4), Kaspaz-11 (ICH-3), Kaspaz-12, Kaspaz-13 (ERICE), Kaspaz-14 (MICE) şeklinde sınıflandırılmaktadır.

İnaktif (zimojen) formdaki kaspazlar kırılarak aktifleşirler ve dimerize olurlar. Kaspaz aktivasyonu (dimerizasyonu) ya hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ya da kaspaz-9 bağlayıcı protein olan Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1)' in oligomerize olmak üzere indüklenmesi ile gerçekleşir.

Apaf-1' in indüksiyonu ise Sitokrom c (Sit C)' nin mitokondriden salıverilmesi ile gerçekleşir. Apaf-1' in oligomerizasyonu kaspaz-9 monomerlerinin bir araya getirilmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9, kaspaz-3' ü aktifleştirir.

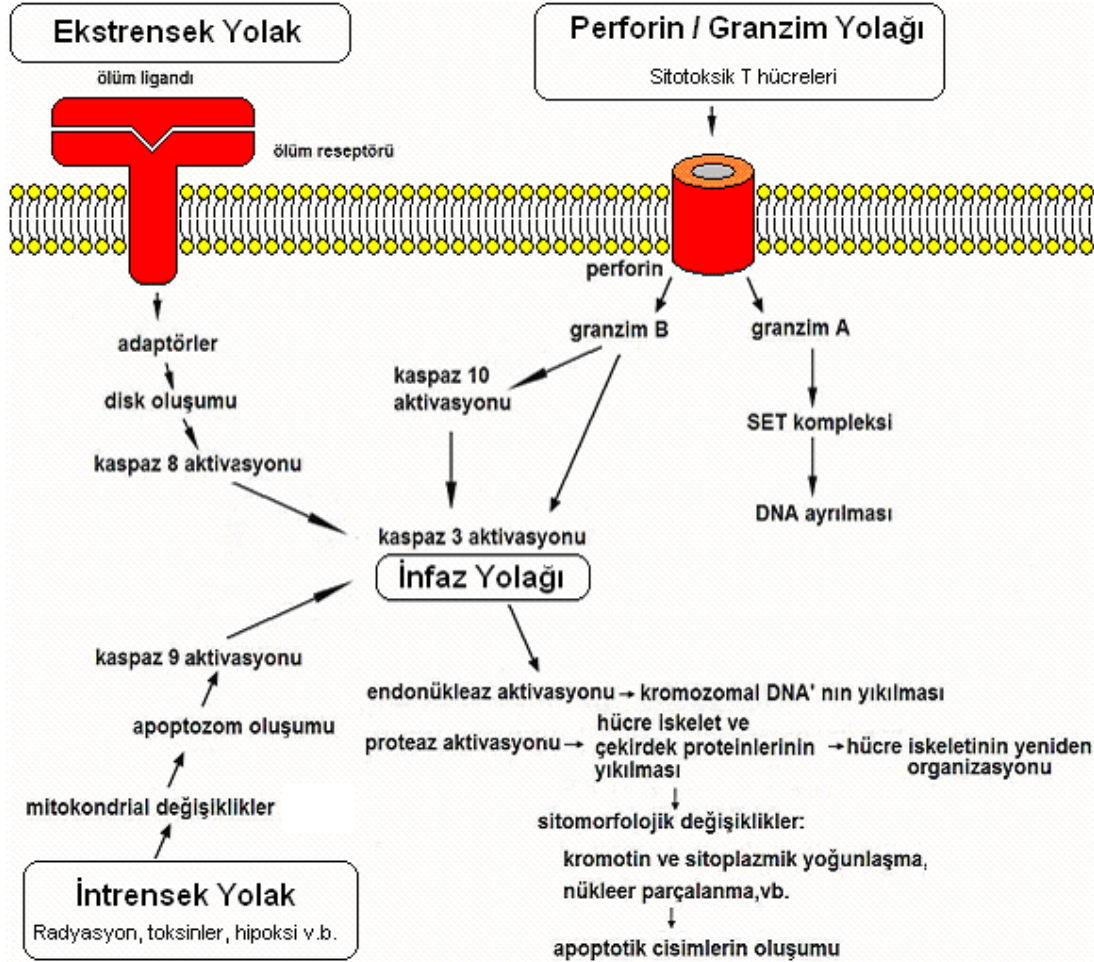
Mitokondriden ayrıca AIF (apoptozis indükleyici faktör)' ler salıverilir. Bunlar henüz bilinmeyen bazı nükleazları aktifleştirerek DNA degradasyonuna yol açarlar ama bunların nükleusda yol açtığı morfoloji değişikliği apoptoziste tipik olarak görülen tipte değildir. Daha ziyade, net olarak seçilebilen sınırlardan ziyade düzensiz sınırlı ve periferik yerleşimli dağınık nükleus parçaları şeklindedir. Her dokunun eksprese ettiği kaspaz tipi farklı olabilir. Bu durumda farklı dokular için farklı kaspazların aktivasyonu yoluyla apoptozisin gerçekleştiği düşünülebilir. Örneğin, periferik T hücreleri ultraviyole ile indüklenmiş apoptozise gitmek için ne kaspaz-3' e ne de kaspaz-9' a gereksinim duyarlar. Oysa embriyonik stem hücreler bu durumda her iki kaspaza da gereksinim duyarlar. (12).

2.2.4. Apoptozisin oluşumu

Birçok fizyolojik ve patolojik durum veya faktör apoptozise neden olabilir. Fakat her hücre aynı faktöre aynı şekilde yani apoptozisle cevap vermez (11). Apoptozisi etkileyen faktörler kabaca büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, TNF (tümör nekroz faktör), Transforming Growth Factor β , Fas/FasL sisteminin aktive olması, DNA hasarı nedeniyle bir tümör supresör gen olan p53' ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar ve glukokortikoidler şeklinde sıralanabilir. Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler de hafif dozlarda apoptozis meydana getirebilirler (14).

Şimdiye kadar yapılan araştırmalarda, apoptozise iki ana yolağın neden olduğu gösterilmiştir. 1) *Ekstresek veya ölüm reseptör yolak*, 2) *İntrensek veya mitokondriyal yolak*. Bununla birlikte bu iki yolun birleştiği ve birbirlerini etkileyebildiklerine dair kanıtlar vardır. T hücre aracılı sitotoksiteyi ve perforin-granzim bağımlı hücre ölümünü içeren ek bir yolak da mevcuttur. *Perforin/Granzim yolağı* apoptozisi hem Granzim A hem de Granzim B vasıtasıyla indükleyebilir. Ekstresek, intrensek ve Granzim B yolakları aynı son noktada yani *infaz yolağı*nda birleşirler. Bu yolak kaspaz-3 ayrımıyla başlatılır ve

DNA parçalanması, hücre iskeletinin ve çekirdek proteinlerinin yıkılması, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimlerin oluşması, fagositik hücre reseptörleri için ligandların ekspresyonu ve son olarak da hücrenin fagositik hücreler tarafından fagositozu ile sonuçlanır. Granzim A paralel bir kaspaz-bağımsız yolağını aktive eder (Şekil 2).



Şekil 2. Apoptoziste yollar.

2.2.4.1. Ekstresek yolak

Ekstresek yolak apoptozisi transmembran reseptör-aracılı etkileşimler ile başlatır. Bu reseptörler TNF reseptör gen ailesinin üyeleri olan “ölüm reseptörlerini” içerir. Bu reseptörlerin hücre dışında sistinden zengin bağlanma bölgeleri (domain), sitoplazmik tarafta ise 80 aminoasitten oluşan “ölüm bağlantı bölgesi” (death domain) adı verilen bağlama bölgeleri vardır. Bu ölüm bağlantı bölgesi ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içine aktarımında kritik rol oynar (11). Güncel olarak en iyi tanımlanmış ölüm reseptörleri; DR1 (TNFR1, CD120a, p55, p60), DR2 (Fas, CD95, APO-1), DR3 (APO-3, LARD, TRAMP, WSL1), DR4 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1

(TRAILR1), APO-2), DR5 (TRAILR2, KILLER, TRICK2), DR6, Ectodysplasin A reseptör (EDAR), Nerve growth faktör reseptör (NGFR)' dür (16).

Art arda gelişen olaylar zinciri en iyi FasL/FasR ve TNF- α /TNFR1 modelleri ile tanımlanmıştır. Fas ligandının Fas reseptörüne bağlanması sonucunda FADD (Fas-associated death domain), TNF ligandının TNF reseptörüne bağlanması sonucunda TRADD sitoplazmik adaptör proteinleri bağlanır. Takiben FADD ölüm efektör bağlantı bölgesinin dimerizasyonu sonucunda prokaspaz-8 ile birleşir. Bu noktada prokaspaz-8' in oto-katalitik aktivasyonu ile sonuçlanan, bir ölüm başlatıcı sinyal kompleksi (death-inducing signaling complex (DISC)) oluşur.

Kaspaz-8 aktive edilince apoptozisin infaz fazı tetiklenir. Ölüm reseptör aracılıklı apoptozis, FADD ve kaspaz-8' e bağlanarak onları inaktif hale getiren c-FLIP (FLICE-inhibitory protein) adında bir protein ile inhibe edilebilir (11). Apoptozisi regüle eden bir başka potansiyel nokta Toso adında bir proteini içerir. Bu proteinin T hücrelerinde kaspaz-8 sürecini inhibe ederek Fas-başlatıcı apoptozisi bloke ettiği gösterilmiştir (17).

2.2.4.2. İntrensek yolak

İntrensek yolak doğrudan hücre içi hedeflere etki eden reseptörden bağımsız uyarının farklı bir düzenini içerir ve mitokondriyal başlangıçlı olaylardır. Hücre içindeki pozitif veya negatif bir sinyal, intrensek yolağı başlatabilir. Negatif sinyaller büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve hormonların eksikliğini içerir. Pozitif sinyaller ise radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve serbest radikallerdir.

Tüm bu uyarılar iç mitokondri membranının geçirgenliğinde bir değişime, mitokondriyal transmembran potansiyel kaybına ve iki ana grup olan pro-apoptotik proteinlerin intermembran boşluktan sitozole salınmalarına neden olur. İlk grupta Sit C, Smac/DIABLO (Second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI), serin proteaz HtrA2/Omi (High-temperature requirement) bulunur. Bu proteinler kaspaz aracılıklı mitokondriyal yolağını aktive ederler. Sit C, prokaspaz-9' a ve Apaf-1' e bağlanır ve onları aktive eder, böylece bir "apoptozom" oluşur (11). Smac/DIABLO ve HtrA2/Omi' nin IAP (inhibitors of apoptosis proteins) aktivitesini inhibe ederek apoptozisi ilerlettiği rapor edilmiştir (18, 19).

Pro-apoptotik proteinlerin ikinci grubu olan AIF, endonükleaz G ve CAD (Caspase-Activated DNase) apoptozis süresince mitokondriden salınır, fakat bu hücre ölüme teslim olduktan sonra gerçekleşen geç bir olaydır. AIF DNA' nın parçalara ayrılmasına ve periferal nükleer kromatinin yoğunlaşmasına neden olur. Endonükleaz G nükleer kromatini ayırarak oligonükleozomal DNA parçaları üretir. CAD sonradan mitokondriden salınır ve

oligonükleozomal DNA parçalanmasına, daha fazla güçlü ve ilerlemiş kromatin yoğunlaşmasına neden olur.

Bu apoptotik mitokondriyal olayların düzenlenmesi ve kontrolü Bcl-2 ailesi proteinleri üyeleri vasıtasıyla oluşur. Tümör baskılayıcı protein p53, Bcl-2 ailesi proteinlerinin düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir. Bcl-2 proteinleri ailesi mitokondriyal membran geçirgenliği yönetir ve hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik olabilirler. Bcl-2 ailesinin ana hareket mekanizmasının mitokondriyal zar geçirgenliğinin değiştirilerek Sit C' nin mitokondriden salınması olduğu düşünülmektedir (11). Bu proteinlerinin mitokondri membranını hedeflemesinin, apoptotik hücrede mitokondrinin fonksiyonların kontrol açısından önemli bir rol oynadığı düşünülmektedirler ve hücrenin apoptozise mi gideceğini yoksa sürecin bozulacağını mı belirlediklerinden özel öneme sahiptirler (11, 20). Apoptoziste önemli diğer organellere örnek olarak lizozomlar ve endoskopik retikulum verilebilir (21).

2.2.4.3. Perforin/granzim yolağı

Sitotoksik T lenfositler hedef hücrelerini ekstrensek yolak ve transmembran delik açan perforin adında bir molekülü sekrete edip sonradan salgılanan sitoplazmik granüllerin bu deliklerden hücre içine geçişini içeren bir bilinmeyen yolak vasıtasıyla öldürebilirler. Serin proteazlar olan granzim A ve granzim B bu granüllerdeki en önemli bilşenlerdir (Şekil 2).

Granzim B, proteinleri aspartat kalıntılarına ayırır, prokaspaz-10' u aktive eder ve ICAD (Inhibitor of Caspase Activated DNase) gibi faktörleri ayırabilir. Bid' in özgün bölünmesi ve Sit C' nin salınmasıyla ölüm sinyalinin gücünü arttırmak için mitokondriyal yolağı da kullanabilir ve ayrıca direkt olarak kaspaz-3' ü aktive de edebilir.

Granzim A da sitotoksik T hücre ile başlatılmış apoptoziste önemlidir ve kaspaz bağımsız yolağını aktive eder. Granzim A hücre içindeyken DNase NM23-H1 vasıtasıyla DNA kodlarını aktive eder ve bir tümör baskılayıcı gen üretir. Bu DNase tümör hücre apoptozisini uyarma yoluyla kanseri engellemede immun denetleme yönünden önemli bir role sahiptir. Nükleozom toplayıcı protein (The nucleosome assembly protein) SET normalde NM23-H1 genini inhibe eder. Granzim A proteaz, SET kompleksini ayırır, böylece NM23-H1' in inhibisyonu kalkar, apoptotik DNA' nın yıkımı gerçekleşir (11).

2.2.4.4. İnfaz yolağı

Ekstrensek ve intrinsek yollarının ikisi de apoptozisin son yolağı olarak düşünülen infaz (execution) fazında sonlanırlar. Bu fazı başlatan infaz kaspazlarının aktivasyonudur. İnfaz kaspazları nükleer materyali parçalayan, sitoplazmik endonükleazı, nükleer ve

sitoplazmik hücre iskelet proteinlerini parçalayan proteazları aktive ederler. Kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7 efektör veya “infazcı” kaspazlar olarak iş görürler. Hücre içindeki birçok substratları ayırır ve sonunda hücrede apoptozise ait morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere neden olurlar.

Kaspaz-3’ ün en önemli infaz kaspazı olduğu ve herhangi bir başlatıcı kaspazla (kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-10) aktive olduğu düşünülmektedir. Kaspaz-3 özellikle endonükleaz CAD’ ı aktive eder. Takiben CAD çekirdekdeki kromozomal DNA’ yı parçalar ve kromatin yoğunlaşmasına neden olur. Kaspaz-3 ayrıca hücre iskeletinin tekrar düzenlenmesini ve hücrenin apoptotik cisimcikler içinde parçalanmasını uyarır.

Apoptotik hücrelerin fagositozu apoptozisin son bileşenidir ve bu hücrelerin yüzeyinde fosfolipid asimetrisi ve fosfatidilserinin dış yüzeye çıkması ve onların parçaları bu fazın ayırıcı özelliğidir. Hücrelerin dış yüzeylerinde fosfatidilserinin ortaya çıkışıyla noninflamatuvar fagositik tanıma kolaylaşır ve hücreler erkenden ortadan kaldırılırlar. İnflamatuvar olmayan cevaptan esas olarak bu sürecin erken, etkili gerçekleşmesi ve hücrenel bileşenlerin salınmaması sorumludur.

2.2.5. Apoptosis ve Nekroz

Apoptosis, nekrozdan oldukça farklı bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Nekroz, kontrolsüz ve pasif bir süreçtir ve genelde geniş alanları, hücreleri etkiler. Aksine apoptosis kontrollü, enerji bağımlı bir süreçtir ve tek bir hücreyi veya bir grup hücreyi tutabilir.

Nekrotik hücre hasarı esasen iki ana mekanizma ile gerçekleşir; 1) Hücreye enerji desteğinin kesilmesi ve 2) Direkt hücre zararının hasarlanması (11). Nekroz fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen apoptosis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir (12).

Apoptosis morfolojik ve mekanizma yönünden nekrozdan özgündür. Nekrozda hücre içine aşırı sıvı girmesi ile hücre şişerken, apoptotik hücre tam tersine küçülür. Nekrozda kromatin paterni hemen hemen normal hücredekine benzerdir ama apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve kondanse olur (11, 12). Nekrotik hücre plazma membran bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cepçikler oluşur. Nekrotik hücre sonra lizise uğrar ama apoptotik hücre küçük cisimciklere parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır, değişen miktarlarda nükleus veya diğer hücre içi yapılar içerirler (12). Nekrozda hücrenin sitoplazmik içeriği doku aralarına çıkar, inflamatuvar hücrelerin toplanması için kemotaktik sinyaller gönderilir ve

inflamasyon uyarılır. Apoptoziste hücre zarı hasarlanmadığından inflamasyon oluşmaz ve hücre veya cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından hızlıca fagosite edilir. DNA'nın internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde ayrılması apoptozisin en önemli özgül yönüdür. Bu durum ultraviyole ışık altında agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının (ladder pattern) ortaya çıkmasına neden olur. DNA'yı parçalayan enzim, Ca^{+2} ve Mg^{+2} bağımlı bir endonükleazdır (11, 12). Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri de plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserinin erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır. Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar (11, 12).

