

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GENEL BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MASTITİSLİ (MEME İLTİHABI) İNEKLERDE KAN
MDA ve GSH DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Haci Ahmet DEVECİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Aysel GÜVEN

2007- KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Hacı Ahmet DEVECİ'nin Yrd. Doç. Dr. Aysel GÜVEN danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı “**Mastitisli (Meme İltihabı) İneklerde Kan MDA ve GSH Düzeylerinin Araştırılması**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy ile kabul edilmiştir.

...../...../2007

Adı ve Soyadı

İmza

Başkan :

.....

Üye :

.....

Üye :

.....

Üye :

.....

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../ 2007 gün ve/.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Vahit ALİŞOĞLU
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışmanın her aşamasında hiçbir zaman yardım ve desteğini esirgemeyen, bilimsel katkı ve önerileri ile bana yol gösteren, çalışmamı yürütme ve sonuçlandırma konusunda olumlu eleştirileri ile beni yönlendiren danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Aysel GÜVEN'e, yapılan arazi çalışmalarında mastitisli hayvanların belirlenmesinde desteklerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Cihan KAÇAR'a ve yüksek lisans eğitimim boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmamın projelendirilmesiyle maddi destek sağlayan Kafkas Üniversitesi Araştırma Fonu (Proje No: FEF- 07)'na teşekkürlerimi sunarım.

Kars-2007

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Serbest Radikaller Hakkında Genel Bilgi	2
2.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri	3
2.1.1.1. Radikaller	4
2.1.1.1.A. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$)	4
2.1.1.1.B. Hidroksil Radikali (OH^{\cdot})	4
2.1.1.2. Non-Radikaller	6
2.1.1.2.A. Hipokloröz asit ($HOCl$)	6
2.1.1.2.B. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	7
2.1.2. Serbest Radikallerin Meydana Gelişi	8
2.1.3. Serbest Radikallerin Kaynakları	10
2.1.3.1. Normal Biyolojik İşlemler	10
2.1.3.2. Oksidatif Stres Yapan Etmenler	10
2.1.3.3. Yaşlanma Süreci	11
2.2. Serbest Radikallerden Etkilenen Hücresel Yapılar	12
2.2.1. Nükleik Asitler ve DNA' ya Etkisi	12
2.2.2. Proteinlere Etkisi	12
2.2.3. Karbonhidratlara Etkisi	13
2.2.4. Lipitlere Etkisi	14
2.3. Lipit Peroksidasyonu	15

2.3.1. Lipit Peroksidasyonunun Mekanizması	17
2.3.1.1. Başlama	17
2.3.1.2. Yayılma	17
2.3.1.3. Sonlanma	18
2.3.2. Biyolojik Sistemlerde Lipit Peroksidasyonunun Sonuçları	20
2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri	21
2.4.1. Endojen Antioksidanlar	22
2.4.1.1. Enzimatik Antioksidanlar	22
2.4.1.1.A. Glutasyon-S-Transferaz (GST)	22
2.4.1.1.B. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	23
2.4.1.1.C. Glutasyon Redüktaz (GSSG-R)	23
2.4.1.1.D. Süperoksit Dismütaz (SOD)	23
2.4.1.1.E. Sitokrom oksidaz	24
2.4.1.1.F. Katalaz (CAT)	24
2.4.1.2. Nonenzimatik Antioksidanlar	24
2.4.2. Eksojen Antioksidanlar	25
2.5. Glutasyon (GSH)	26
2.5.1. Glutasyon Metabolizması	28
2.5.2. Glutasyonun Biyokimyasal Önemi	30
2.5.3. Glutasyona Bağlı Enzim Sistemleri	30
2.5.4. Glutasyonun Tayin Yöntemleri	32
2.5.4.1. Spektrofotometrik Yöntem	32
2.5.4.2. HPLC Yöntemi	32
2.5.4.3. Fluorometrik Yöntem	32
2.6. Mastitis	33
2.6.1. Mastitisin Sınıflandırılması	33
2.6.1.1. Subklinik Mastitis	33
2.6.1.2. Klinik Mastitis	34
2.6.2. Mastitise Neden Olan Faktörler	34
2.6.2.1. Mikroorganizmalar	35
2.6.2.2. Hayvandan Kaynaklanan Faktörler	36
2.6.2.2.A. Meme ve Meme Başı Yaralanmaları	36

2.6.2.2.B. Kalıtım ve Irk	36
2.6.2.2.C. Hayvanın Yaşı	36
2.6.2.2.D. Yüksek Süt Verimi	36
2.6.2.3. Çevresel Faktörler	37
2.6.3. Mastitisin Neden Olduğu Kayıplar	37
2.6.4. Mastitisten Korunma Yolları	38
3. MATERYAL ve METOD	39
3.1. MATERYAL	39
3.1.1. Hayvan Materyali	39
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Aletler	39
3.1.3.Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeleri	40
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	40
3.2. METOD	42
3.2.1. Plazma Lipit Peroksidasyonu (MDA) Tayini	42
3.2.1.1. PrensiP	42
3.2.1.2. Metod	43
3.2.2. Eritrositte GSH Tayini	43
3.2.2.1. PrensiP	43
3.2.2.2. Metod	43
3.2.3. İstatistiksel Hesaplamalar	44
4. BULGULAR	45
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	48
6. KAYNAKLAR	51
7. ÖZGEÇMİŞ	57

ÖZET

Bu çalışmada, mastitisli ve sağlıklı ineklerde kan lipit peroksidasyonu (MDA) ve GSH düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada, Kars ve Ardahan yöresinde değişik köylerde halk elinde yetiştirilen yaşları 3 ile 7 arasında değişen 20 sağlıklı ve 20 mastitisli inek seçildi. Hayvanlardan kan örnekleri alınmadan önce mastitisli olup olmadıkları Kaliforniya Mastitis Testi (CMT) ile belirlendi.

Daha sonra eritrosit GSH ve plazma MDA düzeylerine bakıldı. Sağlıklı ve mastitisli gruplarda eritrosit GSH ($p < 0.001$) ve plazma MDA ($p < 0,001$) düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu.

Sonuç olarak, mastitisin lipit peroksidasyonuna neden olduğu ve bunun sonucunda MDA düzeylerinde bir artışın meydana geldiği, yine aynı şekilde endojen bir antioksidan olan GSH düzeylerinin mastitisli hayvanlarda önemli bir azalmaya uğradığı görüldü.

2007, 65 sayfa

Anahtar sözcükler: İnek, Mastitis, Malondialdehit (MDA), Redükte Glutasyon (GSH), Lipit peroksidasyonu

ABSTRACT

In this study it was aimed to determine the levels of blood lipid peroxidation (MDA) and GSH levels in healthy and mastitic cows.

In this study, 20 healthy and 20 mastitic cows ages between 3 and 7 were selected from different villages in Kars and Ardahan region. Firstly, the animals by California Mastitis Testing (CMT) in order to determine whether they have mastitis or not.

Then, the erythrocyte GSH and plasma MDA levels were determined. The differences between erythrocyte GSH ($p < 0,001$) and plasma MDA ($p < 0,001$) levels between healthy and mastitic groups were found statistically different.

In conclusion, it was found that mastitis resulted in lipid peroxidation and which was measured by caused an increase in the levels of MDA. Similarly, the levels of GSH an endogenous antioxidant caused a significant decrease in mastitic animals.

2007, page 65

Key words: Cow, Mastitis, Malondialdehyde (MDA), Reduced Glutathione (GSH), Lipid peroxidation

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µmol	: Mikromol
nmol	: Nanomol
ml	: Mililitre
°C	: Santigrad derece
ATP	: Adenozin trifosfat
BHT	: Butylated hidroksitoluen
CAT	: Katalaz
CMT	: Kaliforniya Mastitis Testi
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DTNB	: Ditiyobis nitrobenzoik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
GGT	: γ-Glutamil transpeptidaz
GSH	: Redükte Glutasyon
GSSG	: Okside Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
Gly	: Glisin
Cys	: Sistein
Glu	: Glutamat
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HOCl	: Hipokloröz asit
LOO[·]	: Peroksil radikali
LOOH[·]	: Lipit hidroperoksit
LPO	: Lipit peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
OPT	: Oftalaldehit
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
SH	: Sülfidril grubu
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Trikloroasetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa no</u>
Şekil 1. Serbest radikallerin oluşumu	9
Şekil 2. Lipit peroksidasyonunun kimyasal yolu	16
Şekil 3. Biyomembranlarda serbest radikallerin uyardığı lipit peroksidasyonu	19
Şekil 4. Glutatyon (GSH) molekülü	26
Şekil 5. Glutatyon metabolizması	28
Şekil 6. Glutatyon (GSH)'a bağlı enzim sistemleri	31
Şekil 7. Kontrol ve deney gruplarına göre GSH düzeyleri	47
Şekil 8. Kontrol ve deney gruplarına göre MDA düzeyleri	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa no</u>
Çizelge 1. Reaktif oksijen türleri	3
Çizelge 2. Serbest radikallerin endojen ve eksojen kaynakları	11
Çizelge 3. Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri	14
Çizelge 4. Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi	25
Çizelge 5. Kontrol ve deney grubuna ait GSH ve MDA düzeyleri	46
Çizelge 6. Kontrol ve deney gruplarına ait GSH ve MDA değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	47

1. GİRİŞ

Canlılar yaşamlarını sürdürebilmek için oksijene ihtiyaç duyarlar. Yaşam için son derece gerekli olan oksijenin atmosferdeki miktarının biraz artması ya da dış yörüngesine bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron eklenmesiyle bu molekül organizma için toksik etkiye sahip reaktif oksijen moleküllerine dönüşmekte ve serbest radikallerin üretimi artmaktadır [1, 2].

Organizma için oksidatif stres kaynağı olan gebelik, doğum ve laktasyon gibi durumlar plazmada serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca bulaşıcı hastalıklar, stres ve mastitis gibi hastalıklarda da serbest radikal artışı kaçınılmazdır. Serbest radikal artışına paralel olarak lipit peroksidasyonunun son ürünü olan Malondialdehit (MDA) düzeyi de yükselir. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi iç membran özelliklerini değiştirmektedir [1,3].

Organizmada bulunan endojen ve eksojen antioksidanlar reaktif oksijen türlerini toplayarak lipit peroksidasyonunu inhibe eder. Bu antioksidanlardan biri de redükte glutatyon (GSH)'dur. Glutatyon, glutamik asit, sistin ve glisinden ibaret bir tripeptittir. GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek, hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktadır [1].

Süt inekçiliğinde gerek süt üretimi ve kalitesini, gerekse hayvan sağlığını büyük ölçüde tehdit eden hastalıklardan biri olan mastitis; ineklerde meme bezlerinde mikroplar tarafından meydana getirilen iltihabi bir meme hastalığıdır. Hastalık süt veriminin azalması, süt bileşiminin değişimi ve bozulmasının yanında meme loblarında sıcaklık artışı, kızarıklık ve şişkinlik gibi belirtilerle kendini belli eder [4].

Bu tez çalışmasında, yöremizde ilk defa yapılan bir çalışma da olması nedeniyle önemli bir hastalık olan mastitisin ineklerde kan MDA ve GSH düzeylerini nasıl etkilediğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller Hakkında Genel Bilgi

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya birden fazla paylaşılmamış elektron içeren moleküller olup, hem organik hem de inorganik halde bulunurlar. Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime, daima atomların dış orbitallerinde yer alan elektronlar sayesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin reaktivitesini arttırdığı için, serbest radikaller kimyasal aktifliği yüksek moleküllerdir. Serbest radikallerde ortaklanmamış elektron genellikle üst kısma yazılan bir nokta ile gösterilir [5, 6, 7].

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, aerobik canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli olmasına karşın potansiyel olarak toksik bir moleküldür. Serbest radikaller, moleküler oksijeni metabolize eden bütün canlılarda oluşur [8].

Aerobik organizmalarda moleküler oksijenin varlığı ve bunların elektron alma eğilimlerinden dolayı, hücrelerde sürekli reaktif oksijen türleri (ROT) ve bunun sonucu olarak da lipit peroksidasyon ürünleri oluşur. Bu nedenle eritrositler sürekli olarak hücre içi ve hücre dışı serbest radikallere maruz kalırlar. Çünkü poliansatüre (çoklu doymamış) yağ asitlerince zengin olan eritrosit zarları birden çok mekanizma ile sürekli olarak peroksit anyonlarının oluşmasına neden olurken aynı zamanda granülositler, makrofajlar ve metabolik aktif hücrelerde süperoksit anyonları oluşur [9, 10].

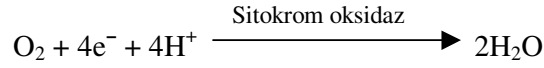
Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aştığı zaman membrandaki yağ asitleri serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Lipit peroksidasyonu, organizmada bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen uzaklaştırılmasıyla başlar ve malondialdehit (MDA) düzeyinin artmasına neden olur [11, 12].

2.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri

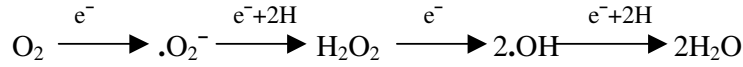
Serbest radikallere aynı zamanda oksidan moleküller ya da reaktif oksijen türleri (ROT) denmektedir. Organizmanın oksijen ihtiyacının artmasıyla mitokondriyal elektron transport zinciri ortaklanmamış elektron çiftinin artışına bağlı olarak reaktif oksijen türleri meydana gelir [1, 12].

Solunum zincirindeki normal ve ROT oluşturan reaksiyonlar aşağıdaki gibidir [13].

a. Normal Fizyolojik Reaksiyon:



b. Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu:



Oksidanlar, ortaklanmamış elektron içerdiklerinden dolayı başka moleküllerle kolayca elektron alışverişi yapabilenler (Radikaller) ve ortaklanmamış elektronları olmadığı halde başka moleküllerle, radikallerden daha zayıf bir şekilde bileşenler (Non-radikaller) olmak üzere iki grupta toplanmaktadırlar [14, 15].

Çizelge1. Reaktif Oksijen Türleri [16].

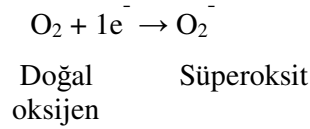
RADİKALLER	NON-RADİKALLER
Süperoksit radikali (O_2^\cdot)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikali (OH^\cdot)	Lipit hidroperoksit (LOOH)
Peroksil radikali (ROO^\cdot)	Hipokloröz asit (HOCl)
Alkoksil radikali (RO^\cdot)	N-Halojenli aminler (R-NH-X)
Semikinon radikali (HQ)	Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	Ozon (O_3)
	Azotdioksit (NO_2)

2.1.1.1. Radikaller

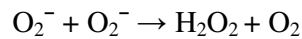
2.1.1.1.A. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$)

Moleküler oksijen (O_2), birer elektronu eksik iki oksijen atomundan oluşmuştur. Ancak bu molekülün reaktif bir özelliği yoktur. Çünkü her iki atom da denge halindedir. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$) meydana gelir [1, 14].

Süperoksit radikali bir oksitleyici gibi davranarak bir elektron daha alabilir. Böylece oluşan peroksi anyonu ortamdaki iki proton alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturabilir. Süperoksit radikali aldığı elektronu başka bir elektron alıcıya vererek tekrar oksijene oksitlenebilir. Böylece bir indirgeyici (redüktör) olarak davranabilir. Süperoksit bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit hem redüktan hem de oksidandır [1].

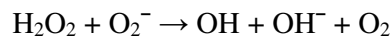


İki süperoksit radikali birbiri ile etkileşerek, biri oksitlenirken diğeri indirgenir ve böylece H_2O_2 ve O_2 meydana gelir. Süperoksit radikalının ortamdaki temizlendiği bu tepkimeye *dismütasyon tepkime* denir.



