

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL KRONİK FLOROZİS OLUŞTURULMUŞ TUJ IRKI
KOYUNLARDA ERİTROSİT SOD, CAT VE GSH-Px
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

138201

Arş. Gör. Sena ÇENESİZ
Biyokimya Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
TEZ YAKLAŞIM MERKEZİ

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Ayla ÖZCAN

Bu çalışma KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir. Proje No. 2003-VF-010

2003-KARS

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyokimya Doktora programı çerçevesinde Arş. Gör. Sena ÇENESİZ tarafından hazırlanmış olan "Deneysel kronik florozis oluşturulmuş tuj ırkı koyunlarda eritrosit SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinin araştırılması" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek **OY BİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: **10.07.2003**

Adı Soyadı

İmza

Başkan: Prof. Dr. Necati KAYA


Üye: Doç. Dr. Şaban MARAŞLI

Üye: Doç. Dr. Sedat YILDIZ

Üye: Yrd. Doç. Ayla ÖZCAN (Danışman)

Üye: Yrd. Doç. Dr. Necati UTLU

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun **19.08.2003** gün ve **08/29**..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Yrd. Doç. Dr. Ayla ÖZCAN
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

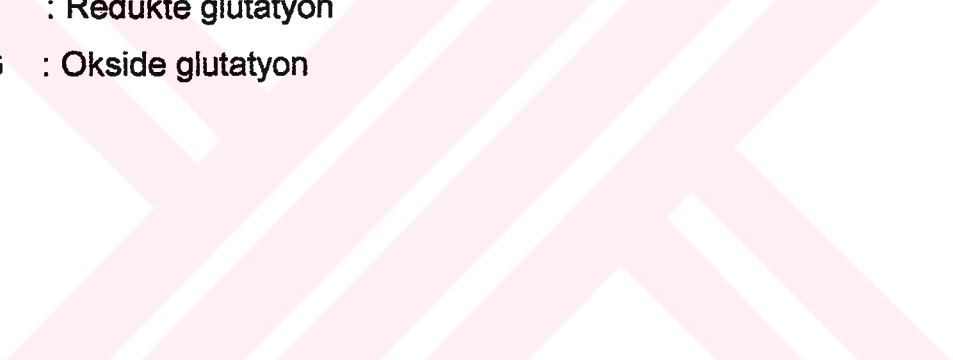
Simgeler ve Kısaltmalar	I
Grafikler Dizini	II
Tablolar Dizini	III
Önsöz	IV
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	1
1.1. Florun Kimyasal Özellikleri	1
1.2. Flor Kaynakları ve Kullanıldığı Alanlar	1
1.3. Flor Metabolizması	2
1.3.1. Vücuda Alınması ve Emilimi	2
1.3.2. Plazmada Flor	4
1.3.3. Florun Birikimi ve Atılması	4
1.4. Flor Zehirlenmesi (Florozis)	5
1.4.1. Akut Florozis	6
1.4.2. Kronik Florozis	7
1.4.2.1. Dental Florozis	8
1.4.2.2. Sistemik Florozis	8
1.5. Floroziste Tanı	10
1.6. Floroziste Enzimler	11
1.7. Floroziste Serbest Radikaller	12
1.8. Reaktif Türler Olarak Radikaller	13
1.8.1. Radikaller Nasıl Oluşur?	14
1.8.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)	16
1.8.1.2. Hidroksil Radikali ($\cdot OH$)	18
1.8.1.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	19
1.8.1.4. Singlet Oksijen (1O_2)	21
1.8.1.5. Nitrik Oksit (NO)	22
1.9. Karakteristik Radikal Reaksiyonları	24
1.10. Serbest Radikal Kaynakları	24
1.11. Klinik Durumlardaki Serbest Radikal Ajanları	25

1.12. Ne Kadar Radikal Yapımı?	26
1.13. Hücredeki Geçiş Metalleri ve Serbest Radikal Kaynakları	27
1.14. Serbest Radikallerin Organizmadaki Etkileri	29
1.14.1. Lipidlere Etkileri	30
1.14.2. Proteinlere Etkileri	31
1.14.3. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri	32
1.14.4. Karbonhidratlara Etkileri	33
1.15. Antioksidan Savunma Sistemleri	33
1.16. Antioksidan Etki Tipleri	35
1.17. Antioksidan Enzimler	36
1.17.1. Süperoksit Dismutaz (E.C.1.15.1.1, EC-SOD)	36
1.17.1.1. Bakır-Çinko İçeren SOD (Cu,Zn-SOD)	37
1.17.1.2. Mangan İçeren SOD (Mn-SOD)	38
1.17.1.3. Demir İçeren SOD (Fe-SOD)	38
1.17.2. Katalaz (CAT) (E.C.1.11.1.6)	39
1.17.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) (EC.1.11.1.9)	40
1.17.4. Glutasyon-S-Transferazlar (GST) (E.C.2.5.1.18)	42
2. MATERYAL METOT	45
2.1. Materyaller	45
2.1.1. Hayvan Materyali ve Numunelerin Hazırlanması	45
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	46
2.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler	46
2.2. Metotlar	46
2.2.1. İdrarda pH Ölçümü	46
2.2.2. İdrarda Flor Ölçümü	47
2.2.3. Kanda Hemoglobin (Hb) Tayini	48
2.2.4. Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini	49
2.2.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini	50
2.2.6. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Tayini	53
2.2.7. İstatistik Hesaplamalar	55
3. BULGULAR	56
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	61

5. ÖZET	66
6. SUMMARY	67
7. KAYNAKLAR	68
8. ÖZGEÇMİŞ	80
9. TEŞEKKÜR	81



SİMGELELER VE KISALTMALAR

- WHO : Dünya Sağlık Örgütü
ALP : Alkalen fosfataz
LDH : Laktat dehidrogenaz
CAT : Katalaz
AST : Aspartat aminotransferaz
ALT : Alanin aminotransferaz
PMN : Polimorfonükleer lökositler
SOD : Süperoksit dismutaz
GSH-Px : Glutatyon peroksidaz
EDTA : Etilen diamin tetraasetik asit
GSH : Redükte glutatyon
GSSG : Okside glutatyon
- 

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 3.1. Kontrol ve deneme gruplarında aylara göre ağırlık değişimleri	56
Grafik 3.2. Deneme grubu koyunlarda idrar pH değişimleri	57
Grafik 3.3. Deneme grubu koyunlarda idrar flor değişimleri	58
Grafik 3.4. Kontrol ve deneme grubunda eritrosit SOD aktivitelerindeki değişimler	59
Grafik 3.5. Kontrol ve deneme grubunda eritrosit GSH-Px aktivitelerindeki değişimler	59
Grafik 3.6. Kontrol ve deneme grubunda eritrosit CAT aktivitelerindeki değişimler	60



TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Doğal (endojen) antioksidanlar	34
Tablo 1.2. Eksojen (farmakolojik) antioksidanlar	35
Tablo 3.1. Kontrol ve deneme gruplarında aylara göre ağırlık değişimleri	56
Tablo 3.2. Kontrol ve deneme gruplarına ait SOD, GSH-Px ve CAT aktiviteleri	58



ÖNSÖZ

Canlılar için bir iz element olan flor dişlerin gelişim süreci içerisinde sistemik yolla alınarak diş yapısına girer. Hava, toprak ve suda mevcut olup, en fazla alınma yolu sudur. Diş çürümelerine karşı suyla alınması gerekli miktarı 1 ppm'dir. Bu düzeyden fazla ve sürekli alınması durumunda flor zehirlenmesi adı verilen "Florozis" meydana gelmektedir.

Florozis, toprakta ve suda yüksek konsantrasyonda flor bulunan volkanik bölgelerde, endüstriyel flor atığının fazla bulunduğu alanlarda endemik olarak ortaya çıkmaktadır.

Ülkemizde, Isparta ve yöresinde, Samsun ili çevresinde Vezirköprü ve Havza ilçelerinde, İç Anadolu Bölgesinde Eskişehir ili Beylikova ilçesi Kızılcaören köyünde, Kırşehir ili Kaman ilçesi Bayındır köyünde, Doğu Anadolu Bölgesinde volkanik bölge olan Tendürek Dağının çevresindeki Ağrı ili Doğubeyazıt ilçesinde, Van ili Muradiye ilçesinde, Elazığ ili Keban ilçesinde doğal volkanik arazi ve flor rezervlerinin bulunuşu sebebi ile uzun yıllardan beri endemik florozis görülmektedir. Ayrıca alüminyum fabrikasının bulunduğu Konya-Seydişehir ve tuğla ve kiremit fabrikalarının bulunduğu Elazığ Hicret Mahallesi ve Sivrice ilçesinde, Muğla-Yatağan bölgesinde de endüstriyel florozise rastlanmıştır.

Ancak, ülkemizde florozis olgularının gerçek durumunu saptama yönünden, yeteri kadar bir tarama ve yoklama yapılarak gerçek durum ortaya konabilmiş değildir. Ülkemizin volkanik oluşumlar ve fosfat yataklarınca zengin oluşu göz önünde tutulursa henüz ortaya çıkartılmamış zehirlenme odaklarının bulunması olasılığı fazladır.

Endemik florozis görülen bölgelerdeki koyun ve sığırların dişlerinin birkaç yıl içinde aşınıp dökülmesi sebebi ile yeteri kadar gıda alamadıklarından et, süt ve yapağlarının hem miktarı azalmakta hem de kalitesi düşmektedir. Ayrıca enzim inhibitörü veya aktivatörü olarak ve vücuttaki organik elementlerin dengesini bozarak metabolizmayı olumsuz etkilemektedir. Hayvanlar elden çıkarılmakta, bu da Türkiye’de hayvancılık sektörüne darbe vurmaktadır.

Organizmaya dışarıdan zehir düzeyinde maddeler alındığında antioksidan sistem harekete geçmektedir. Fakat hangi düzeylerde, hangi antioksidan maddenin aktive veya inhibe olduğu konusunda çeşitli görüşler vardır.

Literatür taramalarında çoğunlukla kendi doğal ortamı içinde fazla miktarda flor alan hayvanlara ait biyolojik meteryallerle çalışılmış, kontrollü deneysel çalışmalara ise çok az sayıda rastlanmıştır. Bu çalışmada ise deneysel kronik florozis oluşturulmuş Tuj ırkı koyunlarda CAT, SOD ve GSH-Px’in aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

1.1. Florun Kimyasal Özellikleri

Flor, periyodik sistemin halojenler sınıfından olan VII A grubu elementidir. Atom numarası 9, atom ağırlığı 19, proton ve elektron sayısı 9, nötron sayısı 10'dur. Kristal yapısı kübiktir ve 1886'da Joseph Henri Moisson tarafından bulunmuştur. Açık sarı renkte oldukça toksik ve aşındırıcı etkiye sahiptir (31,82). Kimyasal olarak en aktif ve en elektronegatif elementtir ve doğada her yerde bulunur (31,78). Diğer halojenlerle (iyot, Klor, Brom) çok kolaylıkla yer değiştirerek onların yerini alabilir (31).

Flor bileşiklerinden bazılarının yapısı ve özellikleri (86)

		<u>Mol.ağırlığı</u>	<u>% F içeriği</u>	<u>Çözünme durumu</u>
CaF ₂	Kalsiyum florür (florospar)	78,08	48,67	Suda pratik olarak çözünmez
CaPO ₃ F	Kalsiyum florofosfat	138,06	13,76	Suda az çözünür
NaBF ₄	Sodyum floroborat	109,82	69,21	Suda az çözünür
AlF ₃	Alüminyum florür	83,98	67,87	Suda az çözünür
NaF	Sodyum florür	42	45,24	Suda az çözünür

1.2. Flor Kaynakları ve Kullanıldığı Alanlar

Toprak, su, atmosfer, bitkisel ve hayvansal dokularda değişik yoğunluklarda bulunan ve üniversal bir halojen olan flor (35,95), yer kabuğunun oluşumuna katılan temel elementlerden birisidir (86) ve volkanik bölgelerdeki su kaynakları yüksek oranda flor ihtiva etmektedir (10,81). Fosfat kayalarının (flor yoğunluğu % 3-4) bulunduğu ülkelerde; Cezayir, Çin, İzlanda, Kuzey-Güney Amerika (86), Hindistan (9), Yeni Zelanda (61), Moldova (90,95), Utah, Idaho (62), Meksika (70,77) gibi geniş bölgelerdeki topraklarda flor içeriği % 0,05 ve özellikle yer altı sularında 15 ppm'e kadar çıkabilmektedir (86). Florid kömür madenlerinin ve endüstriyel bölgelerin çevresindeki geniş

alanlarda da gözlenir (9). Doğada serbest halde bulunmaz. Başlıca bulunuş şekilleri; florospor, kriyolit, spotit, topaz, taurmalin ve mikadır . II. Dünya Savaşına kadar yaygın olmayan flor üretimi gerek atom bombası yapımı, gerekse uranyum madeninin çıkarılması sırasında ihtiyaç duyulması sebebi ile hızlanmıştır (31).

Demir-çelik ve döküm, alüminyum, cam, seramik, tuğla-kiremit, petrokimya sanayi iş kollarında faaliyet gösteren fabrikalar, petrol ürünleri, süper fosfat fabrikaları, termik santraller, pestisid fabrikaları, uranyum tesisleri, demir taşı kalsinasyonu, boya üretimi, petrol rafinerileri, araç emülsiyonları, teflon tava fabrikaları, ilaç sanayi (prozac, anestezikler), kömür madeni işletmeciliği endüstriyel flor kaynakları olarak önemli rol oynamaktadır (21,31,41,64,73,87).

Yüksek oranda flor içeren minerallerle çalışan bazı metalurji dallarında uygulanan yüksek ısı sonucunda artık ve kaçaklar şeklinde flor bileşikleri açığa çıkarak, baca gazları, toz ve duman halinde sanayi kuruluşları çevresindeki bitkilerin ve açık su kaynaklarının kirlenmesine yol açar. Bu tür baca artıkları bazen meteorolojik olaylarla çok uzak mesafelere sürüklenmek suretiyle oldukça geniş bir alanı kirletebilmektedir (87).

1.3. Flor Metabolizması

1.3.1. Vücuda Alınması ve Emilimi

Florun vücuda alınması inhalasyon, çeşitli ilaçlar, yiyecek ve su ile olmaktadır.

1. Inhalasyon: Flor içeren toprağın tozu, endüstri gazları, yanmış kömür ve volkanik gazlar en önemli kaynaklardır (60,86). Atmosferdeki flor hidrojen florür olarak bulunur ve akciğerden hızla emilir (32,86). Bu yolla emilim gastrointestinal kanala göre çok daha hızlıdır (69).

2. İlaçlar: Anestezide kullanılan ve flor içeren organik moleküllerin biotransformasyonu sonucu açığa çıkabildiği gibi (Methoksifluran, halotan, enfluron, prozoc) antihelmintiklerle de alınabilir (32,87).

3. Yiyecekler: Yiyeceklerde bulunan flor miktarı 0,01-1,0 mg/kg arasında değişiklik gösterir. Yüksek düzeyde flor içeren deniz sularından çıkarılan ürünler ve çay en fazla flor alımına neden olabilecek besinlerdir. İngiltere'de yapılan bir çalışmada içime hazır olan çaydaki flor miktarının 0,4-2,8 mg/lt olduğu saptanmıştır (31,32).