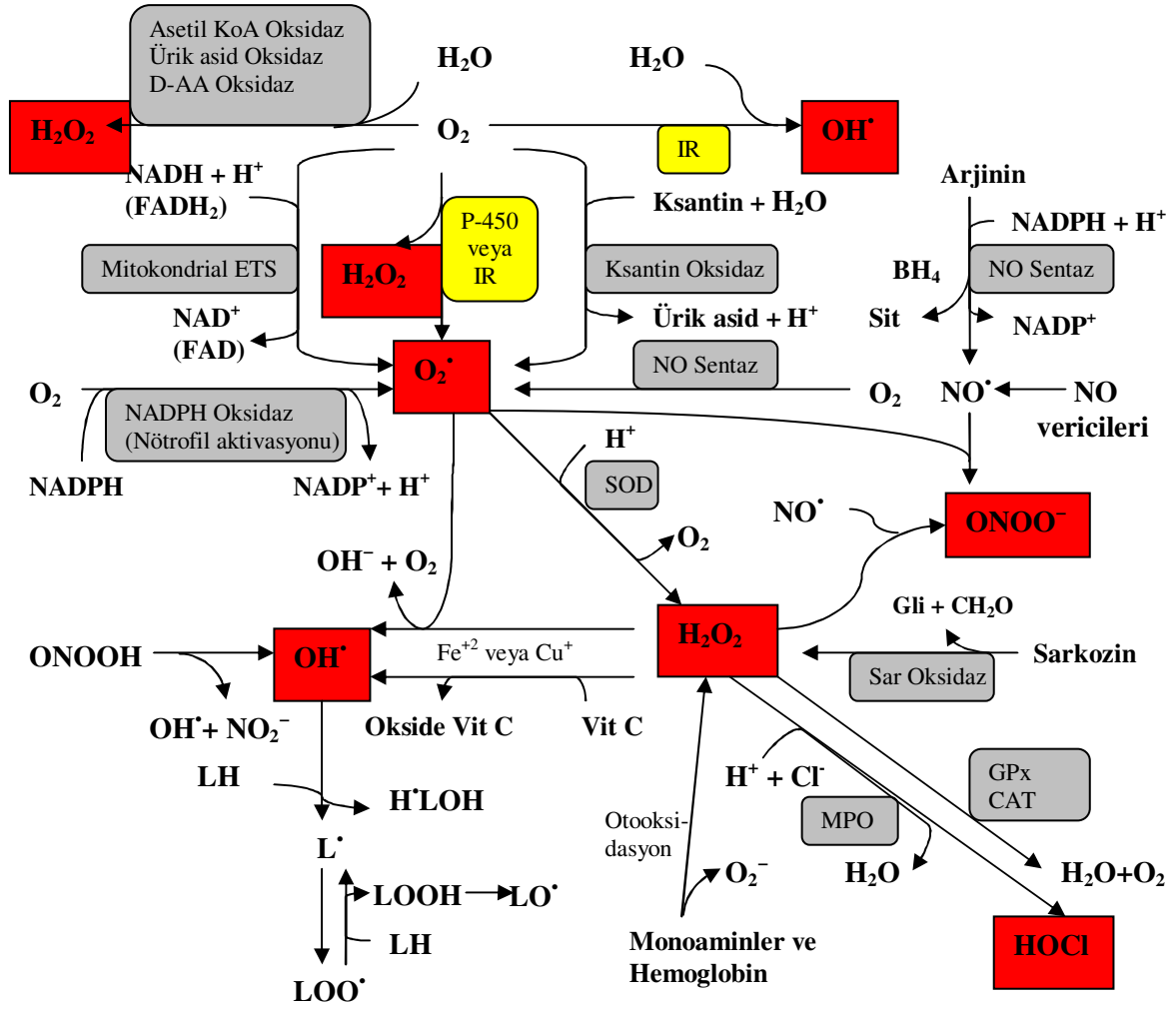
2.3. Oksidatif Stres

Organizmada reaktif oksijen türlerinin oluşum hızı ile bunların intrasellüler ve ekstrasellüler olarak ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak tanımlanır (22, 23). Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Oksidatif stres olarak da adlandırılan, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizlik, doku hasarında, kanser, diyabet ve ateroskleroz gibi patolojik durumların gelişmesinde etkin olur.

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA ve karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşiklerin yapılarının bozulmalarına neden olurlar. (22).

2.3.1. Serbest Radikaller

Atomların çekirdekleri etrafında dönen elektronlar, belirli enerji düzeylerinde, birbirine zıt momentli çiftler şeklinde bulunmaya eğilimlidirler. En dış yörüngede bulunan elektron çiftinin dengesi, yörüngeye bir elektron girmesi ya da çıkmasıyla bozulursa, momenti dengelenmemiş bu tek elektron; atoma (ya da moleküle) büyük bir aktiflik kazandırır. En dış yörüngede eşlenmemiş bir elektronu bulunan molekül ya da molekül gruplarına "radikal" adı verilmektedir ve molekülün kimyasal simgesinin sağ üst köşesine konan nokta veya çizgiyle gösterilir (R^{\cdot} , R^{\cdot}) (24). Bir veya daha fazla sayıda eşlenmemiş elektron içeren ve yüksek reaktivite gösteren atom veya moleküllere "serbest radikal" denir (23). Ayrıca bu moleküllere "oksidan moleküller" veya "Reaktif oksijen türleri (ROS)" da denmektedir (22). ROS her iki serbest oksijen radikallerini (O_2^{\cdot} süperoksid ve OH^{\cdot}) ve bazı radikal olmayan oksijen türlerini (H_2O_2 , hidrojen peroksid) kapsayan ortak bir terimdir. Bu moleküller elektronlarını paylaşmak için diğer moleküllere elektron verir veya onlardan elektron alırlar ve daha stabil türler oluştururlar (Şekil 3) (23).



Şekil 3. Memeli hücrelerinde reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) meydana gelişi (IR: iyonize radyasyon, Sit: Sitrüllin, D-AA: D-Amino asit, BH_4 : Tetrahydrobiopterin, Gli: Glisin, L^{\bullet} : Lipit radikali, SOD: Süperoksit dismutaz, MPO: Miyeloperoksidaz, GSH-Px: Glutasyon peroksidaz, CAT: Katalaz)

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

Hücrelerdeki oksidatif hasarın oluşumunda ilk sırada yer alan serbest radikaller normal hücresel bileşenleri bağlayarak, membran lipidlerinin doymamış bağları ile reaksiyona girerler, proteinlerini denatüre ederler ve nükleik asidlerine saldırırlar (22). ROS fazla üretildiğinde apoptotik ve nekrotik mekanizmalar ile hücrenin ölümüne neden olur (23). ROS' nin ilk hedefleri hücre zarındaki çoklu doymamış yağ asidleri olup, bunun sonucunda zarlarda lipid peroksidasyon sonucu hücre yapı ve fonksiyonunda önemli hasarlara neden olurlar. Ayrıca DNA ve nükleik asidler üzerine serbest radikallerin etkisiyle DNA zincirinde kopmalar meydana gelmektedir. Proteinler açısından ise Triptofan, Tirozin, Fanilalanin, Histidin, Metiyonin gibi sülfür içeren aminoasitlere sahip

proteinler serbest radikaller ile reaksiyonları daha hızlı gerçekleşmektedir. Birçok molekül elektron kazanarak ve kaybederek serbest radikal haline gelebilirken, sadece sınırlı bir kısmı patolojik olaylarda yer alırlar (22).

Güncel olarak değeri yeni anlaşılan bir grup molekül olan RNS diğer bir serbest radikal olan nitrik oksidden (NO) elde edilir. NO hem pro-oksidan hem de anti-oksidan olarak davranabilir. $O_2^{\cdot-}$, NO ile tepkimeye girerek bir sitotoksik oksidan olan peroksinitriti ($ONOO^-$) oluşturur (Şekil 3) (23).

2.3.1.1. Reaktif Oksijen Türleri

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

Oksijen molekülündeki aynı yönde dönen iki elektrona sahip 2P son orbitali önemlidir. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron, bir orbitali bırakıp diğerine geçtiğinde veya farklı yönde döndüğünde “singlet oksijen” oluşur. Orbitallerden birine ters dönüşlü iki elektron veya ikisine ters dönüşlü iki elektron daha gelirse “oksijen radikali” elde edilir. Oluşan radikal eşleşmemiş tek elektronu nedeniyle çok dengesizdir ve hızla ortamdan kaybolur. Bu yüzden bu radikaller tek elektronlarını bir başka moleküle verebilir (redüksiyon) ya da bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilirler (oksidasyon). Sonuçta nonradikal yapıyı radikal şekle dönüştürebilirler (24).

Serbest oksijen radikalleri $O_2^{\uparrow\downarrow}$, O_2^{\cdot} , H_2O_2 ve $HO\cdot$ olup bu radikaller oksijenli solunum metabolizması esnasında oluşurlar. Bu radikallerin yarılanma ömürleri birkaç milisaniye ile saatler arasında değişmektedir (22). Oksijen türevi bileşikler Tablo 3’ de listelenmektedir.

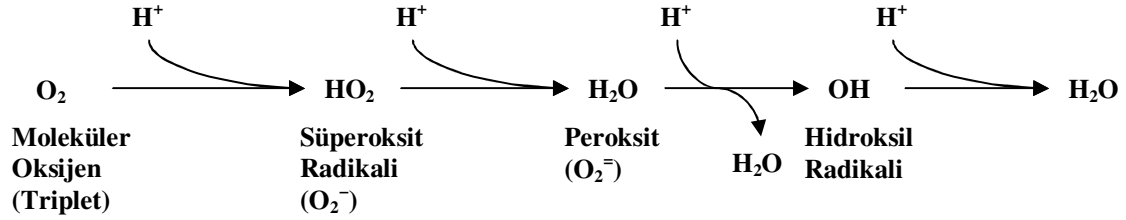
Tablo 3. Oksijen türevi bileşikler (24)

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Hidroksil ($HO\cdot$)	Hidrojen Peroksit (H_2O_2)
Alkoksil ($RO\cdot$)	Singlet Oksijen ($O_2^{\uparrow\downarrow}$)
Peroksil ($ROO\cdot$)	Ozon (O_3)
Süperoksit ($O_2\cdot$)	Hipoklorid ($HOCl$)
Nitrik oksit ($NO\cdot$)	Lipid hidroperoksit ($LOOH$)
Azot dioksit ($NO_2\cdot$)	Peroksinitrit ($ONOO\cdot$)

Moleküler oksijen, aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü sebebiyle hayati bir öneme sahiptir. Moleküler oksijenin toksik etkisi yoktur, fakat aerobik hücre

metabolizmasında moleküler oksijen, serbest oksijen radikaline dönüşür. Enzim reaksiyonları da ROS oluşumuna neden olmaktadır. Oksijen radikalleri doku hasarına neden oldurlar.

Biyokimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan oksijen türevli radikaller Şekil 4' te gösterilmiştir:



Şekil 4. Oksijen türevli radikaller.

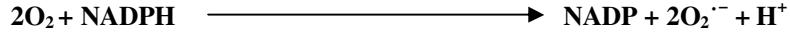
A) Singlet Oksijen($\text{O}_2^{\uparrow\downarrow}$)

Moleküler oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış formudur ve yapısında iki adet çiftlenmemiş elektron taşır. Biyolojik sistemlerde fotosentez reaksiyonları sırasında oluşmaktadır. Oksijenin bu şekilde uyarılan formunun reaktivitesi çok yüksektir. İçerdiği bu yüksek enerjii çevreye dalga enerjisi şeklinde vererek yeniden oksijene dönebilir veya kovalent tepkimelere girer. Yarılanma ömrü 10^{-6} ile 10^{-5} saniye arasındadır, bunun için de çift bağlar ile tepkimeye girmeye eğilimlidir. Hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitleriyle doğrudan reaksiyona girerek lipid peroksitlerin oluşumuna neden olur (22).

B) Süperoksit Radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

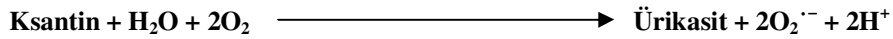
Oksijen molekülü, orbitalinde çiftlenmemiş elektron taşıyorsa süperoksit radikali olarak adlandırılır (22). $\text{O}_2^{\cdot-}$, hücrelerde redükte elektron taşıyıcılarının ootoksidasyonu ile üretilmektedir ve oluşumu; elektron taşıyıcısının redoks durumuna ve ortamdaki oksijen derişimine bağlıdır (24). Selüler hasarlarda tek başına fazla etkili değildir. Bütün aerobik hücrelerde $\text{O}_2^{\cdot-}$ oluşturulur. Organizmanın normal metabolizması sonucu veya çevresel kaynaklı meydana gelebilir (22). Mitokondriyal elektron transport zinciri sırasında $\text{O}_2^{\cdot-}$ nin ootoksidasyonu sonucu oluşur. $\text{O}_2^{\cdot-}$, O_2 varlığında ksantin oksidaz' ın ksantini veya hipoksantini indirgemesiyle, NADPH' nin NADPH oksidaz ile oksidasyonu, mitokondriyal elektron transport sistemi (METS) ile NADH₂ ve FADH₂' nin NAD ve FAD' ye dönüşümü sırasında, $\text{O}_2^{\cdot-}$ nin iyonize radyasyonla, sit p450 ile ve arginin veya tetrahidrobiopterin eksikliğinde nitrik oksit sentazla indirgenmesiyle oluşur (Şekil 3). Makrofajlar ve polimorf nüveli lökositler tarafından gerçekleştirilen fagositoz sırasında O_2

tüketimi artar ve bu durumda plazma membranında bulunan NADPH oksidaz tarafından $O_2^{\cdot-}$ oluşumunu tetikler.

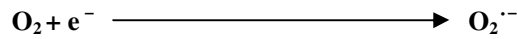


$O_2^{\cdot-}$ dioksijen redüksiyonunun, biyotik ve abiyotik sistemde en sık rastlanan ara üründür. $O_2^{\cdot-}$ 'nin fazla üretimi ya da enzimatik korumanın azalması, büyümenin yavaşlaması, mutagenез ve hücre ölümü ile sonuçlanır (25).

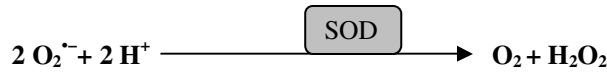
Normal metabolizma sonucu olarak moleküler oksijenin oksidatif fosforilasyon esnasında ksantin oksidaz veya NADPH-oksidadz gibi enzimlerin katalizörlüğünde bir elektron indirgenmesi sonucunda meydana gelmektedir:



Ayrıca indirgeyici moleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken $O_2^{\cdot-}$ oluşturabilirler. Çevresel etki sonucu olarak da alınan bir ksantobiyotiğin redoks döngüsü sırasında oksidasyona uğrayarak tek elektronunu kaybetmesi ve ayrıca moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu oluşur:

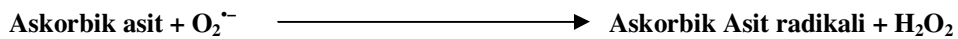


$O_2^{\cdot-}$ 'nin yarılanma ömrü hücrelerin farklı yerlerinde bulunan süperoksit dismutaz enziminin varlığına bağlıdır, fakat genel olarak milisaniye düzeyindedir. $O_2^{\cdot-}$, yüksek katalitik etkiye sahip SOD tarafından katalizlenen bu reaksiyon dismutasyon tepkimesi olarak adlandırılır.



$O_2^{\cdot-}$ kuvvetli bir redükten, fakat zayıf bir oksidandır. Bunun için de tek başına hücrel hasar oluşturma potansiyeli düşüktür. Fakat kısa yarı ömrüne rağmen H_2O_2 ' le reaksiyona girerek hidroksil radikalinin oluşmasına ve böylece oksidatif hasara neden olur (22).

$O_2^{\cdot-}$ 'nin kimyasal davranışı nerede çözüldüğüne göre değişmektedir. Suda çok reaktif değildir. Bazen bir elektron alarak, okside edici ajan olarak davranabilir. Örneğin askorbik asidi okside etmektedir.

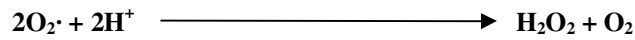


Organik solventlerde daha reaktif ve tehlikelidir. Biyolojik membranlarda oluştuğunda oldukça fazla hasar meydana getirmektedir. $O_2^{\cdot-}$ çeşitli organik ya da inorganik bileşiklerle de reaksiyona girebilir. Nitrik oksit ile reaksiyona girebilir. Nitrik asit ile reaksiyona girip peroksinitriti oluşturması önemlidir (25).

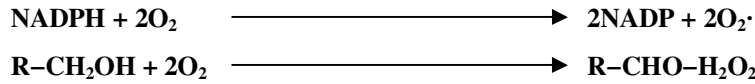
C) Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

H_2O_2 çok potent oksitleyici bir ajan olmasına karşın çok yavaş reaksiyona girmektedir. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz, reaktif bir tür değildir. Oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşurlar (22). Süperoksit anyonunun (O_2^-) hidrojenle yaptığı reaksiyona Dismutasyon reaksiyonu adı verilir ve Dismutasyon hızı asidik pH değerlerinde hızlanır.

Reaksiyon şu şekilde ifade edilir;



Bazı enzimler ya tekli (NADPH oksidaz) ya da çiftli (Glukoz oksidaz) elektron eklenmesini katalize ederek O_2^- veya H_2O_2 oluşmasını sağlarlar (24).

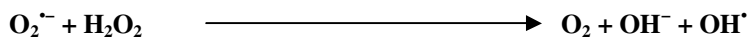


H_2O_2 ' in oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığına bağlıdır. H_2O_2 özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir.

Oksitleyici özelliği nedeni ile biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz yerine getirir. Hidrojen peroksidin doğrudan gösterdiği hasar, protein tiyollerini okside etmesi ve DNA ipliklerine hasar vermesidir. Gösterdiği daha önemli hasar ise Haber-Weiss reaksiyonunda bir substrat görevi görerek çok daha güçlü bir serbest radikal olan hidroksil radikalini oluşturmasıdır (Şekil 5).