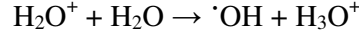
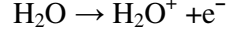
2.1.1.1.B. Hidroksil Radikali (OH^{\cdot})

Hidrojen peroksitin, süperoksit ile indirgenmesi sonucu oluşur. Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir [17].

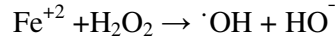


Hidroksil radikalinin yapımına neden olan önemli tepkimeler şunlardır [17].

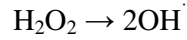
a) İyonlaştırıcı radyasyonun suya etkisi:



b) Fenton tepkimesi:

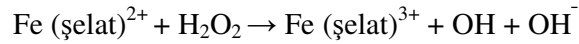
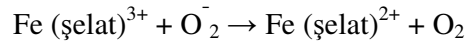


c) Hidrojen peroksidin fotolizi:

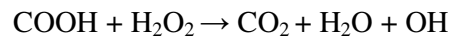


d) Ozona elektron transferi ile OH oluşabilir. Bu nedenle ozon toksisitesinde OH'ın önemli rolü vardır.

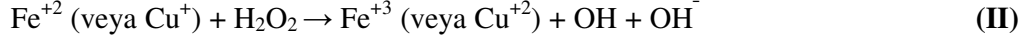
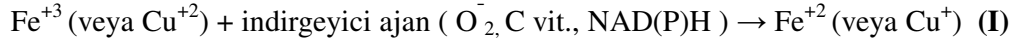
e) İnvivoda OH üretimi bakımından en önemli tepkime Haber-Weiss tepkimesidir. İnvivoda O_2^- radikalinin H_2O_2 ile OH üretmesi şelat yapmış demir tarafından katalizlenir.



f) Radikal tepkimeleri sonucu oluşabilen bir organik radikal, H_2O_2 ile tepkimeye girerek OH üretebilir.



Hidroksil radikalinin mekanizması ise iki reaksiyon sonucunda gerçekleşir.



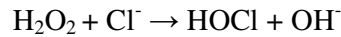
Görüldüğü gibi $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalinin elektron verici olduğu tepkime Haber-Weiss tepkimesi dışında da biyolojik moleküller metal iyonlarını indirgeyerek H_2O_2 varlığında OH yapımını sağlarlar [18].

Hidroksil radikali en reaktif ve en zarar verici oksidan radikaldır. Su dahil ortamda rastladığı her molekül ile tepkimeye girer. Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. Hücre zarı su içermediğinden OH^{\cdot} in başlıca hedefi yağ asididir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir [6, 19].

2.1.1.2. Non-Radikaller

2.1.1.2.A. Hipokloröz asit (HOCl)

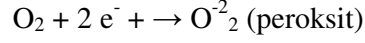
Hidrojen peroksit molekülünün bir klor atomu (Cl) ile reaksiyona girmesi sonucu hipokloröz asit oluşur



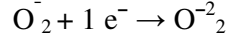
HOCl, fagositik hücreler tarafından bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynar. Aktive olan nötrofiller, monosit, makrofajlar ve eozinofiller $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalini üretirler. Radikal üretimi fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde büyük önem arz eder. Özellikle nötrofiller içerdikleri myeloperoksidaz enzimi aracılığıyla $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin dismütasyonuyla H_2O_2 'i klorür iyonu ile birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'e dönüştürür [20, 21].

2.1.1.2.B. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

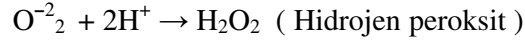
Oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur



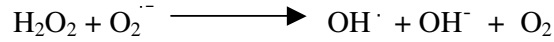
veya



Peroksit molekülü, iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksiti meydana getirir.



H₂O₂, hücre membranlardan kolay geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Yüksüz ve boyutlarının küçük olması biyolojik membranlardan geçişini kolaylaştırır. Kendisi bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Geçiş metal iyonları varlığında daha da hızla gerçekleşen bir reaksiyonla süperoksit anyon radikali ile birlikte en reaktif ve en zarar verici serbest radikal olan hidrosil radikaline kolayca yıkılabilir [1, 16, 22].



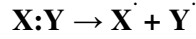
Bu reaksiyona Haber- Weiss reaksiyonu adı verilir. Haber- Weiss reaksiyonu katalizörlü veya katalizörsüz oluşabilir. Fakat katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerlerken, demir gibi geçiş metalleri ile katalizlenen ikinci şekli ise oldukça hızlıdır [1].

Peroksizomlar çok önemli hücre içi H₂O₂ kaynağıdır. Bu organeldeki D- amino asid oksidaz, urat oksidaz, L- hidrosil asid oksidaz ve yağ asidi açıl- CoA oksidaz gibi oksidazlar süperoksit üretmeden bol miktarda H₂O₂ üretimine sebep olurlar. Fakat peroksizomlarda katalaz aktivitesi çok yüksektir. Bu sebeple bu organelden sitozole ne kadar H₂O₂ geçtiği bilinmemektedir [1].

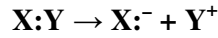
2.1.2. Serbest Radikallerin Meydana Gelişi

Serbest radikaller 3 yolla meydana gelir [1, 4].

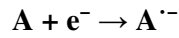
1. Kovalent bağların homolitik kırılması ile: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır ise, her iki atom üzerinde ortaklanmamış elektron kalır ve iki tane yüksek reaktiviteli serbest radikal oluşur.



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi ile: Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalırlar. Böylece serbest radikaller değil, iyonlar meydana gelir.

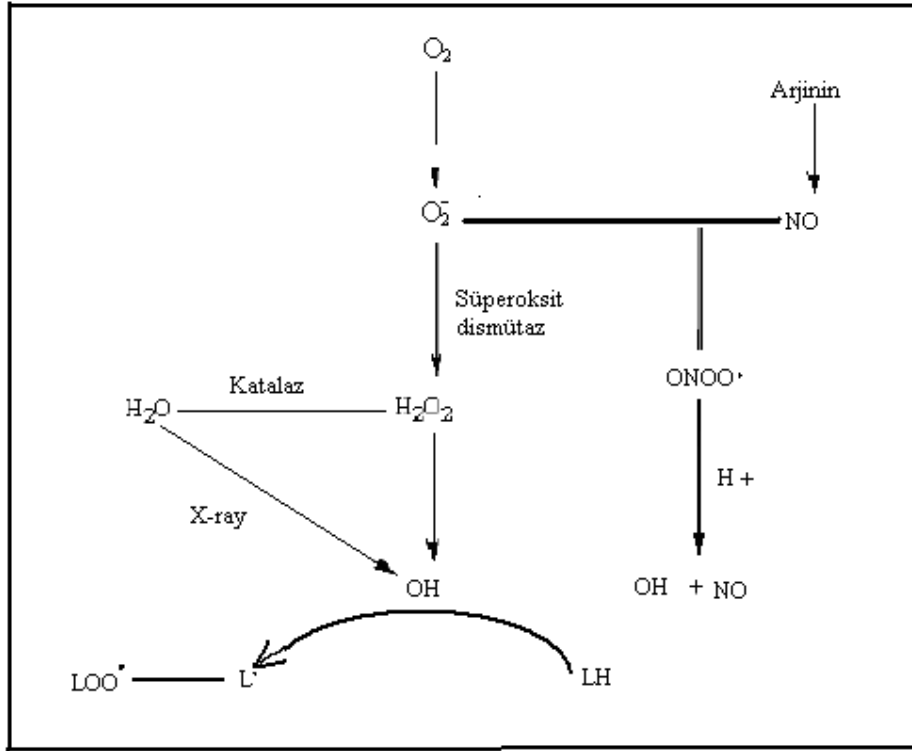


3. Normal bir moleküle tek bir elektron transferi ile: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek bir elektron transferi ile dış orbitalinde ortaklanmamış elektron kalıyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olur. Moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi sonucu oluşan süperoksit bu mekanizma ile meydana gelir.



Biyolojik sistemlerde elektron transferi sonucu oluşan serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral özelliindedir. Bunlar organik ve inorganik moleküller şeklinde olabilirler. Cu^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+2} ve Mo^{+5} gibi geçiş metalleri ortaklanmamış elektrona sahip olduklarından, serbest radikallerin oluşumunda etkin rol oynarlar. Ayrıca hücre içi kalsiyumun artışı ile oksidan enzimler aktive olup lipid peroksidasyonu ve protein dekarboksilasyonu uyarılmakta ve sonuçta oksidanların oluşumu artmaktadır [1].

Oksijen atomunun dış yörüngesini oluşturan p orbitalinde iki elektron eksik olmasından dolayı "*Diradikal*" olarak değerlendirilir. Bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. Radikal olmayan maddelerle ise yavaş reaksiyona girer. Oksijen metabolizmada en son suya indirgenirken, kısmi olarak indirgenmesiyle de çok sayıda reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Oksijen bu kararsız yapısını giderebilmek için başka bir oksijen atomunun dış yörüngesindeki iki elektronu kullanarak "Oksijen Radikalleri"ni oluşturur [16, 23].



Şekil 1. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu [23].

Bu reaktif maddeler bazı biyolojik molekülleri hasara uğratabilirler. Etrafındaki moleküller ile reaksiyona girerek onlardan elektron alıp kararlı hale gelirler. Reaktif oksijen türleri maruz kalınan miktar ve süreye bağlı olarak hücre fonksiyonlarının bozulmasına neden olurlar [2, 16].

2.1.3. Serbest Radikallerin Kaynakları

Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu, normal metabolik olayların seyri sırasında meydana gelebildiği gibi organizmada bazı yabancı maddelerin (ksenobiyotikler) metabolize edilmesi sırasında ve organizmanın radyasyon gibi dış etkenlere maruz kalmasıyla da meydana gelebilir. Serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir [1, 14].

Temel olarak serbest radikallerin kaynakları aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır [14, 24].

2.1.3.1. Normal Biyolojik İşlemler

- a.** Oksijenli solunum
- b.** Katabolik ve anabolik işlemler

2.1.3.2. Oksidatif Stres Yapan Etmenler

- a.** İskemi-hemoroji-travma, radyoaktivite- entoksikasyon
- b.** Ksenobiyotik maddelerin etkisi
 - Alışkanlık yapan maddeler
 - İn hale edilenler
 - İlaçlar
- c.** Stres ile artan katekoleminlerin oksidasyonu
- d.** Fagositik enflamasyon hücrelerinde salgılanma
- e.** Uzun süreli metabolik hastalıklar
- f.** Diğer nedenler (sıcak, soğuk, güneş ışınları)

2.1.3.3. Yaşlanma Süreci

Serbest radikallerin düzeyi yaşlanma süreci ile paralel bir artış gösterir. Yaşlanma ile protein karboksilasyonunun artışı ve katalize edici tüm enzimlerin azalmasının bu dengesizlikte önemli rolleri vardır. Serbest radikallerin yaşlanma sebebi mi, yoksa sonucu mu olduğunu söylemek oldukça zordur. Ancak serbest radikallerin en azından başlamış olan yaşlanma olayını hızlandırdıkları ve yaşlanma ile beraber ortaya çıkan birçok hastalığın fizyopatolojisinde önemli rol oynadıkları söylenebilir [25, 26].

Diğer bir sınıflandırmada ise doğada serbest radikallerin endojen ve eksojen olmak üzere iki temel kaynağı olduğu belirtilmektedir [16, 27].

Çizelge 2. Serbest radikallerin endojen ve eksojen kaynakları [27].

Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
*Mitokondriyal elektron transport zinciri	*İlaç oksidasyonları (Örn:Parasetamol, CCl ₄)
*Kloroplast elektron transport zinciri	*İyonize radyasyon
*Oksidan enzimler: -Ksantin oksidaz -İndolamin dioksijenaz -Triptofan dioksijenaz -Galaktoz oksidaz -Siklooksijenaz -Lipooksijenaz -Mono aminooksidaz	*Güneş ışığı *X- ışınları *UV- ışınları *Isı şoku
*Fagositik hücreler: -Nötrofiller -Monosit ve makrofajlar -Eozinofiller -Endotelial hücreler	*Glutatyon okside eden maddeler *Ortam havası -Sigara dumanı -Ozon -Kükürtdioksit -Egzoz gazları
*Oto-oksidasyon reaksiyonları (Fe ⁺² , epinefrin)	

2.2. Serbest Radikallerden Etkilenen Hücresel Yapılar

Serbest radikaller savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranda oluştuğları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Serbest radikaller hücrelerin; DNA, lipit, protein, karbonhidrat ve enzim gibi önemli biyomoleküllerin tüm sınıfları ve tüm hücre bileşenleri ile etkileşme özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olurlar [22, 28].

2.2.1. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkisi

İyonize edici radyasyonlarla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açar. Sitotoksite büyük ölçüde nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine ve DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Başta hidroksil radikali olmak üzere oksidan maddeler, nükleik asit bazlarının modifikasyonuna ve DNA şeridinin kırılmalarına neden olmaktadır. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek DNA zincirinde kırılmaların yanı sıra DNA polimerazın inhibisyonuna neden olur. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçer ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hücre ölümüne yol açar. Bu yüzden DNA, serbest radikal hasarından kolayca zarar görebilen önemli bir hedeftir. Oksidatif hasardan en fazla etkilenen mitokondrial DNA'dır. Yaşlı insanlarda mitokondrial DNA'nın fazla miktarda hasara uğradığı gösterilmiştir [28, 29].

2.2.2. Proteinlere Etkisi

Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenme dereceleri aminoasit dizilimine bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, methionin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Örneğin, aminoasit içeren paparin ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz enzimleri

serbest radikallerle karşı karşıya kaldıklarında inhibe olurlar. Özellikle bu moleküller serbest radikallerle reaksiyona girerek sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu reaksiyonlar sonucunda immünoglobulin G (Ig G) ve albumin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler [1, 28].

Oksidan maddeler proteinlerde dekarboksilasyona, peptid bağlarının hidrolizine, disülfid bağları ve çapraz bağlar oluşturarak hücre içi esansiyel olan Ca-ATPaz, Na/K ATPaz gibi enzimlerde fonksiyon kaybı sonucu hücre içi ve hücre dışı iyon dağılımının bozulmasına neden olur. Ayrıca enzimler de protein yapıda olduklarından dolayı serbest radikaller enzim aktivitelerinde değişikliklere neden olurlar [1, 12].

2.2.3. Karbonhidratlara Etkisi

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerinde de önemli etkileri vardır. Oksidan maddelerin karbonhidrat metabolizması üzerine etkisi, glikolitik ATP sentezinin azalması ve ATP kullanımının artması yönündedir. Monosakkaritlerin ootoksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehidler meydana gelir. Bunlar diyabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklarda önemli rol oynarlar. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki göstererek kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar [1, 12].

Oksidatif stres, diyabet ve diyabetin daha sonraki komplikasyonlarının patogeneğinde önemli bir rol oynar. Özellikle iyi kontrol edilemeyen diyabette oksidatif aktivitenin artması sonucu serbest radikal oluşumun arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kaldığı bildirilmiştir [30].

Yapılan bir araştırmaya göre diyabetiklerde plazma ve eritrosit lipit peroksit düzeylerinin sağlıklı kişilere göre anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir [31].

2.2.4. Lipitlere Etkisi

Bütün biyomoleküller serbest radikallerden etkilenirler. Fakat lipitler serbest radikallere karşı en hassas olanlarıdır. Organizmada en çok görülen serbest radikal hasarı lipit peroksidasyonu şeklinde olup, membranda doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen çıkmasıyla lipit (L.) radikali oluşur ve zincir şeklindeki reaksiyonların sonunda sitotoksik ürünler olan aldehitler ayrıca pentan gibi hidrokarbon gazları meydana gelir. Bu toksik ürünlerden aldehitlerin en son basamağında yer alan malondialdehit (MDA) ise lipit peroksidasyonunun saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [32, 33].