4. Su: Doğadaki florun ana kaynağı volkanik kayalardır ve bu bölgelerdeki kaynak suları yüksek oranda flor içerir (32,60). Suyun kaynatılması ile florun yaklaşık % 50'si kaybolur. Yumuşak ya da az mineralize sularda daha fazla, sert ya da yoğun mineralize sularda ise daha az flor vardır. Suyun içerisinde bulunan klor ve sodyum bikarbonat kayalardan florun çözünmesine sebep olduğundan bu tip sulardaki flor miktarı yüksektir.

İnsanlar için en önemli flor kaynağı sudur. Yetersiz alımına bağlı diş çürükleri veya aşırı alımına bağlı florozis şekillenebilir (32). Her bir bireye göre maruz kalınabilecek flor dozu alınan su miktarına, sudaki flor konsantrasyonuna ve vücut ağırlığına göre değişir (70).

Oral yolla alınan florun yaklaşık %90'ından fazlası mideden ilk yarım saat içerisinde emilir (32,35,86). Çözünabilir flor bileşikleri (sodyum florür ve sodyum florosilikat gibi) ağızdan verildikten sonra daha iyi emilebilirken, daha az çözünen flor bileşikleri (kriyolit, florospar gibi) ise orta derecede emilirler (86). Üst gastrik sistemden bu denli hızla emilmesi, intoksikasyonlarda tedaviye yaklaşım ve yaklaşım zamanlamasını planlamada önem taşır (32).

Florun sindirim sisteminden emilimini, alınan besinlerdeki Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Al^{+3} iyonları etkiler. Bunlar flor iyonları ile düşük eriyebilirliğe sahip kompleksler oluşturarak, flor emilimini geciktirirler (55). Al^{+3} ve Ca^{+2} florun

mide barsak kanalından emilimini engeller (32,55). Nitekim florla birlikte alüminyum sülfat verilen koyunlarda serum, idrar, kemik ve dışkıdaki flor miktarının düştüğü (43), karaciğer ve böbreklerdeki patolojik lezyonların azaldığı rapor edilmiştir (42).

1.3.2. Plazmada Flor

Gastrointestinal kanaldan veya akciğerlerden alınan florun %90'ı albumine bağlı halde kan dolaşımında bulunurken %10'u ise biyolojik olarak aktif iyonize formdadır ve iyon şeklindeki flor önemli bir role sahiptir (76). İyonize formu spesifik elektrotlarla tayin edilebilirken non-iyonize yani bağlı formu tespit edilemez (32,48). İyonize ve bağlı formların toplam miktarı, total plazma floru olarak adlandırılır. İyonik ve total flor miktarı arasındaki fark non-iyonik formun miktarını yansıtır (32).

Sağlıklı bireylerde serum veya plazma flor konsantrasyonu 10-200 µg/L, eritrositlerde 450 µg/L'dir (35). İçme sularındaki flor düzeyi 2,0 ppm'in altında olan yörelerde plazma non-iyonik flor miktarı daha yüksektir. Florozisin erken dönemlerinde non-iyonik formu azalırken iyonik formda artma olduğu kaydedilmiştir (48). Flor düzeyi 5,6 ppm'in üzerine çıkınca plazmada iyonik formun daha da yüksek değerlere ulaşmasıyla flor alımı artsa bile non-iyonik formun konsantrasyonunda bir artış olmadığını göstermektedir (32).

1.3.3. Florun Birikimi ve Atılması

Yapılan çalışmalarla diş çürümelerini önlemek için günlük flor miktarının 0,1 mg/kg'ı aşmayacak şekilde olması gerektiği bildirilmiştir (32). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) desteklediği sulardaki flor konsantrasyonu 1 ppm düzeyindedir (6,29).

Vücuda alınan flor hızla hücre membranından geçerek en fazla diş ve kemikler olmak üzere iskelet, kalp kası, karaciğer, deri ve eritrositlere dağılır. (35,78).

En önemli atılım yolu böbreklerdir (35,87) ve çok yavaş bir hızla atılır (87). Alkali idrardaki flor atılımı daha fazla olur (32). Memeler florun süte geçişini sınırlayan biyolojik bir engel görevi yaparlar. Bu nedenle hayvanlardan elde edilen sütler, yem ve sulardaki flor varlığından çok az etkilenir (87). İnsanlarda yapılan çalışmalarda anne sütünde bulunan flor miktarının çok düşük olduğu tespit edilmiştir (32). Sütteki bu flor sindirim kanalından kolay emilemez (86). Flor fôtusta zararlı etkiler yapabilecek ölçülerde plasentadan da geçmez fakat bu türe bağlı değişebilir (87). Fransa'da yapılan bir çalışmada gebeliği sırasında flor tableti verilen annelerin fôtuslarında daha yüksek flor konsantrasyonu bulunduğu ve florun transplasental yolla bebeğe geçebildiği gösterilmiştir. Ayrıca gebeliğin 3-4. ayından sonra flor kullanan annelerin bebeklerinin daha sağlıklı dişlere sahip olduğu tespit edilmiştir (32). Sally ve ark.'nın (98) gebe koyunlar üzerinde yaptıkları çalışmada da süte ve plasentaya geçiş tespit edilmiştir.

1.4. Flor Zehirlenmesi (Florozis)

Florun fazla alımı sonucu bir takım klinik semptomlar gözlenir ki bu durumda florozis şekillenir. Florun letal dozu insanlar için 70-140 mg/kg'dır. %2'lik konsantrasyondaki flor solüsyonlarının oral yoldan alımı akut mukozal hücre ölümüne yol açar (32). Florun zehirliliği;

1. Bileşiğin tipi ve çözünürlüğüne
2. Alınan miktarına
3. Maruz kalma süresine
4. Hayvanın türü ve yaşına
5. Vücuttan atılma hızına
6. Beslenme şekline

7. Soğuk, kuraklık, bireysel duyarlılık gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterir (86).

Endemik florozis yetersiz beslenen toplumlarda daha sıklıkla gözlemlenir (18). Flora en duyarlı hayvanlar sırasıyla sığır (buzağı ve süt inekleri), koyun ve atlar (81,86,87), en dirençli hayvanlar ise kanatlılardır (84).

Deneysel olarak incelenen bileşikler arasında sodyum florür, sodyum florosilikat ve atmosferik bulaşmayla bitkilerde depolanan florlu bileşikler en fazla zehirli, kalsiyum florür (florospar) ise en az zehirli bileşikler olarak belirlenmişlerdir (86,87).

Flor alımına bağlı zehirlenmeler akut ve kronik olarak iki farklı şekilde oluşur (32,86,87).

1.4.1. Akut Florozis

Akut zehirlenme genellikle bir kaza sonucu olarak sodyum floroasetat gibi rodentisid zehirlerin, sodyum florosilikat, sodyum florür ve aşırı derecede flora bulaşmış su, bitki ve yemlerin fazla miktarda alınmasıyla ortaya çıkar. Akut zehirlenmeler yönünden özellikle sodyum floroasetat ve sodyum florür tehlikeli bileşikler olarak kabul edilmektedir (87). Bu türden zehirlenmelere en fazla domuzlarda sodyum florür kullanılması nedeni ile rastlanmıştır. Antelmentik amaçlarla % 4-5 oranında yemlere karıştırılarak verilen bu bileşik şiddetli toksik etki yapar. Domuzlar için hazırlanmış yemlerin inekler tarafından yenilmesiyle de zehirlenme kazaları olmaktadır. Sodyum florosilikatın pestisid amaçlarla kullanılması sonucu çiftlik hayvanlarında azımsanmayacak sıklıkla zehirlenmelerle karşılaşılır.

Akut zehirlenmeye yol açacak ölçülerde alınan sodyum floroasetat ve sodyum florür, anaerobik glikolizis enzimlerini, kolinesteraz, lipaz, fosfataz enzimlerini inhibisyona uğratar. Magnezyum ve çinko içeren enzimleri, doku

solunumunu bozar (32). Hızla gelişen metabolik bozukluklar ölüme yol açar (87). Florun kalsiyuma karşı gösterdiği yüksek ilgi sonucu kanın pıhtılaşma kapasitesi azalır, hızla gelişen hipokalsemiye bağlı olarak konvülsiyonlar görülür (32,86).

Ağızdan alınan florun aşırı yakıcı ve irkiltici etkisine, mide sıvısındaki HCl ile reaksiyona girerek oluşturduğu hidrojen florürün iritan etkisine bağlı olarak kusma, karın sancısı, ishal, gastroenterit, kas zayıflığı, fibriler titreme, arka ayaklarda parezi, halsizlik, konvülsiyonlar şeklinde semptomlar görülür (32,87). Şiddetli olaylarda zehrin alınmasından birkaç saat sonra kollaps ve ölüm meydana gelir. Florosilikatla zehirlenmiş koyunlarda salivasyon, durgunluk, dispne, klonik konvülsiyonlar ve kalp hızında artma görüldüğü kaydedilmiştir (87). Yapılan bir çalışmada koyunların 15 ppm dozunda NaF ile zehirlenmesi sonucu gözlerde solukluk, eritrosit ve hemoglobin sayısında azalma görülmüştür (92). Diğer bir akut zehirlenmede koyunların histopatolojik incelenmesinde; karaciğer, böbrek, rumen, kalp, akciğer, beyin, böbrek üstü bezleri, tiroid bezi, kemiklerde hiperemi, doku harabiyeti, dejenerasyon, ödem bulguları gözlemlendiği bildirilmiştir (91).

1.4.2. Kronik Florozis

Bu zehirlenme tipi uzun süre yem ve sularla birlikte subtoksik dozlarda florlu bileşikleri alan hayvanlarda oldukça yavaş ve sinsî bir şekilde gelişen ve daha çok kemik ve diş bozuklukları ile dejeneratif artropati durumuyla kendini gösteren bir zehirlenme şeklidir. Spontan florozis olgularına çeşitli ülkelerde fosfat kaya depozitlerinin volkanik toprakların ve florlu suların bulunduğu yerlerde her zaman rastlanır. Kronik florozisin dental ve sistemik olmak üzere iki tipi vardır (87).

1.4.2.1. Dental Florozis

Toksik etkinin sadece dişlerde gözleendiği dental florozis ilk kez 1901 yılında dikkati çekmiş ve bunların volkanik küllerin suya karışması sonucu oluştuğu ileri sürülmüştür. 1926'da dişlerdeki lekeler ile içme suları arasındaki direkt ilişki vurgulanmış ve 1931'de lekelerin aşırı flor alımına bağlı olduğu hayvan deneylerinde ispatlanmıştır (32). Florozisde dişlerde meydana gelen lezyonlara karşı sığırlar insanlardan daha az duyarlıdır. Bu hayvan türlerinde diş lezyonları en fazla daimi dişlerde şekillenmekle beraber, diğer dişler de az çok etkilenirler (86). Lezyonlu dişlerde diş minesi parlaklığını yitirir, çukurlaşır, sarı-esmer bir renge bürünerek enine çizgili bir hal alır (32,106). Daha ileri durumlarda bozulan minenin yerini koyu renkli pigmentler doldurur. Dental florozisdeki bu tür diş lekelenmeleri 2-4 ppm düzeyinde alınan flor alımına bağlı olarak şekillenebilmektedir (14). Dişlerde meydana gelen bozulmalar diş etlerinin zarar görmesine ve köklerin enfekte olarak alveolar periostit şekillenmesine yol açarlar (32). Gelişme aşamasında olan hayvanlarda diş çıkarma durur ve ergin hayvanlarda da diş sürgünleri geriler. Dişlerde ortaya çıkan bozulma ve iltihaplanmaya bağlı olarak çiğneme hareketleri zorlaşır. Koyunlardaki diş bozuklukları da aynen sığırlardaki gibidir. Bu diş bozuklukları, ortaya çıkan kalsiyum eksikliğinden, kalsiyum-flor arasındaki dengenin bozulmasından ve dişlerde kalsiyum apatitteki hidroksil gruplarının yerine florun geçerek CaF_2 oluşturmasından kaynaklanmaktadır (87).

1.4.2.2. Sistemik Florozis

Florun daha yüksek dozda ve uzun süreli alımı (6 ay, 1 yıl veya daha uzun) ile sistemik florozis şekillenmektedir (32,86). İlk olarak ağırlık kaybı (kaşeksi), şiddetli olmayan bir anemi, kas gelişiminde zayıflık gözlenir (4,106).

Florozisten daha ileri düzeyde etkilenen sığırlarda görülen ilk semptom klinik topallıktır. Topallama genellikle önce bir bacakta daha sonra diğerlerinde ortaya çıkar. Çoğunlukla diyagonal topallık görülür. Önce hafif derecede

semptomlar gösteren hayvanlarda birdenbire şiddetli topallık ortaya çıkar. Bu da kalçada meydana gelen kırılmanın bir belirtisi sayılır. Hasta hayvanlar bulaşmamış bir otağa alınır, yemleri veya suları değiştirilirse birkaç haftalık süreçte klinik düzelme görülebilir.

Topallık görülen hayvanlarda önemli iskelet deformasyonları da gelişir. Sternum ve alt çene kemiği çoğunlukla büyür ve genişler. Uzun kemiklerin diyafizlerinde ekzostozlar ve periartriküler ödem şekillenir. Eklem düzeyinde başlayan bozukluklar tüm omur eklemlerini de kapsadığından hayvanın hareketleri zorlaşır (87). İdrar flor düzeylerine ve florozisin tipine bağlı olarak böbrek fonksiyonunun değişik derecede etkilendiği ve glomerular filtrasyon hızının arttığı da bildirilmiştir (5).

Florozisli sığır ve koyunlarda tipik bir semptom da tırnakların anormal derecede uzaması, uçların yukarı doğru kıvrılmasıdır.

Hayvanlarda iştah azalır, pika ve anoreksi şekillenir, süt verimi azalır (87). Reprodüktif sistemde de aksaklıklar görülür, fertilité azalır (4,27). İlerlemiş olgularda tüm diş çeşitlerinde aşırı ve düzensiz bir aşınma saptanır. Dişlerde kırılmalar ve bazılarının da kökten kırılarak düşmüş olduğu görülür (87,106).

Nekropside karkaslar kaşektik, solgun, vücut yağlarında azalma, kemiklerde osteoporoz ve osteopetroz gözlemlenir. Tebeşir beyazına dönmüş renkte ve yüzeyleri pürüzlü haldeki kemiklerin çapları genişleyerek kalınlaşmıştır. Kalsifikasyonun yetersiz olması nedeniyle ağırlıkları azalır ve suya daldırıldıklarında batmazlar. Kemik iliği çoğunlukla eritrosit rejenerasyon yeteneğini yitirdiğinden florozis olgularında anemi şekillenebilir (87,106), ayrıca tiroid bezinde hipertrofi (guatr) görülebilir (14,40,87). Genellikle fekondasyon yeteneği zayıftır (87). Sekonder nörolojik komplikasyonlar, parapleji, quadripleji görülür (14,29). Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise kronik florozisin karaciğer ve beyin nöronlarında apoptozis meydana getirdiği bildirilmiştir (41). Sodyum florid verilen rat ve farelerde malign kemik

kanserleri gözlemlendiği ileri sürülmektedir. Kronik florozisin bir başka etkisi de beyindeki pineal beze olanıdır ki buradan melatonin üretimini inhibe eder (29). Kronik florozisin preskleral döneminde insanlarda, iştah kaybı, mide ağrısı, mide bulantısı, kusma, kronik ishal veya kabızlık, solunum güçlüğü, öksürük, balgam çıkarma, çarpıntı, eklem ağrısı, romatizmal ağrı, yorgunluk baş ağrısı, uykusuzluk, baş dönmesi, deride kızarıklık saptandığı kaydedilmiştir (96).

1.5. Floroziste Tanı

Toprak ve sularda yüksek düzeyde flor bulunan alanlarda diş ve iskelet sistemi semptomların görülmesi florozis tanısı yönünden önemlidir (86).