D) Hidroksil Radikali (HO^\bullet)

Hidroksil radikali, en aktif ve en toksik oksijen radikali olup üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyon verebilmektedir. Hidroksil radikali, iyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle su moleküllerinin hemolitik kırılması sonucunda oluşabildiği gibi, H_2O_2 ' in metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilmektedir. Demir ve bakır gibi metal iyonları tarafından katalizlenen bu indirgenme reaksiyonu Haber-Weiss tepkimesi olarak bilinmektedir (Şekil 5).

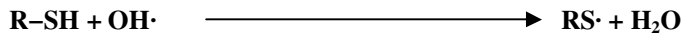


Şekil 5. Haber-Weiss reaksiyonu ve mekanizması.

Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan hidroksil radikali, su dâhil ortamda rastladığı her molekül ile tepkimeye girer. Bütün bu tepkimeler, bu radikalin paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır. Yağlar, sitokromlar, tiyoller, inaktif membran proteinleri, deoksiriboz ve DNA bazları ile de reaksiyon verdiği için genetik hasara da yol açabilir (22).

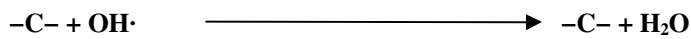
OH[•] radikalleri başta lipid, protein ve nükleik asitler (DNA ve RNA) olmak üzere hemen hemen bütün hücresel moleküllerle reaksiyona girebilmektedirler. OH[•], DNA' da bulunan deoksiriboz molekülüne etki ederek çeşitli ürünler oluşturduğu ve bu oluşan ürünlerin bazılarının mutajenik oldukları görülmüştür. Yine OH[•] aromatik halkaya katılma özelliği gösterdiklerinden DNA ve RNA' da bulunan pürin ve pirimidin bazlarına katılarak radikal oluşumuna neden olurlar. Bunun gibi bir dizi reaksiyona katılabilen OH[•] DNA' nın baz ve şekerlerinde ciddi hasarlar oluşturarak DNA iplik kırılmalarına neden olurlar. Hasar çok kapsamlı olursa hücre koruyucu sistemler tarafından tamir edilemeyebilir ve bunun sonucunda mutasyonlar ve hücre ölümleri meydana gelir.

OH[•] radikalleri DNA' nın pürin ve pirimidin bazları ile etkileşmenin yanısıra tiol grubu içeren biyolojik moleküllerden H atomu da koparabilmektedirler.



Sonuçta oluşan sülfür radikalleri ilginç kimyasal özelliklere sahiptir. Sülfür radikalleri, O₂ ile kombine olabilir ve oksisülfür radikallerini oluşturur ve bunların birçoğu da biyolojik moleküllerde hasara neden olurlar (24).

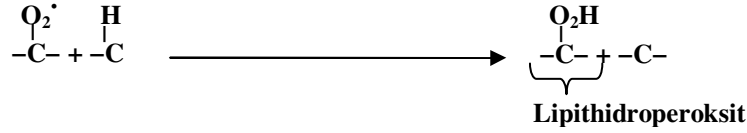
Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur (22). OH[•] membran fosfolipitlerinin doymamış yağ asit yan zincirlerine hücum eder. Bu özellikle araşidonik asit gibi doymamış yağ asit yan zincirlerinden -C atomunun birinden H atomunun çıkartılması ve su oluşumu şeklinde gerçekleşir.



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



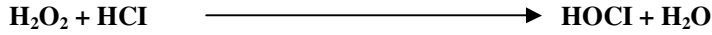
Peroksil radikaller reaktiftir ve yakınındaki doymamış yağ asitlerinin yan zincirlerine saldırır;



Böylece OH[•] radikalleri, yüzlerce yağ asitlerinin yan zincirlerini lipit hidroperoksitlere dönüştürür. Membranda lipit hidroperoksitlerinin birikimi membran fonksiyonunu bozar, geçirgenliğini arttırır, membrana bağlı bazı enzimleri ve reseptörleri inaktive ederler ve sonuçta hücre ölümüne sebep olabilir (22, 24).

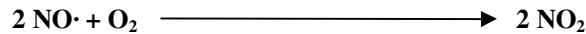
E) Hipoklorik Asit (HOCl)

Hipokloröz asit de radikal olmadığı halde ROS içinde yer almaktadır. Aktive olan nötrofiller, monositler makrofajlar ve eozinofiller süperoksit radikallerini (O₂[•]) üretirler. Radikal üretimi fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde büyük önem arz etmektedir. Özellikle nötrofiller miyeloperoksidaz enzimleri aracılığıyla önce O₂[•] ni oluştururlar ve daha sonra dismutasyonuyla oluşan H₂O₂' i klorür iyonuyla birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl' i meydana getirirler (Şekil 3).

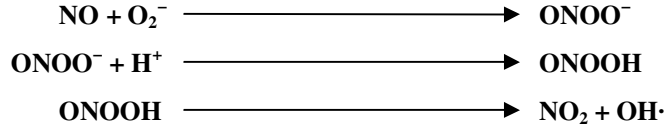


2.3.1.2. Reaktif Nitrojen Türleri (NO, NO², NO⁺, NO⁻)

Lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir. Düşük konsantrasyonlarda iken, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilen NO, bilinen en düşük molekül ağırlıklı, biyoaktif memeli hücresi sekresyon ürünüdür. Diğer radikallerden farklı olarak düşük dozlarda toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevleri gerçekleştirir. NO[•], bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır. Bu lipofilik serbest radikal damar endotel hücrelerinde Nitrik Oksid Sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-argininden sentezlenir. NOS' ın birçok izoformu tanımlanmıştır. NO[•] in yarı ömrü 10–20 saniyedir. Kolayca düz kasa geçerek Guanilat Siklaz enziminin “hem” demirine bağlanır ve cGMP sentezini uyarıp damar gevşemesini uyarır. NO[•] metabolize olurken moleküler oksijen ile bağlanıp NO₂ oluşturur:



NO[•] in ROS' leri ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitriti (ONOOH) oluşturduğu ve bunun da ileri dekompozisyonla OH[•] radikalinin oluşumuna yol açtığı ifade edilmektedir (Şekil 3):



OH[•] radikali ise biyolojik olarak yıkıcı bir moleküldür. Ayrıca, peroksinitrit de tirozin gibi fenolik amino asitleri nitrolayarak toksik nitro- türevlerini (nitrotirozin) oluşturmaktadır. Sonuç olarak NO, endotel hücre disfonksiyonu ve buna bağlı ateroskleroz, hipertansiyon ve DM gibi bazı önemli hastalıklarda rol oynayabilmektedir (24).

2.3.1.3. Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Serbest radikaller organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında olduğu gibi çeşitli dış kaynaklı etkilerin etkisiyle de oluşabilir. Hücre organellerinin her biri farklı miktarda radikal oluşumuna sebep olurlar. Bunların yanısıra radyasyon, stres ve ksenobiyotikler aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini arttırmırlar. Sitokrom P 450, sitokrom b5, ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, lipooksijenaz, prostoglandin sentetaz, hemoglobin, flavoproteinler, lipid peroksidasyonu, oksidatif stres yapan iskemi, travma ve intoksikasyon gibi durumlar, METS, moleküler otooksidasyon yapan tiol, hidrokinon, katekolamin, flavin ve antibiyotik gibi moleküllerin hepsi hücrel serbest radikalleri oluştururlar. Serbest radikal oluşturan kaynaklar endojen ve ekzojen olmak üzere iki gruba ayrılabilir.

A) Endojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Normal olarak metabolizmada, bazı biyokimyasal olayların çeşitli basamaklarında serbest radikaller oluşmaktadır. Her ne kadar serbest radikal yapısına sahip maddelerin organizmaya zarar verme potansiyelleri varsa da, bazı metabolik olayların ilerleyebilmesi için bunların oluşması kaçınılmazdır. Bunlardan başlıcaları; METS, endoplazmik retikulum, redoks döngüsü, araşidonik asit metabolizması, fagositoz, otooksidasyon ve oksidan enzimlerin reaksiyonlarıdır.

METS, mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin %1–5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH dehidrogenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçığının olmasıdır. Fizyolojik koşullar altında METS serbest radikal üretiminin en önemli kısmını oluşturmaktadır.

Endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P–450 moleküler oksijeni kullanarak birçok substratı oksitler. Oksijen molekülünün bir atomu substrata bağlanır, diğer atomu ise su oluşturur. Bu reaksiyon monooksijenaz veya karışık fonksiyonlu oksidaz reaksiyonu

olarak adlandırılır. Kimyasal ajanların serbest radikal oluşturmadaki en önemli mekanizmaları, mikrozomal sitokrom P-450 sistemi ile aktivasyonudur. Bu sistem, molekülleri indirgeyerek veya oksitleyerek serbest radikal oluşturur.

Menadion, parakuat, dikuat, nitrofurantoin, gibi bileşikler alternatif bir redoks siklusuna girerler. Bu bileşikler, ilave bir çiftlenmemiş elektron kazanma eğilimindedirler. Bu ajanlardan oluşan radikaller, tekrar ana bileşiğe dönüşmek için kolayca oksijenle oksitlenir ve O_2^{\cdot} ni oluştururlar.

Hücre membranlarında prostaglandin için en önemli doymamış yağ asidi prekürsörü araşidonik asittir. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonu, plazma membranlarında araşidonik asidin salınımına yol açar. Araşidonik asidin siklooksijenaz tarafından katalizlenen oksidasyonu prostaglandinleri, lipooksijenaz tarafından katalizlenen oksidasyonu ise lökotrienleri verir ve bu tepkimeler sırasında serbest radikaller oluşur.

Radyasyon, stres ve ksenobiyotikler aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini arttırırlar. Aktive olmuş fagositlerde üretilen serbest radikaller patojenlerle savaşta önemli rol oynar.

Doku bileşenlerinin çoğu moleküler oksijenin varlığında kimyasal olarak stabil değildirler ve metabolik şartlar altında az yada çok otookside olurlar. Kolayca otookside olabilen bu bileşenler doku ve hücrelerin son derece önemli komponentleridirler. Bunlar arasında, hemogloblin gibi metalloproteinler, hormonlar, tiyoller, doymamış membran lipitleri sayılabilir. Bütün otooksidasyonlar sırasında serbest radikal intermediyerleri kadar aktive oksijen türleri de üretilir (Şekil 3).

Aerobik organizmalarda oksidan enzimlerin rol aldığı birçok reaksiyonda oksijenin tek değerlikli indirgenmesiyle süperoksid anyonu meydana gelebilir. Glikojen oksidaz, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, NADH oksidaz, diamin oksidaz, urat oksidaz gibi enzimler bunlardan bazılarıdır. Üzerinde en çok çalışılan enzim Ksantin oksidaz (XOD), aslında ksantin dehidrogenaz (XDH) olarak sentezlenmekte ve bu şekilde dokularda yaygın olarak bulunmaktadır. Bu enzim elektronlarını moleküler oksijene değil NAD' ye verir ve süperoksid anyon radikali oluşturmaz. Fakat XOD sülfidril oksidasyonu ya da sınırlı proteolizis ile dehidrogenaz formunda oksidaz formuna dönüşebilir. XOD moleküler oksijeni kullanarak H_2O_2 ve O_2^{\cdot} oluşturmaktadır (24).

B) Ekzojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Serbest radikaller, ekzojen nedenlerle de oluşabilir. İyonize ve non-iyonize radyasyon, hava kirleticiler, sigara dumanı, zehirli gazlar, doğal zararlı gazlar (ozon,

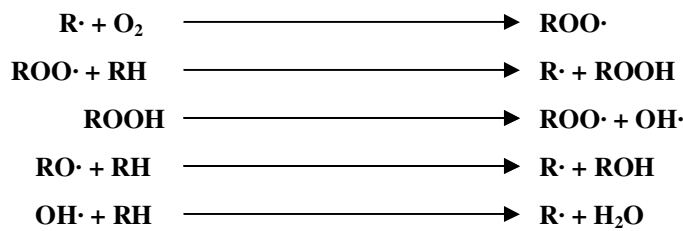
oksijen ve hiperbarik oksijenin yüksek konsantrasyonları), bazı ilaçlar, kanserojen maddeler, alkol, patojenik bakteri, virüsler ve pestisitler en önemli ekzojen serbest radikal üretim kaynakları olarak bilinirler (24, 25).

2.3.1.4. Serbest Radikallerin Vücuttaki Etkileri

A) Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri

Serbest radikallerin en önemli etkisi lipitler üzerine yaptığı etkidir ki bu lipit peroksidasyonu olarak adlandırılır (24). Lipid peroksidasyonu (LPO) reaksiyonları, genel olarak serbest radikal kaynaklı zincir reaksiyonları olarak bilinir ve serbest radikal çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidasyonuna neden olan ve böylece zar lipid yapısını değiştirerek hücre yapı fonksiyonlarını bozan bir olaydır (22). Biyolojik sistemlerde bu radikalin süperoksit anyon radikali ile hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Süperoksit anyon radikali hidroksil radikaline dönüşmektedir. Benzer şekilde hidrojen peroksidin de hidroksil radikaline dönüştüğü bilinmektedir. Bu nedenle lipit peroksidasyonunu başlıca hidroksil radikali başlatmaktadır (24).

PUFA' lar peroksidasyona kolaylıkla maruz kalabilen yapılardır (22). Lipit peroksidasyonu doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerle etkileşmesi sonucu doymamış yağ asidindeki α -metilen grubundan bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır (22, 24). Uzaklaşan hidrojen atomu sebebi ile karbon atomu üzerinde ortaklanmamış bir adet elektron kalır ki bu da yağ asiti zincirinin radikal olmasına neden olur. Oluşan lipid radikali kararsız bir bileşiktir. Molekül stabil duruma gelebilmek için molekül içi bağlarını tekrar düzenler ve konjuge dien yapısına dönüşür. Reaksiyon moleküler oksijenin lipid radikali ile etkileşmesi ve lipid peroksi radikalinin oluşmasıyla devam eder. Lipid peroksi radikali, membran yapısında bulunan diğer çok doymamış yağ asidi zincirlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşmasına yol açarken, kendisi de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid perokside dönüşmüş olur. Bu tetikleme olayının ne zaman sona ereceğini ortamda bulunan oksijen ve antioksidan miktarına bağlıdır. Lipid peroksidasyonu bir zincir tepkimesi şeklinde başlayıp, serbest radikaller için kesintisiz bir kaynak oluşturmaktadır (22).



Birçok olayda bu şekilde oluşan lipit peroksiti RO' ve OH' verecek şekilde parçalanır ve bu oluşan radikaller hemen substrat ile reaksiyona girerek yeni zincir reaksiyonlarını başlatacak olan R' radikallerini oluştururlar (24). Hücre bileşenlerinin, LPO olarak adlandırılan bu şekilde parçalanışı, hücrenin harabiyeti ile sonuçlanır. (22).

Lipit peroksitleri hücre zarlarının önemli bir komponentidir ve Fe, Cu gibi geçiş metallere varlığında alkoksi ve peroksi radikallerini verirler. Bu nedenle Fe veya Cu tuzları lipit peroksidasyonunun hızını arttırmaları. Sonuçta hücre zarının akışkanlığını ve permabilitesini azaltarak zar bütünlüğünün bozulmasına yol açarlar (24). Lipid peroksidasyonunun sonucunda oluşan hasar nedeni ile homeostaz bozularak, iyonlara özellikle kalsiyuma olan geçirgenlik artarken kalsiyum pompası aktivitesi bozulur (22). Lizozomal membranların tahribi hidrolitik enzimlerin salınmasına ve intrasellüler sindirime neden olur. Biriken hidroperoksitler direkt olarak toksik etki göstermenin yanı sıra duyarlı aminoasit kalıntılarını okside eder veya zincir polimerizasyon reaksiyonlarıyla enzimleri inaktive edebilirler (24).

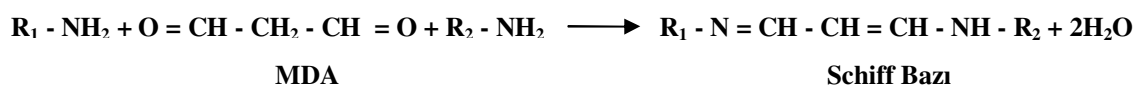
Lipid peroksidasyon kanser, kalp hastalıkları ve yaşlanmanın başlıca nedeni olarak görülmekte olup, inflamasyon, ateroskleroz, alkolik karaciğer hastalıkları ve travma gibi birçok hastalığın patogeneğinde önemli rol oynamaktadır.

Lipid peroksidasyonla oluşan, bozularak çoğalma reaksiyonları sonucu karbonil bileşiklerini de içeren birçok ürün oluşur. PUFA' ların peroksidasyonu sonucu oluşan kararsız yağ asidi hiperoksitleri daha kararlı karbonillere dönüşür.

Lipid peroksidasyonu, lipit hidroperoksitlerin aldehit ve diğer karbonil bileşikleri ile etan, pentan gibi uçucu gazlara dönüşmesi ile sonuçlanır. Oluşan son ürünlerden birisi de kan plazmasında kolaylıkla teşhis edilebilen ve oksidatif stres ölçümlerinde kullanılan MDA molekülüdür.

a) Malondialdehit (MDA)

Lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA, kimyasal olarak aktif bir moleküldür, çevre, hücre ve dokulara kolayca difüze olarak moleküler düzeyde, özellikle proteinler üzerinde zararlı etkiler gösterebilir. Malondialdehit, bir Schiff bazı oluşturmak için iki amin grubu ile reaksiyona girebilen bifonksiyonel bir aldehittir (Şekil 6).



Şekil 6. Malondialdehitten Schiff bazı oluşumu.