Serbest radikallerin oluşumu hücredeki antioksidan savunma sistemlerini aşarsa, membrandaki yağ asitleri serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup, hücrenin diğer bölümlerine hasar yayarlar. Böylece birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olurlar. Orotik asit, etanol ve fosfor tarafından meydana getirilen karaciğer hasarını lipit peroksidasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [34, 35].

Çizelge 3. Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri [2].

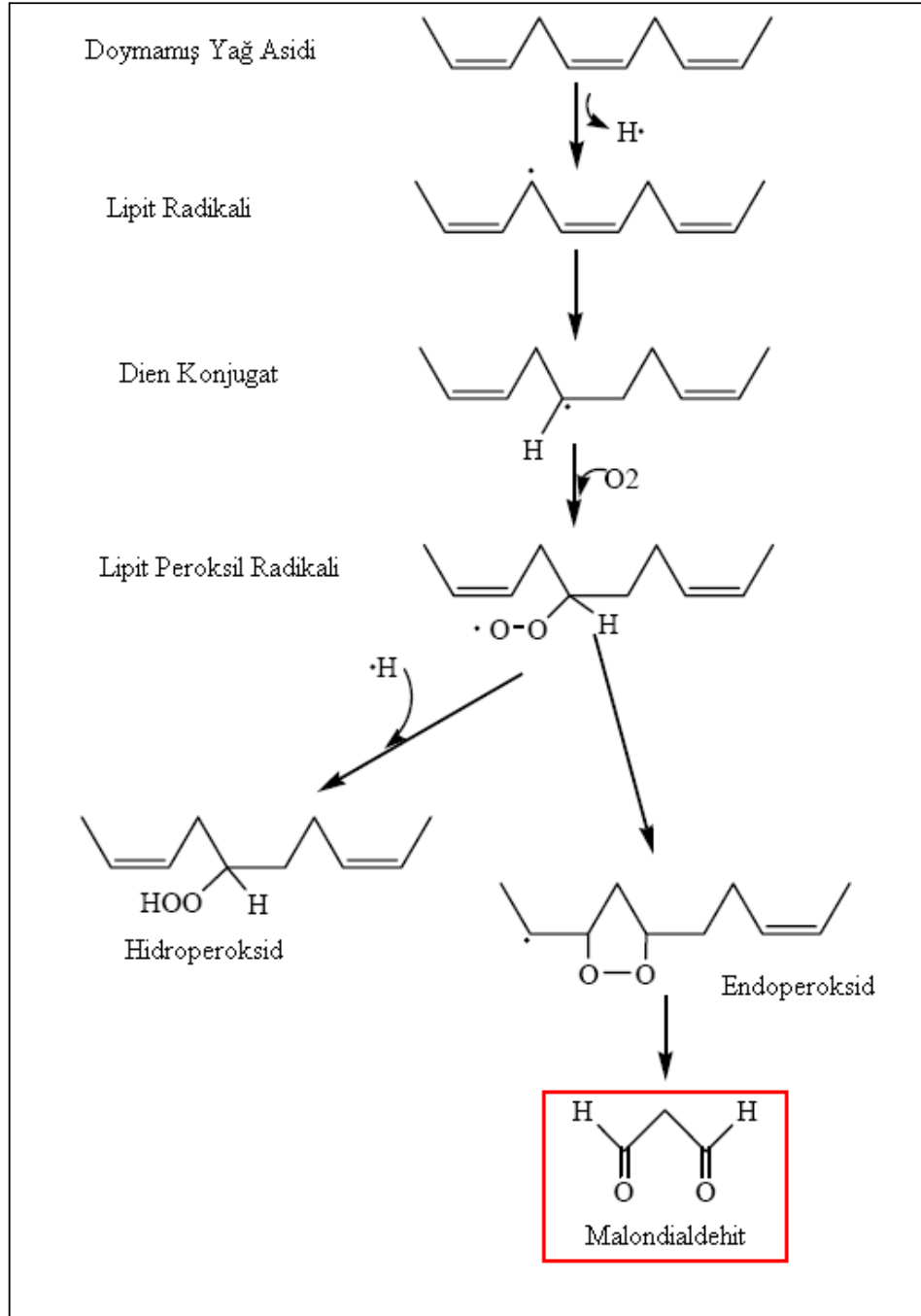
Doymamış yağlar	<ul style="list-style-type: none">• Kolesterol ve yağ asitlerinde oksidasyon• Lipitlerde çapraz bağlanmalar• Organel ve hücrelerde çapraz bağlanmalar
Karbonhidratlar	<ul style="list-style-type: none">• Polisakkaritlerin depolimerizasyonu
Proteinler	<ul style="list-style-type: none">• Peptid zincirlerinde kopma• Denatürasyon
Kükürtlü aminoasitler	<ul style="list-style-type: none">• Protein denatürasyonu ve çapraz bağlanma• Enzimlerde inhibisyon
Nükleik asitler	<ul style="list-style-type: none">• Tek ve çift iplik kırılmaları• Proteinlerde çapraz bağlar• Baz içermeyen bölgeler
Nükleik asit bazları	<ul style="list-style-type: none">• Hidroksilasyonlar• Mutasyonlar, kimyasal modifikasyonlar• Şekerlerde benzer reaksiyonlar

2.3. Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu bir zincir reaksiyonu olup, daha ileri peroksidasyonu başlatan serbest radikaller için devamlı bir kaynak sağlar. Lipit peroksidasyonu; fosfolipit, glikolipit, gliserid ve steroidlerin yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin oksidan maddeler aracılığıyla alkol, aldehit, hidroksi asit, etan ve pentan gibi ürünlere yıkılmasını kapsayan, potansiyel olarak yıkıcı etkileri olan zincir reaksiyonudur. Bu şekilde meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür [1, 12].

Serbest oksijen gruplarının dokulara yönelik olarak meydana getirdikleri hasar ve bunların önemli sonuçlarından biri olan lipit peroksidasyonunun şiddetini belirleyen en önemli kriterlerinden biri malondialdehit (MDA) düzeylerinin tespit edilmesidir. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir. Fakat lipit peroksidasyonunun derecesiyle iyi ilişki gösterir. Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan MDA kan plazmasında kolaylıkla teşhis edilebilmekte olup, oksidatif stres ölçümlerinde kullanılır. Ayrıca MDA plazmada çözünür olduğundan idrarda da saptanabilir [1].

Üç yada daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu, malondialdehit (MDA) üretimiyle sonuçlanmaktadır. Membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olan MDA; deformabilite, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzeyindeki belirleyicilerin kümeleşmesi gibi iç membranın bazı özelliklerini değiştirmektedir. Ayrıca diffüze olabildiğinden DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilmektedir. MDA bu özelliklerinden dolayı mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir [1, 36].



Şekil 2. Lipit peroksidasyonunun kimyasal yolu [37].

2.3.1. Lipit Peroksidasyonunun Mekanizması

Biyolojik membranlarda serbest radikallerle uyarılan lipit peroksidasyonu Başlama, Yayılma ve Sonlanma reaksiyonları olmak üzere üç aşamada gerçekleşir [38].

2.3.1.1. Başlama

Peroksidasyon, serbest radikallerin doymamış yağ asitlerinin yan zincirindeki metilenik karbonlardan hidrojen atomu çıkartmak için yaptıkları atakla başlar. Demir ve bakır gibi eşlenmemiş elektronlara sahip olan geçiş iyonlarının varlığı peroksidasyonun başlaması için gereklidir. Hidrojen atomunun zincirden çıkarılması karbon atomu üzerinde eşlenmemiş bir elektron bırakır ve karbon merkezli radikal (L.) oluşumuna yol açar. Aerobik hücrelerde sık görülen bu olay radikallerin moleküler düzenlenme ile konjuge dien şekline çevrildikten sonra moleküler oksijenle reaksiyona girerek peroksi radikalini (LOO.) üretmesidir.

2.3.1.2. Yayılma

Bu peroksi radikali diğer bir peroksi radikali ile birleşir ya da membran proteinleri ile etkileşebilir. Fakat en önemlisi peroksi radikallerinin membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomu çıkarabilmeleri ve peroksidatif zincir reaksiyonu yaymalarıdır. Böylece yan zincirlerden hidrojen atomunun çıkarılması ile her defasında lipit hidroperoksitleri (LOOH) ve yeni bir peroksi radikali oluşmaktadır. Peroksidasyon, bir kere başladıktan sonra otokatalitik olarak yayılabilmekte ve yüzlerce yağ asidi zincirleri lipit hidroperoksitlerine çevrilebilmektedir.

Yayımla zincirinin uzunluğu birçok faktöre bağlıdır;

1. Membrandaki lipit/protein oranı: Membran proteini ile etkileşen radikalın şansı membranın protein içeriği arttıkça yükselir.

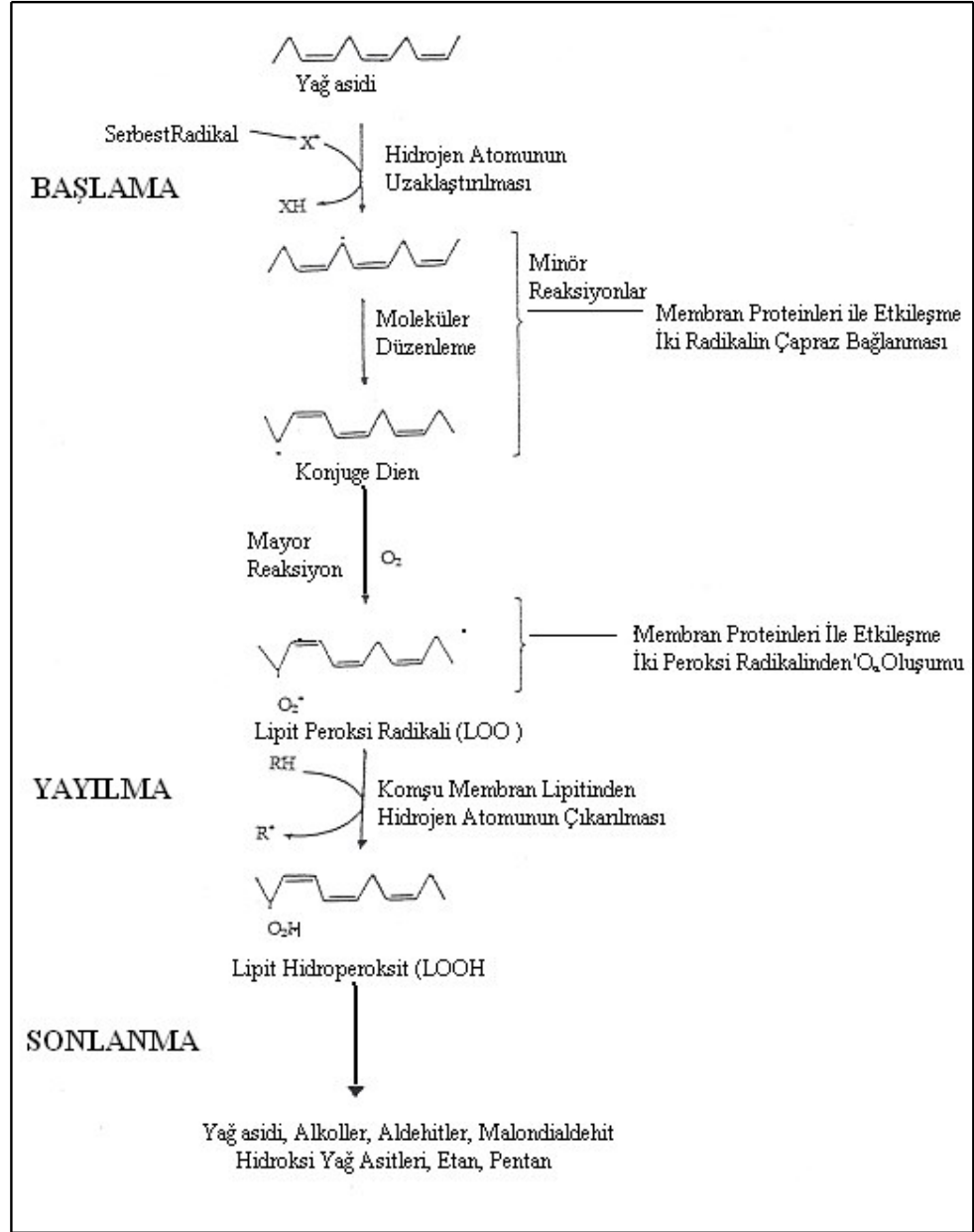
2. Yağ asidi bileşimi radikalın membranda doymamış yağ asidi içeriğinin artması peroksidasyona olan duyarlılığı arttırmaktadır. Halbuki kolesterolün varlığı peroksidasyonu baskılamaktadır. Normal insan eritrositlerinde lipit peroksidasyonunun derecesi ile membran kolesterol konsantrasyonu arasında belirgin bir negatif korelasyon bulunmuştur. Plazma membranında kolesterolün varlığı bazı radikallerin yollarının kesilmesine neden olduğu gibi yağ asidi zinciri ile kolesterolün hidrofobik halkasının etkileşmesi membranın iç yapısını değiştirir.

3. Oksijen konsantrasyonu.

4. E vitamini gibi zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanların varlığı: Biyolojik membranlarda serbest radikal toplayıcısı olarak görev yapan E vitamini kendi hidrojen atomunu peroksi radikallerine vererek hidroperoksitlerin oluşumuna yol açar. Bu hidroperoksitler daha sonra glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ile kendilerine karşılık gelen nontoksik hidroksi bileşiklerine ayrılmaktadır.

2.3.1.3. Sonlanma

Demir ve bakır iyonları veya bu iyonların fosfat esterleri ile oluşturduğu basit şelatları (Fe^{+2} ADP), hem, hemoglobin ve miyoglobin içeren bazı demir proteinleri lipit hidroperoksitlerini bozarak peroksidasyonu sonlandırmaktadır. Bu kompleks bozunma reaksiyonlarının ürünlerini; etan, pentan gibi hidrokarbon gazları, ROOH, RCOOH, ROH ve RCHO gruplarını içeren kısa zincirli yağ asitleridir.



Şekil 3. Biyomembranlarda serbest radikallerin uyardığı lipit peroksidasyonu [38].

2.3.2. Biyolojik Sistemlerde Lipit Peroksidasyonunun Sonuçları

Lipit peroksidasyonu sonucu açığa çıkan ürünler, membran permeabilitesini ve mikrovizkozitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Membranlardaki yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan kısa zincirli yağ asitleri ve triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi aminoasitleri içeren yapısal proteinlerin oksidasyonu, membran permeabilitesinin artmasına ve membrandaki akışkanlığın azalmasına neden olmaktadır. Lipit hidroperoksitleri ve lipit peroksi radikalleri serbest oksijen radikalleri gibi aynı hücrenin birçok komponentiyle reaksiyona girerek sellüler ve metabolik fonksiyonlar üzerinde toksik etkilerini şu şekilde gösterirler [38, 39].

- Membrana bağlı reseptörlerin ve enzimlerin inaktivasyonuna yol açarlar.
- Membranın salgılama fonksiyonunun kaybına neden olurlar.
- Trans membran iyon gradiyentini bozarlar. Ca^{+2} gibi iyonlara karşı non spesifik permeabiliteyi arttırırlar.
- Mitokondride oksidatif fosforilasyonu olumsuz yönde etkilerler.
- Mikrozomal enzim aktivitelerinde değişikliklere yol açarlar.
- Subsellüler organellerin (lizozom gibi) bütünlüğünün kaybolmasına neden olurlar.