İçme sularındaki flor düzeyinin 4,0 ppm' den fazla veya solunan havadaki flor düzeyinin 2,5 mg/m³ üzerine çıktığı durumlarda kronik florozis gözlemlenebilir (32).

Laboratuvar analizlerinde ise idrar ve kemiklerdeki flor düzeyleri kronik florozisin en iyi göstergesidir (86). Koyunlardaki normal idrar flor konsantrasyonu 1 ppm (21), insanlardaki 1 ppm'den azdır (86). Şendil ve Bayşu (88), idrardaki flor konsantrasyonunu florozisli koyunlarda 3,80-26,6 ppm, florozisli insanlarda ise 3,80-30,61 ppm olarak bulurken, Ergün ve ark. (55) koyun idrarında flor miktarını ortalama 8,11 ppm, insan idrarında 4,32 ppm olarak bildirmişlerdir. Keçeci ve Özdemir'in (39), florozisli koyunlarda yaptığı bir çalışmada idrar flor konsantrasyonunun 5 ppm'in üzerinde olduğu kaydedilmiştir.

Ayrıca endemik florozisin erken teşhisinde alkalen fosfataz (ALP), laktat dehidrogenaz (LDH) ve hidrosibütirat dehidrogenaz (HBDA)'ın aktivitesinin kullanılması da önerilmektedir (25).

Kemiklerdeki normal flor değeri 400 ppm olup, bazen 2000 ppm'e kadar çıkabilir. Florozisli hayvanlarda bu 3000 ppm ve daha yukarıdır. Dişlerde bulunan 250 ppm'lik normal flor düzeyi florozipte 5000 ppm'e ve daha fazlasına çıkabilir. İnsan plazmasında flor miktarı normal olarak 0,2 ppm'den az olup, 2,6 ppm ve daha fazla miktarları zehirlenmeyi gösterir (86). Li ve ark. (47) da serum flor ile total flor/magnezyum oranı arasında bir korelasyon bulunduğunu ve bunun da erken tanıda kullanılabileceğini önermişlerdir .

1.6. Floroziste Enzimler

Florun enzimler üzerinde hem aktivatör, hem de inhibitör etkisi olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (94).

Vani ve Reddy'nin (94) farelerde yaptıkları çalışmada florun enerji üretiminde, membran bağımlı ve neurotransformasyonda görev alan enzimleri ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - ATPaz, Mg^{++} -ATPaz, AchE) inhibe ettiği kaydedilmiş, ayrıca fare caput ve cauda epididimisinde ATPaz'ın inhibe olduğu her iki çalışmada da gösterilmiştir (11,13).

Yüksek flor konsantrasyonları kofaktörü Mg^{+2} olan enzimleri inhibe etmektedir. Enolaz, piruvat kinaz, ATPaz'ın aktivasyonu azalırken (57,76), hücre içi ATP miktarı ve kan glukoz düzeyinin düştüğü, Zn^{+2} 'nin aktive ettiği enzimlerin ise flor tarafından çok düşük inhibisyona uğradığı kaydedilmiştir (76).

Prostetik grup olarak heme-demir içeren sitokrom c peroksidaz ve katalaz (CAT) gibi enzimler de flor tarafından inhibe edilmektedir (76). Nitelikim hayvanlara 40 ppm düzeyinde florlu su verildiğinde karaciğer (2), beyin ve kasta CAT aktivitesinde azalma olduğu rapor edilmiştir (94).

Karaciğer, metabolizmanın merkezi kontrol organıdır ve karaciğer metabolik aktivitesi ölçülerek fonksiyonel durum hakkında bilgi edinilebilir. Florozis

olgularında plazmadaki aspartat aminotransferaz (AST) (2), LDH, aktivitesinde düşüş olduğu bildirilirken (2,44,76) bir başka çalışmada yüksek flor konsantrasyonunda LDH aktivitesinde artma tespit edilmiştir (97). Shivashankara ve ark. (78) florozisli çocuklarda, Chinoy ve ark. (12) ise florozisli farelerde yaptıkları çalışmada serum alanin aminotransferaz (ALT) ve AST aktivitesinde artma tespit etmişlerdir.

Floroziste en çok incelenen enzimlerden biri olan ALP'ın florozisli çocuklarda ve yetişkinlerde aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (46,78). Kessabi ve ark. (44) yaptıkları çalışmada flor dozu arttıkça ALP'ın aktivitesinin düştüğünü bildirmişlerdir.

Florozis olgularında bu enzimlerden başka glutamat dehidrogenaz aktivitesinde azalma (44) hücre glikojen seviyesinde ve hücre süksinat dehidrogenaz (SDH) aktivitesinde düşme, asit fosfataz (AcP) aktivitesinde artma bildirilmiştir (10-12,45,94,97).

1.7. Floroziste Serbest Radikaller

Fagositik hücrelerin (nötrofilik granüositler, polimorf nükleer lökositler (PMN)) immun yanıtı sırasında solunum patlaması meydana gelmektedir. Flor da solunum patlamasını artırmakta ve NADPH-oksidadın aktivasyonu ile $\cdot\text{O}_2^-$ 'lerinin daha fazla üretilmesine sebep olmaktadır (75). $\cdot\text{O}_2^-$ 'leri direkt olarak zarar vermez fakat H_2O_2 kaynağı olması sebebi ile zararlı etkileri vardır. H_2O_2 membran lipidlerinde lipid peroksidasyonuna, enzim inaktivasyonuna, DNA hasarına neden olmaktadır (18,21,91).

Flor tarafından stimüle edilen insan PMN lökositleri hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}^-$), $\cdot\text{O}_2^-$ üretirken süperoksit dismutaz (SOD) ve CAT bu etkileri ortadan kaldıramaz (75). Üstelik yüksek flor konsantrasyonu $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$ radikallerinin üretimini artırırken SOD'un aktivitesini de inhibe etmektedir (75,80,99).

Flor en reaktif elementtir ve organizmada birçok iyonun yerine geçer. Fe^{+2} , Haber-Weiss reaksiyonlarına katılarak H_2O_2 ile, $\cdot O_2^-$, $\cdot OH$ 'lerinin artmasını sağlarken, floroziste de bu radikallerin arttığı ayrıca antioksidan enzimlerin aktivitesinde de azalma olduğu bildirilmiştir.

Flor ile inkübe edilen izole rat mast hücreleri histamin salgılar ve oksijen radikalleri açığa çıkar. Flor $\cdot O_2^-$ üretimini çok fazla artırır. Romatoid artritli hastalarda açığa çıkan $\cdot O_2^-$ anti-inflamatuar ilaç olan diclofenac ile baskılanırken flor tarafından meydana gelen $\cdot O_2^-$ 'i ise baskılayamaz (75).

1.8. Reaktif Türler Olarak Radikaller

Atomlar, proton ve nötronlardan oluşan pozitif yüklü bir çekirdek ve çekirdeğin etrafında bulunan negatif yüklü elektronlardan oluşur. Elektronlar hem partikül, hem de dalga özelliğine sahip olup, çekirdek etrafında ışık hızı ile hareket ederler. Bu nedenle elektronların çekirdek etrafındaki yeri tam olarak tarif edilemez. Yalnızca bulunma olasılığının en yüksek olduğu yer olan orbitalden bahsedilebilir (103).

Kuantum kimyasına göre ancak iki elektron bir bağın yapısına girebilir. Ayrıca iki elektronun ters dönüş doğrultusunda olması gerekir. Yani yukarıya doğru dönen bir elektronun eşi aşağıya doğru dönen bir elektrondur. Elektron çiftleri oldukça kararludur ve insan vücudunun neredeyse tüm elektronları elektron çifti halinde bulunur (26).

Radikal terimi, Latince kökenli olup, Radix (kök) kelimesinden türemiştir. Radikaller, dış orbitallerinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron içeren kimyasal türlerdir (50,52). Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dış orbitallerindeki elektron seviyesinde gerçekleşir. Dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron bulunması, söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için radikaller, reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir.

Bir bağ koptuğunda elektronlar ya birlikte kalır (ikisi de bir atoma katılır) ya da ayrılırlar (biri bir atoma, diğeri diğesine). Birlikte kalırlarsa oluşan atom iyon, ayrılırlarsa serbest radikal olur. Bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjilidir ve eşleşmemiş elektronları ayırıp işlerine engel olurlar. Bu işlem serbest radikalleri hem tehlikeli hem de kullanışlı yapar (26).

Aerobik yaşam, hücrede metabolik işlemler sırasında reaktif oksijen metabolitleri ve radikalleri doğal olarak üretir. Reaktif metabolit ve ürünlerin biyokimyasal, fizyolojik ve farmakolojik nitelikleri araştırıldıkça, radikallerin rol aldığı reaksiyonların zincir yapısı ve radikal üretimini artırabileceği gösterilmiştir. Bu toksik ürünler pek çok patolojik durumun oluşumuna ve yaygın olarak doku hasarına yol açarlar. Bu nedenle de serbest radikallerin organizmadan uzaklaştırılması veya üretiminin dengelenmesi hastalıklardan korunma ve dirençte oldukça önemli bir potansiyeldir (101).

Bilim adamları 1954'ten beri serbest radikallerin yaşlanma ve dejeneratif hastalıklara neden olduğunu bildirmektedirler (26). 1956 yılında Haman tarafından serbest radikallerin zararlı etkileri (hücre hasarı, kanser, yaşlanma) tanımlanmış ve daha sonra McCord ve Fridovich'in SOD'u bulmaları ile biyolojik önemleri anlaşılacak bir çok çalışma yapılmıştır (17).

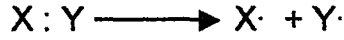
1.8.1. Radikaller Nasıl Oluşur?

Serbest radikallerin meydana gelmesinin 2 yolu vardır. Birincisi radyasyon, ikincisi enzimler veya metal iyonları ile katalizlenen redoks reaksiyonlarıdır (50,83).

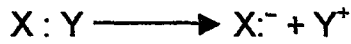
Radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşur:

1. Kovalent Bağların Hemolitik Kırılması: Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak hemolitik

bölünmesidir. Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık neden olur.



2. Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Örneğin askorbik asit, glutatyon ve tokoferoller gibi hücrel antioksidanlar, radikal türleri tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur.



3. Normal Bir Moleküle Elektron Transferi: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme, radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan $\cdot O_2^-$ 'in oluşumuna neden olur. $\cdot O_2^-$ yapımındaki artış da oksijenin diğer radikal türlerinin ve diğer atom merkezli radikallerin oluşumu için tetik fonksiyonu görür (103).



Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi sonucu meydana gelen serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötr olabilirler. Cu^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+2} ve Mo^{+5} gibi geçiş metallerinin de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Buna karşın, bu iyonlar reaksiyonları katalize ettiklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (3).

Serbest radikaller, zigot döneminden itibaren natal ve postnatal dönemlerde, organizmanın canlılığı devam ettikçe normal biyolojik süreçte meydana

gelirler (26). Serbest oksijen radikal türleri; $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$, alkoksil radikali ($\text{RO}\cdot$), peroksit radikali ($\text{LOO}\cdot$), H_2O_2 , singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$) ve nitrojen dioksit (NO_2)'dir (7,34,101,104).

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

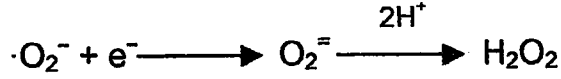
Canlılarda oluştuğu ilk gösterilen radikaldir (12). Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest $\cdot\text{O}_2^-$ açığa çıkar.



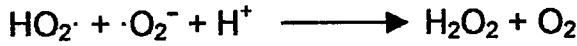
Başlıca şu mekanizmalarla üretilmektedir.

1. İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken $\cdot\text{O}_2^-$ oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotidler gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken $\cdot\text{O}_2^-$ yapımına neden olurlar.
2. Başlıca çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında $\cdot\text{O}_2^-$ bir ürün olarak oluşur.
3. Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin % 1-5 kadarı $\cdot\text{O}_2^-$ yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH-dehidrogenaz ve koenzim-Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır.
4. Aktive edilen fagositik lökositler bol miktarda $\cdot\text{O}_2^-$ üreterek fagozom içine ve buldukları ortama verirler. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır.

Hücresel koşullarda üretilen $\cdot\text{O}_2^-$, oksitleyici veya indirgeyici olarak davranabilir. Aldığı elektronu metal iyonuna, sitokrom c'ye veya bir radikale verirse tekrar oksijene oksitlenir. Oksijenden daha oksitleyici olan $\cdot\text{O}_2^-$ bir elektron daha alırsa peroksit anyonuna indirgenir (103).



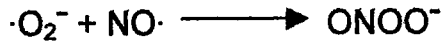
İki $\cdot\text{O}_2^-$ birbirleriyle etkileşerek, biri oksitlenirken diğeri redüklenir. Böylece H_2O_2 ve O_2 meydana gelir.



$\cdot\text{O}_2^-$ 'in temizlendiği ve "Dismutasyon Tepkimesi" adı verilen bu reaksiyon kendiliğinden veya SOD enzimi aracılığı ile gerçekleşir (89).

$\cdot\text{O}_2^-$, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak zarar vermez. Asıl önemi, H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır.

$\cdot\text{O}_2^-$ 'in, fizyolojik bir serbest radikal olan $\text{NO}\cdot$ ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksi-nitrit meydana gelir.



Böylece $\text{NO}\cdot$ 'in normal etkisi inhibe edilir. Ayrıca, peroksinitritlerin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır ve NO_2^- , $\cdot\text{OH}$, nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi daha başka toksik ürünlere dönüşürler.

$\cdot O_2^-$, hem oksitleyici hem de redükleyici özelliğe sahiptir. Redükten olarak görev yaptığında, örneğin ferrisitokrom c'nin ya da nitrobluetetrazolium'un redüksiyonunda bir elektron kaybeder ve oksijene okside olur. Sitokrom c'yi indirgemesi SOD tarafından inhibe edilir. Bundan faydalanılarak da SOD aktivitesi ve fagositler tarafından üretilen $\cdot O_2^-$ tayini yapılabilir.

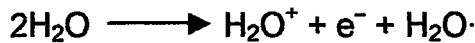


Oksidan olarak görev yaptığında, örneğin epinefrinin oksidasyonunda bir elektron alır ve hidrojenperokside indirgenir (3).

1.8.1.2. Hidroksil Radikali ($\cdot OH$)

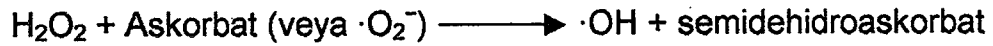
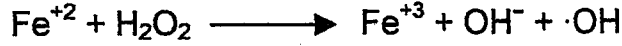
Biyolojik sistemlerin en reaktif oksidantı olan $\cdot OH$ ortamda uygun bulunduğu elektron vericisi ile hemen reaksiyona girer ve bu yüzden canlı sistemlerde direkt olarak saptamak çok zordur. Yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştığı yerde çok büyük hasara neden olur (7,50,83,101). Fizyolojik şartlarda $\cdot OH$ oluşması için $\cdot O_2^-$ 'in elektronunu H_2O_2 'e aktararak $\cdot O_2^-$ 'i indirgemesi gerekir ve kendiliğinden dismutasyonuna göre çok yavaştır (7). Canlılarda iki mekanizma ile oluşabilir.

1. İyonlaştırıcı radyasyonun etkisi ile sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması gerçekleşir.