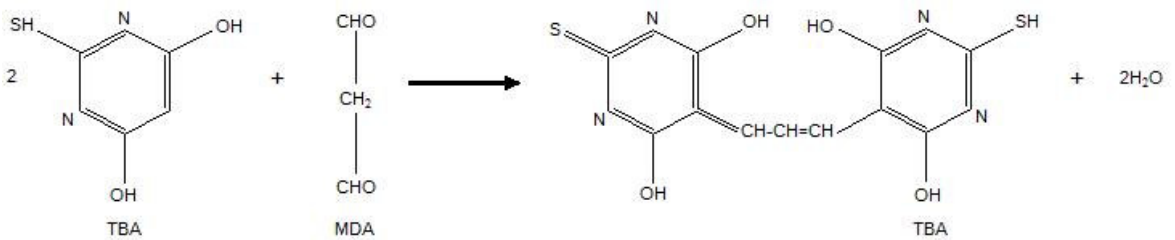
Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile MDA oluşur. MDA düzeyi lipid peroksidasyonunun yaygınlığı ile korelasyon gösterir.

Malondialdehit, Tiyobarbitürik asit (TBA) ile belirlenebilen bir lipid peroksidasyon ürünüdür. Bilirubin gibi diğer başka maddeler de TBA ile reaksiyon verdiğinden, lipid peroksidasyon düzeyi TBARs olarak ifade edilir. Bunun sonucunda iyon taşıma özellikleri ve enzim aktivitesi zarar görür. Kolaylıkla difüze olabildiğinden DNA' nın azotlu bazlarıyla reaksiyon vererek yapılarını bozar. Lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan lipid peroksitler kararsız yapılardır ve ikincil, üçüncül reaksiyonları sonucu zincir ayrılma ürünleri oluşur. Bu ürünler n-alkanlar, 2,4-alkadealler, malondialdehit, alkoller, ketonlar, furanlar, laktonlar, alkanlar ve aklenlerdir.

Malondialdehit, in vivo enzimatik LPO ürünü olarak ortaya çıktığı gibi prostoglandin metabolizmasında da siklooksijenaz reaksiyonunun ürünü olarak da meydana gelmektedir. Vit E yetersizliği, demir veya karbon tetraklorüre maruziyet gibi LPO' yu indükleyen durumlarda ve dokuların PUFA açısından zengin olduğu ortamlarda total MDA atılımı artar.

En yüksek oranda bulunan ürünlerin 4-hidroksi-alkaneller olmasına karşı, üzerinde an fazla durulan LPO ürünü MDA' dır. Peroksidasyon sonucu oluşan MDA çapraz bağlanmaya membran komponentlerinin polimerizasyonuna neden olabilir. Bunun sonucunda iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre düzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özellikleri değişmektedir. Malondialdehit, aminoasitler ve proteinlerle de reaksiyona girebildiği gibi, diffüze olabildiği için DNA' nın nitrojenli bazlarıyla da reaksiyon verebilir.

Lipid peroksidasyonunu ölçmek için geliştirilen tekniklerden biri TBA testidir. Bu metod lipid peroksid seviyelerinin ölçülmesinde kullanılan en yaygın ve en kolay spektrofotometrik yöntemdir. MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, fakat lipid peroksidasyonun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Malondialdehit iki molekül TBA ile reaksiyona girerek 532 nm' de pembe renkli bir kompleks oluşturur (Şekil 7).

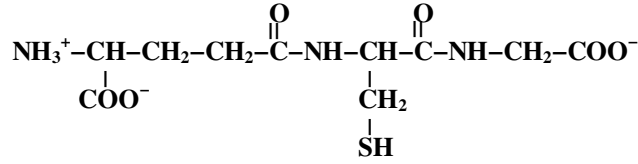


Şekil 7.Tiyobarbitürik asitin MDA ile reaksiyonu (22).

TBA testinde ölçülen MDA miktarının tümünün LPO esnasında olduğu düşünülmekteydi. Ancak deney esnasında (özellikle ısıtma ve asidik yapma) gerçekleşen reaksiyonlar sonucunda bir miktar MDA açığa da çıkabilir. Bu yüzden yöntemin TBA-RS olarak adlandırılması daha uygundur.

b) Glutasyon (GSH)

GSH vücudun birçok hücresinde bulunan ve fonksiyonel proteinlerini oksidan ajanlara karşı koruyan bir tripeptittir (Şekil 8).



Şekil 8. Glutasyonun yapısı (22).

GSH, hayvan hücrelerinin hemen hemen hepsinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur (0,1-10 mM). Glutasyon disülfid (GSSG), GSH' daki sisteinin tiyol grubunun oksidasyonu ile oluşmaktadır. Hücrede bulunan GSH' nın üçte bire yakın miktarı disülfid şeklinde ve tiyol grubu içeren sistein, koenzim A gibi bileşikler ile beraber bulunur.

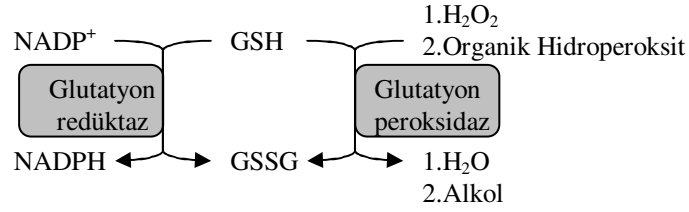
GSH, DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır.

GSH iki peptit bağı, iki karboksilik asit grubu, bir amino grubu ve bir tiyol grubundan oluşmuş bir moleküldür. GSH molekülünde çok sayıdaki hidrofilik fonksiyonel grubun düşük molekül ağırlıklı atomlarla birleşmesi bu molekülün su, etanol ve amonyak gibi polar çözücüler içinde kolaylıkla çözünmesine neden olmaktadır. GSH' daki tiyol grubunun oksitlenmesi ile oluşan GSSG, antioksidan özelliğini kaybeder. Tiyol grubunun asitliği GSH' yı kendi anyonu ile sulu çözeltilerde kuvvetlice reaksiyon vermesine sebep olur. Reaksiyonun oluşma sıklığı ortam pH' ına bağlı olarak değişmektedir.

GSH sentezi, L-glutamat ve L-sisteinin gama-glutamilsistein sentetaz enzimi ile katalizlenmesi ile başlar ve GSH sentetaz enziminin katalizörlüğünde GSH' ya dönüştürülür. GSH, doğrudan elektrofillere bağlanarak veya dolaylı olarak GSH biyosentezi ve rejenerasyonunun inhibitörlerine eklenerek tüketilir. GSH in vivo olarak karaciğerde g-glutamilsistein ve glisinlerden, GSH sentetaz enzimi ile üretilir.

GSH iki önemli enzime sahiptir: Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve Glutasyon-S-transferaz. GSH-Px selenyuma bağlı ve bağımsız iki formda bulunabilir ve

hidroperoksitlerin reaktif olmayan bileşiklere dönüşmesini sağlar. Memeli hücreleri, toksik kimyasallar ve selüler metabolizmanın yarattığı normal oksidatif ürünlerinden, en önemli endojen sistem olan glutatyon redoks döngüsü ile korunur. Glutatyon yüksek konsantrasyonda (genelde milimolar düzeyinde) GSH, düşük konsantrasyonda GSSG (GSH' nın disülfidleri ve diğer tiyol grupları içeren) ve az miktarda tiyoeter içerir. GSH nükleofilik özellik göstererek birçok bileşiğin elektrofilik merkezi ile tiyoeter bağları oluşturur. GSH peroksidaz ise hidroperoksitleri süpürür (Şekil 9).



Şekil 9. Glutatyon peroksidaz tarafından H₂O₂ ve lipid hidroperoksitlerinin yıkımı.

İkinci enzim ise glutatyon-s-transferazdır. Glutatyon-s-transferaz, asetaminofen veya halojenli aromatik hidrokarbonların mikrozomal metabolizması sonucu oluşan elektrofilik ürünlerin GSH ile reaksiyonunu katalizler. Elektrofilik ajanlar nükleofilik tiyollerle ve proteinlerle reaksiyon verme eğiliminde olduğundan indirgenmiş GSH ile kolayca reaksiyon verebilirler (22).

B) Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Serbest radikallerin proteinlere etkisi proteinlerin aminoasit içeriğine göre değişir. Protein molekülleri üzerindeki sülfhidril veya amino gruplarıyla serbest radikallerin etkileşmesi sonucu proteinlerde oluşan yapısal değişiklikler üçe ayrılır: 1) Amino asitlerin modifikasyonu, 2) Proteinlerin fragmantasyonu, 3) Proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmalarıdır.

Aromatik aminoasitlerde (fenilalanin, tirozin, triptofan) doymamış yapılar olduğundan oksidatif ataklara çok hassastırlar. Sülfürlü amino asitler olan sistein ve sistin de serbest radikal atağına hassas amino asitlerdir. Proteinin temel yapısındaki değişme, antijenitesindeki değişmeye ve proteolize hassasiyete yol açabilir. Radikaller, membran proteinleri ile reaksiyona girebilirler ve enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilirler.

C)Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksid, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Bunlar diabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik proseslerde önemli rol oynarlar.

İnflamatuvar eklem hastalıklarında sinoviyal sıvıya geçen H_2O_2 ve O_2^{\cdot} buradaki mukopolisakkarit olan hiyalüronik asidi parçalarlar. Gözün vitröz sıvısında bol miktarda hiyalüronik asit bulunur. Bunun da oksidatif hasarı katarakt oluşumuna katkıda bulunur.

D)Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri

Serbest radikallerin, DNA atakları mutasyonlara ve hücre ölümlerine yol açmaktadır. Hidroksil radikali bazlarla ve deoksiribozlarla kolayca reaksiyona girer. H_2O_2 ise membranlardan kolayca geçebileceğinden hücre çekirdeğindeki DNA'ya ulaşır ve hücre disfonksiyonuna hatta ölümüne yol açar.

ROS ve RNS ile DNA hasarlarının çok az bir kısmı doğal olarak meydana gelmektedir. DNA hasarlarının oluşumunda yer alan endojen reaksiyonlar oksidasyon, metilasyon, depürinasyon ve deaminasyon reaksiyonlarıdır. Nitrik oksid veya NO_2 , $ONOO^-$, dinitrojen trioksid (N_2O_3) ve nitrik asid (HNO_3) gibi reaktif ürünleri, nitrozasyon ve deaminasyon reaksiyonları ile mutajenik aktivite gösterirler.

Hidroksil radikali fraksiyonunun DNA'daki şeker grubu ile etkileşmesi, beş karbon atomunun herhangi birinden bir H atomunun çıkarılmasıyla olmaktadır. DNA'daki değişikliğe uğramış şeker grupları DNA zincirinden salınabilir ya da fosfat bağlarıyla DNA'ya bağlı kalabilir.

Baz ve şeker radikallerinin reaksiyonları; değişik modifiye baz ve şekerler, kontrolsüz baz dizilimi, zincir kırılmaları ve DNA-protein çapraz bağlarını meydana getirirler. Oksidatif DNA hasarları da denilen bu tip hasarlar mutagenezise, kanserogenezise ve yaşlanmaya yol açmaktadır (24).

2.3.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikaller potansiyel olarak toksik oldukları için organizmalarda bunları etkisiz hale getirmek amacıyla savunma sistemi mevcuttur. Bunlar kısaca "antioksidanlar" şeklinde adlandırılır (22). Anti-oksidanlar "özel bir maddenin oksidasyonunu engelleyen veya geciktiren her madde" şeklinde de tanımlanabilir ve kabaca enzimatik ve non-enzimatik olarak sınıflandırılabilirler (Tablo 4) (23).

Tablo 4. Majör antioksidanlar (23)

Major Antioksidanlar					
Enzimatik		Non-enzimatik			
Süperoksit dismutaz	Vitaminler	İndirgen ajanlar	Bağlayıcı proteinler	Enzim bileşenleri	Diğerleri
Katalaz					
Glutasyon peroksidaz	Vit E	Glutasyon	Albumin	Çinko	Ürik asit
Glutasyon redüktaz	Vit A	Sistein	Serüloplazmin	Selenyum	Bilirubin
	Vit C	Tioredoksin	Laktoferrin		Eritropoietin
	Koenzim Q		Transferin		
	B-keroten				

Hücreler serbest radikal oluşumunu önlemek ve serbest radikallerin verdiği hasarı sınırlamak için “antioksidan savunma sistemi” adı verilen bu mekanizmaların enzimleri ile peroksitleri inaktive eder, geçiş metallerini tutan proteinler sentezler ve serbest radikalleri süpürürler. Antioksidan molekülleri endojen ve ekzojen kaynaklı yapılar olup, oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler. Hücre dışı savunma, albumin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, Vit C, Vit E, sülfhidril grupları, ürik asit ve diğer tanımlanmamış molekülleri içermektedir (22, 23). Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl oksidan savunmayı sağlamaktadır.

Oksidanlar belirli düzeyin üzerinde oluşur veya antioksidanlar yetersiz olursa, yani denge bozulursa söz konusu oksidan moleküller organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asit ve yararlı enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar. Dolayısıyla işleyişin radikaller lehine bozulduğu durumlarda patolojik olaylar ortaya çıkar.

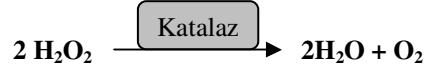
Serbest radikaller çeşitli kimyasal olayların sonucu olarak vücutta sürekli olarak ortaya çıkmaktadırlar. Serbest radikallerin yol açtığı hücre hasarının derecesi, hücre içindeki koruyucu sistemlerin etkinlik derecelerine bağlıdır. Bunun için vücutta serbest radikalleri önleyici, süpürücü özelliklere sahip olan endojen sistemler vardır. Serbest radikallere karşı doğal antioksidan savunma sistemleri arasında SOD, katalaz, glutasyon peroksid ve melatonin vardır. SOD’ un yapısında bakır, çinko ve manganez; GSH-Px’ de ise selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler metaloenzim olarak da adlandırılırlar.

SOD, $O_2^{\cdot-}$ detoksifikasyonunda önemli rol oynayan bir metalloenzimdir.



Enzim, süperoksidi uzaklaştırıcı etkiye sahipken; çok güçlü bir oksidan olan peroksid oluşumuna katkıda bulunacaktır. Katalaz ve glutasyon peroksidaz da H_2O_2 ’ yi detoksifiye ederek, SOD’ u H_2O_2 ’ nin inaktive edici etkisinden kurtarmaktadır.

Katalaz, GSH-Px gibi H₂O₂' i reaktif olmayan ürüne çevirir.



Enzim H₂O₂' ye karşı spesifiktir ve özellikle hücre içi tüm peroksizomlarda bulunur. Glutasyon peroksidazla karşılaştırıldığında daha yüksek konsantrasyonlarda H₂O₂ süpürebilir. Katalaz sirkülasyona giren bir enzim değildir. Plazmadaki yarı ömrü dakikadan azdır.

Tek ve çok moleküllü organizmalar serbest radikallere karşı α -tokoferol (Vit E) ve askorbatla (Vit C) da korumayı sağlamaktadır. α -tokoferol lipide çözülebilir olduğu için kolayca kan-beyin bariyerini geçerek hücre membranlarına girerler ve radikal zincir reaksiyonlarını önlerler. Askorbatın kan-beyin bariyerinden geçişi çok yavaş gerçekleşir. Askorbatın O₂' ve H₂O₂ ile etkileşimi sonucu dehidroaskorbat oluşur. Bunların yanı sıra Vit E, Vit C, β -keroten, şavanoidler, koenzim Q ve Vit A da antioksidan faktörlerdir. Demir taşıyıcı protein olan transferin, laktoferrin ve serüloplazmin vücut sıvılarında demir ve bakırı bağlayarak oksidatif hasarı önlerler.

Oksidatif ortamlarda yaşayan tüm aerobik organizmalar, doğal olarak oksijen radikallerinin etkisi altında kalmaktadır. Oluşan ROS' lar proteinlere, lipidlere, karbonhidratlara ve DNA' ya hasar verebilme yeteneğindedir. Endojen sistemler bazı ksenobiyotiklerin indüklediği hasarı da önlemekte önemli rol oynarlar. Teorik olarak organizmada endojen olarak bulunan savunma sistemleri ekzojen radikal süpürücüler ile desteklenirse oksidatif hasara karşı koruma daha güçlü olur.

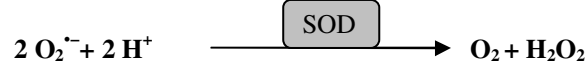
Antioksidanlar, hücreleri oluşturabilecek oksidatif hasara karşı değişik şekillerde koruma özelliklerine sahiptirler. Bunlar; a) Radikal oluşumunu engelleyerek, b) Radikallerin oluşturdukları hasarı azaltarak veya engelleyerek, d) Hasara uğrayan moleküllerin eliminasyonunu arttırarak, e) Hasarlı molekülleri onarıp mutasyonları en aza indirgeyerek olabilir.

Her ne kadar antioksidanlar LPO' nün inhibitörleri ya da zincir kırıcılar olarak adlandırılırsa da aslında daha ayrıntılı savunma ile hücreleri korudukları bir gerçektir. Antioksidanlar, oksijenli ortamdan uzaklaştırarak veya konsantrasyonunu düşürerek; O₂' ve peroksit gibi ana oksijen türevlerini ortadan kaldırarak; singlet oksijeni süpürerek; hidroksil, alkoksil ve peroksil gibi serbest radikalleri temizleyerek ve başlatılmış LPO zincirini kırarak etki gösterirler (22).

2.3.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

A) Süperoksit Dismutaz

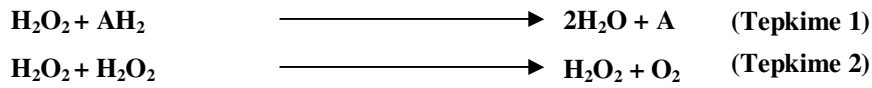
SOD süperoksit anyonunun hidrojen perokside dismutasyonunu katalizler.



SOD ile $\text{O}_2^{\cdot -}$ 'nin dismutasyonu ile H_2O_2 çıkarılması hücre için biyolojik avantaj sağlar. Hücreden H_2O_2 çıkarılması için SOD; katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile birlikte çalışır.