2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu koruyucu mekanizmaların bir kısmı serbest radikal oluşumunu önlerken, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemektedir. Bu işlevleri yapan maddelere genel olarak *Antioksidanlar* denir. Diğer bir ifadeyle, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların organizmada oluşturduğu hasarı önlemek için vücutta şekillenen savunma mekanizmalarına *Antioksidanlar* veya *Antioksidan Savunma Sistemleri* denir [12, 16].

Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve reaktif oksijen türlerini toplayarak lipit peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar etkilerini, serbest radikallerin meydana gelişini önlemek ve mevcut olanları etkisiz hale getirmek suretiyle göstermektedirler [12]. Antioksidanlar etkilerini, şimdiye kadar tespit edilebilen altı değişik mekanizma ile gösterirler. Bu mekanizmalar birbirinden bağımsız veya bir arada işleyebilmektedir [16, 27, 40].

1. Oksijen ile reaksiyona girerek ya da onun yerini alarak lokal oksijen konsantrasyonunu azaltabilirler.
2. Hidroksil (OH) radikali yapısında yer alan hidrojen atomları bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyerek peroksidasyonun başlamasını önleyebilirler.
3. Membran lipitlerini direkt etkileyerek peroksit oluşturabilen singlet oksijeni (1O_2) baskılayabilir ya da temizleyebilirler.
4. Peroksitleri, alkol gibi nonradikal ürünlere çevirebilirler. Örneğin; GSH-Px, peroksitleri bu yolla temizleyen bir antioksidandır.
5. Metal iyonlarını bağlayarak, reaktif grupların (OH, $Fe^{+2}/Fe^{+3}/O_2$ kompleksleri gibi) veya lipit peroksitlerden peroksil ve alkoksil radikallerinin oluşumunu önleyebilirler.
6. Zinciri kırabilirler. Yani, zincir oluşumuna neden olabilen serbest radikallerle reaksiyona girebilirler ve yağ asidi zincirlerinden sürekli hidrojen iyonu salınımını önleyebilirler.

Bir oksidatif zincirde antioksidanlar farklı basamaklarda etki gösterirler. Lipit peroksidasyonunu (LPO) yukarıdaki mekanizmalardan ilk dört tanesi ile önleyenler "Koruyucu Antioksidanlar" olarak adlandırılır. Beşinci mekanizma ile etki eden antioksidanlar koruyucu olmakla birlikte reaksiyon sırasında tüketilebilir ya da tüketilemezler. Altıncı mekanizma ile etki eden zincir kırıcı antioksidanlar ise radikallerle kompleks yaptıklarında kırma reaksiyonu sürecinde tüketilirler [16].

Antioksidanlar endojen antioksidanlar ve eksojen antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılabilirdiği gibi enzim olanlar ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar [1, 2].

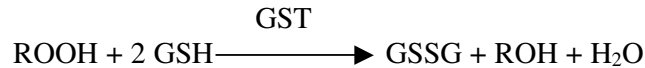
2.4.1. Endojen Antioksidanlar

2.4.1.1. Enzimatik Antioksidanlar

Hücrede, hücresel karışıklıkları azaltıp, oksidatif strese neden olan etmenlerin etkilerini yok ederek hücrenin en uygun koşullarında kalması için uğraşan antioksidan enzim sistemler mevcuttur. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon-S-Transferaz (GST), Süperoksit Dismütaz (SOD), Sitokrom Oksidaz ve Katalaz (CAT), lipit peroksidasyonunu ve toksik oksijen radikallerini etkisiz hale getirebilen en önemli antioksidan savunma sistemleri arasındadır [1, 16, 41].

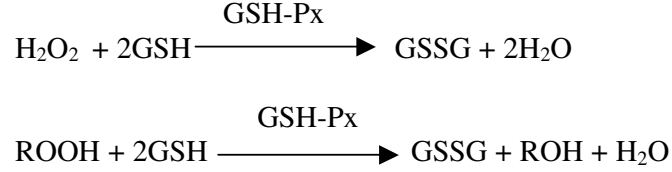
2.4.1.1.A. Glutasyon-S-Transferaz (GST)

Ksenobiyotiklerin (yabancı maddeler) biyotransformasyonunda önemli rol alan bir enzimdir. GST'lar antioksidan aktivitelerine ilave olarak çok önemli biyokimyasal fonksiyonlara da sahiptirler. GST'lar temel olarak ksenobiyotik bileşiklerin, ilaçların, karsinojenlerin, pestisit ve herbisit gibi çevre kirleticilerin yer aldığı grupların detoksifikasyonunda rol oynarlar [1, 21].



2.4.1.1.B Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

GSH-Px, hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlayan ve yağ asidi peroksitlerinin alkollere dönüşümünü katalize eden enzimdir. GSH-Px'in bu etkisiyle hücrel ve subsellüler membranların oksidatif etkiden korunmasını sağladığı belirtilmiştir. GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizlemektedir [1, 21].



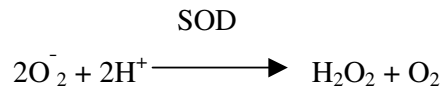
2.4.1.1.C. Glutasyon Redüktaz (GSSG-R)

Hidroperoksitlerin redükte olması esnasında meydana gelen okside glutasyon (GSSG), GSSG-R'nin katalizlediği reaksiyonla tekrar redükte glutatyona (GSH) dönüşür. Reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH'a ihtiyaç vardır [1].



2.4.1.1.D. Süperoksit Dismütaz (SOD)

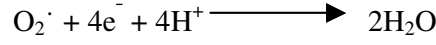
Bu enzim, süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder.



Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipit peroksidasyonunu inhibe eder [1].

2.4.1.1.E. Sitokrom Oksidaz

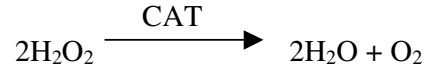
Solunum zincirinin bir enzimi olup, aşağıdaki reaksiyonla süperoksiti detoksifiye eder.



Fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden bu reaksiyonda süperoksit üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşar. Bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek peroksitin zararlı etkilerine engel olurlar [1].

2.4.1.1.F. Katalaz (CAT)

Dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Görevi, hücreler için zararlı olan hidrojen peroksiti suya ve oksijene parçalamaktır.



Katalazın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşı olup, büyük moleküllü lipit hidroperoksitlerine ise etki etmez [1].

2.4.1.2. Nonenzimatik Antioksidanlar

β - karoten, α - tokoferol (vitamin E), askorbik asit (vitamin C), ürat, seruloplazmin, sistein, miyogloblin, transferin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, albumin, methionin, melatonin, karnozin ve glutatyon önemli nonenzimatik antioksidanlardır [12].

2.4.2. Eksojen Antioksidanlar

Vitamin A, vitamin C, vitamin E, allopurinol, oksipurinol, folik asit, pterin aldehit, adenozin, lokal anestetikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar, trolox-C (vitamin E analogu), mannitol, DMSO (Dimetil sülfoksit), sitokinler, demir şelatörleri ve mannitol eksojen antioksidanlardır. Vitamin E, vitamin C, tioller ve karotenoidlerin serbest radikallerin zararlı etkisi sonucu oluşan doku ve makromolekül (DNA, lipit, protein) hasarına karşı vücudu koruduğu ve hücrenin antioksidan sistemini güçlendirdiği bildirilmiştir. Vitamin E'nin bilinen en önemli fonksiyonlarından birisi antioksidan özelliği nedeniyle doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu önlemesidir [34, 41].

Oksidatif stres sonucu meydana gelen oksidan maddelerin zararlı etkilerinden korunmak amacıyla sitokinler, barbitüratlar, demir şelatörleri, ksantin oksidaz inhibitörleri ve mannitol gibi ajanların kullanımı oldukça yaygındır [12].

Son yıllarda oksidan maddelerin olumsuz etkilerinin azaltılması veya ortadan kaldırılması yönünde çeşitli nonenzimatik antioksidan besinlerin tespiti yoğunluk kazanmıştır. Bu besin maddelerinden biri de kefirdir. Kefir sütteki tüm besin öğelerini içerir ve süte göre vitamin B₁, B₂ ve folik asit yönünden zengindir. Kefirin antioksidatif etkisinin yanında antifungal, antibakteriyel, hipokolesterolemik ve immunmodülatör etkisinin olduğu da belirtilmiştir [10].

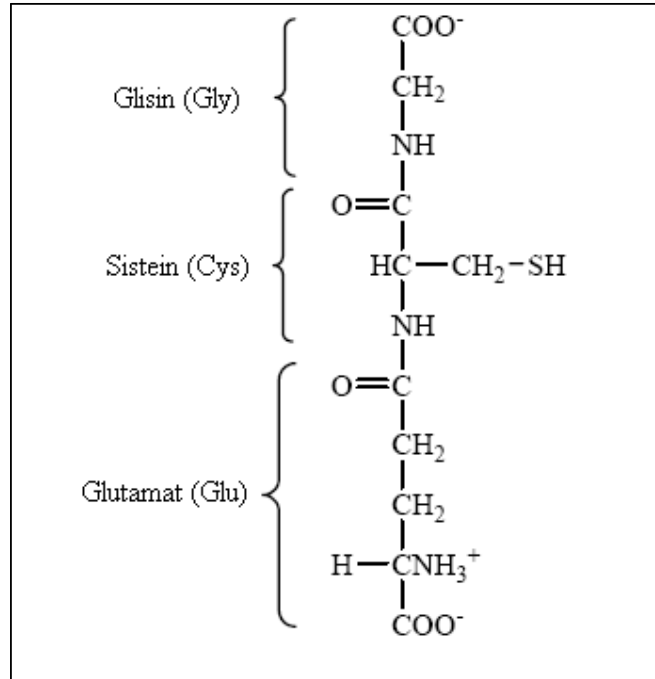
Çizelge 4. Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi [2].

Enzimatik Antioksidanlar	Nonenzimatik Antioksidanlar	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon (GSH)	Albumin
Katalaz (CAT)	α - Tokoferol (vit E)	Seruloplazmin
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Askorbik asit (vit C)	Transferrin
Glutasyon-S-Transferaz (GST)	β -Karoten	Ferritin
Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	Flavonoidler	Laktoferrin
Fosfolipit hidroperoksit	Ürat	Melatonin
glutasyon peroksidaz (PLGSH-Px)	Bilirubin	Sistein

2.5. Glutatyon (GSH)

İlk kez 1890 yılında “philothion” olarak adlandırılan glutatyon (gamma-glutamil-sisteinil glisin) RH_2 formülü ile gösterilmiştir. Daha sonra bileşik glutatyon olarak adlandırılmış, glutamat ve sisteinden oluşmuş bir dipeptid olduğu ileri sürülmüştür. 1929 yılında ise Kendall ve arkadaşları tarafından bugünkü gamma-glutamil-sisteinil glisin adıyla bilinen bir tripeptid olduğu bildirilmiştir [42, 43].

Glutatyon (GSH) hemen hemen tüm aerobik canlılarda en yaygın olarak bulunan, düşük molekül ağırlıklı intrasellüler tiyol bileşiği olup bütün canlı hücrelerde milimolar (0.5-10 mM), plazmada ise mikromolar (μM) derişimlerde bulunur. Tripeptid yapısında olan GSH molekülü, gamma-glutamil köprüsü ve sülfidril grubu şeklinde iki kısımdan meydana gelmiştir [42, 44].



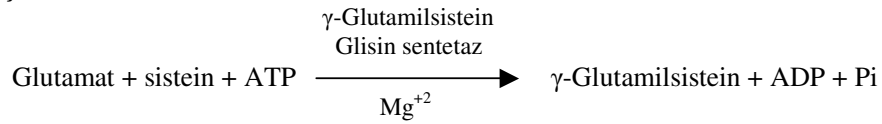
Şekil 4. Glutatyon (GSH) molekülü [45].

Hücre içerisinde belirli miktarlarda bulunan GSH'nın, protein ve DNA sentezi, transport, enzim aktivitesi, metabolizma ve oluşan oksidatif strese karşı hücre savunması gibi çok önemli biyolojik fonksiyonları olduğu bilinmektedir. Çok yönlü fonksiyonlarının olmasından dolayı GSH, enzim mekanizmaları, makromolekül biyosentezi, ara metabolizma, ilaç metabolizması, radyasyon, kanser toksisitesi, transport mekanizmaları, immünoloji, endokrinoloji ve yaşlanma gibi değişik konularda yapılan araştırmalar için önemli bir yer tutmaktadır [42, 43].

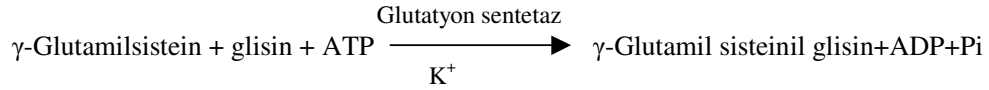
GSH bir çok reaksiyonda koenzim olarak görev yaparken ilaçlar ve diğer yabancı maddeler, metabolik aktivite sırasında oluşan östrojen, prostoglandin ve lökositler gibi bileşiklerle konjugatlar oluşturarak metabolizma olaylarına katılmaktadır. Hücre dışına taşınabilen GSH membranda bulunan γ -glutamil transpeptidaz (GGT) enziminin etkisiyle aminoasitlerle birleşip bunların transportunda rol oynamaktadır. Taşınan GSH hücre membranı ve yakın çevrelerinde oluşan indirgenme tepkimelerine katılır, plazmaya ve diğer hücrelere geçebilir. Bu bakımdan glutatyonun, sisteinin depo ve transport formu olduğu düşünülmektedir [42, 44].

Glutatyonun biyosentezi, sitozolde iki aşamada meydana gelmektedir.

I. Aşama



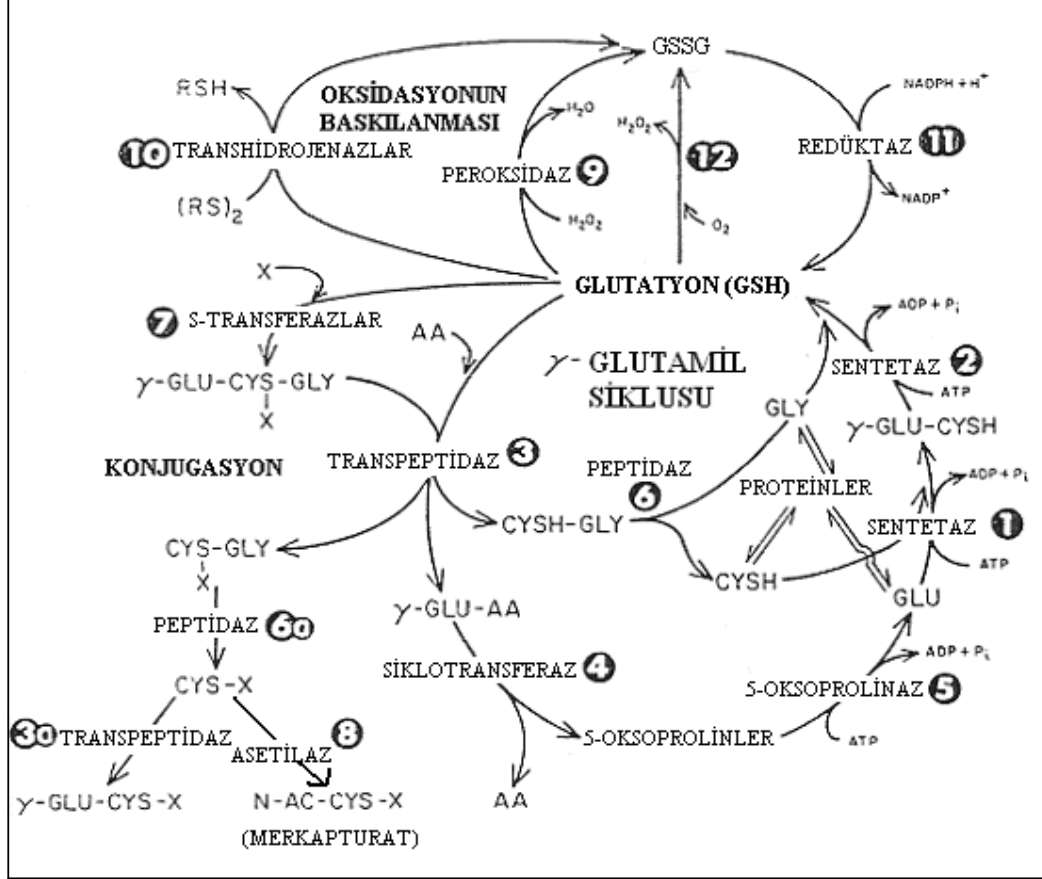
II. Aşama



GSH hücre içi düzeylerinin düzenlenmesi amacıyla, Glutamil sistein sentetazı, non allosterik feed-back inhibisyon yoluyla kontrol etmektedir [42, 44].