Uyarılmış su molekülü ($H_2O\cdot$) hemolitik yıkım ile; H_2O^+ ise su molekülü ile tepkimeye girerek $\cdot OH$ oluştururlar. Bu tepkimeler çok kısa sürede gerçekleşir ve üretilen $\cdot OH$, radyasyonun canlılardaki toksik etkisinden sorumlu başlıca kimyasal türdür.

2. H_2O_2 'in eksik indirgenmesi ile $\cdot OH$ yapımı, vücutta bu radikalın en önemli kaynağıdır. H_2O_2 'in iki elektron ile indirgenmesi ile su oluşurken, tek elektron ile indirgenmesi $\cdot OH$ yapımına neden olur. Bu tür indirgenme Fe, Cu gibi metal iyonları tarafından katalizlenir. Askorbik asit, $O_2^{\cdot -}$ gibi indirgeyici bileşiklerin de bulunduğu ortamda oksitlenen metal iyonu tekrar indirgendiğinden H_2O_2 'den $\cdot OH$ yapımı sürekli bir duruma gelir (34,103).



Haber-Weiss tepkimesi (fenton tepkimesi) olarak adlandırılan bu tepkime ile oluşan $\cdot OH$ vücutta üretilen H_2O_2 derişimi ve serbest metal iyonunun varlığına bağlıdır. Biyolojik koşullarda $O_2^{\cdot -}$ oluşumunun arttığı ortamda $\cdot OH$ üretimi kaçınılmazdır (103).

Biyolojik sistemlerin en reaktif türü olan $\cdot OH$, su dahil ortamda rastladığı her biyomoleküllerle tepkimeye girer. Öncelikle uzun zincirli doymamış yağ asitleri, proteinler, DNA ve karbonhidratlarla reaksiyona girerek hücre hasarı meydana getirir (34,50,103). Başlıca tepkimeleri;

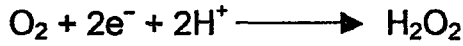
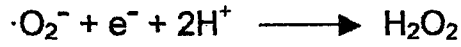
a) Elektron transfer tepkimeleri (paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır).

b) Hidrojen çıkarma tepkimeleri ($\cdot OH$ 'in organik moleküllerden hidrojen atomu alarak suya indirgendiği tepkime)

c) Katılma tepkimeleri (Elektronlarca zengin moleküllerle purin, primidin bazları gibi gerçekleşir) (103).

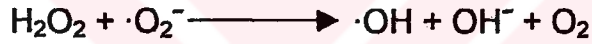
1.8.1.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya $\cdot O_2^{\cdot -}$ 'in bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomu ile birleşerek H_2O_2 'i meydana getirir (3).

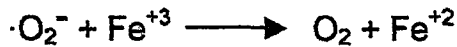


Sonuçta radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon tepkimesidir ve H_2O_2 bir elektron oksidasyonunun ikincil ürünüdür. Dismutasyon kendiliğinden veya SOD enzimi tarafından katalizlenir (101).

Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir fakat reaktif oksijen türleri (ROT) sınıfına dahildir (7,103). $\cdot\text{OH}$ 'in oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında öncüsü olarak davranmasıdır (103). $\cdot\text{O}_2^-$ ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan $\cdot\text{OH}$ oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (3).



H_2O_2 reaktif olmadan biyolojik membranları geçer ve hücre içine girerek buradaki fosfolipidleri, karbonhidratları, metaloproteinleri ve DNA'yı hedef alarak hücre hasarı meydana getirir (34,50). Demirle katalizlenen ve Haber-Weiss reaksiyonu adı verilen bu reaksiyon biyolojik sistemlerde katalizörlü ya da katalizörsüz oluşabilir. Katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{+3}) O_2^- tarafından ferro demire (Fe^{+2}) indirgenir. Sonra Fe^{+2} kullanılarak "Fenton reaksiyonu" ile H_2O_2 'den $\cdot\text{OH}$ ve OH^- üretilir (28,40,50).



Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) gibi bazı şelatlayıcı ajanlar $\cdot\text{OH}$ oluşumunu Haber-Weiss tepkimesi aracılığıyla aktive ederken, dietilen triamin penta asetik asit (DTPA) gibi bazı bileşikler ise inhibe eder (3).

1.8.1.4. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da neden olur. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale değiştirmesiyle oluşur (3). Reaktivitesi çok yüksektir ve aldığı enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde verip yeniden oksijene dönebilir (103). Manyetik alanda emülsiyon spektrumunda tek bant verdiği için singlet oksijen olarak adlandırılmıştır (40).

Moleküler oksijen $^3\Sigma_g\text{O}_2$

Δ (Delta formu) $^1\Delta_g\text{O}$

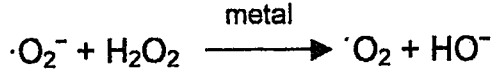
Σ (Sigma formu) $^1\Sigma^+_g\text{O}_2$ (18)

$^1\text{O}_2$ 'in $\Delta_g\text{O}$ formunda iki elektron aynı orbitalde, spinleri birbirine zıt şekilde bulunur. $\Sigma^+_g\text{O}_2$ formunda ise ayrı orbitallerde birbirine zıttır (3,7). Sigma singlet oksijenin enerjisi daha fazladır ve çok kısa ömürlü iken, delta singlet oksijenin yarı ömrü daha uzundur ve gözlenen reaksiyonlardan esas sorumlu formun bu olduğu kabul edilmektedir (3).

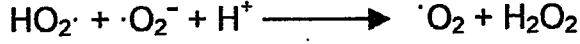
$^1\text{O}_2$ vücutta başlıca şu mekanizmalar ile oluşabilir.

1. Pigmentlerin (örneğin flavin içeren nükleotidler, retinal, bilirubin) oksijenli ortamda ışığı absorblamasıyla; Pigment ışığı absorbe ederek daha yüksek elektronik oksidasyon durumuna geçer. Daha sonra üzerindeki enerjiyi moleküler oksijene aktararak, dış iki orbitalindeki paralel olan spinlerin yönünü tersine çevirir ve $^1\text{O}_2$ oluşur.

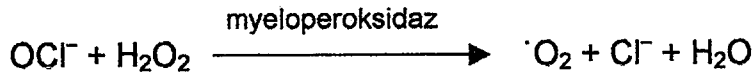
2. H_2O_2 'lerin metaller varlığındaki yıkım tepkimelerinde,



3. Kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında,



4. Prostaglandin endoperoksit sentaz, sitokrom P₄₅₀ tepkimeleri, myelo/kloro/laktopeptidaz enzimlerinin etkisi sırasında oluşur.



$\cdot\text{O}_2$ diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları $\cdot\text{O}_2$ 'in tepkimeye girdiği bağlardır. Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan tepkimeye girerek peroksi radikali oluşturur ve $\cdot\text{OH}$ kadar etkin bir şekilde peroksidasyonunu başlatabilir (103).

1.8.1.5. Nitrik Oksit (NO \cdot)

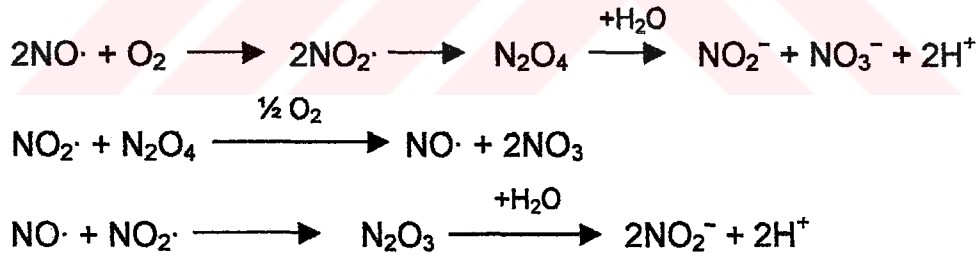
Azot monoksit olarak da adlandırılan oldukça toksik, renksiz bir gaz olan NO \cdot , serbest radikal tanımına uyar ve yarı ömrü çok kısadır (50). NO \cdot çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrojen merkezli bir radikaldir. Paylaşılmamış elektron aslında nitrojen atomuna ait ise de, bu elektronun hem nitrojen hem de oksijen atomu üzerinde yer almamış olması nedeniyle tam radikal özelliği taşımaz.

Oksijen radikalleri çok sayıdaki enzimatik ve enzimatik olmayan yollar ile fiziksel, kimyasal mekanizmalarla oluşurlar. Oysa organizmada NO \cdot sentezini sağlayan mekanizmalar son derece kısıtlıdır. Vücuda giren nitro bileşiklerinin metabolize edilmesi sırasında oluşan NO \cdot bir tarafa bırakılacak olursa, endojen NO \cdot oluşturan tek kaynak nitrik oksit sentaz (NOS) enzimidir. Bu enzimin nöronal (nNOS; tip I), endotelyal (eNOS; tip II) ve indüklenbilir

(iNOS; tip III) olmak üzere 3 formu vardır (17,66,103). NOS, L-argininden moleküler oksijen ve hem, FAD, FMN, BH₄ (tetrahidrobiyopterin) kofaktörleri aracılığıyla sitrulin ve NO[•] oluşturur. NOS uyarıldığında iki moleküler oksijen L-arginine girerek bazı ara türler oluşturarak NO[•] ve sitrulin üretilmektedir (17,56,66). eNOS ve nNOS aktivitesi hücre içi Ca konsantrasyonu ile düzenlenirken iNOS ise sitokinler, lipopolisakkaritler ve diğer immunolojik ajanlar tarafından aktive edilir (17).

Fizyolojik değişimde üretilen NO[•] esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO₃⁻) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, NO[•]'i ortamdaki temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. Aerobik ortamda NO[•] stabil olmayıp, değişimin artması ile oksidasyonu hızlanır. Bu nedenle ortamdaki derişimi ile kendi ömrü arasında ters bir orantı vardır (103).

NO[•] elektriksel olarak yüksüz olduğundan, reseptörlere bağlı olmayan yollarla kolayca membrandan diffüze olabilir. NO[•] aşağıdaki gibi bir seri nitrojen oksitlerine dönüşebilir.



Nitrojen oksitlerinin etkileri:

NO[•] (Nitrik oksit): Serbest radikal

NO⁻ (Nitroksil anyonu)

NO₂[•] (Nitrojen oksit): Serbest radikal, nitroze edici ajan

N₂O (Nitröz oksit): Anestezik

N₂O₃ (Dinitrojen triksit): Nitroze edici ajan

N₂O₄ (Dinitrojen tetraoksit): Dimerik NO₂⁻, nitroze edici ajan

NO₂⁻ (Nitrit): Asidik ortamda NO oluşturur

NO₃⁻ (Nitrat): Stabil anyon

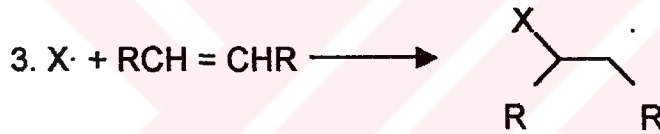
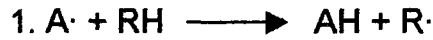
Nitrojen oksitleri (NO_x) aminleri nitrozilleyerek, nitrozaminleri oluşturur (64).



Nitrozaminler, DNA'da nitrozilasyon, deaminasyon ve alkil nükleofillerinin oluşmalarına neden olabilirler. Bu şekildeki mutasyonlar onkojenleri indükleyerek malign transformasyon oluştururlar (65).

1.9. Karakteristik Radikal Reaksiyonları

Radikallerin karakteristik olarak 5 temel reaksiyonu vardır. Bunlar;



1.10. Serbest Radikal Kaynakları

1. Eksojen Kaynaklar

- Radyasyon (iyonize radyasyon)
- Hava kirliliği, sigara dumanı, hiperoksi, pestisitler, organik solventler, anestozidler, aromatik hidrokarbonlar, güneş ışığı

2. Endojen Kaynaklar: Bunlar mitokondri, lizozom, peroksizom, nükleus, endoplazmik retikulum ve plazma membranlarında meydana gelir.

- Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Tioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidropterinler, antibiyotikler

- Enzimler ve proteinler: Ksantin oksidaz, galaktoz oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin
- Mitokondrial elektron transportu
- Peroksizomlar: Oksidazlar, flavoproteinler
- Plazma membranı: Lipoksijenaz, prostaglandin sentetaz, fagositlerde NADPH oksidaz, lipid peroksidasyonu
- Oksidatif stres yapıcı durumlar: İskemi, travma, intoksikasyon
- Mikrozomal elektron transfer zinciri ve zincir metalleri
- Otoksidasyon reaksiyonları (Fe^{+2} , epinefrin)
- Aktive olmuş fagositler (3,52).

1.11. Klinik Durumlardaki Serbest Radikal Ajanları

1. Çeşitli organlarda; yangı, glomerulonefritis, vaskulitis (hepatit B virüsü, ilaçlar), otoimmün hastalıklar, iskemi, ilaç ve toksin reaksiyonları karbon tetraklorür gibi), Fe fazlalığı (talasemi, diğer kronik anemiler), beslenme yetersizliği, alkol, radyasyon, kanser, amiloid hastalıklar

2. Tek başına organlarda

- Eritrositlerde; Fenilhidrazin, primaguin, sulfonamidler, protoporfirin foto-oksidasyonu, malarya, sickle-cell anemi, fankani anemisi

- Akciğerlerde; Sigara kullanımı, amfizem, hiperoksi, karbonmonoksit, bronkopulmonar displazi, oksidan hava kirliliği, akut solunum hastalığı, blecmycin toksisitesi, paraquot toksisitesi

- Kalp ve kardiovasküler sistemde; Alkol kardiomyopatisi, keshan hastalığı (selenyum yetersizliğinde), arteriosklerozis, dexorubisin toksisitesi

- Böbreklerde; Nefrotik antiglomerular membran hastalıkları, aminoglikozid nefrotoksitesisi, ağır metal nefrotoksitesisi, böbrek doku reddi

- Karaciğer; Endotoksinler ve karbon tetraklorürün neden olduğu karaciğer hasarı, alloksan tarafından oluşan diabet, nonsteroidal antienflamatuar ilaçlar

- Eklemlerde; Romatoid artrit ve inflamasyon

- Beyin; Hiperborik oksijen, nörotoksinler, senil demantia, parkinson, serebral travma, allerjik ensefalomyelitis, ataksi-telangietasi sendromu, travmatik hasar, alüminyum fazlalığı, A-beta lipoproteinemi

- Göz; Kataraktogenezis, okuler hemaraji, prematür retinopatisi (oksijen), fotic retinopati

- Deri; Solar radyasyon, termal hasar, porfiriya, kontakt dermatitis, fotosensitif boyalar, çiçek sendromu (15,40,83).

1.12. Ne Kadar Radikal Yapımı?

Yaşam için mutlaka gerekli olan oksijen yaşamın sona erdirilmesinde de etkili olan faktörlerin başında gelir. Canlıların yaşlanması, radikallerin neden olduğu kalıcı hasarların bir birikimi olarak değerlendirilmektedir.

Vücutta üretilen radikaller her zaman tehlikeli kimyasal türler olarak değerlendirilmemelidir. Oksijenin biyokimyasal tepkimelerde kullanılması için reaktif formlarına çevrilmesi zorunludur. Örneğin;

- Steroid yapıdaki çok sayıdaki bileşiklerin, eikozanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi

- Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu

- Çok sayıdaki oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin etkileri

- Sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları

- Elektron transferi ve enerji üretimi için radikal yapımı olmazsa olmaz bir koşuldur.