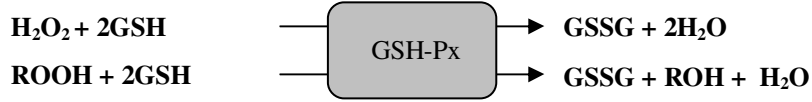
B) Katalaz

Katalaz yapısında hem grubu içerdiğinden bir hemoprotein olarak kabul edilmiştir. H_2O_2 oluşum hızının düşük olduğu durumlarda peroksidatif tepkimeyle (tepkime 1) veya H_2O_2 oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle (tepkime 2) H_2O_2 'i suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır.



C) Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz, hidrojenperoksidlerin indirgenmesinden sorumlu, tetramerik ve 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Birbirine kenetli enzim sistemi GSH-Px ve GSH-Rd glutatyon harcayarak H_2O_2 'nin redüksiyonunu katalizler.

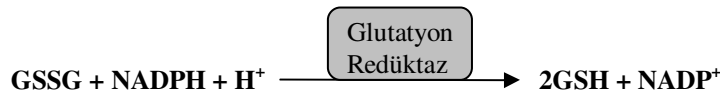


Fosfolipid hidroperoksid glutatyon peroksidaz da (PLGSH-Px) molekül ağırlığı 20.000 dalton olan, monomerik selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksidlerini, alkollere indirger.



Membrana bağlı en önemli antioksidan olan Vit E yetersiz olduğu zaman PLGSH-Px membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlar.

Hidroperoksidlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH' a dönüşür.



GSH-Px' in, fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller.

Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar.

D) Glutation-S-Transferazlar

Glutation-S-Transferaz (GST) 'lar antioksidan aktivitelerine ilave olarak çok önemli başka biyokimyasal fonksiyonlara da sahiptirler. Bu enzimler katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak; yabancı maddeleri glutatyon (GSH)'daki sisteine ait -SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize ederler ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlarlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir veya daha ileri metabolize olurlar. Bu yol, GST' ların kanserojen, mutajen ve diğer zararlı kimyasalların hücre içi detoksifikasyonunda rolleri olduğunu gösterir.

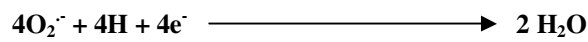
Başta araşidonik asid ve lineolat hidroperoksidleri olmak üzere lipid peroksidlerine karşı GST' lar Se-bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluştururlar.



Metabolize edilmeyen lipofilik-hidrofobik pek çok bileşiği bağlamaları ise bu enzimler için depo ve taşıma rolü üstlendiğini gösterir.

E) Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz

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



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

2.3.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

A) Askorbik Asit (Vit C)

Vit C, suda çözünme özelliği gösterir; ancak lipit peroksidasyonunu başlatan radikallerin etkilerini yok ederek, lipitleri oksidasyona karşı korur.

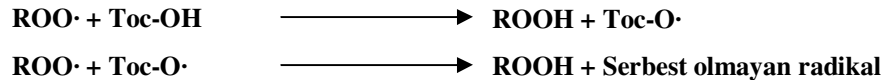
Vit C, antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller. Vit E' nin rejenerasyonunda görev alarak tokoferoksil radikalının α -tokoferole indirgenmesini sağlar.

Vit C, antioksidan etkileri yanında organizmada fenton reaksiyonunda ferri demiri ferro demire indirgeyerek H_2O_2 ' le etkileşmeye uygun olan O_2 ' nin üretimine neden olur.

Bu etkisi sebebiyle askorbik asit aynı zamanda pro-oksidan olarak kabul edilmektedir; fakat bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü daha yüksek konsantrasyonlarda ise güçlü bir antioksidan olarak etki gösterir.

B) α -Tokoferol (Vit E)

α -Tokoferol (Toc) yağda çözünen ve zincir-kırıcı bir antioksidandır. En önemli görevi oksijen serbest radikallerinin ataklarına karşı membran lipidlerindeki yağ asitlerini korumaktır. Mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma membran fosfolipitlerinin α -tokoferole karşı çok yüksek affinitesi vardır. Tokoferoller fenolik bir hidrojeni peroksidasyona uğramış bir doymamış yağ asidindeki serbest peroksit radikaline aktarırlar. Bunun sonucunda serbest radikal zincir reaksiyonları kırılır.



Oluşan serbest α -tokoferol radikali bundan sonra yeni bir serbest peroksit radikaliyle reaksiyona girer. Kroman halkası ve yan zincir şeklindeki serbest olmayan radikal ürününe okside olur. Bu oksidasyon ürünü ikinci konumundaki hidroksil grubu üzerinden glukronik asit ile konjugasyona uğrayarak safra yoluyla atılır.

Tokoferolün antioksidan etkisi yüksek oksijen konsantrasyonlarında etkilidir.

Bundan dolayı en yüksek oksijen kısmi basınçlarına maruz kalan lipit yapılarında örneğin eritrosit ve solunum sistemi membranlarında etkileri belirgindir.

B) Diğerleri

Diğer bazı enzimatik olmayan antioksidanlar ise; β -karoten (Vit A' nın ön maddesi), polifenoller, transferin ve laktoferrin, seruloplazmin, albümin, ürik asit, bilirubindir.

β -karoten, yağda çözünen bir antioksidan olarak serbest radikaller biyolojik hedeflerle interaksyonuna girmeden önce direkt olarak onları yakalayabilir ve aynı zamanda zincir kıran bir antioksidan olarak etki ederek de peroksit radikalleri oluşumunu önler.

Polifenoller, aromatik halkaya bağlı OH grubu içeren etkili antioksidanlardır, çünkü bu bileşiklerden oluşan radikaller, rezonans kararlılığına sahiptir, bu nedenle diğer radikallere göre etkin olmayan radikallerdir.

Transferin, demiri bağlayarak lipid peroksidasyonu ve demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonlarına katılımını durdurur veya yavaşlatır.

Seruloplazmin, oksijen radikal ara ürünleri salınmaksızın Fe^{+2} , yi Fe^{+3} , e oksitler. Seruloplazmin demir ve bakır bağımlı lipit peroksidasyonu inhibe eder.

Albümin, kuvvetli şekilde bakır ve zayıf olarak da demiri bağlar. Aynı zamanda miyeloperoksidaz türevi bir oksidan olan HOCl' i hızlı bir şekilde temizler.

Ürik asit, kuvvetli olarak demir ve bakır bağlama yeteneği vardır. Lipit peroksidasyonunu inhibe etme ve radikalleri temizleme görevine sahiptir.

Bilirubin, yağ asitlerini peroksidasyona karşı koruma görevine sahiptir (24).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Çalışmada Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında rutin olarak kullanılan cihazlardan yararlanılmıştır.

- 1- Santrifüj (Hermle Z300, Selectra)
- 2- Spektroflorometre (Shimadzu UV-1700 MODEL)
- 3- Derin dondurucu (Sanyo, -80°C)
- 4- Hassas terazi (Metler Toledo AB 204-S)
- 5- Dijital pH-metre (Metler Toledo, Seveneasy)
- 6- Otomatik biyokimya analizörü (İntegra 800 Roche)
- 7- Hormon cihazı (Roche E-170)

3.2. Deney Protokolü

Her bir grup 7 adet rattan oluşmak üzere toplam 42 adet rat (Wistar Albino) 6 gruba ayrıldı. Sırasıyla gruplar;

1. Grup: Kontrol grubundaki ratlara herhangi bir müdahale yapılmadan bu gruptaki ratlar standart laboratuvar ortamında 1 ay süreyle beslendi.

2. Grup: Antioksidan grubundaki ratlara sadece antioksidan madde olarak Vit C (20 mg/kg/gün, intraperitoneal) ve Vit E (50 mg/kg/gün, İ.M.) verildi.

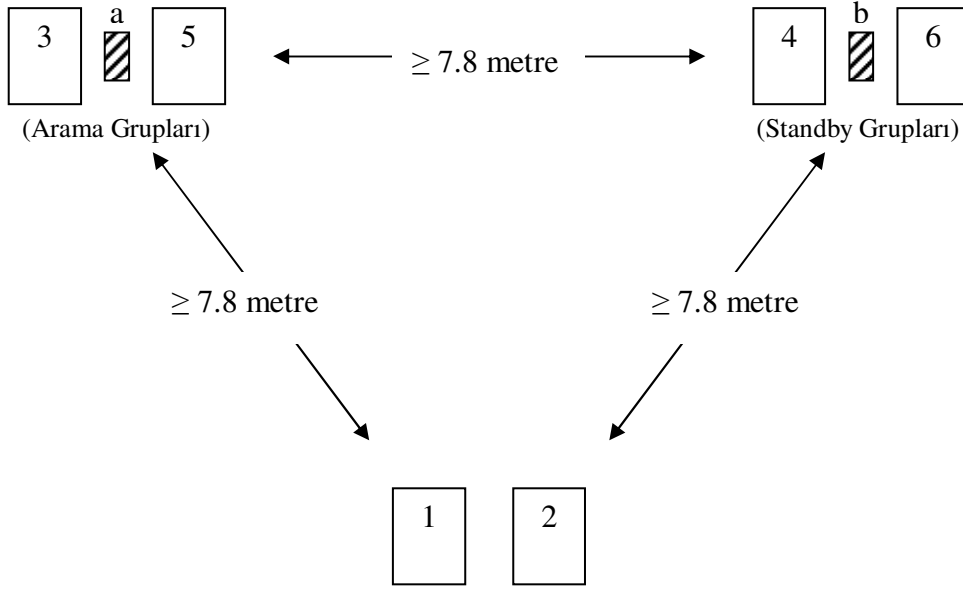
3. Grup: Arama grubundaki ratlar 1 ay boyunca günlük 8 saat süreyle her saat başı 10 dk. aranan ve diğer zamanlarda stand-by konumunda duran cep telefonunun yaydığı elektromagnetik radyasyona maruz bırakıldı.

4. Grup: Stand-by grubundaki ratlar 1 ay boyunca devamlı stand-by konumundaki cep telefonunun yaydığı elektromanyetik radyasyona maruz bırakıldı.

5. Grup: Arama + Antioksidan grubundaki ratlar 1 ay boyunca günlük 8 saat süreyle her saat başı 10 dk aranan ve diğer zamanlarda stand-by konumunda duran cep telefonunun yaydığı elektromanyetik radyasyona maruz bırakılırken, aynı süre içinde bu ratlara ek olarak antioksidan madde olarak Vit C (20 mg/kg/gün, intraperitoneal) ve Vit E (50 mg/kg/gün, İ.M.) verildi.

6. Grup: Stand-by + Antioksidan grubundaki ratlar 1 ay boyunca devamlı stand-by konumundaki cep telefonunun yaydığı elektromanyetik radyasyona maruz bırakılırken aynı süre içinde ek olarak antioksidan madde olarak Vit C (20 mg/kg/gün, intraperitoneal) ve Vit E (50 mg/kg/gün, İ.M.) verildi.

Çalışmada iki adet SAR değeri 1.00 W/kg olan (24) Nokia 8210 cep telefonu ve DCS1800 haberleşme sistemi (Avea) kullanıldı. Telefonlar 1 ay süresince devamlı şarj durumunda tutularak kapanmaları engellendi. 3 ile 5. gruptaki ratlar için ortak bir telefon, 4 ile 6. gruptaki ratlar için ise ayrı olarak ortak bir cep telefonu kullanıldı. Cep telefonuna maruz bırakılan ve bırakılmayan gruplar birbirlerinden en az yaklaşık 7.80 metre uzakta ve ayrı ayrı odalarda tutuldu (Şekil 10).



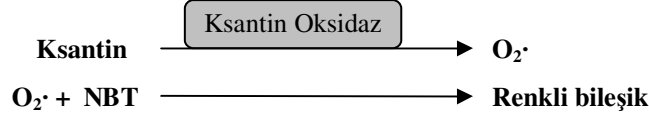
Şekil 10: Deney düzeneğinin şematik gösterimi. 1: Kontrol grubu, 2: Antioksidan grubu, 3: Arama grubu, 4: Stand-by grubu, 5: Arama + Antioksidan grubu, 6: Stand-by + Antioksidan grubu, a: Arama+stand-by konumundaki cep telefonu, b: Stand-by konumundaki cep telefonu

3.3. Yöntemler

1 aylık süre sonunda genel anestezi altında ratların testisleri alınıp testis dokusunda apoptozisi değerlendirmek amacıyla TUNEL yöntemi ve apoptoziste kullanılan antijeni ortaya çıkarmak için Proteinaz K kullanıldı. Ayrıca oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla MDA, SOD, GSH-PX, Katalaz düzeyleri ölçüldü.

3.3.1. Testis dokularında SOD Tayini

Doku SOD aktivitesi, Yi-Sun' un 1988' de tanımladığı, ksantin ksantin oksidaz ile $O_2^{\cdot-}$ oluşturması ve bunun da Nitrotetrazolium Blue (NBT) ile renkli bir bileşik oluşturarak bu renk şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (27). Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar fazla ise $O_2^{\cdot-}$ yi ortadan kaldıracacağı için oluşan rengin şiddeti o kadar az olacaktır.



3.3.1.1. Reaktifler

- Stok ksantin: 3mmol/ L
- NBT: 150 μ mol/L
- Na₂CO₃: 400 mmol/L
- BSA (Bovine serum albumin): 1 g/L
- CuCl₂: 0.8 mmol/L

Ksantin oksidaz (XO) enzim çözeltisi: 1/100 (v/v) 2 M' lık amonyum sülfat çözeltisi ile dilüe edildi.

Kloroform / etanol: 3/5 (v/v)

Reaktif karışımı: 40 ml 10 kat dilüe edilmiş stok ksantin çözeltisi + 20 ml NBT +12 ml Na₂CO₃ + 6 ml BSA karıştırıldı ve 250 ml' ye tamamlandı.

3.3.1.2. Ölçümün Yapılışı:

Dokular distile su ile ½ oranında teflon metal uçlu homojenizatörle homojenize edildi. Süpernatant, kloroform/etanol karışımı ile 1/1 (v/v) oranında karıştırıldı. 5,000 x g' de +4 °C' de 2 saat santrifüj edildi. Enzim aktivitesi tayini ve protein tayini bu süpernatandan yapıldı. Protein miktarları Lowry metodu ile ölçüldü (28).

Tablo 5. Numune ve Kör karışımlarının oluşturulması

	Kör	Numune
Reaktif karışımı	2.9 ml	2.9 ml
Numune	-	50 μ l
Distile su	50 μ l	--
XO çözeltisi	50 μ l	50 μ l

25°C' de 20 dakika inkübasyondan sonra tüplere 0.8 mM CuCl₂' den 1 ml eklendi ve 560 nm' de distile suya karşı okundu.

3.3.1.3. Hesaplama:

$$\% \text{ inhibisyon} = \left(\frac{\text{Kör abs} - \text{Numune abs}}{\text{Kör}} \right) \times 100$$

% 50 inhibisyonu 1 Ü aktivitenin sağladığı düşünülerek hesap yapıldı. SOD enzim tayini sonucu elde edilen sonuçlar protein miktarlarına bölünerek Ü/mg protein olarak verildi.

3.3.2. Testis dokularında Lowry yöntemi ile protein tayini

3.3.2.1. Reaktifler

- % 2' lik Na₂CO₃ içinde 0.1 N' lik NaOH (A)
- % 2' lik Na-K tartarat (B1)
- % 1' lik CuSO₄ (B2)
- Folin Ciocalteu (F.c); 1 hacim F.c. + 1 hacim distile su
- Standart olarak 1 mg/ml BSA kullanıldı.
- C solüsyonu; 0.5 ml B₁ + 0.5 ml B₂ + 16.5 ml A

3.3.2.2. Deneyin yapılışı

Deney tüpleri vortekslendikten sonra, 20 dakika bekletildi. Daha sonra deney tüplerine 200 µl folin çekolte eklenerek iyice vortekslendi ve 40 dakika karanlıkta bekletildi. Tüpler 750 nm' de köre karşı okundu.

Tablo 6. Kör, standartlar ve numune karışımlarının hazırlanış şekli

	BSA	Distile su	C solüsyonu
Kör	-	100 µl	2 ml
Standart-1	10 µl	90 µl	2 ml
Standart-2	20 µl	80 µl	2 ml
Standart-3	40 µl	60 µl	2 ml
Standart-4	80 µl	20 µl	2 ml
Numune	20 µl	80 µl	2 ml

3.3.2.3. Hesaplama

$$\text{Protein miktarı} = \left(\frac{\text{Numune abs}}{\text{Standart abs}} \right) \times \text{Standart konsantrasyonu}$$

Sonuçlar mg/ml olarak elde edildi.

3.3.3. Testis dokularında MDA tayini

3.3.3.1. Reaktifler

- % 0.6' lık TBA (renk için)
- % 1' lik fosforik asit (asidik ortam için)
- % 1.15' lik KCl (doku homojenize esnasında ayırım için)
- n-bütanol

3.3.3.2. Deneyin Yapılışı

% 1.15' lik soğuk KCl' deki % 10' luk doku homojenatlarından 0.5 ml alınıp üzerine 3 ml % 1' lik fosforik asit ve 1 ml % 0.6' lık TBA solüsyonu ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra 45 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Tüpler soğutulur ve 4 ml n-bütanol ilave

edilip karıştırıldı. 3,000 devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra tüpün üst kısmındaki n-bütanol fazı 535 ve 520 nm' de spektrofotometrede okundu. İki absorbans arasındaki fark nmol/gr doku MDA düzeyi olarak kullanıldı (29).

3.3.4. Testis dokularında GSH-Px Tayini

3.3.4.1. Reaktifler

- 50 mM Fosfat Tamponu
- 3.6 mM NaN₃
- 5 mM GSH
- 0.3 mM NADPH
- 0.25 mM H₂O₂
- Glutasyon Redüktaz

3.3.4.2. Homojenatin Hazırlanışı

Dokular 20 mM, pH 7.4, Tris-HCl tamponunda buzlu su banyosu içinde homojenize edildi. Elde edilen homojenat +4 °C 'de 5,000 x g' de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatandan GSH-Px aktivitesi ölçüldü

3.3.4.3. GSH-Px Aktivitesinin Ölçümü

Glutasyon peroksidaz aktivitesi Paglia ve Valentina' nın çift enzim metodunun bir modifikasyonu ile tayin edildi (30).