Glutatyon biyosentezinde inhibitör etkili bir bileşik olan bütionin sülfoksimin, γ -glutamil sisteinil sentetaz enzimini inhibe eder. Bu bileşik glutamin sentetaz inhibitörü olan metionin sülfoksim'in analogudur. Metionin sülfoksim, γ -glutamil sistein sentetaz enzimini de inhibe eder. Metionin sülfoksim, ATP tarafından fosforillenerek enzimin aktif bölgesine geri dönüşümsüz olarak bağlanır [42, 43].

2.5.1. Glutatyon Metabolizması



Şekil 5. Glutatyon metabolizması [42].

AA: Aminoasitler, 1: γ -glutamil sistein sentetaz, 2: GSH sentetaz, 3 ve 3a: γ -glutamil transpeptidaz, 4: γ -glutamil siklotransferaz, 5: 5-Oksoprolinaz, 6 ve 6a: Dipeptidazlar, 7: GSH-S-Transferaz, 8: N-Asetilaz, 9: GSH Peroksidaz, 10: Transhidrojenazlar, 11: Glutatyondisülfid redüktaz(GSSG), 12: O₂ tarafından GSH'ın oksidasyonu.

Glutasyon metabolizması genel olarak aşağıdaki şekilde özetlenebilir [42, 43].

GSH'un sentez ve yıkımını gösteren genel reaksiyonlar (Reaksiyon 1-5) arasındadır. Gammaglutamil döngüsü olarak da adlandırılan Meister Döngüsü ile aminoasitlerin hücre zarından transportu sağlanır. Bu döngüde GSH, GSSG ve konjugatlarının yıkımı membrana bağlı bir enzim olan γ -glutamil transpeptidaz (GGT) tarafından başlatılır. Bu reaksiyon sonunda γ -glutamil aminoasitleri, γ -glutamil glutasyon ve glutasyon meydana gelir. γ -glutamil aminoasitleri başta böbrek olmak üzere diğer organ ve hücrelere serbest aminoasitlerden daha hızlı taşınır.

GSH'un oksidasyonu (Reaksiyon 12) ya enzimatik olmayan şekilde ya da glutasyon tiyol transferaz (Reaksiyon 10) ve glutasyon peroksidaz (Reaksiyon 9) enzimlerinin aktivitelerine bağlı olarak gerçekleşir. Glutasyon disülfid redüktaz (Reaksiyon 11) tarafından katalizlenen reaksiyon ile GSH transferaz enzimleri için substrat; peroksidaz enzimleri ve tiyol transferazlar için ise indirgeyici güç sağlamış olur.

Glutasyonun okside (GSSG) ve redükte (GSH) formları, bazı endojen ve eksojen bileşikler ile konjuge olurlar (Reaksiyon 7) ve oluşan S-konjugatlarının glutamat kalıntıları γ -glutamil transpeptidaz etkisi ile uzaklaştırılırken (Reaksiyon 3) parçalanmayı takiben meydana gelen dipeptit (Reaksiyon 6) asetilasyon ile merkapturat'a (Reaksiyon 8) dönüşür. Merkapturik asit sentezi olarak da bilinen bu yan yol ile asetillenen bazı ilaçların toksik etkileri GSH tarafından ortadan kaldırılır.

Glutasyonun dokulardaki düzeyinin düzenlenmesinde γ -glutamil transpeptidazın (GGT) rolü olduğu düşünülmektedir. GSH'un karaciğerdeki sentezi ile böbrek dokusundaki GGT enzimi tarafından yıkımı arasında bir denge vardır. Bu denge vasıtasıyla GSH'un dolaşımında sabit düzeylerde kalması sağlanır.

2.5.2. Glutatyonun Biyokimyasal Önemi

Glutatyon metabolizmada meydana gelen serbest oksijen türlerinin yıkıcı etkilerine karşı hücreleri koruyan en önemli antioksidan maddelerden birisidir. Glutatyon hücrelerde okside (GSSG) ve redükte (GSH) formda bulunur ve antioksidan etkisini bu iki form arasındaki döngüsü sırasında gerçekleştirir. GSH'un esas reaktif grubu SH grubu, serbest radikallerin ortaklanmamış elektronu ile bağlanarak radikal oluşumunu azaltmaktadır.

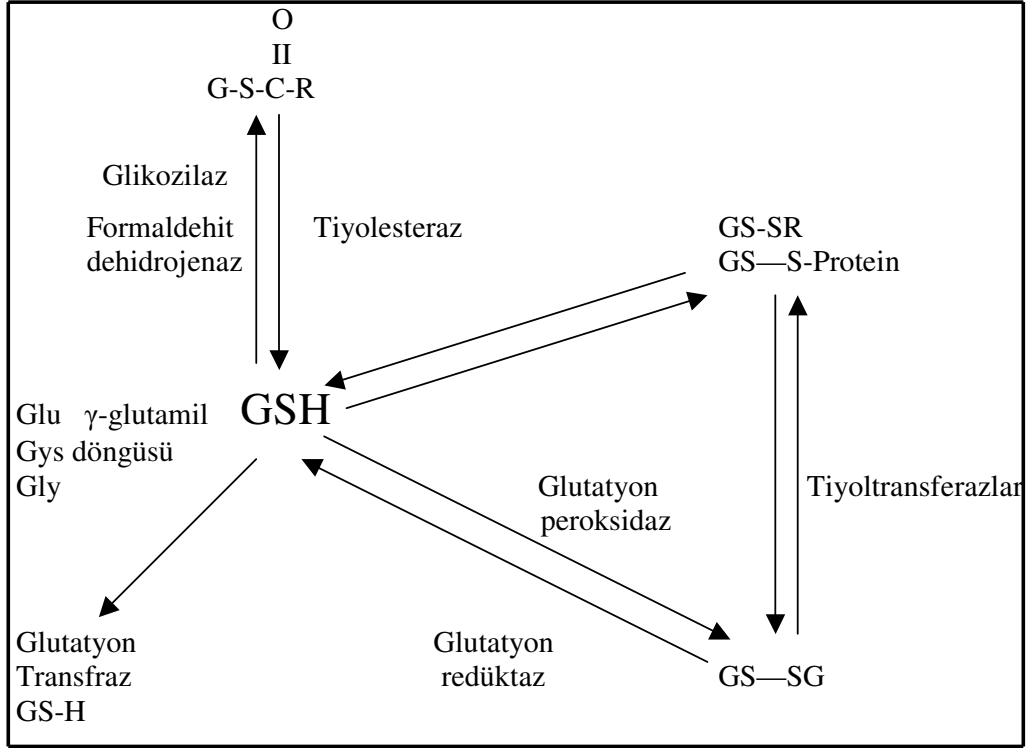
Lipit peroksidasyonunun oluşumu ile GSH konsantrasyonu azalırken, GSSG konsantrasyonu yükselir. Çevre, metabolizma ve bireye bağlı bir çok faktörün etkisiyle organizmada oksidatif stres artabilir ve buna bağlı olarak da serbest radikal oluşumu artar. Dolayısıyla hücreleri bu serbest radikallerin yıkıcı etkilerine karşı korumakla görevli GSH düzeyleri de değişmektedir. Hücrelerde oksidatif stres artarken genellikle GSH düzeyleri düşer, bununla birlikte GSSG seviyeleri yükselir [42, 43].

Glutatyonun organizmada üstlendiği biyolojik görevler şunlardır;

- Endojen peroksitler ve serbest radikallerin yıkımı
- Zararlı bazı bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlaması
- Aminoasitlerin membran transportunda yer alması
- Proteinlerdeki –SH grubunu koruması
- Bazı enzimler için koenzim görevi yapması
- Disülfit değişim reaksiyonlarına katılması

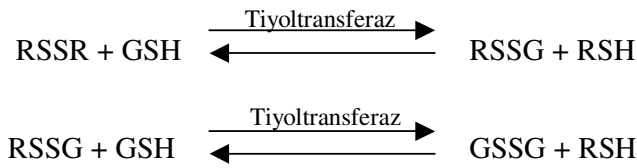
2.5.3. Glutatyona Bağlı Enzim Sistemleri

GSH, biyolojik materyallerde indirgenmiş sülfür kaynağı olarak bulunan bir bileşiktir. Bu nedenle oksijen metabolizması sırasında meydana gelen toksik ve reaktif bileşiklerin detoksifikasyonunda GSH ve GSH'a bağlı enzimlerin rolü büyük olup, aşağıda Şekil.6'da olduğu gibi özetlenebilir. GSH'un canlı organizmada çok önemli ve kilit rolleri vardır [42, 44].



Şekil 6. Glutasyon (GSH)'a bağlı enzim sistemleri [42, 44].

Tiyol grupları hücre içerisinde daima indirgenmiş durumda bulunur. Sistein aminoasidi ve CoA'nın protein sentezi ve bir takım enzimatik reaksiyonlar için indirgenmiş durumda olmaları gerekir.



Formaldehit dehidrojenaz ve glikozilaza gelince, bu enzimler reaktif aldehyitlerin inaktivasyonunu katalizlerler. Reaksiyon esnasında glutasyon tiyol grubu ile aldehyit arasında bir tiyohemiasetal türevi meydana gelir. Glutasyon türevi enzimatik reaksiyon ile bir tiyol estere dönüştürülür. Bu dönüşümde aldehyit grubunun yükseltgenmesi, karboksilik asit yükseltgenme düzeyine eşdeğerdir. Kinetik çalışmalarına göre glutasyon formaldehit dehidrojenaz enziminin katalitik mekanizmasında esas aktivatör olarak görülmektedir [44].

2.5.4. Glutasyonun Tayin Yöntemleri

2.5.4.1. Spektrofotometrik Yöntem

Dokularda geniş bir dağılım gösteren ve bazı önemli biyolojik fonksiyonlara sahip GSH ve türevlerinin miktar tayini çalışmaları GSH'un ilk keşfedildiği yıllara dayanır. GSH indirgenmiş halde sülfidril ve oksitlenmiş glutasyon (GSSG) olarak da disülfid gruplarına sahip iki şekilde bulunur [46]. GSSG'nin miktar tayini GSH'a göre daha güçtür. Bunun nedeni de GSSG'nin normalde hücreler içerisinde ve düşük miktarlarda bulunuyor olmasıdır. GSSG'nin tayini genel olarak GSSG'nin kimyasal elektrolitik ve enzimatik olarak indirgenip GSH'a dönüştürülmesi ve oluşan GSH üzerinde saptanması esasına dayanır. Enzimatik indirgenme NADH veya NADPH tarafından maya glutasyon redüktazı varlığında oluşturulur. Daha sonra oluşan GSH, 2-nitro-5-tiyobenzoik asit ile kromoforik bir bileşik meydana getirir ve bu bileşiğin 412 nm'de spektrofotometrik olarak (ng) düzeyinde saptanması mümkündür [44, 47].

2.5.4.2. HPLC Yöntemi

GSH, izokratik ters faz HPLC metodu ile tümör hücrelerinden sağlanan biyopsi materyalinde ölçülebilmektedir. Materyal sülfosalisilat çözeltisi ile ön işlemden geçirilir. GSH için konjugatlarını elde etmek amacıyla monobromobiman kullanılır ve floresans özellikli GSH konjugatları ters faz oktadesilsilan kolonundan elde edilir. İzokratik koşullar asetonitril/amonyum fosfat tamponu tetrabutylamonyum hidroksit ile sağlanır [44, 48].

2.5.4.3. Fluorometrik Yöntem

GSH ve GSSG'nin fluorometrik tayinini oftalaldehit gibi bir floresans bileşik kullanılarak geliştirilmiştir. Bu yöntemde, GSH OPT ile pH: 8 ve GSSG OPT ile pH:12'de reaksiyona girer. GSH N-etilmaleimit ile kompleks meydana getirir. Bu durumda GSSG ölçümünde GSH'un girişimi engellenmiş olur. Bu yöntemde GSH ve GSSG için verim %91-100 oranındadır [44, 48].

2.6. Mastitis

Mastitis, tüm memeli hayvanlarda görülebilen meme bezlerinde mikroorganizmalar tarafından meydana getirilen yangılı ve iltihabi bir meme hastalığıdır. Süt veren bütün ineklerde görülebilen bu hastalık, özellikle süt verimi yüksek olan ineklerde daha fazla görülmekte olup, dolayısıyla bu tür ineklerde daha çok önem taşımaktadır. Hastalık süt veriminin azalması, süt bileşiminin değişimi ve bozulması gibi belirtilerle dikkat çeker. Ayrıca meme loblarında sıcaklık artışı, kızarıklık ve şişlik gibi belirli belirsiz bulgularla kendisini gösterir [4].

Batı ülkelerinde yapılan araştırmalara göre, süt inekçiliğinde endemik seyreden hayvan hastalıkları içerisinde en fazla ekonomik kaybın mastitisten kaynaklandığını ortaya koymuştur. Mastitis ülkemizde de görülmekte olup, süt inekçiliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Dünyada ve ülkemizde mastitis üzerine bir çok çalışma yapılmıştır. Buna rağmen mastitis günümüzde süt inekçiliğinin önemli bir sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır [49, 50].

2.6.1. Mastitisin Sınıflandırılması

Mastitisler hastalığın seyri ve yangı belirtilerine göre değişik şekillerde sınıflandırılır. Ancak yapılan çalışmalarda patolojik bulgulara göre mastitisler genel olarak, subklinik ve klinik mastitis olarak sınıflandırılmıştır [51, 52].

2.6.1.1. Subklinik Mastitis

Gizli mastitis adını da verebileceğimiz bu olgular klinik mastitise göre çok daha yaygındır. Süt inekçiliği yapılan işletmelerde karşılaşılan en önemli problemlerden biri olan subklinik mastitiste klinik olarak memede ve hayvanda hiçbir belirti gözlenemez. Ancak laboratuvar çalışmaları ile sütteki somatik hücre sayısının artışı ve biyokimyasal parametrelerin değişimleri belirlenerek subklinik mastitisin teşhisine gidilebildiği ve patojenik etkenlerin izolasyonlarının yapıldığı bildirilmektedir [51, 52].