Biyolojik ihtiyacın üzerinde üretilen radikaller gözlenen toksik etkilerden sorumludurlar ve zincir reaksiyonundaki kontrolsüzlük hücre hasarı meydana getirir. Çevresel faktörler (iyonlaştırıcı radyasyon gibi), vücuda alınan çeşitli kimyasal bileşikler, çeşitli enfeksiyonlar, doku travması gibi patolojik durumlar vücutta radikal yapımında artışa neden olurlar. Düşük derişimlerdeki radikal yapımının etkileri çok uzun bir süreçte örneğin yaşlanma sonucunda

görülürken; yüksek derişimde ve yaygın radikal yapımının etkileri kısa sürede ve ciddi bir patolojik durum olarak karşımıza çıkabilir (26,103).

1.13. Hücredeki Geçiş Metalleri ve Serbest Radikal Kaynakları

Her bir kaynak ve özel hasarları tam olarak bilinmemektedir. Birincilden daha sıklıkla ikincil hasarlar gözlemlenmektedir. Travma, hücre rupturu gibi birçok tip doku hasarı vardır. Bunlar metal iyonlarının (demir gibi) geçişini sağlar ve doku hasarını hızlandırır. Ayrıca fagositoz, elektron transport sistemi de vardır (40).

A. Fagositoz

Fagositik hücreler serbest radikallerin en iyi bilinen biyolojik kaynağıdır. Makrofajlar ve nötrofiller aktive olduğu zaman çok miktarda $\cdot O_2^-$ türevleri açığa çıkar ve bu hücrelerde belirgin bir oksijen tüketimi görülür. Bu 1973'te Babor ve ark. tarafından "solunum patlaması" olarak gösterilmiştir ve çevresel patojenlere karşı önemli ve ilk karşı savunmadır. Yapılan çalışmalarda solunum patlamasının sorumlusunun hücre dışı bir enzim olan NADPH oksidaz olduğu gösterilmiştir (17,46). Fagositik NADPH oksidaz bakteriyel lipopolisakkaritler ya da lipoproteinler, sitokinler gibi interferon- γ , interleukin- 1β , interleukin- γ ile aktive olurlar (17). Kronik granulomatozisli hastalarda (CGD) NADPH oksidaz enziminin genetik defekt nedeni ile solunum patlamasını gerçekleştirilemediği bildirilmiştir (66).

Uygun bir stimulusla fagosit uyarıldıktan sonra NADPH oksidaz aktive edilir ve indirgenmiş pirimidin nükleotidlerinden (NADPH) iki elektron alınarak iki molekül oksijene transfer edilir. Böylece iki molekül $\cdot O_2^-$ oluşturulur (3,66).



Solunum patlaması sırasında tüketilen oksijenin çoğu $\cdot\text{O}_2^-$ ara ürünü üzerinden fagositler tarafından bakterisidal bir ajan olarak kullanılan H_2O_2 'e dönüştürülür (3).



B. Mitokondrial Elektron Transport Zinciri

Serbest radikal üretiminin özellikle de $\cdot\text{OH}$ ve $\cdot\text{O}_2^-$ en büyük kaynağıdır. Mitokondrianın iç zarında yerleşmiş NADPH-koenzim Q (kompleks I), süksinat koenzim Q (kompleks II) ve koenzim QH_2 -sitokrom-c redüktaz (kompleks III) enzimlerinin katalizi sırasında serbest radikaller açığa çıkarlar (40,104).

C. Mikrozomal Elektron Transport Zinciri

Bazal kondüsyon durumunda önemli bir serbest radikal kaynağı değildir (40).

D. Çözünebilir Oksidaz Enzimleri

Endojen ve eksojen substratları okside edebilen çözünebilir enzimler, ksantin oksidaz, β -hidroksilaz, D-aminoasit oksidaz, urat oksidazdır. Bunlardan yaygın ve en iyi bilineni ksantin oksidazdır. Oksijen molekülünü direkt olarak $\cdot\text{O}_2^-$ ve H_2O_2 ' de çevirebilir. Ksantin oksidaz pek çok dokuda serbest radikal üreterek doku hasarına neden olabilir. Dopamin- β -hidroksilaz serbest radikal toksikolojisinde pek fazla çalışılmamış ve doku hasarındaki rolü fazla bilinmeyen bir enzimdir (40).

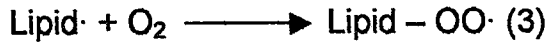
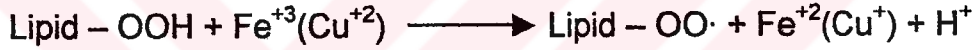
E. Endojen ve Ekzojen Substratların Otoksidasyonu

Hayvan hücrelerinde $\cdot\text{O}_2^-$ 'in bir başka kaynağı da askorbik asit, tioller (glutatyon, sistein gibi), epinefrin ve flavin koenzimleri gibi bazı bileşiklerin otoksidasyonudur (3).

Deneysel çalışmalarda en fazla epinefrinin otooksidasyonu çalışılmıştır. Parkinson hastalığının 1-methyl-4-phenyl-1-2,3,6-tetrahidropiridin'in (MPTP) etkisiyle oluştuğu ve bu hasarın muhtemelen dopamin oksidasyonuna bağlı olabileceği rapor edilmiştir (40).

F. Geçiş Metalleri

Geçiş metalleri, çoğunlukla da demir ve bakır, lipid, protein, DNA gibi biyolojik makro moleküllerin elektron transferini kolaylaştırır. Buna ilaveten metal iyonları organik peroksitlerin parçalanmasını katalizlerler. Sonuçta bu reaksiyonlar daha az zararlı olan radikalleri daha zararlı hale getirirler (40).



1.14. Serbest Radikallerin Organizmadaki Etkileri

Serbest radikaller eğer nötralize edilmezler ise vücutta ciddi hasara neden olabilirler. Bunlar;

- Membran lipid ve proteinlerini yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engellemek

- Nükleus membranını yıkarak genetik materyale etki edip DNA zincirini kırmak ve mutasyona açık hale getirmek

- Bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sistemini zorlamak

- Mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller permeabiliteyi bozmak
- Hücrenin potasyum kaybını ve trombosit kümeleşmesini artırmak
- Proteaz, fosfolipaz, elastaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz, lipoksijenaz, triptofan dioksijenaz ve galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktifleştirirken α -1-antitripsin gibi bazı savunma sistemlerini inaktive etmek (3,26).

Klinik olarak; kanser, diyabet, arterosklerozis, nörodejeneratif hastalıklar, kronik enflamasyon, HIV enfeksiyonu, iskemi, apne, alzheimer, mitokondrial miyopati, Kearns-Sayre sendromu, Leigh sendromu, Pearson sendromu gibi hastalıkların gelişmesinde oksidatif stresin büyük rolü olduğu bildirilmiştir (17).

1.14.1. Lipidlere Etkileri

Membranlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü, kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (3,58). Toksik etki lipid peroksitlerinin düzeyi ölçülerek belirlenir. Doymamış yağ asitlerindeki bir hidrojen atomunun çıkması peroksidasyonun başlamasına neden olur. Böylece yağ asidi zinciri lipid radikali niteliği kazanır. Radikal dayanıksız olup, çift bağların yerini değiştirir ve oksijenle reaksiyonu sonucu lipid peroksil radikaline dönüşür. Lipid peroksil radikalleri diğer doymamış yağ asitlerine etkiyerek yeni radikaller oluşturur, bir yandan da hidrojen atomlarını alarak hidroperoksitlere dönüşürler. Hidroksi peroksitlerin parçalanmasıyla lipid alkalisi radikalleri açığa çıkar. Lipid peroksidasyonu antioksidan reaksiyonlarla sonlandırılır ya da devam ederek daha ileriye gider. Fe ve Cu gibi redoks yapan metaller varlığında artar.

Lipid peroksidasyon ürünleri olarak açığa çıkan lipid peroksitler, hidroperoksitler ve aldehitler membran yapısına direkt olarak, diğer hücre bileşenlerine ise aldehit üreterek indirekt olarak zarar verir. Buda pek çok hastalığın ve doku hasarının oluşmasına neden olur. Membranın yapısının bozulması sonucu malondialdehit (MDA) oluşur (58). Oluşan MDA membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonlarına neden olabilir. Bu yüzden membran deformasyonu, membran transport bozuklukları, enzim aktivite değişiklikleri ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonları gibi patolojik sonuçları olabilir. Bu etkiler MDA'nın mutajenik, karsinojenik ve genotoksik etkilerini açıklar (67,89).

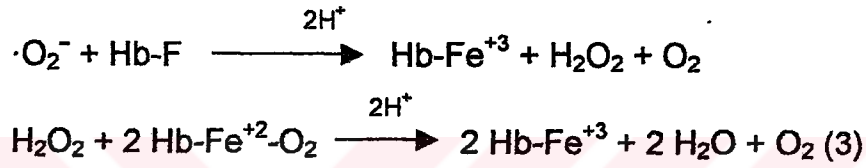
1.14.2. Proteinlere Etkileri

Proteinler, lipidlere oranla radikallere daha az hassastır ve amino asit dizilişine bağlı olarak etkilenirler. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu reaksiyonlar sonucu immunglobulin G (IgG) ve albumin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (3). Serum proteinlerinde ve inflamatuvar eklem hastalarının sinovial sıvılarındaki IgG'lerinde serbest radikal hasarı tespit edilmiştir (50).

$\cdot O_2^-$ başta sistein, triptofan, tirozin olmak üzere bütün amino asitlerle, perhidroksi radikali ise başta triptofan, tirozin, histidin ve sistin olmak üzere $\cdot O_2^-$ 'lerinden daha etkili olarak bütün amino asitlerle tepkimeye girer. Bu iki radikalın amino asitlerle tepkimesi $\cdot OH$ 'den 10^6 - 10^9 kez daha yavaştır. Esas toksik etkinin $\cdot O_2^-$ ve $\cdot OH$ 'den kaynaklandığı kabul edilmektedir (16,24).

Sitoplazmik ve membran proteinleri ozon ve protoporfirin IX gibi okside edici ajanlara maruz kaldıktan sonra çapraz bağlanarak dimerleşir veya daha büyük agregatlara dönüşürler. Prolin ve lizin, $\cdot\text{O}_2$, H_2O_2 ve $\cdot\text{OH}$ üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Proteinler üzerinde olan serbest radikal hasarı birikmişse ya da belirgin proteinlerin spesifik bölgesi üzerinde yoğunlaşmışsa hücrenin canlılığı bakımından zararlı etki yapar (3).

Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin $\cdot\text{O}_2^-$ veya H_2O_2 ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olur (3,19).



1.14.3. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açar. Bunu DNA'da direkt modifikasyon veya transkripsiyon faktörlerini veya genetik düzenlemedeki enzimleri bozarak yapar (3,34). Sitotoksisite, büyük oranda nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. $\cdot\text{OH}$ deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar (3,40,50). Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H_2O_2 membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre fonksiyonunun bozulmasına ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA, serbest radikallerden kolay zarar görebilen önemli bir hedeftir. $\cdot\text{O}_2^-$ 'e maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde daha fazla antijenik etki gösterir ki bu oldukça önemlidir. Çünkü otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematozis (SLE)'te ve romatoid artrit (RA) dolaşımında anti-DNA antikörleri bulunur. SLE'li hastaların

supresör hücrelerinde bir kusur bulunduğu kaydedilmiştir. Aynı durum, RA'lı hastaların sinoviyal sıvılarındaki supresör hücreler için de geçerlidir.

T lenfositleri genelde serbest radikal saldırısına karşı daha hassastırlar. *In vitro* deneylerde serbest oksijen radikallerinin, T-supresör hücreleri için T-helper hücrelerine göre sitotoksik oldukları gösterilmiştir. Bu bulgular, serbest radikal reaksiyonlarının, immun supresör hücrelerin otoimmun reaksiyonları kontrol etmelerini engelleyebilecekleri tarzdaki görüşü desteklemektedir (3).

1.14.4. Karbonhidratlara Etkileri

Monosakkaritlerin örneğin glukoz, mannoz ve deoksi şekerlerin otooksidasyonu sonucu H_2O_2 , peroksit (hücre içi 10^{-8} M) ve okzaloaldehitler meydana gelir. Açığa çıkan okzaloaldehitler proteinlere bağlanabilme özelliğinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanmaya neden olabilirler (3,58).

Bağ dokusunun önemli bir mukopolisakkaridi olan hiyalüronik asit, sinovial sıvıda da bol bulunur. Enflamatuar eklem hastalıklarında sinovial sıvıya çok sayıda polimorf hücreler geçer ve muhtemelen immun komplekslerle aktivasyonları sonucu ekstrasellüler sıvıya H_2O_2 ve O_2^- salgırlarlar. Bu radikallerin *in vitro* hiyalüronik asidi parçaladıkları gösterilmiştir. Hiyalüronik asit parçalanması enflamatuar eklem hastalıklarında sinovial sıvının karakteristik bir özelliğidir (3).

Gözün vitreous humour'unda da bol miktarda hiyalüronik asit bulunur. Bunun oksidatif hasarı da katarakt ve mikroanjiopati oluşumuna katkıda bulunur (3,50).

1.15. Antioksidan Savunma Sistemleri

Organizmanın canlı ve sağlıklı kalabilmesi için hücresel homeostatik dengenin korunmasına yönelik çabalar tüm hücrelerde meydana gelmektedir.

Tablo 1.1. Doğal (Endojen) Antioksidanlar (72)

ANTIOKSIDAN	YAPISI	YERLEŞİMİ	İŞLEVİ
Sitokrom oksidaz	Tetramerik protein	Plazma	O ₂ nötralizanı
Süperoksit dismutaz	Cu/Zn, Mn SOD	Mitokondri, plazma peroksizom	Süperoksidi H ₂ O ₂ 'ye dönüştürür
Katalaz	Tetramerik hemoprotein	Peroksizomlar	H ₂ O ₂ , metil, etil hidroperoksit nötralizanı
Glutasyon peroksidaz	Selenoprotein	Sitosol, mitokondri	Lipid peroksidasyonu ürünlerini indirger
Glutasyon redüktaz	Dimerik protein	Sitosol, mitokondri	Düşük molekül ağırlıklı disülfidleri indirger
α-tokoferol (Vit E)	Yağda çözünen vitamin	Membranlar, ekstrasellüler ortam	Peroksidasyon ürünlerinin reaktivitesini düşürür
β-karoten	Vit A prekürsörü	Hücre ve doku membranı	Peroksil radikali temizleyicisi
Glutasyon	Tripeptid	Intrasellüler, intraalveoler ortam	GSH redoks substratı radikal reaktifi
Askorbik asit (Vit C)	Suda çözünen vitamin	Hücre içi ve hücre dışı sıvılar	Radikal giderici ve Vit E jeneratörü
Ürik asit	Okside pürin bazı	Geniş dağılım gösterir	OH toplar, Vit C oksidasyonunu önler
Sistein	Aminoasit	Geniş dağılım gösterir	Organik bileşikleri indirger
Albumin	Protein	Plazma, serum	Geniş spektrumlu radikal giderici
Bilirubin	Hemoprotein kataboliti	Dolaşım kanı, dokular	Peroksil radikali reaktanı, zincir kırıcı antioksidan
Seruloplazmin	Protein	Dolaşım kanı, dokular	O ₂ 'i H ₂ O ₂ 'ye dönüştürür
Transferrin	Glikoprotein	Plazma	Dolaşımdaki demir iyonlarını bağlar
Laktoferrin	Protein	Plazma	Dolaşımdaki demir iyonlarını bağlar
Ferritin	Glikoprotein	Dolaşım kanı, dokular	Dolaşımdaki demir iyonlarını bağlar

Normal fizyolojik şartlarda iç ve dış kaynaklı stresörler hücresel dengeyi sürekli değiştirmektedir. Buna karşı koruma hücrenin geliştirdiği ve antioksidan savunma olarak adlandırılan komponentlerle gerçekleştirilmektedir. Kısaca antioksidan ajanların görevi, serbest radikallerin toksik etkilerine karşı organizmayı ve reaktif moleküllerin oksidatif yıpratmasına karşı hücresel homeostazisi korumaktır (101).