3.3.4.4. Deneyin Yapılışı

3,6 mM NaN₃, 5 mM GSH ve 0.3 mM NADPH 50 mM Fosfat Tamponu içinde çözülerek reaktif karışımı hazırlandı. 1 ml reaktif karışımı içine 20 µl numune, 10 µl glutasyon redüktaz eklenerek 5 dakika boyunca oda ısısında inkübe edildi. Karışıma 25 µl H₂O₂ ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. 5 dakika boyunca 340 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı. NADPH için molar absorpsiyon katsayısı $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak $\Delta A = a_m \Delta C$ formülüne göre dakika başına okside olan nmol NADPH hesaplandı. Süpernatandan da Lowry metodu ile protein tayini yapılarak glutasyon peroksidaz aktivitesi, µmol/mg protein olarak hesaplandı.

3.3.5. Testis dokularında katalaz Tayini

Aebi metodu ile çalışıldı (31).

3.3.5.1. Reaktifler

- 50 mM pH:7 Fosfat tamponu
- 100 cc Fosfat tamponu + 18.612 mg EDTA' dan oluşan homojenizasyon tamponu

- 17 mM H₂O₂ (0.15 ml H₂O₂ +100 ml fosfat tamponu)

3.3.5.2. Homojenatin Hazırlanışı

100 mg doku 0.9 ml homojenizasyon tamponunda çözülerek Homojenize edildi.

Homojenat 5,000 g' de +4 °C' de 10 dk santrifüj edilerek süpernatandan katalaz çalışıldı.

3.3.5.3. Deneyin Yapılışı

Tablo7. Kör ve numune karışımlarının hazırlanış şekli

	Kör	Numune
Numune	-	10 ul
Distile Su	100 ul	90 ul
H₂O₂	-	2.8 ml
Fosfat tamponu	2.8 ml	-

Fosfat tamponuna karşı H₂O₂ absorbanı 0.450 – 0.550 arasında olmalıdır.

240 nm dalga boyunda 3 dk boyunca okuma yapıldı. Absorbans eğrisinin lineer aralığından hesaplama yapıldı. Sonuçlar katal/mg protein olarak elde edildi.

3.3.5.4. Hesaplama

$$K = (2,3/\Delta t) * [\log(\Delta_1/\Delta_2)]$$

Δt : İlk absorbans ve son absorbansın lineer olduğu aralık (sn)

Δ_1 : İlk okuma absorbans değeri

Δ_2 : Son okuma absorbans değeri

3.3.6. Testis dokularındaki apoptotik hücrelerin tayini

Rat testisleri Bouin solüsyonunda tespit edildikten sonra standart doku takip işlemine alındı ve parafin içerisine gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitler deparafinize ve rehidrate edildikten sonra kesitlerden biri rutin hematoksilin eozin ile boyanırken diğeri germ hücre apoptozisini belirlemek üzere TUNEL yöntemi ile boyandı. Bunun için Takara In situ Apoptosis Detection Kit (Takara Biomedicals, Tokyo, Japonya) kullanıldı. Deparafinize ve rehidrate edilen ve bir süre distile suda tutulan kesitlere oda sıcaklığında 15 dakika süre ile Proteinaz K (20 µg/ml) uygulandı. PBS (phosphate-buffered saline) içerisinde yıkanan kesitler endojen peroksidaz inaktivasyonu için % 3' lük H₂O₂ solüsyonunda tutuldu. Tekrar PBS ile yıkanan kesitler TUNEL reaksiyon karışımı (5 µl TdT-terminal deoxynucleotidyl transferase enzim ve 45 µl reaksiyon solüsyonu) ile ısısı 37 °C' ye ayarlanmış etüv içerisinde nemli ortamda 60 dakika inkübe edildi. Üç ayrı PBS solüsyonunda 5' er dakika yıkanan kesitler Anti-FITC HRP bileşiminde 37 °C' de 30 dakika tutuldu. Üç ayrı PBS solüsyonunda 5' er dakika

yıkanan kesitler oda sıcaklığında 10 dakika DAB (diaminobenzidine) ile renklendirildi. Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapılan kesitler ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Her doku için en az 500 seminifer tubulde apoptotik hücre sayımı yapıldı. Nükleer boyanma pozitif reaksiyon olarak kabul edildi. Değerlendirme için iki ayrı apoptotik indeks kullanıldı.

1. Apoptotik indeks-1 (AI-1) her 100 tubuldeki TUNEL pozitif apoptotik hücre sayısını,
2. Apoptotik indeks-2 (AI-2) her 100 tubuldeki TUNEL pozitif apoptotik hücre içeren tubul sayısı temsil etmektedir.

3.4. İstatistiksel Analiz

Çoklu karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Bu test için $p < 0.05$ bulunması durumunda Mann-Whitney U testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı ve bu durumda anlamlılık sınırı $p < 0,003$ olarak kabul edildi. Kruskal-Wallis testinde $p > 0.05$ saptanması durumunda ise ikili karşılaştırmalar yapılmadı. Analizler SPSS 13.0 kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

MDA ve CAT düzeylerine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Sırasıyla $p=0.243$ ve $p=0.063$, *Kruskal-Wallis*).

SOD düzeylerine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.042$, *Kruskal-Wallis*). SOD düzeylerine göre gruplar arasındaki yapılan ikili karşılaştırmalarda Arama grubu ile Stand-by + Antioksidan grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.002$, *Mann-Whitney U*). Diğer ikili karşılaştırmalarda bulunan farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.003$, *Mann-Whitney U*).

GSH-Px düzeylerine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.000$, *Kruskal-Wallis*). GSH-Px düzeylerinde gruplar arasındaki yapılan ikili karşılaştırmalara göre Kontrol grubu ile Arama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.001$, *Mann-Whitney U*). Kontrol grubu ile Stand-by grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.002$, *Mann-Whitney U*). Antioksidan grubu ile Arama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.001$, *Mann-Whitney U*). Yapılan diğer ikili karşılaştırmalarda bulunan farklar istatistiksel olarak anlamlı değil ($p>0.003$, *Mann-Whitney U*).

AI-1' e göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.001$, *Kruskal-Wallis*). AI-1' e göre gruplar arasındaki yapılan ikili karşılaştırmalarda Antioksidan grubu ile Arama + Antioksidan grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.002$, *Mann-Whitney U*). Antioksidan grubu ile Arama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.002$, *Mann-Whitney U*). Stand-by grubu ile Arama + Antioksidan grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.002$, *Mann-Whitney U*). Stand-by grubu ile Arama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.001$, *Mann-Whitney U*). Yapılan diğer ikili karşılaştırmalarda bulunan farklar istatistiksel olarak anlamlı değil ($p>0.003$, *Mann-Whitney U*).

AI-2' ye göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.001$, *Kruskal-Wallis*). AI-2' e göre gruplar arasındaki yapılan ikili karşılaştırmalarda Arama grubu ile Stand-by grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.001$, *Mann-Whitney U*). Arama ile Kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.002$, *Mann-Whitney U*). Arama grubu ile Antioksidan grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.002$, *Mann-Whitney U*). Yapılan diğer ikili karşılaştırmalarda bulunan farklar istatistiksel olarak anlamlı değil ($p>0.003$, *Mann-Whitney U*) (Tablo 8) (Resim1, Resim 2, Resim3).

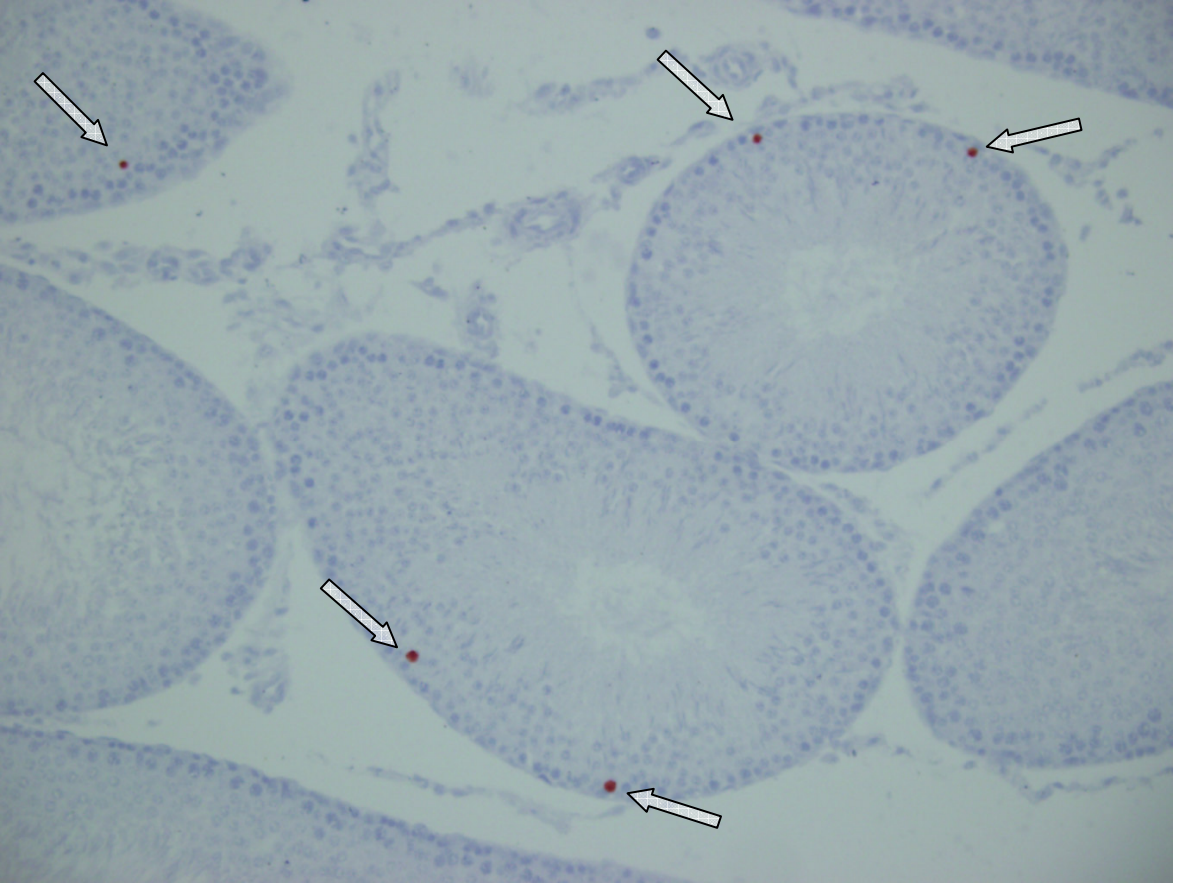
Tablo 8. Gruplara göre parametrelerin karşılaştırılması. Grup I, Kontrol; Grup II, Antioksidan; Grup III, Arama; Grup IV, Stand-by; Grup V, Arama + Antioksidan; Grup VI, Stand-by + Antioksidan. Üstteki değerler, ortalama (SD: Standart sapma); alttaki değerler, ortanca (minimum-maksimum).

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI	p *
MDA	34.62 (10.34) 36.15 (21.54-45.39)	34.95 (5.99) 36.92 (26.92-43.08)	36.81 (6.02) 38.46 (25.39-42.31)	27.69 (7.04) 30.00 (13.85-33.85)	37.95 (9.29) 41.54 (22.31-46.92)	34.29 (5.25) 33.08 (26.15-41.54)	0.243
SOD	33.02 (5.44) 30.76 (27.86-42.19)	36.31 (9.57) 37.38 (25.64-54.79)	32.32 (2.77) ^A 31.64 (28.96-36.34)	32.16 (9.20) 30.91 (17.94-48.81)	29.63 (4.89) 29.20 (24.77-38.44)	25.20 (4.18) ^A 24.49 (20.06-31.19)	0.042
CAT	0.14 (0.03) 0.14 (0.11-0.18)	0.10 (0.02) 0.11 (0.08-0.12)	0.12 (0.03) 0.14 (0.08-0.14)	0.10 (0.02) 0.09 (0.07-0.13)	0.10 (0.02) 0.10 (0.08-0.13)	0.10 (0.01) 0.10 (0.08-0.11)	0,063
GSH-Px	38.28 (18.70) ^{B, C} 40.56 (16.28-61.92)	52.78 (7.79) ^D 47.39 (46.25-65.34)	91.24 (17.99) ^{B, D} 93.57 (68.62-121.36)	76.94 (14.43) ^C 81.72 (60.54-98.04)	60.47 (10.41) 59.32 (47.02-77.95)	69.19 (18.95) 67.98 (47.75-102.41)	0,000
AI-1	3.29 (0.88) 3.43 (2.00-4.50)	2.71 (0.49) ^{E, F} 2.80 (2.00-3.33)	4.77 (0.65) ^{E, G} 4.79 (4.00-5.50)	2.24 (0.86) ^{G, H} 2.30 (1.00-3.70)	4.06 (0.41) ^{F, H} 4.15 (3.45-4.50)	3.40 (1.01) 3.30 (2.20-5.20)	0,001
AI-2	1.80 (0.50) ^I 1.73 (1.10-2.40)	1.71 (0.51) ^J 1.67 (0.20-2.30)	3.04 (0.32) ^{I, J, K} 3.00 (2.60-3.50)	1.51 (0.50) ^K 1.50 (1.00-2.50)	2.49 (0.33) 2.35 (2.18-3.00)	2.18 (0.47) 2.25 (1.33-2.65)	0,001

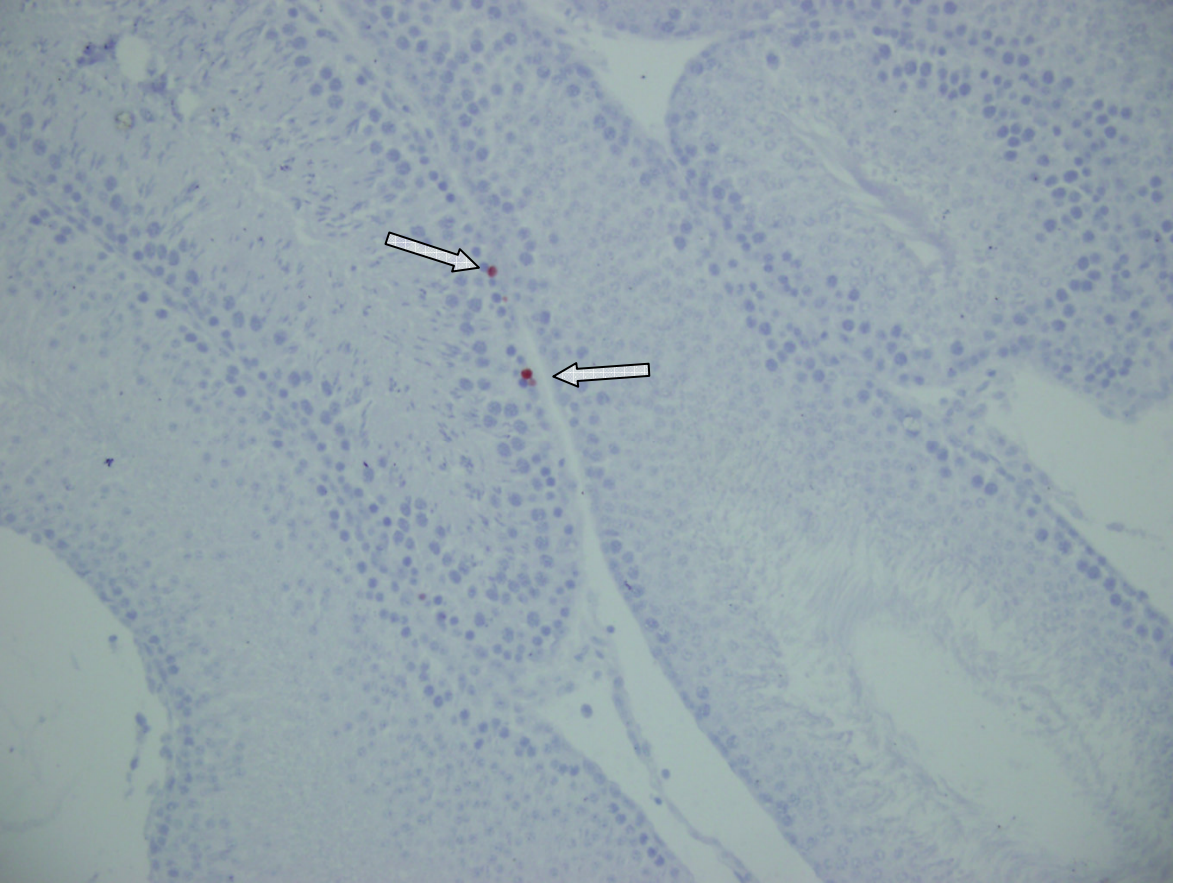
* *Kruskal-Wallis testine göre.*

Mann-Whitney testine göre olmak üzere diğer p değerleri A için 0.002, B için 0.001, C için 0.002, D için 0.001, E için 0.002, F için 0.002, G için 0.001, H için 0.002, I için 0.002, J için 0.002, K için 0.001. P değerleri verilmeyen tüm karşılaştırmalar için p>0.003.