Dış muayenelerde memelerde ve hayvanın genel durumunda hiçbir anormallik göze çarpmaz. Fakat yangılı meme lobunun süt verimi diğer loblara kıyasla belirli bir şekilde azalmıştır. Subklinik mastitisler, memelerin tamamen normal görünüşte olması ve sütün kalitesinde gözle görülebilir bir bozukluk bulunmaması nedeniyle, genellikle dikkatten kaçır. Halbuki, sağlık açısından ve ekonomik açıdan klinik mastitisten çok daha önemlidir. Çünkü subklinik mastitis dikkatten kaçtığı için sağım sırasında mastitisli ineklerden sağlıklı ineklere bulaşabileceği gibi zamanla mikroorganizmaların artması sonucu klinik mastitise dönüşebilir. Subklinik mastitis vakalarının yaklaşık % 40'ı zaman içinde klinik mastitis vakasına dönüşebilir [51].

2.6.1.2. Klinik Mastitis

Klinik mastitisten hayvanın genel durumunda halsizlik, iştahsızlık, ateş gibi genel hastalık belirtileri görülür. Memede şişlik, kızarıklık, ağrı ve büyüklük farklılıkları vardır. Sütte kanlı, irinli ve pıhtılı bir görüntü tespit edilir. Ateşin hafif yükselmesiyle hastalık başlar. Bulaşma süresi 1-2 hafta kadar sürer. Meme şişer ve sertleşir. Hızlı bir şekilde memede doku tahribatı şekillenir ve süt salgısı azalır. Genelde sütün görünüşü de normal değildir. Memeden önceleri pıhtılı, iltihaplı sonra su gibi akıntı gelir. Süt sarımtırak bir renk alır. Klinik mastitisin kronikleşmiş şeklinde yangılı meme lobu sertleşir, hasta memenin sütü iyice azalır veya hiç gelmez ve sonuçta meme körleşir [51].

2.6.2. Mastitise Neden Olan Faktörler

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de hayvancılık sektöründe önemli ekonomik kayıplara neden olan mastitise bir çok faktör neden olmaktadır. Ancak, mastitis daha çok patojen mikroorganizmalar, hayvandan kaynaklanan faktörler ve çevresel faktörler gibi üç ana faktörün karşılıklı etkileşimi sonucu şekillenmektedir. Olumsuz çevre koşulları hayvanın direnç gücünü aştığı zaman mastitis ortaya çıkmaktadır [53].

2.6.2.1. Mikroorganizmalar

Bir çok mastitiste hastalığın esas nedeni mikroorganizmalardır. Yapılan araştırmalar 50'nin üzerinde bakteri türünün ve 20'den fazla mantar türünün mastitisin oluşumuna neden olduğunu göstermektedir. Bu etkenlerden önemli olanlarını bakteriler, virüsler, mantarlar ve mayalar olarak sıralamak mümkündür [4, 54].

Mikroorganizmaların parankim dokusuna ulaşmaları şu şekilde gerçekleşir [4].

1. Meme başı deliği, meme başı kanalı, meme başı sinüsü, sinüs laktiferus ve duktus laktiferus yolu ile memeye ulaşan buluşma yolu ile meydana gelen mastitisler (*Galaktojen enfeksiyon*).
2. Meme başı ve meme derisinin doku bütünlüğünün bozulması sonucu meydana gelen mastitisler (*Yara enfeksiyonu*).
3. Organizmanın herhangi bir yerindeki bilinen veya gizli bir enfeksiyon kaynağından köken alan, kan, lenf ve diğer yollarla memeye ulaşan bulaşım yolları ile meydana gelen mastitisler (*Hematojen mastitis*).

Bulaşmada birinci yol çoğunlukta ve önem teşkil etmektedir. Araştırmacılar, gerek elle sağım ve gerekse makine ile sağım sonunda mikroorganizmaların sağımın bitmesinden hemen sonra meme başı deliğinden içeri girdiklerini bildirmektedir. Böylece memeye giren mikroorganizmalar, meme lobunun alt kısmındaki sekretorik dokuda ve süt kanallarında çoğalmaya başlar. Enfeksiyon daha sonra buradan bütün memeye yayılır. Enfeksiyona neden olan mikroorganizmalar yerleştiği yerlerde asit, toksin ve iritan maddeler salgılayarak yangısal tepkilerin meydana gelmesine neden olurlar.

Bu nedenle mastitisin meydana gelmesi özet olarak üç aşamada meydana gelir [4].

1. Hastalık etkenlerinin memeye girmesi (*İnvazyon dönemi*).
2. Süt kanalları meme dokularına ulaşan etkenlerin çoğalması ve meme dokusunu istila etmesi (*Enfeksiyon dönemi*).
3. Memenin hastalık etkenlerine ve bunların toksinlerine karşı reaksiyon göstermesi (*Yangı dönemi*).

2.6.2.2. Hayvandan Kaynaklanan Faktörler

Meme ve meme başı yaralanmaları, kalıtım ve ırk, hayvanın yaşı, yüksek süt verimi gibi durumlar mastitisin oluşumunda etkili faktörlerdendir. Bunları kısaca açıklayalım [4, 55].

2.6.2.2.A. Meme ve Meme Başı Yaralanmaları

Anatomik olarak normal ve sağlam olan bir meme kanalı mikroorganizmaların meme içine geçmesine mani olur. Meme loblarında ve meme başlarında oluşan kesik yaraları, travma ve ezikler memenin normal yapısını bozarlar. Böylece hastalık etkenleri memeye girerek hastalık oluştururlar. Ayrıca memelerin büyük ve sarkık oluşu da mastitisin oluşumuna zemin hazırlar.

2.6.2.2.B. Kalıtım ve Irk

Saf kan hayvanlarda, tek yönlü verim elde etmek için yetiştirilen hayvanlarda daha çok görülür. Süt ineklerinde kalıtımla mastitis arasında doğru bir orantı bulunmaktadır. Jersey ırkı inekler gerek mastitis gerekse meme başı bozuklukları bakımından Siyah-Beyaz ırklarla Danimarka Kırmızılarında daha sağlıklıdır.

2.6.2.2.C. Hayvanın Yaşı

Yapılan araştırmalar yaş ilerledikçe mastitisin arttığını ortaya koymuştur. Genç hayvanlarda meme başı kanalının dar ve gevşememiş olması mikroorganizmaların memeye girişini engeller. Ancak yaşlı hayvanlarda meme başı sfinkterlerinin gevşemesi sonucu mikroorganizmalar memeye kolaylıkla girerek mastitise neden olmaktadır.

2.6.2.2.D. Yüksek Süt Verimi

Yüksek süt verimine sahip ineklerde meme lobları verdikleri süt miktarına bağlı olarak büyür ve gelişir. Böylece büyüyen memeler yaralanmalara ve travmalara daha çok maruz kalacağından mastitis görülme oranı bu tip ineklerde daha fazladır.

2.6.2.3. Çevresel Faktörler

Beslenme, barınakların yapısı ve hijyeni, hava şartları, sağım makineleri, hatalı elle sağım, buzağı emzirtme, eksik sağım, stres, yüksek östrojenik etki gibi faktörler mastitisin meydana gelmesinde etkili olan çevresel faktörlerdir [4, 55].

2.6.3. Mastitisin Neden Olduğu Kayıplar

Mastitis, süt inekçiliği yapılan işletmelerde en fazla ekonomik kayba neden olan hayvan hastalıklarından biridir. Ülkemiz süt inekçiliği tüm dünyada olduğu gibi mastitisten olumsuz etkilenmektedir. Mastitisin neden olduğu kayıplar şunlardır [4].

- Hasta olan meme lobları diğer sağlam meme loblarına oranla daha az süt verirler. Bazen halkın *meme kör oldu* deyimini gibi hiç süt alınmayabilir. Bu süt verimini etkileyen önemli bir kayıptır.
- Bazı durumlarda mastitisli olgularda meme bozukluğu ve süt verimi düşüklüğü yanı sıra hayvanın genel durumu da bozular. Gangrenli mastitisler zamanında tedavi edilmezse ölüme sebep olur.
- Mastitisli sütler değerini kaybeder. Bu tür sütlerde yağ oranı düşer. Süt ürünleri imalatında randıman alınmaz. Peynir ve yoğurt yapımında mayalanma şekillenmez.
- Hasta memelere tedavi sırasında ödenecek veteriner hekimlik hizmetleri bedeli ve ilaç masrafları tutarı küçümsenmemelidir.
- Mastitisli sütler insan sağlığı için zararlıdır. Kontrolsüz olarak tüketime sunulan ve insan sağlığını bozan mastitisli sütlerin yol açtığı zarar çok önemli ve üzerinde ciddi bir şekilde durulması gereken bir konudur.

2.6.4. Mastitisten Korunma Yolları

Süt ineklerini mastitisten korumanın en geçerli yolu; iyi bakım ve beslenme, iyi sağım, temizlik ve sağlık kurallarına özen göstermek, aşılama, sürüdeki mastitisli hayvanları ayırmak ve hemen tedavi etmektir.

Mastitisten korunmak için alınması gereken tedbirler şunlardır [51].

1. Altlığı ve ahırını dezenfekte etmek (Bunun için sönmemiş kireç en uygundur)
2. Süt ineklerinin altına daima kuru altlık sermek,
3. Makine ile sağımda, makine bakımını düzenli yaptırmak,
4. Sağımı günün belirli saatlerinde düzenli olarak yapmak,
5. Elle sağımda, sağıma başlamadan önce memelerin ve ellerin temizliğine dikkat etmek, her ineğin sağımından sonra elleri ilaçlı su ile yıkamak,
6. Sağımdan sonra memeyi mutlaka dezenfektanlı suyla yıkamak ve kurulamak,
7. Yaşlı hayvanların meme başı büzücü kasları gevşek olduğundan daha sık yakalanır. Bunun için yaşlılar ile genç hayvanlar ayrı yerlerde barındırılmalıdır,
8. Belirli aralıklarla veteriner hekim tarafında genel sağlık kontrolü yapılmalıdır.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Hayvan Materyali:

Bu araştırmada Kars ve Ardahan yoresindeki değişik köylerde halk elinde yetiştirilen, yaşları 3 ile 7 arasında değişen 20 sağlıklı ve 20 mastitisli olmak üzere toplam 40 tane inek kullanıldı. İneklerin mastitisli olup, olmadıkları Kaliforniya Mastitis Testi (CMT) ile belirlendi.

Mastitisli ve sağlıklı inekler belirlendikten sonra Vena jugularis'ten 10 ml'lik EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri buz çantasında laboratuvara getirildi. Daha sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üstte kalan plazma kısmı kapaklı polipropilen tüplere alındı. Alınan bu plazmalar, plazmada lipit peroksidasyon (MDA) düzeyleri belirleninceye kadar -20 °C'de deep freeze'de saklandı. Plazma kısmı ayrıldıktan sonra altta kalan kırmızı kan hücreleri üç defa serum fizyolojik ile yıkanarak eritrosit paketleri yapıldı. Bu eritrosit paketleri yine kapaklı polipropilen tüplere alındı ve eritrosit GSH düzeyleri belirleninceye kadar -20 °C'de deep freeze'de saklandı.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Aletler

- Spektrofotometre (Tecan Spectre III, A 5082, Uniequip, Austria)
- Vorteks (Velp Scientifica, ZX³, Italy)
- Santrifüj (Helius, Germany)
- Çalkalayıcı (Heidolph promax 2020, Germany)
- Hassas terazi (Precisa, 205A SCS, Switzerland)
- PH metre (Orion, 420 A, USA)
- Manyetik karıştırıcı (Nüve, MK 318, Türkiye)
- Derin dondurucu (Arçelik, 2560, Türkiye)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

- Ayarlanabilir otomatik pipetler (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, Ependorf, Varipette 4710, Germany)
- Isısı ayarlanabilir su banyosu (Clifton, England)

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeleri

- Etanol (Merck)
- Butulated hidroxy toluen (BHT) (Merck)
- TBA (Sigma)
- TCA (Merck)
- DTNB (Sigma)
- Perchloric acid %60 (Merck)
- Trisma (Merck)
- K₂HPO₄ (Merck)
- KH₂PO₄ (Merck)
- KCl (Merck)
- NaOH (Merck)
- Na₂HPO₄ (Merck)
- Vakumlu ve EDTA'lı kan alma tüpleri ve iğneleri (MN-2138M)
- 1,5 ml'lik ependorf mikro santrifüj tüpleri
- Otomatik pipet uçları
- 10 ml'lik cam ve poly etilen santrifüj tüpleri

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

- GSH Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

0,1 M Potasyum Fosfat Tamponu / 0.15 M KCl çözeltisi (pH: 7,4)

- 17.418 g K₂HPO₄
- 13.609 g KH₂PO₄
- 0.15 M KCl (11.475 g/L çözeltisinde 1 L'ye tamamlanır)
- Çözeltinin pH'sı NaOH ile manyetik karıştırıcıda pH: 7.4'e ayarlanır.

5 µM DTNB Çözeltisi (Ditiobisnitrobenzoik asit)

- 0,99 mg DTNB
- Distile su ile 500 ml'ye tamamlanır.

GSH Standartları

20, 50, 75, 100 mg/dl GSH olacak şekilde distile suda deney günü hazırlandı.

5 µM EDTA Çözeltisi

%5'lik TCA Çözeltisi

- 5 mg TCA
- Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

- MDA Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Fosfat Tamponu İle Tamponlanmış Serum Fizyolojik (pH: 7,4)

- 8.1 gr NaCl
- 2.302 gr Na₂HPO₄
- 1000 ml distile su

BHT Çözeltisi (% 0.88)

- 88 mg BHT tartılıp
- 10 ml mutlak alkol içerisinde eritilir.

TCA Çözeltisi (%30)

- 30 gr TCA
- Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

EDTA Çözeltisi (0.1 M)

- 37.224 gr EDTA-Na₂ 2H₂O tartılıp
- Distile su ile 1 lt'ye tamamlanır.

TBA Çözeltisi (% 1'lik)

- 1 gr TBA
- 100 ml 0.05 N NaOH

NaOH Çözeltisi (0.05 N)

- 2 gr NaOH
- Distile su ile 1 lt'ye tamamlanır.

3.2. METOD

Uygulanan metodların rutin hale getirilmesi için araştırmaya başlamadan önce gerekli ön çalışmalar yapıldı. Araştırmadan daha iyi sonuçların alınması amacıyla en duyarlı metodların kullanılmasına çalışıldı. Hemolizat hazırlanması metodlarda belirtildiği şekilde yapıldı.

3.2.1. Plazma Lipit Peroksidasyonu (MDA) Tayini

Plazmada lipit peroksidasyonu (MDA) belirlemek için Ohkawa ve ark.[56]'nın tanımladığı spektrofotometrik yöntem kullanıldı.

3.2.1.1. Prensip

pH'nın 3.4 olduğu aerobik bir ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile plazmanın 100 °C'de inkübasyonu, lipit peroksidasyonunun sekonder bir ürünü olan malondialdehidi (MDA) oluşturmaktadır. Oluşan MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks yapar. Pembe rengin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile lipit peroksidasyonu saptanır.

Standart eğri çizimi için 1, 1, 3, 3 tetraethoxypropane'den 10µl alındı. Daha sonra 10 ml absolut ethanolde çözülerek +4 °C'de koyu bir şişede saklandı. Bu stok çözeltilerden farklı konsantrasyonlarda çalışma çözeltileri hazırlanarak standart eğri çizildi. Belirlenen absorbans değerleri MDA standart eğrisinden nmol/ml olarak hesaplandı.

3.2.1.2. Metod

0.2 ml numune üzerine 0.8 ml fosfat tamponu, 0.025 ml BHT ve 0.5 ml %30'luk TCA eklendi. Tüpler vorteks ile karıştırılır ve iki saat buzda bekletildi. Daha sonra 2000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 1 ml alınarak başka bir tüpe aktarıldı. Üzerine 0.075 ml 0.1 M'lık EDTA ve 0.25 ml %1'lik TBA eklendi. Tüpler karıştırılıp su banyosunda 15 dakika bekletildikten sonra spektrofotometrede 532 nm'de absorbansları okundu. Bir antioksidan olan BHT, ölçüm sırasında hatalı yüksek TBA reaktivitesi ile sonuçlanabilecek MDA oluşumunu önlemek için kullanıldı.