Tablo 1.2. Eksojen (Farmakolojik) Antioksidanlar (72)

ANTIOKSIDAN SINIFI	SPEŞİFİK TİPİ	İŞLEVI
Ksantin oksidaz inhibitörleri	Allopurinol Oksipurinol Pterin aldehit Tungsten	Ksantin oksidaz reaksiyonlarında $\cdot O_2$ üretimini inhibe eder
Proteaz inhibitörleri	Soya tripsin inhibitörü Serin proteaz inhibitörleri Fenilmetilsülfonil (PMSF)	Ksantin dehidrogenazdan ksantin oksidaz oluşumunu bloke eder
NADPH oksidaz inhibitörleri	Adenozin Lokal anestetikler Nonsteroid antiinflamatuvarlar Cetiedil	Nötrofil, makrofajlarda NADPH oksidaz ile $\cdot O_2$ oluşumunu önler
Süperoksit dismutaz	Doğal SOD IgA bağımlı SOD Polietilen glikol SOD	$\cdot O_2$ 'den H_2O_2 dismutasyonunu katalizler
	Ginkgo Biloba (Egb 761)	Fe-SOD içerir ve SOD ile benzer fonksiyon gösterir
Katalazlar	Doğal katalaz PEG-katalaz Lipozom kapsüllü katalaz	H_2O_2 'nin oksijen ve suya indirgenmesi
Enzimatik olmayanlar	Mannitol	$\cdot OH$ gidericisi
	Albumin	Geniş spektrumda antioksidan toplayıcı
	Dimetil sulfoksid	$\cdot O_2$, $\cdot OH$ toplayıcı
	17-aminosteroidler lazaroidler	H_2O_2 , hidroksil giderici
	Glutasyon	Süperoksit giderici
	Ürik asit	Süperoksit ve $\cdot OH$ giderici
Demir redoks zinciri inhibitörleri	Deferoksamin Apotransferrin Seruloplazmin	Serbest Fe^{+3} atomlarını bağlayarak radikal reaksiyonlarını önler
	Antinötrofil serumu	Hücrel GSH-Px enzim aktivitesini artırır
	Monoklonal antikolar Platelet aktive edici faktör	Nötrofillerin endotele adezyonunu inhibe eder

1.16. Antioksidan Etki Tipleri

Antioksidanlar toplayıcı, bastırıcı, zincir kırıcı, onarıcı olarak 4 şekilde etki ederler (3).

1. Toplayıcı (scavenger) etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek tutma veya daha zayıf bir moleküle çevirme işlemine denir. Antioksidan enzimler, trakeobronşial mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.

2. Bastırıcı (quencher) etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya denir. Vitaminler, flavonoidler, trimetazidin ve antisianoidler bu tarz bir etkiye sahiptir.

3. Zincir kırıcı (chain breaking) etki: Serbest oksijen radikallerini kendine bağlayarak zincir kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye denir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller buna örnektir.

4. Onarıcı (repair) etki (3)

1.17. Antioksidan Enzimler

1.17.1. Süperoksit Dismutaz (E.C.1.15.1.1, EC-SOD)

$\cdot O_2^-$ radikalini H_2O_2 'e katalizleyen SOD ilk defa 1968 yılında Fridovich ve McCord tarafından bulunmuştur (23,50).



SOD'un katalize ettiği reaksiyon çok hızlıdır ve spontan reaksiyonun yaklaşık 4000 katıdır. Biyolojik kaynaklardan Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD olmak üzere 3 tipi izole edilmiştir. Ökaryotik hücrelerde Cu,Zn-SOD ve Mn-SOD tespit edilebilmiştir. Fridowich ve ark (24), alyuvarlardan saflaştırdıkları ve daha önceden aktivitesi bilinmeyen, bakır içeren mavi protein (eritrokuprein)'i ksantin oksidaz deney sistemine eklediklerinde, sitokrom-c'nin indirgenmediğini görmüşlerdir. Daha sonra bu mavi proteinin SOD enzimi olduğunu, değişik dokularda değişik metalloenzim tiplerinin bulunduğunu (Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD gibi) ve $\cdot O_2^-$ 'in H_2O_2 'e dismutasyonunu sağlayarak sitokrom-c'nin indirgenmesini inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Enzimin fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri $\cdot\text{O}_2^-$ 'in zararlı etkilerine karşı korumaktır. Hücre içi $\cdot\text{O}_2^-$ veya doku oksijen basıncı ($p\text{O}_2$) arttığında SOD'un biyosentezi de artar (24).

Wilde ve Yu (99) mitokondriyal SOD'nin optimum aktivitesi için pH'yı 7.8, ısı derecesini 37 °C olarak bildirmişlerdir.

SOD'un, $\cdot\text{O}_2^-$ 'e olan etkisi; $\cdot\text{O}_2^-$, Cu^{+2} travma, hücre rupturu gibi ve bir arginin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır. Bu bağlanma sonucunda $\cdot\text{O}_2^-$ 'ten bir elektron Cu^{+2} 'a transfer olurken Cu^+ ve moleküler oksijen meydana gelir. İkinci bir $\cdot\text{O}_2^-$ Cu^+ 'dan bir elektron, bağlanma ortağında ise iki proton alarak H_2O_2 ' ti oluştururken, enzim tekrar Cu^{+2} formuna dönmüş olur (3).



SOD'un, fagosite edilmiş bakterilerin öldürülmesinde rol oynadığı gibi enjekte edildiğinde antienflamatuar etki gösterdiği de bilinmektedir. Doku hasarı meydana geldiğinde, nötrofiller tarafından $\cdot\text{O}_2^-$ üretilir, bu da ekstrasellüler kompartmanda yerleşmiş olan SOD tarafından temizlenir. Sığır Cu,Zn-SOD'u bir rata enjekte edildiğinde (dolaşımdaki yarılanma ömrü 6 dakika) ekstrasellüler kompartmanlarda antienflamatuar etkinin en üst düzeyde olduğu kaydedilmiştir. Ayrıca SOD tarafından meydana gelen bu etki serum albumin ve polietilen glikol tarafından da gözlemlenir. *S. fecalis*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. ruminantium*, *S. sanguis*, *B. fragilis* ortamdaki intrasellüler $\cdot\text{O}_2^-$ artırır ve SOD üretimi de artar (24).

1.17.1.1. Bakır-Çinko İçeren SOD (Cu,Zn-SOD)

Ökaryotik hücrelerde, hücrenin sitozol, nükleer membran ve mitokondrilerinin membranlar arası bölgesinde bulunur (24). Birbirine eş ve 15600-16500

dalton ağırlığında iki monomerden oluşan bu dimerik enzimin mol ağırlığı 31000-33000 dalton arasındadır (68).

Her bir subünitede, bir Cu atomu, bir Zn atomu, bir sülfidril grubu (S – H), asetillenmiş terminal amino grubu ve zincirleri bir arada tutan disülfid bağı (S-S) bulundurmaktadır. Ortama merkaptoetanol konduğu zaman S – S bağı redüksiyona uğrayarak S – H haline gelir ve iki monomer birbirinden ayrılır . Genel olarak hücrede en bol bulunan Cu,Zn-SOD'dur ve 21 nolu kromozomda lokalize olmuştur (3).

1.17.1.2. Mangan İçeren SOD (Mn-SOD)

Mitokondride bulunur ve etki mekanizması Cu,Zn-SOD ile aynıdır (3). Prokaryotlardaki izomeri dimerik yapıda olup, molekül ağırlığı 36000-46000 dalton arasındadır (68). 6 nolu kromozomda lokalize olup, siyanidle inhibe olmaz (3).

Paraguay, E. coli'de sadece Mn-SOD'un biyosentezini bozar. X irritasyonu yöntemiyle; sodyum siyanür (NaCN) ilavesinin Cu,Zn-SOD'u sıgır karaciğerinde azaltırken, Mn-SOD'u rat karaciğerinde artırdığı gözlenmiştir (24).

1.17.1.3. Demir İçeren SOD (Fe-SOD)

E. coli'den izole edilen Fe-SOD'un etki mekanizması diğerleri ile aynıdır. Prokaryotlara özgüdür, ökaryotlarda çok nadirdir ve insanlarda bulunduğu dair bilgi henüz yoktur. Fe-SOD'un içerdiği demir Fe^{+3} şeklindedir ve bir monomerinin ağırlığı Mn-SOD'a benzer olarak 19000-23000 dalton arasındadır. Bakterilerde, yeşil alglerde Fe'den zengin ortamlarda tespit edilmiştir (24).

1.17.2. Katalaz (CAT) (E.C.1.11.1.6)

Katalaz 4 tane hem grubu içeren, prostetik olarak Fe^{+3} bulunduran porfirin enzimidir. Her monomer yaklaşık 6000 dalton molekül ağırlığına sahiptir. Bazıları kristal şekilde elde edilmiştir (3,33). Tüm hayvanlarda ve bitki hücrelerinde bulunur fakat bitki hücrelerinde aktivitesi minimaldir.

Kanda, kemik iliğinde, müköz membranlarda, böbrek ve karaciğerde bulunur (36). Karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde en fazla aktivite gösterirken (33) bağıdoku aktivitesinin en düşük olduğu kısımdır (36). Peroksizomlarda lokalizedir ve bu peroksizomlarda oksidazlarda bulunur. Bu durum H_2O_2 üreten enzimler ile onu parçalayan enzimi gruplamada biyolojik avantaj olabileceğini düşündürür (33).

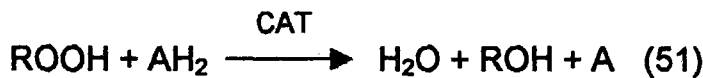
CAT'ın peroksidatik ve katalitik olmak üzere iki fonksiyonu vardır. Katalitik etkisinde H_2O_2 'nin enzimatik parçalanması yanında, düşük H_2O_2 konsantrasyonunun da metil, etil, hidroperoksitler, metanol, etanol, fenol gibi küçük moleküllü elektron vericilerini indirgeyebilir. Peroksidatik etkisinde ise lipid peroksitleri gibi büyük molekülleri indirgeyemez (51).

Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak, CAT'ın bir molekül H_2O_2 'i elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanılabilir. Birçok durumda, CAT'ın peroksidaz aktivitesi tercih ediliyor gibi görünür.

1. Katalitik aktivite



2. Peroksidatik aktivite



1.17.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) (EC.1.11.1.9)

Selenoprotein ailesindedir ve kandaki selenyum (Se) konsantrasyonu ile korelasyon gösterir (85,101). GSH-Px'in Se içeren 4 türü bilinir. Bunlar cGSH-Px (GSH-Px1), GSH-Px-GI (GSH-Px2), pGSH-Px (GPx3) ve PHGSH-Px (GSH-Px4)'dir. GSH-Px aktivitesi ilk defa 1957 yılında kaydedilmiştir. Klasik olarak GSH-Px (cGSH-Px) olarak isimlendirilmiştir (şimdi GSH-Px1 olarak bilinir). Eritrositlerde hidroperoksitlerin katalizinden sorumludur. Tetramerik 4 Se atomu içeren ve 85000 dalton molekül ağırlığında olan cGSH-Px fosfolipidlerin yağ asidi hidroperoksidlerini katalize etmez.

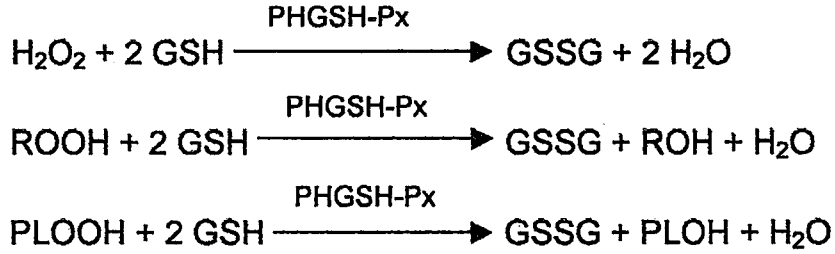
İkinci formu olan GSH-Px-GI (GSH-Px2) ise sitozolde bulunur ve GSH-Px gastrointestinal olarak isimlendirilir. Her iki cGSH-Px ve GSH-PxGI'de aynı substrata (H_2O_2) spesifite gösterir. Ratta GSH-Px-GI mRNA gastrointestinal sistemde, insanda karaciğer ve barsakların geniş bölümünde izole edilmiş fakat diğer organlarda bulunamamıştır.

pGSH-Px (GSH-Px3) plazmada veya ekstrasellüler sıvıda bulunur. Plazmada pGSH-Px, ekstrasellüler sıvıda ise eGSH-Px olarak isimlendirilir. Tetrameriktir ve herbir alt ünitesi yaklaşık 23000-25000 dalton molekül ağırlığındadır. İnsanlarda en fazla böbrekte ve proksimal tübüllerin epitel hücrelerinde bulunur.

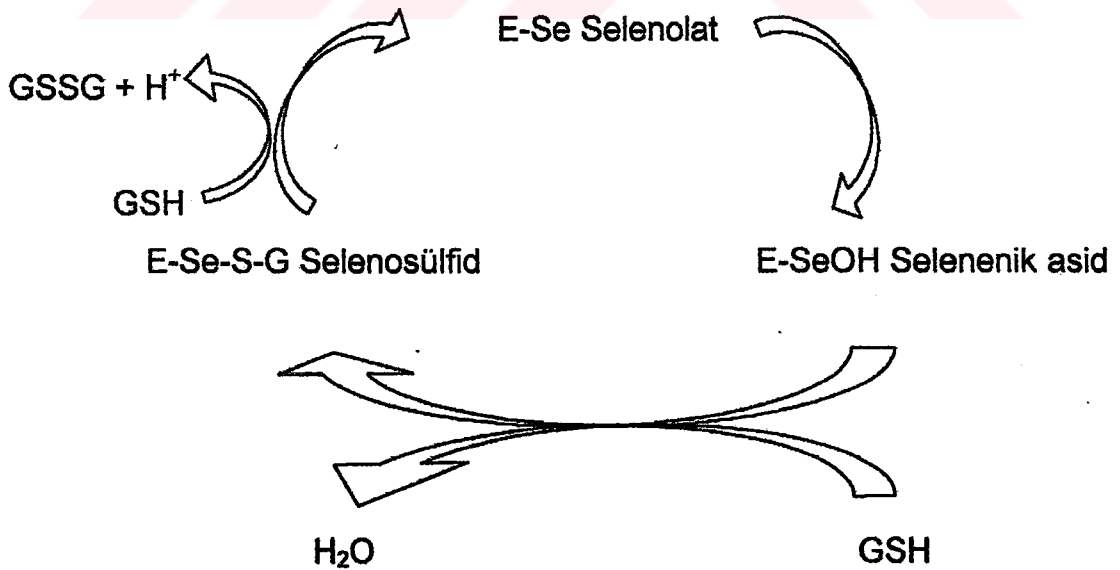
PHGSH-Px (GPx4), fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (GSH-Px4) olarak isimlendirilir. Bu da diğerleri gibi 4 Se atomu içerir. İlk defa 1982' de Ursini ve ark tarafından tanımlanmıştır (30,53). 20000-22000 dalton ağırlığında monomerik bir proteindir. Sadece bu tür H_2O_2 'i kolesterol ve kolesterol esterlerinin metabolizmasından açığa çıkan lipid hidroperoksitleri substrat olarak kullanabilir. PHGSH-Px mRNA'sı hepatomlarda, nöronal hücrelerde, nefroblastomada, meme epitel hücresinde daha yüksek oranda bulunur. Ayrıca PHGSH-Px spermatogenezis ve sperm fonksiyonunda da rol alır. İnsan sperması yüksek oranda uzun zincirli doymamış yağ asidi ve bir

miktarda dekosaheksanoik asit bulundurur. Bunlardan açığa çıkan serbest radikalleri Cu,Zn-SOD ve Mn-SOD H_2O_2 'te , PHGSH-Px'de H_2O_2 'i H_2O ' ya ve O_2 ' ne katalizler. Bu yüzden insan infertilitesinde önemlidir (30).