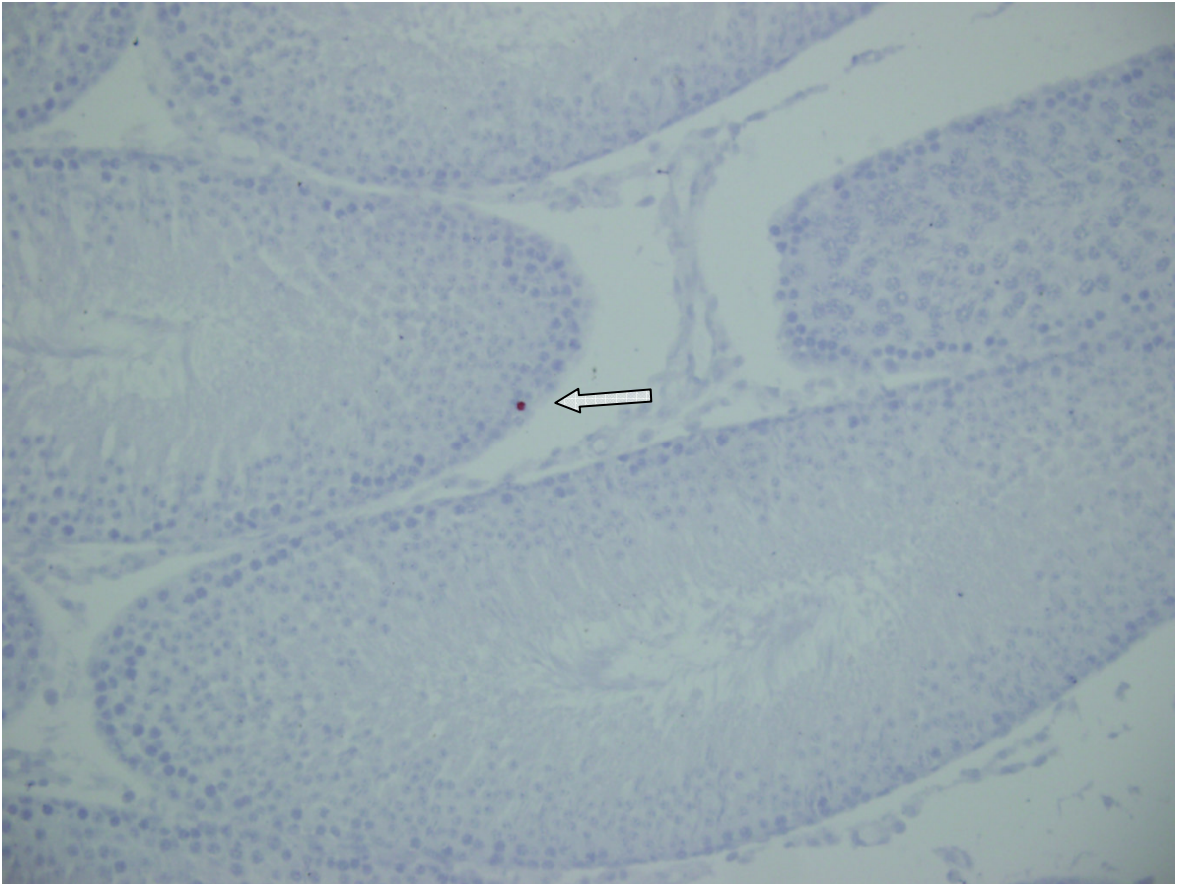
Resim 1. Arama grubundaki bir rata ait testis dokusu (*Oklar, apoptozise giden hücreler, TUNEL, X 400*)



Resim 3. Arama + Antioksidan grubundaki bir rata ait testis dokusu (*Oklar, apoptozise giden hücreler, TUNEL, X 400*)



Resim 3. Kontrol grubundaki bir rata ait testis dokusu (*Ok, apoptozise giden hücre, TUNEL, X 400*)



5. TARTIŞMA

Cep telefonu, baz istasyonu ile iletişimini elektromanyetik radyasyonun bir çeşidi olan RF dalgaları ile sağlamaktadır (8). Bu dalgalar iyonlaştırmayan radyasyon grubunda yer almaktadır. Ortamdaki iyonlaştırıcı olmayan elektromanyetik dalgaların etkisinde kalma sonucunda canlılarda iki tür etki oluşabilir. “Isıl etkiler” ve “ısılmayan etkiler” (7). İnsan vücudu termoregülasyon sistem sayesinde RF dalgalarının ısı etkilerinden korunmakta, RF dalgaları insan vücudunun ısınımlı ısı etkiler oluşturacak kadar arttırmamaktadır (8). Bu nedenle cep telefonunun yaydığı RF dalgasının muhtemel zararlı etkilerini araştıran araştırmacılar daha çok RF dalgalarının ısılmayan zararlı etkileri üzerine yoğunlaşmışlardır (2, 7, 32, 33, 34, 35).

Apoptozis hem patolojik hem de fizyolojik şartlarda oluşabilen bir süreçtir. Temel olarak “intrensek” ve “ekstrensek” olmak üzere iki ayrı yoldan başlatılır. Serbest radikaller ve radyasyon, hücreyi apoptozise götüren muhtemel nedenler arasında yer almakta ve bu iki faktörün apoptozisi intrinsek yoldan üzerinden tetiklediği düşünülmektedir (11).

Çalışmamızda cep telefonunun arama sırasında oluşturduğu RF dalgalarının testis dokusunda apoptozisi istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı (Arama ile Kontrol grubu arasında, $p=0.002$; Arama ile Antioksidan grubu arasında, $p=0.002$) ancak stand-by konumunda arttırmadığı bulunmuştur. Arama grubunda oluşan apoptozis, stand-by grubundakinden önemli derecede fazlaydı ($p=0.001$). Ayrıca arama ve stand-by konumundaki cep telefonunun belirli derecelerde oksidatif stres oluşturduğu da belirlenmiştir. Antioksidanlar ise ne apoptozisi, ne de oksidatif stresi azaltmamıştır.

Cep telefonu ile iletişim sistemlerinde kullanılan RF dalga boyu aralığındaki dalgaların çeşitli dokular üzerinde apoptozisi arttırdığına dair çalışmalar mevcuttur (2, 32).

Bununla birlikte bu çalışmada direk olarak cep telefonunun arama ve stand-by konumları karşılaştırmalı olarak testiküler apoptozis üzerindeki etkisi bildiğimiz kadarıyla ilk olarak çalışılmıştır. Dolayısıyla buradaki deney düzeneğinde arama ve stand-by konumundaki telefonların olası etkileri ayrı ayrı çalışılmış ve genel olarak cep telefonunun bu iki konumda da apoptozise yol açtığı ilk olarak gösterilmiştir.

Güncel olarak cep telefonu ile iletişim sistemlerinde kullanılan RF dalgalarının testis dokusunda apoptozis üzerine etkisini değerlendiren sadece iki çalışma bulunmaktadır (35, 36).

Bu konudaki ilk çalışma Daşdağ ve arkadaşlarının 2008 yılında yayınladıkları çalışmadır. Bu çalışmada araştırmacılar cep telefonu değil bir GSM simülatörü tarafından üretilen 900 MHz RF dalgalarına maruziyetin rat seminifer tübüllerinde spermatogoniyalar üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çalışmada 31 erkek rat 3 gruba ayrılmıştır (kontrol grubu, sham grubu ve EMF' ye maruz kalan grup). EMF grubu 10 ay boyunca 2 saat/gün (7 gün/hafta) 900 MHz RF dalgalarına maruz bırakılmış, Sham grubu ise EMF cihazı kapatılarak EMF grubu ile aynı işleme tâbi tutulmuştur. Kontrol grubuna herhangi bir işlem yapılmamıştır. 10 ay sonra hayvanlar sakrifiye edilerek testisleri alınmış ve apoptozis, çalışmamızdan farklı olarak testis dokularındaki aktif kaspaz-3'ün immunhistokimyasal olarak boyanmasıyla değerlendirilmiştir. Sonuç olarak EMF grubu ile sham ve kontrol grubu arasında herhangi bir istatistiksel fark bulunmamış ve cep telefonunun ürettiği RF dalgalarına maruz kalmanın ratlarda spermiogenezde apoptozise neden olmadığını tespit etmişlerdir (35). Özetle bu çalışma RF üretici olarak bir simulator kullanması, cep telefonu için arama ve stand-by konumlarını karşılaştırmaması ve apoptotik parametre olarak kaspaz-3 boyaması kullanması açılarından çalışmamızdan farklı bir metot kullanmıştır.

Konuyla ilgili ikinci çalışma ise aynı şekilde 2008' de yayınlanmış olan Yılmaz ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmadır. Bu çalışmada yazarlar çalışmamıza benzer şekilde RF üretici olarak cep telefonu kullanmışlar ve cihaz tarafından üretilen 900 MHz RF dalgaların rat beyin ve testis dokularındaki apoptozise olan etkilerini araştırmışlardır. Apoptozis, çalışmamızdan farklı olarak anti-apoptotik bcl-2 protein düzeyinin değerlendirilmesiyle ölçülmüştür. Yılmaz ve arkadaşlarının bu çalışmasında 16 erkek rat sham ve EMF' ye maruz kalan grup şeklinde iki gruba ayrılmıştır. EMF grubu 1 ay boyunca 20 dk/gün (7 gün/hafta) konuşma modundaki cep telefonunun 900 MHz RF dalgalarına maruz bırakılırken sham grubunda cep telefonu kapatılmış, ama EMF grubu ile aynı işleme tabi tutulmuştur. 1 ay sonra hayvanlar sakrifiye edilmiş, testisleri ve beyin dokuları alınarak bcl-2 için immunhistokimyasal olarak boyanmıştır. Sonuç olarak EMF grubu ile sham grubundaki ratların, testis ve beyin dokuları arasında bcl-2 düzeyleri açısından herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir (36). Özetle bu araştırmada RF üretici olarak çalışmamıza benzer şekilde cep telefonu kullanılmakla birlikte stand-by konumundaki apoptotik etki incelenmemiştir. Apoptozis bu çalışmada bizden farklı olarak doku bcl-2 ile ölçülmüştür. Ayrıca ratlar konuşma konumundaki cep telefonuna 1 ay boyunca yaklaşık 600 dakika maruz bırakılırken, çalışmamızda bu süre arama modundaki telefona olmak üzere 1 ay içinde saat başı 10 dakika olmak üzere günde 80 dakika ve ayda

yaklaşık 2400 dakika olmuştur. Yılmaz ve arkadaşlarının çalışmasının tersine araştırmamızda cep telefonunun apoptotik etkiye neden olmasında, cep telefonunu konuşma değil arama modunda kullanmamız, üstelik maruziyet süresinin 4 kat fazla olmasının etkisi olabileceği düşünülmüştür. Bilindiği gibi arama modundaki RF üretimi, konuşma modundakinden yüksek olmaktadır (8).

Bu iki çalışma göz önüne alındığında, çalışmamızda cep telefonunun hem arama hem de stand-by konumunda testiküler apoptozise yol açıp açmadığı ilk kez araştırılmış ve cep telefonunun stand-by konumunda değil ama arama modunda önemli testiküler apoptozis oluşturduğu ilk kez ortaya konulmuştur.

Çalışmamızda cep telefonunun stand-by konumunda iken ürettiği RF dalgalarının testis hücrelerinde apoptozisi arttırmadığı tespit edilmiştir ($p>0.003$). Bu bulgu yukarıda belirtildiği gibi stand-by konumundaki cep telefonun testis dokusundaki apoptotik etkisini değerlendirme bakımından ilk olmaktadır.

Bununla birlikte stand-by konumundaki cep telefonunun testis dışı dokulardaki apoptozise etkisi çalışılmıştır. Nitekim stand-by konumundaki cep telefonunun genel olarak hücreler üzerine apoptotik etkisini değerlendiren tek çalışma 2006 yılında yayınlanan Zhao TY ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmadır. Bu çalışmada araştırmacılar 1,900 MHz RF dalgaları üreten cep telefonun primer nöron ve astrosit kültürlerinde apoptozisle ilgili genlerin ekspresyonunu artırıp arttırmadığını araştırmışlardır. Primer nöron ve astrosit kültürlerini “açık” konumdaki ve “stand-by” konumdaki cep telefonun RF dalgalarına 2 saat maruz bırakmış takiben nöron ve astrositlerdeki kaspaz-2, kaspaz-6 ve Asc gen ekspresyonlarının artışlarına bakmışlardır. Nöronlarda cep telefonu hem “stand-by” hem de “açık” konumda iken artış gözlenmişken astrositlerde sadece “açık” konumda artış gözlenmiştir. Ek olarak astrositler Bax geni düzeyinde de artış tespit etmişlerdir. Sonuç olarak cep telefonunun ürettiği RF dalgalarına kısa süreli maruziyete rağmen beyinden elde edilen hücrelerde apoptotik elemanların arttığı ve nöronların astrositlere göre bu etkiye daha duyarlı oldukları tespit edilmiştir (32).

Bu çalışmalardan farklı olarak ayrıca çalışmamızda apoptotik süreçlerle ilgisi nedeniyle oksidatif süreçler de incelenmiş, ayrıca antioksidanların hem oksidasyona, hem de apoptozise etkileri ortaya konmuştur. Buna göre çalışmamızda antioksidanların, cep telefonun arama sırasında ürettiği RF dalgalarının neden olduğu apoptozisi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmadığı tespit edilmiştir ($p>0.003$). Böylece bulgularımız antioksidanların cep telefonu ile oluşturulmuş apoptozis üzerine etkisini araştıran ve sonuçta antioksidanların apoptozisi düzeltmediğini ortaya koyan ilk çalışma olmaktadır.

Bununla birlikte Daşdağ ve arkadaşları cep telefonunun testiküler etkilerini p53 ve MDA gibi parametrelerle araştırmışlar, ancak herhangi önemli etki saptamamışlardır (37). p53 düzeyinin apoptotik süreçlerdeki rolü dikkate alınacak olursa bu çalışma cep telefonunun testiküler apoptozise neden olmadığını ayrıca aynı şekilde MDA-oksidatif stres ilişkisi nedeniyle herhangi bir peroksidasyon oluşturmadığını zayıf da olsa göstermektedir.

Cep telefonunun testis dışı dokulardaki apoptozis ve oksidatif stres etkileri bazı araştırmacılar tarafından çalışılmıştır. Örneğin Oral B. ve arkadaşları 900 MHz RF dalgalarının rat endometriyum dokularında apoptozis ve oksidatif stresi arttırdığını ve Vit E ve C tedavisinin bu iki parametre üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışmada 24 adet rat; sham grubu, 900 MHz EMF' ye maruz bırakılmış grup (30 dk/gün, 1 ay), 900 MHz EMF' ye maruz bırakılıp ve antioksidan (50 mg/kg İ.M. Vit E ve 20 mg/kg İ.P. Vit C) verilmiş grup olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Bir lipid peroksidasyon indeksi olarak MDA' ya, apoptozis parametreleri olarak Bcl-2, Bax, kaspaz-3 ve kaspaz-8 düzeylerine bakılmıştır. Bu çalışmada EMF grubundaki ve EMF + Vit grubundaki ratların endometriyum dokularında MDA seviyeleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. EMF + Vit grubu ile EMF grubu karşılaştırıldığında ise EMF + Vit grubundaki ratların endometriyumlarındaki MDA miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir. Bu durum Vit E ve C' nin serbest radikalleri yakalayıcı ve antioksidan özelliklerine bağlanmıştır. Yine EMF grubunda apoptotik parametrelerde kontrol grubuna ve EMF + Vit grubuna göre anlamlı olarak artış tespit edilmiştir. EMF ve EMF + Vit grubu karşılaştırıldığında ise EMF grubuna göre EMF + Vit grubunda apoptotik parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edilmiş. Sonuç olarak 900 MHz RF dalgalarının rat endometriyum dokularında apoptozis ve oksidatif stresi arttırdığı fakat Vit E ve C tedavisinin bu değişiklikleri azalttığı tespit edilmiştir (2).

Çalışmamızda cep telefonunun hem arama sırasında hem de stand-by konumundayken oluşturduğu RF dalgalarının testis dokusunda bir antioksidan enzim olan GSH-Px düzeyini istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı bulunmuştur (Arama ile Kontrol grubu arasında, $p=0.001$; Arama ile Antioksidan grubu arasında, $p=0.001$; Stand-by ile Kontrol grubu arasında, $p=0.002$). GSH-Px düzeyindeki bu artışın cep telefonunun hem arama hem de stand-by konumundayken yaydığı RF dalgalarının testis dokusunda oksidatif stresi arttırması ile meydana geldiği düşünülmüştür. Yine çalışmamızda, arama ve stand-by konumundaki cep telefonu tarafından artırılan GSH-Px düzeylerinin

antioksidanlarca düşürüldüğü, ancak bu düşmenin istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur ($p>0.003$).

Çalışmamızda cep telefonu hem arama sırasında hem de stand-by konumundayken testis dokusunda GSH-Px düzeylerinde önemli bir artışa neden olurken ilginç olarak CAT düzeylerinde önemli bir artış oluşturmamıştır ($p=0.063$). Araştırmalara göre düşük konsantrasyonlardaki H_2O_2 'in öncelikle GSH-Px tarafından parçalandığı, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda CAT'in devreye girdiği bulunmuştur (38). Dolayısıyla çalışmamızda cep telefonunun neden olduğu oksidatif stresin, katalazın aktive olmasına yol açacak derecede yüksek bir H_2O_2 düzeyi oluşturmadığı, oluşan oksidasyonun GSH-Px düzeyinde durdurulabildiği düşünülmüştür.

Bilgilerimize göre cep telefonundan kaynaklanan RF dalgalarının testis dokusunda oksidatif stresi arttırıp arttırmadığına dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır ve mevcut çalışma bu konuda da ilk çalışmadır. Fakat Daşdağ ve arkadaşlarının çalışmasında cep telefonunun MDA düzeylerini yükseltmediği, dolayısıyla cep telefonunun oksidatif stresi arttırmadığı zayıf olarak gösterilmiştir. Çünkü bu çalışmada oksidatif stres durumunun tespitinde kullanılan diğer parametreler (SOD, GSH-Px, CAT v.b.) çalışılmamıştır (37). Bununla birlikte cep telefonunun ürettiği RF dalgalarının çeşitli dokular üzerinde oksidatif stresi arttırıp arttırmadığına dair çeşitli çalışmalar mevcuttur (39, 40, 41).