3.2.2. Eritrositte GSH Tayini

Eritrositte GSH düzeylerini belirlemek için Sedlak ve Lindsay [57]'in tanımladığı spektrofotometrik yöntem kullanıldı.

3.2.2.1. Prensip

GSH'nın sülfidril grubunun asitte çözünerek, tiyol grubunun enzimatik veya kimyasal işlemler ile ölçülmesi bu bileşiğin miktar tayininin temelini oluşturur. Belirlenen absorbans değerleri GSH standart eğrisinden $\mu\text{mol/ml}$ red blood cell (RBC) olarak hesaplandı.

3.2.2.2. Metod

	<u>Kör Tüpü</u>	<u>Deney Tüpü</u>
Hemolizat	-	100 μl
Fosfat Tamponu	1 ml	1 ml
DTNB	0.125 μl	0.125 μl
Distile su	100 μl	-

Yukarıda belirtildiği Şekilde çalışıldı ve karıŐımlar 3-4 dakika içerisinde 412 nm’de okundu. GSH standartları da aynı protokol gerçekleŐtirilerek çalışıldı ve standart eğri çizilerek miktar tayini yapıldı.

3.3. İstatistiksel Hesaplamalar

MINITAB for Windows Release 12.1 bilgisayar programı kullanılarak gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel önemliliği 2-Sample t- testi kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

Önemli bir hayvan hastalığı olan mastitisin, ineklerde kan lipid peroksidasyonu (MDA) ve GSH düzeylerini nasıl değiştirdiğini araştırmak için yapılan bu çalışmada kontrol ve deney grubu olarak iki gruba ayrılan ineklerde eritrosit GSH ve plazma MDA düzeylerinin her bir inekteki ortalama ve standart sapmaları sırasıyla izelge 5’de sunulmuştur.

Çalışmada mastitisli ve sağlıklı gruplar karşılaştırıldığında, sağlıklı grupta GSH değeri $1,39 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/ml}$, mastitisli grupta ise $1,33 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/ml}$ olarak tespit edilmiştir. Yine sağlıklı grupta MDA değeri $4,55 \pm 0,20$ nmol/ml iken mastitisli grupta $5,26 \pm 0,40$ nmol/ml olarak bulunmuş ve izelge 6’da verilmiştir.

Mastitisli grubun eritrosit GSH düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş ($p < 0,001$) göstermiştir. Aynı şekilde mastitisli grubunun plazma MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı bir artış ($p < 0,001$) göstermiştir.

Kontrol ve deney gruplarına ait eritrosit GSH ve plazma MDA düzeylerinin ortalama, standart hata ve gruplar arasındaki önemi izelge 6’da sunulmuştur. Ayrıca gruplar arası GSH ve MDA düzeylerinin grafiksel olarak değişimi ise şekil 7 ve 8’de belirtilmiştir.

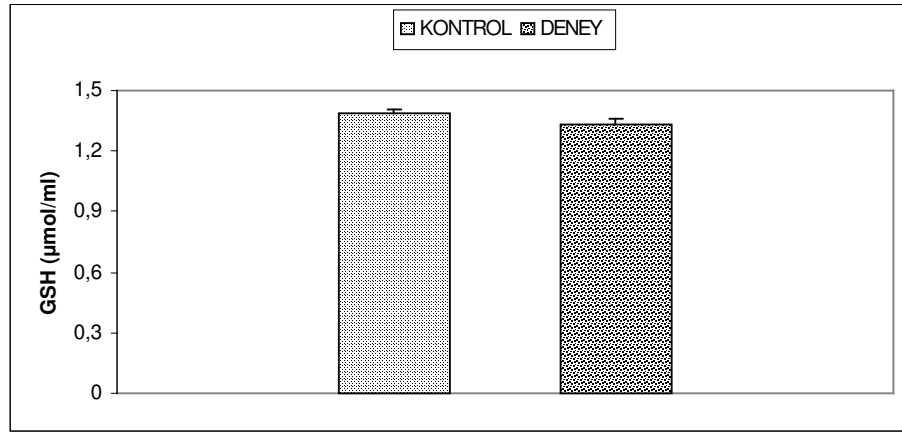
Çizelge 5. Kontrol ve deney grubuna ait GSH ve MDA düzeyleri

KONTROL GRUBU			DENEY GRUBU		
Örnek No	GSH (µmol/ml)	MDA (nmol/ml)	Örnek No	GSH (µmol/ml)	MDA (nmol/ml)
1	1,35	4,86	1	1,37	4,82
2	1,35	4,75	2	1,29	5,87
3	1,39	4,35	3	1,32	5,40
4	1,39	4,46	4	1,33	5,29
5	1,38	4,38	5	1,34	4,86
6	1,36	4,78	6	1,31	5,43
7	1,41	4,57	7	1,35	4,96
8	1,43	4,35	8	1,37	4,56
9	1,42	4,46	9	1,30	5,40
10	1,39	4,42	10	1,38	4,82
11	1,40	4,38	11	1,33	5,33
12	1,39	4,71	12	1,29	5,83
13	1,38	4,75	13	1,34	5,00
14	1,36	4,86	14	1,31	5,36
15	1,42	4,31	15	1,36	4,82
16	1,37	4,64	16	1,30	5,91
17	1,37	4,75	17	1,32	5,43
18	1,38	4,57	18	1,29	5,87
19	1,42	4,38	19	1,37	4,93
20	1,43	4,24	20	1,33	5,33
Ort ± SH	1,39 ± 0,02	4,55 ± 0,20	Ort ± SH	1,33 ± 0,03	5,26 ± 0,40

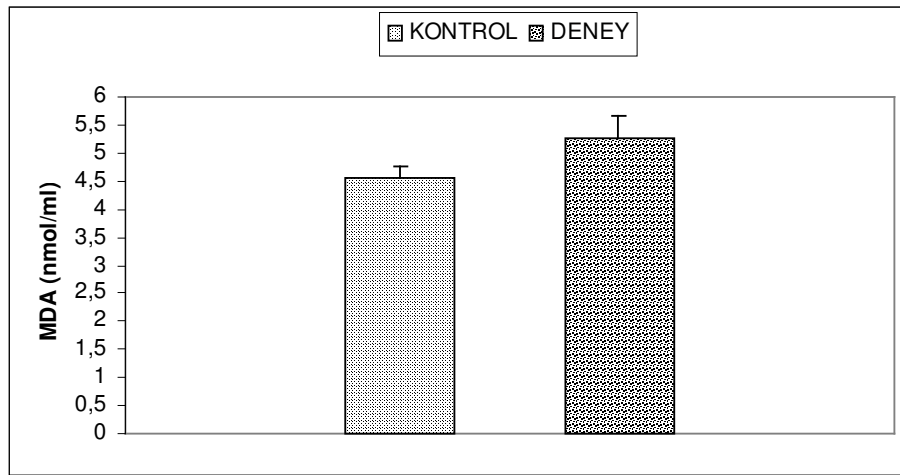
Çizelge 6. Kontrol ve deney gruplarına ait GSH ve MDA değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması ($\bar{X} \pm SD$: Ortalama \pm Standart Sapma)

GRUPLAR (N = 40)	GSH ($\mu\text{mol/ml}$)	MDA (nmol/ml)
Kontrol Grubu (n = 20)	$\bar{X} \pm SD$ $1,39 \pm 0,02$	$\bar{X} \pm SD$ $4,55 \pm 0,20$
Deney Grubu (n = 20)	$1,33 \pm 0,03^*$	$5,26 \pm 0,40^*$

* : $p < 0,001$ N : Toplam hayvan sayısı n : Her gruptaki hayvan sayısı



Şekil 7. Kontrol ve deney gruplarına göre GSH düzeyleri



Şekil 8. Kontrol ve deney gruplarına göre MDA düzeyleri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Süt sığırcılığında sık görülen ve önemli bir yangısal hastalık olan mastitis, tüm dünyada olduğu gibi ülkemiz hayvancılığında da büyük oranda ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bunun için mastitisin erken teşhis edilmesi, uygun tedavinin ve korunma yöntemlerinin uygulanması önerilmektedir [58].

Farklı türlerde, yangısal hastalıklarda yangının gelişimi ve ilerlemesinde serbest radikal oluşumunun direkt ve indirekt bir rol oynadığını gösteren çok sayıda araştırma bulunmaktadır [59, 60, 61].

Serbest radikallerin artması sonucu hücrelerde lipit peroksidasyonunun oluşturduğu oksidatif hasara bağlı olarak, hücre membran bütünlüğünün bozulduğu, DNA zincirlerinde kopma olduğu, proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının değiştiği bildirilmekte ve sonuç olarak çeşitli biyolojik indikatörlerin düzeylerinde artış meydana geldiği, söz konusu modifikasyonların, yangı oluşumuyla birlikte ortaya çıkan klasik bulgularla ilişkili olduğu ifade edilmektedir [61, 62].

Bu çalışmada, mastitisin ineklerde lipit peroksidasyonu (MDA) ve GSH düzeylerini ne ölçüde etkileyebileceği ile hayvanlarda teşhis ve tedavinin erken yapılmasında biyokimyasal parametrelerin önemini tartışmak amaçlanmıştır.

Çalışmada mastitisli ve sağlıklı gruplar karşılaştırıldığında, sağlıklı grupta GSH değeri $1,39 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/ml}$, mastitisli grupta ise $1,33 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/ml}$ olarak tespit edilmiştir. Yine sağlıklı grupta MDA değeri $4,55 \pm 0,20$ nmol/ml iken mastitisli grupta $5,26 \pm 0,40$ nmol/ml olarak bulunmuştur.

İncelenen literatürlerde mastitis hastalığı ile lipit peroksidasyonu (MDA) ve GSH arasındaki ilişkiyi araştıran birkaç yayından başka bir yayına rastlanmamıştır. Bu nedenle mastitis ve yangısal hastalıkların semptom ve sağaltım yöntemlerinin benzerliği göz önünde bulundurularak tartışma yangısal hastalıklarla ilgili literatürlerle desteklenmiştir.

GSH, serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı koruma sağlayan ve sayısız hücrel fonksiyonlara sahip olan önemli endojen bir antioksidandır [63].

Bazı araştırmacılar [59, 64] mastitisli ineklerde GSH seviyesinin sağlıklı ineklere oranla daha düşük olduğunu bildirmektedirler. Mastitis olgularında yangıya bağlı olarak meydana gelen serbest radikallerin etkisi sonucu antioksidan kullanımı artmakta, bunun sonucunda da antioksidanların düzeyleri azalmaktadır. Bu çalışma, mastitisli ineklerde GSH değerleri kontrollerle kıyaslandığında yapılan önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Atroschi ve ark. [65] mastitisli ve sağlıklı inekler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, mastitisli olgularda kontrollere oranla GSH düzeyinin azaldığını saptamışlardır.

MDA, arakidonik asidin enzim oksijenasyonu sırasında üretilen, oksidatif lipit dejenerasyonunun bir ürünüdür [66]. Literatürlere göre [59, 64], mastitisli ineklerde MDA değerlerinin sağlıklı ineklere oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen MDA değerleri de literatür çalışmalarıyla benzerlik göstermektedir.

Dündar ve ark. [67] sağlıklı ve mastitisli ineklerde kan MDA düzeyi farkını önemli bulurken, süt MDA düzeyini farkını ise önemsiz bulmuşlardır. Başka bir araştırmada ise sağlıklı ve mastitisli koyunlar arasında plazma MDA düzeyi farkı önemsiz bulunmuştur [68]. Sağlıklı ve mastitisli gruplarda plazma MDA düzeyi araştırmacıların [67] bildirimleri ile uygunluk gösterirken, diğer araştırmacıların [68] bildirimleri ile benzer değildir.

Meme bezi yangılarında fagositik hücrelerin yangı yerine göçü sonucu aktivitelerine bağlı olarak daha fazla oksijen kullanılmasıyla lipit peroksidasyonu oluşmakta ve lipit peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA düzeyi artmaktadır [69].

Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan ürünler, kuvvetli bir antioksidan olan GSH tarafından peroksidasyonun erken dönemlerinde zar fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerini koruyarak oksidatif strese karşı savunma hattını oluşturmasıyla önlenmektedir [70].

Şimşek ve ark. [70] yaptıkları bir araştırmada sağlıklı ve mastitisli gruplar arasındaki farkı istatistiksel olarak plazma MDA ve eritrosit GSH için ($p < 0,001$) düzeyinde anlamlı bulmuşlardır. Yapılan bu çalışmada da mastitisli ve sağlıklı gruplar arasında fark istatistiksel olarak plazma MDA ve eritrosit GSH için ($p < 0,001$) düzeylerinde önemli bulundu.

Gürgöze ve ark. [61] sağlıklı ve bursitis prekarpalisli sığırlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, bursitis prekarpalisli sığırlarda sağlıklı sığırlara oranla GSH düzeylerinin azaldığı, plazma MDA düzeylerinin ise arttığını saptamışlardır.

Şındak ve ark. [71] sağlıklı ve çeşitli ayak hastalığı olan sığırlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada ise değişik ayak hastalığı olan sığırların, sağlıklı sığırlarla kıyaslandığında plazma MDA düzeylerinde önemli bir artışın meydana geldiğini saptamışlardır.

Sonuç olarak bu araştırmada, mastitisli ineklerde lipit peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA ve önemli bir endojen antioksidan olan GSH düzeylerinde önemli değişikliklerin olduğu saptandı. Bu aynı zamanda mastitisin erken teşhis ve tedavisi ya da diğer hayvanlara bulaşmasını önlemek açısından da önemlidir.

6. KAYNAKLAR

- [1]. Akkuş, İ., “Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri”, 1.Baskı, *Mimoza Yayınları*, Konya, (1995).
- [2]. Yanbeyi, S., “Aspirin ve Antioksidant Buthylated Hydroxyanisole’ün Tavşanlarda Eritrosit Total Katalaz, Süperoksit dismütaz ve Glutasyon peroksidaz Aktiviteleri Üzerine Etkileri”, Doktora Tezi, *Ondokuz Mayıs Üniv. Biyoloji Anabilim Dalı*, Samsun, (1999).
- [3]. Arıkan, S., Konukoğlu, D., Arıkan, Ç., Akçay, D., Davas, İ., “Lipit Peroxidation and Antioxidant Status in Maternal and Cord Blood”, *Gynecol Obstet, Invest*, 51: 145-149 (2001).
- [4]. Timurkan, H., “Sığırların Meme Yangısı”, *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 4(1-2): 237-250 (1993).
- [5]. Uzun, K., Vural, H., Öztürk, T., Özer, F., İmecik, İ., “Diagnostic Value of Lipit Peroxidation in Lung Cancer”, *Eastern Journal of Medicine*, 5(2): 48-51 (2000).
- [6]. Altıntaş, S., “Kahramanmaraş’ta Bazı İş Kollarında Çalışan Boya İşçilerinde Plazma ve Eritrosit Membranı Sialik Asit, Glutasyon, Plazma Nitrik Oksit ve Lipit Peroksidasyonu Düzeylerinin Değerlendirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniv., Fen Bil. Enstitüsü*, Kahramanmaraş, 8-23 (2006).
- [7]. Wu, D., Cederbaum, A.I., “Alcohol, Oxidative Stress and Free Radical Damage”, *Alcohol Research & Health*, 27(4): 277-284 (2003).
- [8]. Stolon, I., Oros, A., Moldaveanu, E. “Mineral view, Apoptosis and Free Radicals”, *Biochem. Mol. Med.*, 59: 93-97 (1996).
- [9]. Sözmen, E.Y., Onat, T., Tanyolaç, T, Erlaçın, S., “Eritrositlerin Antioksidan Enzimlerde Yaşa Bağlı Değişiklikler”, *Biyokimya Dergisi*, 18(3): 83-89 (1993).
- [10]. Güven, A., Güven, A., Kamiloğlu, N.N., “Kefirin Lipit Peroksidasyonuna Etkilerinin Araştırılması”, *Kafkas Üniv.Vet.Fak. Dergisi*, 10(2): 165-169 (2004).
- [11]. Esterbauer, H., Cheeseman, K.M., Dianzani, M.U., Poli, G., Slater, T.F., “Seperation and Characterization of the Aldehydic Products of Lipit Peroxidations Stimulated in Rat Liver Microsomes”, *Biochem. J.*, 208: 129-140 (1982).
- [12]. Yerer, M.B., Aydoğan, S., “Oksidatif Stres ve Antioksidantlar”, *Erciyes Üniv. Sağlık Bilimleri Dergisi*, 9(1): 49-53, (2000).
- [13]. Mayer, B., Pfeiffer, S., “A New Pathway of Nitrit Oxide / Cyclic GMP Signalling Involving S-nitrosoglutathione”, *J. Biol. Chem.*, 273(6): 3264-3270 (1998).