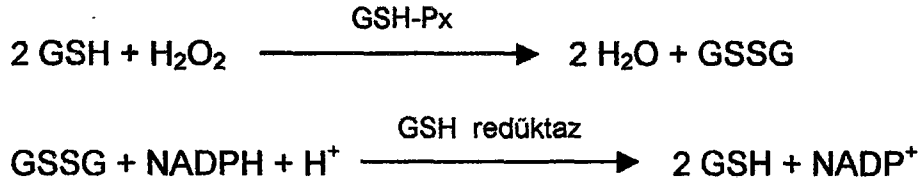
Membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğu zaman PHGSH-Px membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlar.



GSH-Px'in selenolat formu ($E-Se^-$) peroksit substratını alkole indirgerken, kendisi okside selenik aside dönüşür ($E-Se-OH$). Redükte glutatyon (GSH) , bu evrede reaksiyona katılarak selenosülfite ($E-Se-S-G$) oluşturur. İkinci bir GSH'ın selenosülfite bağlanması ile enzim, aktif formu olan selenolat forma dönerken, glutatyon okside (GSSG) hale dönüşür.



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



GSH-Px'in fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, H₂O₂'in artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (3).

1.17.4. Glutatyon-S-Transferazlar (GST) (E.C.2.5.1.18)

Her biri iki alt bölümden oluşmuş (dimerik) bir enzim ailesi olup ilk defa 1961 yılında tanımlanmışlardır. O zamandan beri bu enzimler üzerinde yoğun olarak çalışmalar yapılmakta ve her geçen gün yeni izoenzim tipleri bulunmaktadır. Ksenobiotiklerin (yabancı maddeler) biotransformasyonunda önemli rol almalarından dolayı biyokimyacılara ilaveten genetikçiler, klinisyenler, farmakolojistler ve toksikolojistlerin ilgisini çeken bir enzimdir.

Başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı GST'lar Se-bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluştururlar (3).



Son zamanlara kadar GST'lar katalizledikleri reaksiyona göre sınıflandırılmaktaydılar (aril transferaz, alkil transferaz, epoksit transferaz, aralkil transferaz ve alken transferaz gibi). Daha sonra yapılan çalışmalar bu enzimlerin söz konusu reaksiyonların herhangi birine özgül olmadığını, iç içe geçmiş substrat özgüllüğüne sahip olduğunu ortaya koymuş ve bunlar "glutatyon-S-transferaz"lar adı altında toplanmıştır. Günümüzde ise bu türe

bağımsız bir sınıflama yapıldığında GST'lar geleneksel olarak üç sitozolik bir de mikrozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılırlar. Sitozolik GST'lar izoelektrik noktaları ve SDS-poliakrilamid jel elektroforezindeki moleküler ağırlıklarına göre; α (bazik), π (asidik), μ (nötral) diye isimlendirilirler. Bazik GST'nin α , β , γ , δ , ϵ isimli benzer aminoasit kompozisyonu ve immunolojik karakterlere sahip 5 değişik şekli bulunmaktadır. Nötral sınıfı GST'lerin ise çok benzer 2 formu bildirilmiştir.

Bu enzimler katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak yabancı maddeleri glutatyondaki sitesine ait $-SH$ grubu ile bağlayarak onların elektrolitik bölgelerini nötralize ederler ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlarlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir veya daha ileri metabolize olurlar. GSH'dan glutamat ve glisinin koparılmasından sonra sisteinin serbest amino grubu asetillenerek merkaptürik asitlere dönüştürülür. Ksenobiotiklerin klasik atılım ürünleri olan bu merkaptürik asitler, yani N-asetil sisteinin S-alkile olmuş türevleri, daha sonra safra ile atılırlar. Bu yol GST'ların kanserojen, mutajen ve diğer hücre içi detoksifikasyonunda rolleri olduğunu gösterir. Ayrıca lökotrien C_4 'ün sentezi, lökotrien C sentez aracılığı ile lökotrien A_4 'ün GSH ile bağlanması sonucu olur. GST'lar prostaglandin (PG) sentezinde PG izomeraz etkisine sahiptirler. GST- π 'nin çekirdekte bulunması, sitozolden gelen genotoksik maddeleri detoksifiye etmelerini ya da hormon ve büyüme uyarıcı faktörler gibi endojen ve eksojen bileşikler için taşıyıcı proteinler olarak hareket ettiklerini akla getirmektedir (3).

GST- μ : Karaciğerde sitP₄₅₀'de oluşan ara ürünleri daha az reaktif konjugata dönüştürür.

GST- π : Normal karaciğerde bulunmaz, fötüs karaciğerinde bulunur. Hepatomada tümör göstergesidir.

GST- α : 10 haftalık gebelikten sonra tüm karaciğer ve adrenal sitozolünde bulunur. Erken karaciğer hasarında AST ve ALT'den daha duyarlıdır (3).



2. MATERYAL METOT

2.1. Materyaller

2.1.1. Hayvan Materyali ve Numunelerin Hazırlanması

Araştırma için, ortalama 1 yaşında ve canlı ağırlığı ortalama 31 ± 2 kg olan 20 adet Tuj ırkı koyun Kafkas Üniversitesi Eğitim, Uygulama ve Araştırma Çiftliğinde barındırıldı. Klinik muayenelerinin yapılmasının ardından iç ve dış parazit ilaçları uygulandı. Ayrı bir bölmeye alınarak hayvanlara kulak numaraları verildi. Denemeye başlamadan önce adapte olmaları için 30 gün beklendi.

Koyunların içme sularına günlük 4 ppm NaF ilave edildi. Çalışma süresince hayvanlara su ve kuru ot *ad libitum* olarak verildi. Kronik florozisin oluşum sürecinin saptanması amacıyla günlük olarak idrar flor konsantrasyonu ve idrar pH'sı ölçüldü. Literatürlerde (12,14) kronik florozisli koyunlarda idrar flor düzeyinin 8-30,6 ppm arasında değiştiği bildirilmektedir. 38 hafta boyunca sürdürülen içme suyuna flor katımı uygulaması ile idrar flor konsantrasyonu ortalama 16 ppm'lik bir düzeye ulaştı.

Kronik florozis şekillenmesinin tespitinin ardından deneme ve kontrol grubu koyunların vena jugularisinden usulüne uygun olarak antikoagulanlı tüplere kan alındı. Kanlar herhangi bir işleme tabi tutulmadan önce hemoglobin değerleri tespit edilmek üzere 0,5 ml'si ayrıldı. Daha sonra tüpteki kan numuneleri hiç bekletilmeden 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Hücre paketinde en üst tabaka olan lökosit tabakası eritrosit tabakasından ayrıldı. Böylece saf eritrosit numunesi elde edildi. Daha sonra eritrositler % 0,9 NaCl ile 3 defa 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Yıkanmış eritrositler + 4 °C'de soğutulmuş distile su ilavesi

ile hemoliz edildi (1). Hemolizatlar -24 °C'de analiz yapılincaya kadar saklandı.

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Sodyum Florür (NaF), Sodyum Hidroksit (NaOH), Heparin, Ksantin, Ksantin Oksidaz, Nitrobluetetrazolium (NBT), Bakır Klorür (CuCl₂), Sığır Serum Albumini (BSA), Glutasyon (GSH), Glutasyon Redüktaz (GR), Sodyum Azid (NaN₃) SİGMA firmasından, Sodyum Karbonat (Na₂CO₃), Hidrojen Peroksit (H₂O₂), Etilen Diamin Tetraasetik Asid (EDTA), Amonyum Sülfat ((NH₄)₂SO₄), Kloroform, Etanol, Sodyum Klorür (NaCl), Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH₂PO₄), Absolüt Etil Alkol MERCK firmasından temin edildi.

2.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler

- Otomatik pipet (Nichiryo)
- Vortex (Labinco)
- Spektrofotometre (Shimadzu)
- Hassas terazi (Sartorius)
- Santrifüj (Heraeus)
- Manyetik karıştırıcı (Labinco)
- pHmetre (Consort marka)
- Etüv (Nüve)
- Derin dondurucu (Bosch)

2.2. Metotlar

2.2.1. İdrarda pH Ölçümü

EDT Micro2 pH/ION Meter kullanılarak yapıldı.

2.2.2. İdrarda Flor Ölçümü

Flor iyon aktivitesi ölçülürken, çözeltinin toplam iyonik kuvvetinin sabit tutulması, pH'sının ayarlanması ve alüminyum, demir, magnezyum gibi metal kationlarının flor iyonu ile verdikleri komplekslerin bozulması amacıyla, toplam iyonik kuvvet ayarlama tamponu, "Total Ionic Strength Adjustment Buffer" (TISAB) kullanıldı (93).

Gerekli Reaktifler

1-TISAB II solüsyonu: Thomas Scientific firmasından temin edilen bu solüsyonun pH'sı 5.0-5.5 ve içeriği şöyledir.

a-Sodyum klorür: %5.8

b-Glasial asetik asit: %5.7

c-1,2 sikloheksandiamin-N,N,N',N'- teraasetikasit (CDTA): %0.4

d-Sodyum hidroksit: %0.5

2- Standart flor solüsyonu: Thomas Scientific firmasından temin edilen 1000 ppm'lik solüsyon kullanıldı.

Standart Eğrinin Hazırlanması

Standart eğrinin hazırlanması için 5 adet plastik beher alındı, kör, standartlar olarak işaretlendi. Kör işaretli behere 10 ml deiyonize su ve 10 ml TISAB II pipetlenerek karıştırıldı. 0.1, 1, 10 ve 20 ppm'lik flor konsantrasyonlarını elde etmek için 1000 ppm'lik standart çözeltiden 1, 2, 3 ve 4 standart beherlerine sırası ile 2, 20, 200 ve 400 µl eklendi. Üzerlerine 10 ml TISAB solüsyonu ilâve edildikten sonra de iyonize su ile 20 ml'ye tamamlandı. Kör için hazırlanan karışıma kombine pH ve selektif flor elektrotu daldırılarak pH kontrolü yapıldı ve gerektiğinde pH 5.0-5.5'e ayarlandı (4N NaOH veya 4N HNO₃ ile). Flor için 0 ppm noktası belirlendikten sonra standartların flor konsantrasyonu (mV) okundu (25).

Çalışmada kullanılan EDT Micro2 pH/ION Meter ile bu eğri çizimi otomatik olarak yapıldı ve her ölçümde standart eğri yeniden çizildi, standart ve örneklerin flor konsantrasyon ölçümleri aynı sıcaklıkta yapıldı.

Flor Ölçümünün Yapılışı

5 ml idrar alınıp üzerine 5 ml TISAB II ilave edildi. Manyetik karıştırıcı üzerine alınan idrar-TISAB II karışımına kombine pH ve kombine selektif flor elektrodu daldırılarak önce pH'nın 5.0-5.5 arasında olup olmadığı kontrol edildi. (Gerektiğinde 4 N NaOH veya 4 N HNO₃ kullanılarak pH ayarlamaları yapıldı). Daha sonra konsantrasyon değerleri takip edilerek, okunan değer sabit bir hal aldığı anda ölçüm tamamlandı (37).

2.2.3. Kanda Hemoglobin (Hb) Tayini

Oksihemoglobin yöntemiyle Hb miktarının ölçülmesi: Bu yöntemde kan örneğinin hemolizi ve oksidasyonu amonyum hidroksit (NH₄OH) ilavesi ile sağlanır. Bilinen molar absorbtiviti kullanılarak, Hb'nin konsantrasyonu 578 nm'deki absorbanstan doğrudan hesaplanır (100).

Kullanılan Reaktifler

%0,1'lik NH₄OH: % 25' lik NH₄OH solüsyonundan 4ml alınarak distile su ile 1 lt'ye tamamlandı. Bu solüsyon süresiz olarak dayanıklıdır.

Deneyin Yapılışı

0,02 ml kan 5 ml NH₄OH solüsyonu içinde çözüldü ve iyice karıştırıldı. NH₄OH solüsyonuna karşı 578 nm'de absorban okundu (58).

Hesabı

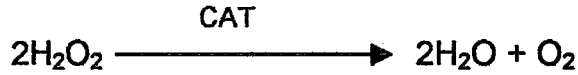
$$\%gr \text{ Hb} = A(T) \times 26,3$$

$A(T)$ = testin absorbansı

26,3 = testin 578 nm'deki katsayısı

2.2.4. Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini

CAT, H_2O_2 'i parçalayarak su ve oksijene dönüştürür.



CAT aktivitesinin tayini Aebi yöntemi kullanılarak yapıldı. Prensip olarak bu metotta ortamdaki H_2O_2 'in CAT tarafından parçalanması ile meydana gelen absorbans azalmasının 240 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Standart şartlarda deney ortamına eklenen H_2O_2 'nin birim zamandaki absorbans azalması hızı, CAT aktivitesini belirler (1).

Kullanılan Reaktifler

- Fosfat Tamponu (pH=7,0 50 mM) (a) 50 mM (6,81g/1 lt) KH_2PO_4 ve (b) 50 mM (8,90g/1lt) $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ distile suda hazırlandı. a ve b solüsyonları 1:1,5 oranında (v/v) karıştırıldı.

- H_2O_2 Çözeltisi (30 mM) (0,34 ml H_2O_2 dilue edilerek) % 30'luk H_2O_2 çözeltisinden, hazırlanan fosfat tamponunun 100 ml'sine optik dansitesi (240 nm'de) 0,5 olana kadar ilave edilerek hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

Eritrosit hemolizati distile su ile 100 kat dilüe edildi.

	<u>Kör</u>	<u>Numune</u>
Süpernatant	-	0.01 ml
Fosfat Tamponu	2,99 ml	-
H_2O_2 'li Fosfat Tamponu	0.01 ml	2.99 ml

İlavesinden hemen sonra 240 nm'de 15 sn aralıklarla 90 sn boyunca absorbands azalması kaydedildi. Lineer absorbands azalmasının olduğu zaman aralığı değerlendirilmeye alındı (1).