Bu çalışmalardan biri Meral ve arkadaşlarının 2007' de yaptıkları çalışmadır (39). Yazarlar bu çalışmada 900 MHz EMF' ye maruz kalan guinea pigler beyin ve dokularında oksidatif stres etkisine ve kandaki bazı vitaminlerin (Vit A, Vit D₃ ve Vit E) ve oksidatif stres parametrelerinin (MDA, GSH ve CAT) seviyesini araştırmışlardır. Araştırmacılar 14 erkek guinea pigi randomize olarak her grup 7 hayvandan oluşmak üzere iki gruba ayırmışlardır; kontrol ve uygulama grubu. Uygulama grubu 30 gün boyunca günlük 11 saat 45 dk stand-by ve 15 dk konuşma modundaki bir cep telefonun ürettiği 890 ile 915 MHz aralığındaki RF dalgalarına maruz bırakılmıştır. Kontrol grubu, uygulama grubundan ayrı bir odada tutulmuştur. 30 günün sonunda guinea piglerin kanları (intrakardiyak yoldan), beyin dokuları alınmıştır. EMF' ye maruz kalan guinea piglerin beyin dokularında MDA seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı derecede yükselmiş, GSH seviyeleri ve CAT enzim aktiviteleri ise istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış olarak bulunmuştur. Fakat Vit A, D₃ ve E seviyelerinde ise istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunamamıştır. Aynı gruptaki hayvanların kanlarında ise MDA, Vit A, D₃ ve E seviyeleri ve CAT enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artma ve GSH seviyelerinde ise istatistiksel

olarak anlamlı derecede azalma tespit edilmiş. Sonuç olarak cep telefonun ürettiği EMF' nin guinea piglerin beyin dokularında oksidatif stresi arttırabileceği anlaşılmıştır.

Bu konudaki diğer bir çalışma ise Özgüner F ve arkadaşlarının 2005' te yayınlanan çalışmalarıdır. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada ise uzun süre cep telefonundan yayılan 900 MHz EMF' ye maruz kalan retina dokusundaki oksidatif stres üzerine, birer antioksidan olan melatonin ve CAPE (caffeic acid phenethyl ester)' in koruyucu etkisini araştırmayı amaçlamışlardır. Yazarlar 40 adet erkek Sprague–Dawley ratı her grup 10 adet rattan oluşmak üzere 4 gruba ayırmışlardır; 1) Sham, 2) EMR (Electromagnetic radiation), 3) EMR + Melatonin, 4) EMR + CAPE grupları. 2, 3 ve 4. gruplara 60 gün boyunca günde 30 dk bir EMF üreten cihazın ürettiği 900 MHz EMF' ye maruz bırakılmışlardır. Ek olarak EMF' ye maruziyet öncesi 3. gruba antioksidan olarak Melatonin ve 4. gruba antioksidan olarak CAPE verilmiştir. 60 günün sonunda hayvanlar sakrifiye edilerek retina dokuları alınmış. Retinal dokuda oksidatif stres belirleyicileri olarak MDA ve NO bakılmıştır. Antioksidan durumu belirlemek içinde retinal dokuda SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri değerlendirilmiştir. EMR' ye maruz kanatlıların retinal dokularında NO ve MDA seviyelerinde artış saptanırken, melatonin ve CAPE' nin NO ve MDA seviyelerini anlamlı derecede azalttığı tespit edilmiştir. Keza EMR' ye maruz kalan gruptaki ratların retina dokularında SOD, GSH-Px ve CAT seviyelerinde azalma saptanırken melatonin ve CAPE antioksidan enzimlerin aktivitelerinde anlamlı olarak yükselmeye neden olmuştur. EMR' ye maruz bırakılıp melatonin ve CAPE ile tedavi etme SOD, GSH-Px ve CAT aktivitelerini kontrol grubuna göre daha fazla seviyelerde arttırmıştır. Sonuç olarak uzun süre cep telefonun ürettiği 900 MHz' lik EMF' ye maruziyet sonrası retinal dokuda oluşan oksidatif stresi melatonin ve CAPE' nin azalttığı tespit edilmiştir. Bununla beraber bu iki antioksidanın EMR tarafında retinada oluşturulan oksidatif strese karşı etkilerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Rat retinalarında sadece GSH-Px aktivitelerinde fark tespit edilmiştir. Melatonin retinal GSH-Px aktivitesini CAPE' den daha fazla sitümüle etmiştir (40).

Cep telefonu gibi RF dalgaları üretilen EMF oluşturan cihazların testis ve diğer dokularda oluşturacakları muhtemel oksidatif stres, apoptozis ve bu etkilere antioksidan maddelerin koruyucu etkinlikleri hakkında daha ileri araştırmalar gerekmektedir.

6. SONUÇ

Radyo frekans dalgalara maruz kalan dokularda genel olarak belirgin apoptozis artışı bulunurken, oksidatif stres parametrelerinde GSH-Px dışında belirgin değişiklik gözlenmemiştir. Antioksidanlar ise apoptozis ve oksidatif stres üzerinde belirgin bir etki göstermemişlerdir.

Cep telefonunun özellikle arama sırasında yaydığı radyo frekans dalgalarının belirgin oksidatif stres oluşturmadan apoptozise yol açmasının, oksidasyon dışı bilinmeyen diğer bazı apoptotik süreçlere de işaret edebileceği düşünülmüştür. Ayrıca bu yargıyı destekler şekilde cep telefonun neden olduğu apoptozisin antioksidanlarca azaltılamadığı da saptanmıştır.

Sonuç olarak daha geniş serili ve insan çalışmalarına dayanan ileri çalışmalar sonuçlanıncaya kadar cep telefonunun özellikle üretken yaş grubunda stand-by konumundaki biyolojik etkileri açısından dikkat edilmesinin, aranma konumunda uzun tutulmamasının, genel olarak vücuttan uzakta tutulmasının ve radyo frekans dalgalarla çalışmayan iletişim sistemlerin tercih edilmesinin uygun olacağı, yine de biyolojik etkileri az, daha ileri teknolojilerin geliştirilmesinin gerekli olduğu düşünülmüştür.

ÖZET

ANTIOKSİDANLARIN CEP TELEFONU İLE OLUŞTURULMUŞ TESTİKÜLER APOPTOZİS VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİLERİ

Bu çalışmanın amacı, cep telefonunun rat testis dokusundaki apoptozis ve oksidan/antioksidan dengesi üzerine olası etkilerinin, ayrıca bu etkiler üzerine C ve E vitaminlerinin olası koruyucu rolünün belirlenmesidir.

Çalışmada 42 adet erkek Wistar Albino türü rat kullanıldı. Sıçanlar her grupta 7 adet olmak üzere; Kontrol, Antioksidan, Arama, Stand-by, Arama + Antioksidan, Stand-by + Antioksidan olmak üzere altı gruba ayrıldı ve biyokimyasal olarak oksidan/antioksidan değişkenler, patolojik olarak apoptotik indeksler çalışıldı. Çalışmada biri “stand-by” ve diğeri “arama” gruplarında olmak üzere aynı marka ve modelde iki adet cep telefonu kullanıldı.

Bu çalışmada cep telefonunun arama konumunda iken testis dokusunda apoptozisi istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı fakat stand-by konumunda iken artırmadığı gösterildi. Arama konumunda oluşan apoptozis, stand-by konumundakinden önemli derecede fazlaydı. Oksidatif stres ise hem arama, hem de stand-by konumlarında bir dereceye kadar yükselmiş bulundu. Bununla birlikte antioksidanların ne apoptozis, ne de oksidatif stres üzerinde düzeltici bir etkisi gösterilemedi.

Sonuç olarak testiküler apoptozisi arama konumundaki cep telefonunun, oksidatif stresi ise hem arama hem de stand-by konumundaki cep telefonunun arttırabildiği, ayrıca antioksidanların bu iki hasarlanmayı da düzeltemediği bulunmuştur. Çalışmamızda bildiğimiz kadarıyla cep telefonunun testiküler apoptozis ve oksidatif stres üzerindeki etkileri, arama ve stand-by konumları ayrı ayrı ve karşılaştırmalı olarak ilk kez çalışılmış, ayrıca antioksidanların bu iki hasarlanma üzerindeki etkileri ilk kez değerlendirilmiştir. Ayrıca cep telefonunun testiküler apoptozisi arttırdığı ilk kez bu raporda gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Cep telefonu, apoptozis, oksidatif stres, antioksidan, C ve E vitaminleri.

SUMMARY

THE EFFECTS OF ANTIOXIDANTS ON TESTICULAR APOPTOSIS AND OXIDATIVE STRESS PRODUCED BY CELL PHONE.

The aim of the study is to determine the probable effects of cellular phone on apoptosis and oxidative/antioxidative balance in testicular tissue, and probable protective role of vitamins of C and E on these processes.

Forty two males Wistar albino type rats were used in the study. The rats were divided into 6 groups. There were 7 rats in each group (Control, Antioxidant, Calling, Stand-by, Calling plus Antioxidant, Stand-by plus Antioxidant). Oxidant and antioxidant parameters and apoptotic indexes were studied. Two identical cell phones were used in groups of the calling and the stand-by.

In this study it was demonstrated that cell phone significantly increased apoptosis at calling, but not at stand-by position in testicular tissue. Apoptosis produced at calling mode was significantly more excessive than at stand-by mode. Oxidative stress was found as high to some extent at both calling and stand-by position. However no improver effect of antioxidants could be demonstrated on either apoptosis or oxidative stress.

It has been concluded that apoptosis is increased by cell phone at calling mode, but oxidative stress by cell phone at both calling and stand-by mode, and the antioxidants do not improve both injuries as well. In our study, to our knowledge, it has been firstly investigated that the effects of cell phone on testicular apoptosis and oxidative stress at calling and stand-by positions as comparatively and individually, and the effects of the antioxidants on both these two injuries. In addition increasing apoptosis by cell phone has been firstly showed in this report.

Key Words: Cell phone, apoptosis, oxidative stress, antioxidant, vitamins C and E.

KAYNAKLAR

- 1) <http://www.gsmworld.com/index.shtml>
- 2) Oral B, Guney M, Ozguner F, Karahan N, Mungan T, Comlekci S, Cesur G. Endometrial apoptosis induced by a 900-MHz mobile phone: preventive effects of vitamins E and C. *Adv Ther.* 2006 Nov-Dec;23(6):957-73.
- 3) Lee JS, Ahn SS, Jung KC, Kim YW, Lee SK..Effects of 60 Hz electromagnetic field exposure on testicular germ cell apoptosis in mice. *Asian J Androl.* 2004 Mar;6(1):29-34.)
- 4) Khaki AA, Tubbs RS, Shoja MM, Rad JS, Khaki A, Farahani RM, Zarrintan S, Nag TC. The effects of an electromagnetic field on the boundary tissue of the seminiferous tubules of the rat: A light and transmission electron microscope study.*Folia Morphol (Warsz).* 2006 Aug;65(3):188-94.)
- 5) http://en.wikipedia.org/wiki/Motorola_DynaTAC
- 6) <http://inventors.about.com/library/weekly/aa070899.htm>
- 7) Yaykaşlı EO. Cep telefonu radyasyonunun sıçan (*wistar albino*) karaciğer dokusundaki oksidant/antioksidant dengesi üzerine etkisinin incelenmesi. (Yüksek lisans tezi) Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006
- 8) <http://www.biltek.tubitak.gov.tr/sandik/gsm.pdf>
- 9) Özgüner F, Mollaoğlu H. Manyetik alanın organizma üzerindeki biyolojik etkileri. S.D.Ü. Tıp Fak. Derg. 2006;13(1)/ 38-41
- 10) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57.
- 11) Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4):495-516
- 12) http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf
- 13) Doğan AL. Apoptozis ve ürolojik tümörler açısından önemi: Özen H, Türkeri L editörler. Üroonkoloji kitabı. Ankara: Ertem Basım Yayın. 2007; 25-32.
- 14) Tomatır AG. Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T Klin Tıp Bilimleri* 2003; 23:499-508.
- 15) Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:367-401.
- 16) Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci.* 2005 Jan 15;118(Pt 2):265-7.
- 17) Hitoshi Y, Lorens J, Kitada SI, Fisher J, LaBarge M, Ring HZ, Francke U, Reed JC, Kinoshita S, Nolan GP. Toso, a Cell Surface, Specific Regulator of Fas-Induced Apoptosis in T Cells. *Immunity.* 1998 April;8:461-471
- 18) Van Loo G, Van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, Gevaert K, Vandekerckhove J, Declercq W, Vandenabeele P. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ.* 2002 Jan;9(1):20-6
- 19) Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res.* 2004 Oct 15;64(20):7183-90. Review.
- 20) Packham G, Stevenson FK. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology.* 2005; 114:441-449
- 21) Bröker LE, Kruyt FAE, Giaccone G. Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clin Cancer Res.* 2005 May; 11(9):3155-3162
- 22) Aliyev V. Sigara içenlerde oksidatif stres göstergelerinin değerlendirilmesi (Yüksek lisans tezi) Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2006.

- 23) Shoji H, Yamashiro Y, Koletzko B. Oxidative stress and antioxidants in the perinatal period: Packer L, Sies H editors. Oxidative stress and inflammatory mechanisms in obesity, diabetes, and the metabolic syndrome. Boca Raton, London, New York: CRC Press, 2002;71-92
- 24) Aktan E. Benign prostat hiperplazili hastalarda total oksidan ve antioksidan kapasite (Uzmanlık tezi) Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, 2006.
- 25) Demirel ÖÖ. Ratlarda farklı dozlarda uygulanan çinkonun çeşitli dokularda oksidan-antioksidan sisteme etkileri (Uzmanlık tezi) Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 2007.
- 26) <http://www.sarvalues.com/eu-complete.html>
- 27) Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem. 1988 Mar;34(3):497-500.
- 28) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951 Nov;193(1):265-75.
- 29) Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal Biochem. 1978 May;86(1):271-8.
- 30) Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med. 1967 Jul;70(1):158-69.
- 31) Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984;105:121-6.
- 32) Zhao TY, Zou SP, Knapp PE. Exposure to cell phone radiation up-regulates apoptosis genes in primary cultures of neurons and astrocytes. Neurosci Lett. 2007 Jan 22;412(1):34-8. Epub 2006 Dec 21
- 33) Joubert V, Leveque P, Rametti A, Collin A, Bourthoumieu S, Yardin C. Microwave exposure of neuronal cells in vitro: Study of apoptosis Int J Radiat Biol. 2006 Apr;82(4):267-75
- 34) Velizarov S, Raskmark P, Kwee S. The effects of radiofrequency fields on cell proliferation are non-thermal. Bioelectrochem Bioenerg. 1999 Feb;48(1):177-80.
- 35) Dasdag S, Akdag MZ, Ulukaya E, Uzunlar AK, Yegin D. Mobile phone exposure does not induce apoptosis on spermatogenesis in rats. Arch Med Res. 2008 Jan;39(1):40-4. Epub 2007 Aug 20.
- 36) Yilmaz F, Dasdag S, Akdag MZ, Kilinc N. Whole-body exposure of radiation emitted from 900 MHz mobile phones does not seem to affect the levels of anti-apoptotic bcl-2 protein. Electromagn Biol Med. 2008;27(1):65-72.
- 37) Dasdag S, Ketani MA, Akdag Z, Ersay AR, Sari I, Demirtas OC, Celik MS. Whole-body microwave exposure emitted by cellular phones and testicular function of rats. Urol Res. 1999 Jun;27(3):219-23
- 38) Erdoğan F. Metabolik sendromda endotel disfonksiyonu ve ateroskleroz riski arasındaki ilişkinin oksidatif stres ve nitrik oksit metabolizması üzerinden değerlendirilmesi (Uzmanlık tezi) Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 2007.
- 39) Meral I, Mert H, Mert N, Deger Y, Yoruk I, Yetkin A, Keskin S. Effects of 900-MHz electromagnetic field emitted from cellular phone on brain oxidative stress and some vitamin levels of guinea pigs. Brain Res. 2007 Sep 12;1169:120-4. Epub 2007 Jul 17.
- 40) Ozguner F, Bardak Y, Comlekci S. Protective effects of melatonin and caffeic acid phenethyl ester against retinal oxidative stress in long-term use of mobile phone: a comparative study. Mol Cell Biochem. 2006 Jan;282(1-2):83-8.
- 41) Ilhan A, Gurel A, Armutcu F, Kamisli S, Iraz M, Akyol O, Ozen S. Ginkgo biloba prevents mobile phone-induced oxidative stress in rat brain. Clin Chim Acta. 2004 Feb;340(1-2):153-62.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca çok değerli tecrübe, yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren saygıdeğer hocam ve tez danışmanın Sayın Doç. Dr. Doğan Ünal' a ve yine tez araştırmalarımın laboratuvar deneyleri aşamasında samimi destekleri ile yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Cemile KOCA' ya, çok değerli kardeşim Araş. Gör. Dr. Murat AYDIN' a, patoloji preparatların hazırlanmasında ve değerlendirilmesinde büyük emekleri olan Yrd. Doç. Dr. Reyhan Bayrak' a, ratların sakrifiye edilmesi ve dokuların alınması sırasındaki emeklerinden dolayı sevgili kardeşim Araş. Gör. Dr. Mehmet Erol Yıldırım' a teşekkürlerimi sunarım.

Desteklerinden dolayı, sevgili hocalarım, Doç. Dr. Ersin Çimentepe, Yrd. Doç. Dr. Ömer Bayrak ve Yrd. Doç. Dr. Ömer Faruk Karataş' a teşekkür ederim.

Emekleri ile karşılığını ödeyemeyeceğim, bana olan güven ve inançlarını sonsuz hissettiren, tüm dert ve sıkıntılarımın yanımda olan, yorucu tez hazırlama sürecinde sıkıntılara katlanan, beni anlayışla karşılayan, her konuda destek olan, güç veren ve hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan aileme sonsuz saygı ve şükranlarımı sunar, teşekkür ederim.