- [14]. Özdemir, G., “Reaktif Oksijen Partikülleri (ROP)”, *Roche Bilimsel Eserleri Serisi*, (1993).
- [15]. Little, R.E., Gladen, B.C., “Levels of Lipid Peroxides in Uncomplicated Prenancy: a Review of the Literature”, *Reproductive Toxicology*, 13: 347-352 (1999).
- [16]. Tekkes, Y., “Streptozotosin ile Diabet Oluşturulmuş Farelerde Aspirin ve E Vitaminin Dokularda Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Sisteme Etkisinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniv., Fen Bil. Enstitüsü*, Kahramanmaraş, 1-23, (2006).
- [17]. Şengil A., Gürbilek, M., “Serbest Radikaller”, *Selçuk Üniv. Tıp Fak. Dergisi*, 13(4): 673-681 (1992).
- [18]. Czapski, G., “Reaction of OH: In Colowick SP. Kaplan NO (eds).”, *Methods in Enzymology*, Academic Pres. New York, Volume 105: 209-215 (1984).
- [19]. Nishiyama, Y., İkedda, H., Haramaki, N., “Oxidative Stress is Related to Exercise Intolerance in Patients with Heart Failure”, *Am Heart J.*, 135: 115 (1998).
- [20]. Carr, A.C., McCall, M.R., Frei, B., “Oxidation of LDL By Myeloperoxidase and Reactive Nitrogen Species Reaction Pathways and Antioxidant Protection”, *Arterioscl. Thromb Vasc Biol.*, 20: 1716-1723 (2000).
- [21]. Rencüzoğulları, N., “Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Kadmiyum Toksikasyonu Üzerine Likopenin Etkilerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Mustafa Kemal Üniv. Sağlık Bil. Enstitüsü*, Hatay, 1-11 (2006).
- [22]. Cheeseman, K.H., Slater, T.F., “An Introduction to Free Radical Biochemistry”, *British Med. Bull.*, Jul, 49(3): 481-493 (1993).
- [23]. Stahl, W., Sies, H., “Introduction; Reactive Oxygen Species”, *Research Monographs*, 1-2 (2002).
- [24]. Evan, C.R., Halliwell, B., Cunt, G.G., “Free Radicals and Oxidative Stress : Enviroment”, *Drugs and Food Addivites*, Protland Press. London, 120-129 (1995).
- [25]. Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T., “Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma”, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 3-4: 92-95 (1997).
- [26]. Vural, H., Akkus, İ., Bor, A., “Serbest Radikaller ve Yaşlanmadaki Rolü”, *Selçuk Üniv. Tıp Fak. Derg.*, 11(1): 101-103 (1995).
- [27]. Cross, C.E, Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M., Harman, D., “Oxygen Radicals and Human Disease”, *Ann Intern. Med.*, Oct. 107(4): 526- 545 (1987).

- [28]. Kankofer, M., "Pleacantal Release/ Retention in Cows and Relation to Peroxidative Damage of Macromolecules", *Rebrod Dom anim.*, 37: 27-30 (2002).
- [29]. Cape, G., Thorpe, G., Holder, R., "Serum and Tissue Antioxidant Caposity in Cevrical Intraepithelial Neoplasia Investigated Using an Enhanced Chemiluminescand Reaction", *Annals of Clin. Chem.* , 36: 86-93 (1990).
- [30]. Altıntaş, Y., Güven, M., İnce, E., Açbay, Ö., Caner, M., Sultanbek, G., Hatem, H., "The invitro Effects of Captopril on the Levels of Lipid Peroxidation and Glutathione of Erythrocytes in Type II Diabetics", *Tr. J. Med. Sci.*, 26:139-142 (1996).
- [31]. Dingiloğlu, N., Özmen, D., Bayındır, O., Kutay, F., Yılmaz, C., "Diabetiklerde Eritrosit ve Plazma Lipit Peroksitleri, Eritrosit GSH ve Glikoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Düzeyleri", *Biyokimya Dergisi*, 18(3): 13-18 (1993).
- [32]. Okoda, M., Ito, Y., Inano, K., Mudo, T., Mussato, T., "Structural Changes in Oxidative Modifacation Products, Surface Change and Spectrophotometric Patterns", *Ann Clin. Biochem.*, 34: 173-178 (1997).
- [33]. Güven, A., Güven, A., Gülmez, M., Beytut, E., Erişir, M., "Aterosklerotik Farelerde Kefir ve Yoğurdun, Lipit Peroksidasyonuna ve Antioksidan Enzimlere Etkileri", *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 9(1): 79-83 (2003).
- [34]. Aydemir, T., Öztürk, R., Bozkaya, L.A., Tarhan, L., "Effect of Antioxidant Vitamins A, C, E and Trace Elements Cu, Se on CuZn SOD, GSH-Px, CAT and LPO Levels in Chicken Erythrocytes", *Cell Biochemistry and Function*, 18: 109-115 (2000).
- [35]. Güven, A., Güven, A., Gülmez, M., "The Effect of Kefir on the Activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO Levels in Carbon Tetrachloride –Induced Mice Tissues", *J. Vet. Med.*, 50: 412-416 (2003).
- [36]. Yoneyama, Y., Sawa, R., Suzuki, S., Doi, D., Yoneyama, K., Otsubo, Y., Araki, T., "Relationship Between Plasma Malondialdehyde Levels and Adenosine Diaminase Activities in Pre-eclampsia", *Clin. Chim. Acta.*, 322: 169-173 (2002).
- [37]. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, R.A, Rodwell, V.W., "Fizyolojik Öneme Sahip Lipitler", Harper'ın Biyokimyası 24. Baskı, Çev: Dikmen, N., Özgünen, T., *Bariş Kitabevi*, İstanbul (1996).
- [38]. Köse, K., Doğan, P., "Lipit Peroksidasyonu", *Erciyes Üniv. Tıp Fak. Derg.*, 1: 340-350 (1992).
- [39]. Freeman, B.A., Crapo, J.D., "Biology of Disease. Free Radicals and Tissue Injury", *Lab. Invest*, 47: 412-426 (1982).

- [40]. Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., "Oxidants, Antioxidants and the Degenerative Disease of Aging", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(17): 7915-7922 (1993).
- [41]. Ürek, R.Ö., Bozkaya, L.A., Tarhan L., "The Effect of Antioxidant Vitamin and Trace Elements of Cu, SOD, CAT, GSH-Px and LPO Levels in Chicken Tissues", *Cell Biochem. Funct.*, 19: 125-132 (2001).
- [42]. Meister, A., Anderson, M.E., "Glutathione", *Ann. Rev. Biochem.*, 52: 711-760 (1983).
- [43]. Kamiloğlu, N.N., "Tuj Koyunlarında Döl Verimi ve Antioksidatif Savunma Sistemi Üzerine A Vitamini ve β -Karoten Enjeksiyonlarının Etkileri", Doktora Tezi, *Kafkas Üniv. Sağlık Bil. Enst.*, Kars, 29-41 (2002).
- [44]. Güven, A., "Kaz Karaciğerlerinde Karbon Tetraklorür (CCl_4) ve Etil Alkol (C_2H_5OH) ile Oluşturulan Doku Hasarlarında Redükte Glutasyon (GSH), Glutasyon-S-Transferaz (GST) ve Selenyum (Se) Düzeylerinin Araştırılması", Doktora Tezi, *Kafkas Üniv. Sağlık Bil. Enst.*, Kars, 4-37 (2003).
- [45]. Champe, P.C., Harvey, R.A., "Glikozaminoglikanlar", Biyokimya, Lippincott's Illustrated Reviews Serisi, Çev.; A. Tokullugil, M. Dirican, E. Ulukaya., *Nobel Tıp Kitabevi*, İstanbul, 147- 156 (1997).
- [46]. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodweel, V.W., "Harper'ın Biyokimyası" Çev.; Menteş, G., Ersöz, B., *Barış Kitabevi*, 46, 814 (1993).
- [47]. Ferreyra, E.C., Bernacchi, A.S., Castro, J.A., "Increased Glutathione (GSH) Content in Livers of Control and Carbontetrachloride Poisoned Rats Treated with the Anticalmodulin Drug Trifluoperazine (TFP)", *Res. Commun Chem. Path. Pharmacol.*, 53-3, 399-402 (1986).
- [48]. Lamphug, S.M., Apeageyi, F., Mwanmut, D., Hendrickse, R.G., "Aflatoxins in Breast Milk, Neonatal Cord Blood and Serum of Pregnant Women", *Br. Med. J.*, 296: 968 (1988).
- [49]. Blosser, T.H., "Economic Losses from the National Research Program on Mastitis in the United States, Symposium: Bovine Mastitis", *Journal of Dairy Science*, 62: 119-127 (1977).
- [50]. Yalçın, C., Cevger, Y., Türkyılmaz, K., Uysal, G., "Süt İneklerinde Subkilinik Mastitisten Kaynaklanan Süt Verim Kayıplarının Tahmini", *Türk J. Anim. Sci.*, 24: 599-604 (2000).
- [51]. Eskiizmirliler, S., "Sığırlarda Mastitis", Büyükbaş Hayvan Hastalıkları, *Çiftçi Eğitim Serisi Yayınları*, Ankara, 6: 21-35 (2004).

- [52]. Huang, L.Q., Rongxiang-Cai, M.S., “Correlation Between Somatic Cell Counts, Bacteria and Enzymes in Milk of Subclinical Mastitis”, *Proceeding of the Third IDF International Mastitis Seminar*, Telaviv, Israel, 88-91 (1995).
- [53]. Uzmay, C., Kaya, A., Kaya, İ., Akbaş, Y. “İzmir İli Holstein Damızlık Süt Sığırı Yetiştirici Birliği İşletmelerinde Mastitisin Yaygınlık Düzeyi ve Etkileyen Etmenler Üzerine Araştırmalar”, *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 38(2-3): 71-78 (2001).
- [54]. Aydın, N., “Mastitisten Korunma Yöntemleri ve İmmünizasyonun Önemi”, *I. Mastitis Semineri*, Ankara, (1984).
- [55]. İzgür, H., “Mastitise Predispoze Faktörler”, *I. Mastitis Semineri*, Ankara, (1984).
- [56]. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K., “Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction” *Anal. Biochem.*, 95: 351-358 (1979).
- [57]. Sedlak J., Lindsay R.H., “Estimation of Total Protein-bound and Non-protein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman’s Reagent”, *Anal. Biochem.*, 25: 192-205 (1968).
- [58]. Smith, K.L., “Mastitis Control: A Discussion”, *J. Dairy Sci.*, 66: 1790- 1794, (1983).
- [59]. Şimşek, H., Aksakal, M., “Subklinik Mastitisli İneklerde E Vitamininin Plazma A Vitamini, Beta- Karoten, Glutasyon Peroksidaz, Redükte Glutasyon ve Süt A Vitamini Düzeylerine Etkisi”, *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 20(3): 199-203 (2006).
- [60]. Kızıl, Ö., Gül, Y., “Şap Aşısı Uygulanan Besi Sığırlarında Antioksidan Vitaminlerin Klinik ve Hemotolojik Parametreler ile Antioksidan Enzim ve Lipit Peroksidasyon Düzeylerine Etkisi”, *F.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi*, 18(2): 97-106 (2004).
- [61]. Gürgöze, S.Y., Şındak, N., Yılmaz, S., Sertkaya, H., Ozan, S.T., “Bursitis Prekarpalisli Sığırlarda Kortikosteroid Tedavisinin Bazı Antioksidan Enzim ve Lipit Peroksidasyon Seviyeleri Üzerine Etkileri”, *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Dergisi*, 14(2): 97-101 (2003).
- [62]. Ramos, V.A., Ramos, P.A., Dominguez, M.C., “The Role of Oxidative Stress in Inflammation in Patients with Juvenil Rheumatoid Arthritis”, *J. Pediatr.*, 76(2): 125-132 (2000).
- [63]. Hayes, J.D., McLellan, L.I., “Glutathione and Glutathione Dependent Enzymes Represent a Coordinately Regulated Defence Against Oxidative Stress”, *Free Radic. Res.*, 31(4): 273-300 (1999).

- [64]. Atroshi, F., Työppönen, J., Sankari, S., Kangasntemi, R., Parantainen, J., “Possible Roles of Vitamin E and Glutathione Metabolism in Bovine Mastitis”, *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 57: 37-43 (1986).
- [65]. Atroshi, F., Parantainen, J., Sankari, S., Osterman, T., “Prostaglandins and Glutathione Peroxidase in Bovine Mastitis”, *Res. Vet. Sci.*, 40: 361-366 (1986).
- [66]. Bird, R.P., Draper, H.H., “Comparative Studies of Different Methods of Malondialdehyde Determination”, *Methods Enzymol.*, 105: 299-305 (1984).
- [67]. Dündar, Y., Eryavuz, A., Aslan, R., Uçar, M., “Malondialdehyde and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Levels in Healthy and Subclinical Mastitis Cows”, *Y.Y.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 6: 84-86 (2000).
- [68]. Colitti, M., Stradaidi, G., Stefanon, B., “Effect of α -tocopherol Deprivation on the Involution of Mammary Gland in Sheep”, *J. Dairy Sci.*, 83: 345-350 (2000).
- [69]. Mayer, S.J., Wterman, A.E., Keen, P.M., Craven, N., “Oxygen Concentration in Milk of Healthy and Mastitic Cows and Implications of Oxygen Tension”, *J. Dairy Sci.*, 55: 513-519 (1988).
- [70]. Şimşek, H., Aksakal, M., “Sublinik Mastitisli İneklerde Kan ve Sütte Lipit Peroksidasyon ve Bazı Antioksidanlar Üzerine E Vitamininin Etkisi”, *Ankara Üniv. Vet. Fak. Dergisi*, 52: 71-76 (2005).
- [71]. Şındak, N., Gürgöze, S.Y., Sertkaya, H., Biricik, H.S., “ Bazı Ayak Hastalıklarının Antioksidan Enzim ve Lipit Peroksidasyon Düzeyleri Üzerine Etkisi”, *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Dergisi*, 15(1-2): 5-9 (2004).

7. ÖZGEÇMİŞ

Gaziantep ilinin İslahiye ilçesinde 1980 yılında doğdu. İlk ve orta öğrenimini aynı ilçede tamamladıktan sonra 2000 yılında Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı ve 2004 yılında ikincilikle biyolog olarak mezun oldu. 2004 yılında aynı üniversitede Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.