Hesabı

$K =$ aktivite sabiti

$$K = 1/\Delta t \times \ln A_1/A_2 = 2,3/\Delta t \times \log A_1/A_2$$

$\Delta t = 60$ sn olduğundan

$$K = 2,3/60 \times \log A_1/A_2 = 0,0383 \times \log A_1/A_2$$

Formül 1 ml'ye göre düzenlendiği için 100 kat dilue edilmiş 10 μ l numune kullandığından $100 \times 100 = 10000$ ile çarpılmalı.

$$K = 0,0383 \times \log A_1/A_2 \times 10000$$

K ml'deki hemoglobine bölündüğünde;

$$K = 383 \times \log A_1/A_2 / \text{gHb/ml}$$

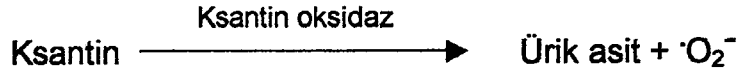
$A_1 =$ ilk okunan absorbands

$A_2 =$ son okunan absorbands

2.2.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini

Bu metod, SOD tarafından ksantin-ksantin oksidaz yoluyla üretilen süperoksit radikallerinin, H_2O_2 'ye dönüştürülmesi ve nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirgemesi esasıyla çalışan bir metottur. İndirgenen NBT 560 nm'de maksimum absorbands veren mavi renkli fomazana dönüşür (74). SOD enzimi

de iki süperoksiti dismute ederek H_2O_2 oluşturmaktadır. Böylece belirli bir miktar NBT'nin bulunduğu deney ortamında, süperoksidin miktarı standardize edildiği zaman ortamdaki SOD enziminin aktivitesiyle NBT ters orantılı olarak mavi renk oluşturur. Buradan da SOD ile NBT'nin oluşan O_2^- ile reaksiyona girdiği söylenebilir.



Kullanılan Reaktifler

- Assay Reaktifi

200 ml 0,3 mmol/L (9,13 mg) Ksantin

100 ml 0,6 mmol/L (23 mg) Na_2EDTA

100 ml 150 μ mol/L (12,3 mg) NBT

60 ml 400 mmol/L (2,54 mg) Na_2CO_3

30 ml 1 g/L (30 mg) BSA

Bu çözeltilerin hepsi karıştırılarak koyu renkli şişede 4 °C'de saklandı.

- Ksantin Oksidaz:167 U/L (11860 U/L ksantin oksidaz stok çözeltilisinden 14 μ l alınıp soğuk 2 M'lık $(NH_4)_2SO_4$ ile 1 ml'ye tamamlandı)

- $CuCl_2 \cdot 2 H_2O$: 0,8 mmol/L (13,6 mg 100 ml)

- $(NH_4)_2SO_4$: 2M (2,64mg 10 ml)

- Kloroform-Etanol çözeltisi : 3 hacim kloroform 5 hacim etanol ile karıştırıldı.

Deneyin Yapılışı

100 kat dilüe edilen eritrosit numuneleri ile 3/5 oranında hazırlanan kloroform/etanol çözeltisi eşit hacimde karıştırılarak 4 °C'de 30 dk santrifüj edildi. Daha sonra üstteki süpernatanttan alınarak çalışmaya başlandı.

	<u>Kör</u>	<u>Numune</u>
Assay reaktifi	2.45 ml	2.45 ml
Süpernatant	–	0.5 ml
Distile su	0.5 ml	–
Ksantin oksidaz	50 µl	50 µl

20 dakika 25 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda,

CuCl₂ 1 ml 1 ml

İlave edilerek reaksiyon durduruldu. Distile suya karşı kör ve numunelerin absorbansları 560 nm'de ölçüldü.

Hesabı

% inhibisyon = (absorbans kör (Ak) – absorbans test (At) / absorbans kör (Ak))x100

Bir ünite SOD; NBT redüksiyonu %50 inhibe eden enzim aktivitesidir.

Buna göre;

$$[(Ak - At) / Ak] \times \%100/50 = [(Ak - At) / Ak] \times 2$$

1ml'deki ünite miktarı; eritrosit için 0,5 ml numune kullanıldığından ve eritrosit önce 100 kat sonra da 2 kat kloroform-etanol çözeltisi ile sulandırıldığından 200 ile çarpmak gerekir.

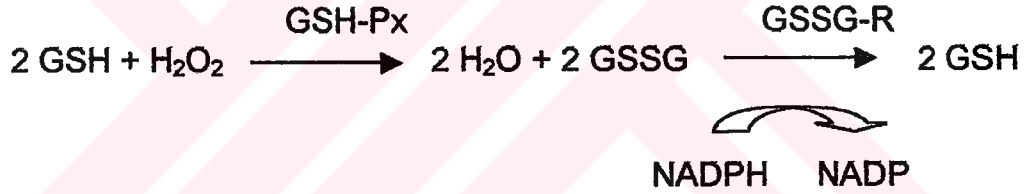
$$U = [(Ak - At) / Ak] \times 2 \times 1/0,5 \times 200$$

$$U = [(Ak - At) / Ak] \times 800$$

Çıkan sonuç eritrosit için gram Hb'e bölünerek spesifik aktivite bulundu.

2.2.6. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Tayini

GSH-Px, in vitro olarak GSH'ın oksidasyonu aracılığıyla H₂O₂'in suya dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Reaksiyon sonunda GSH, GSSG'a dönüşür. Bir diğer H₂O₂'in suya katalizi için GSSG'un GSH'a dönüşmesi gerekir. Bu dönüşüm, ortamda redükte NADP varlığında glutasyon redüktaz tarafından gerçekleştirilir. Böylece ortamda azalan NADPH'in miktarı GSH-Px'in aktivitesini gösterir.



NADPH 340 nm'de maksimum absorpsiyon verdiği için, GSSG-R aktivitesi devam ettikçe NADPH azalma miktarı ile ortamdaki GSH-Px aktivitesi hesaplanabilir.

Kullanılan Reaktifler

1. EDTA'lı fosfat tamponu: (a) 50 mM KH₂PO₄ (6,8 gr), (b) 50 mM Na₂HPO₄ (7,1gr) 1'er lt hazırlanıp 600 ml a+400 ml b karıştırıldı. İçerisine 5 mM'lük EDTA (2,08gr) ilave edildi.

2. NaN₃ (Sodyum azid): 1 mM (65 mg 1 ml fosfat tamponunda taze hazırlandı)

3. GSH : 2 mM (50 mg 1 ml fosfat tamponunda taze hazırlandı)
4. H₂O₂: 0,25 mM (15 µl 5 ml fosfat tamponuna pipetlendi)
5. NADPH: 0,2 mM (5 mg 1 ml fosfat tamponunda taze hazırlandı)
6. GSH Redüktaz: 1,2 U/ml (30 mg alınıp 1 ml 3,2 M NH₄'de çözüldü)

Deneyin Yapılışı

Eritrosit numuneleri için 100 kat dilüe edilmiş numuneler kullanıldı.

	<u>Numune Tüpü</u>
Fosfat Tamponu	2.650 ml
Redükte GSH	0.100 ml
NADPH	0.100 ml
GSH Redüktaz	0.010 ml
NaN ₃ (Sodyum azid)	0.010 ml
Numune	0.020 ml

Tüpler iyice karıştırılıp, oda ısısında 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her tüpe 100 µl H₂O₂ ilave edilip reaksiyon başlatılarak 3 dk süresince absorban azalması takip edilecek şekilde 340 nm'de okundu.

Hesabı

Bir ünite GSH-Px , bir dakikada okside olan NADPH'in µmol cinsinden miktarıdır.

$$U/L (\mu\text{mol/dk/L}) = [(\Delta A/t) \times V_t \times 10^6] / E \times V_s \times L$$

E= NADPH'in ekstinsiyon sabiti ($6,22 \times 10^3 \text{ Lxmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

V_t= Total reaksiyon zamanı (3 dk)

V_s = Total reaksiyon içindeki numune hacmi (0,02 ml)

L = Küvet çapı

$\Delta A/t$ = Dakikada absorban değişimi

10^6 = molün mikromole çevrilmesi

$$U/L = \Delta A/t \times V_t \times 10^6 / 6,22 \times 10^3 \times 0,02 \times 1 = \Delta A/t \times 3 \times 10^6 / 124,4$$

$$U/L = A_{ilk} - A_{son} / 3 \times 100 \times 24115$$

Spesifik aktivite için ise bulunan sonuçlar gHb'e bölündü. Böylece sonuç U/gHb olarak bulundu (71).

2.2.7. İstatistik Hesaplamalar

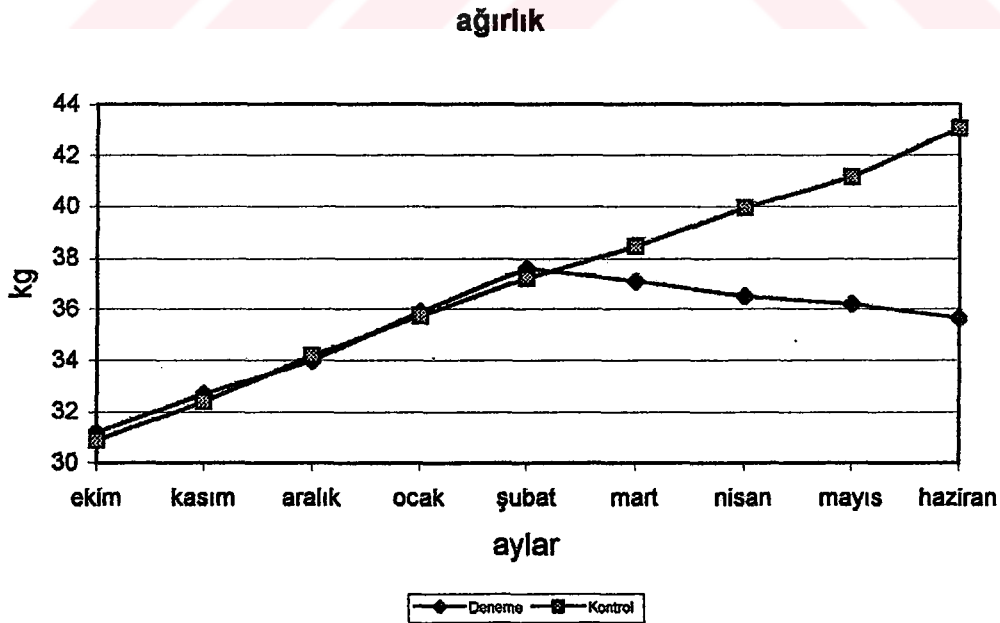
Çalışmada elde edilen verilerin istatistiki hesaplamaları MINITAB istatistik paket programı (Minitab Inc. Pennsylvania, ABD) (63) ile hesaplandı. Kontrol ve deneme grupları arasındaki farklar Student's t testi kullanılarak yapıldı.

3. BULGULAR

Florozis için kullanılan 10 adet koyunda flor uygulamasının yapıldığı 38 hafta boyunca herhangi bir enfeksiyon durumuna rastlanılmamıştır. Klinik bakıda ise herhangi bir bozukluk görülmez iken sadece dişlerde enine çizgili lekelenmeler tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmanın sürdürüldüğü 38 hafta sonunda deneme grubunda kontrol grubuna göre ağırlık azalışı saptanmıştır. Flor verilmeye başlanıldığı ilk günden (0. gün) itibaren kronik florozisin oluştuğuna karar verilen 38. haftaya kadar canlı ağırlık değişimleri Tablo 3.1 ve Grafik 3.1'de sunulmuştur.

Tablo3.1. Kontrol ve Deneme Gruplarında Aylara Göre Ağırlık Değişimleri

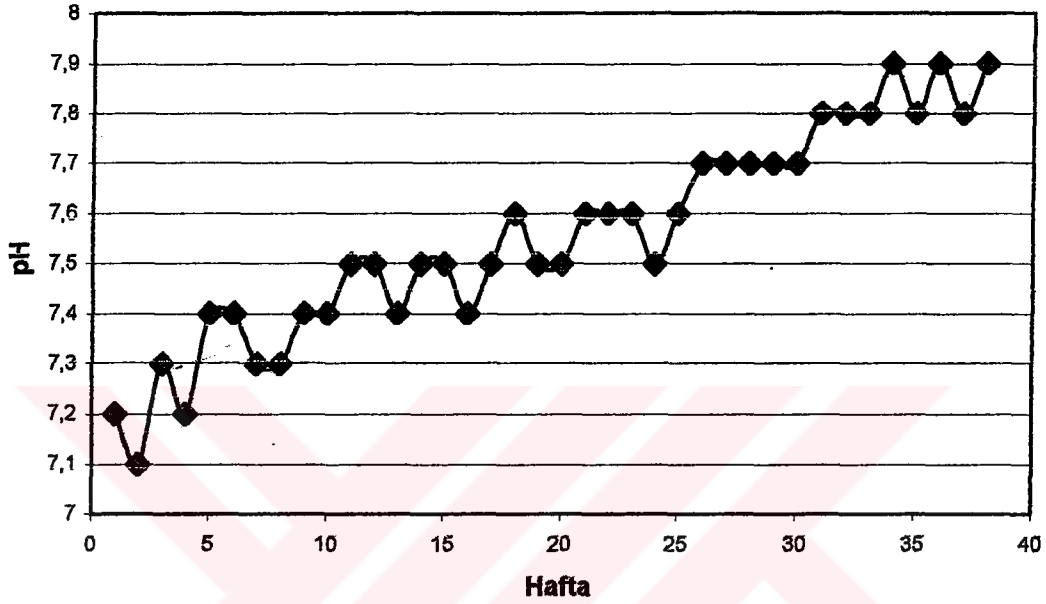
	Ekim	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran
Kontrol	30,9±0,8	32,4±0,8	34,2±0,7	35,75±0,6	37,2±0,6	38,45±0,7	39,95±0,6	41,15±0,5	43,05±0,5
Deneme	31,2±0,8	32,7±0,7	34,0±0,7	35,9±0,6	37,6±0,6	37,1±0,5	36,5±0,5	36,2±0,5	35,65±0,5



Grafik 3.1. Kontrol ve deneme gruplarında aylara göre ağırlık değişimleri

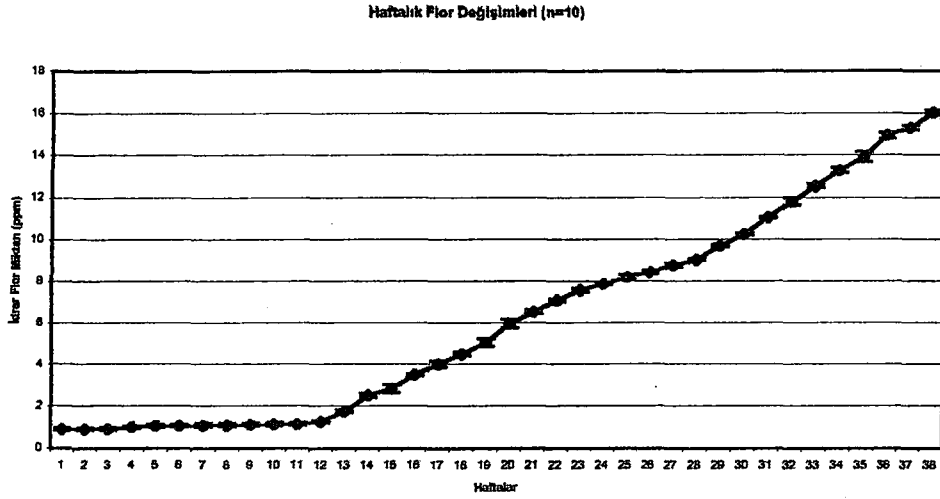
İdrar pH ve flor değişimleri ise sırasıyla Grafik 3.2 ve Grafik 3.3'de verilmiştir.

Deneme grubu koyunlarda başlangıçta 7.2 olan idrar pH düzeyi deneme sonunda 7.9 olarak saptandı.



Grafik 3.2. Deneme grubu koyunlarda idrar pH değişimleri

Deneme grubu koyunlarda, başlangıçta idrar flor konsantrasyonu ortalama 0.9 ppm iken, 12. hafta sonuna kadar yavaş seyreden bir artışla ortalama 1.27 ppm'e ulaştı. Daha sonra artış hızlı bir şekilde devam etti ve 38. haftada ortalama 16 ppm olarak tespit edildi.



Grafik 3.3. Deneme grubu koyunlarda idrar flor değişimleri

Kontrol ve deneme grubuna ait eritrosit SOD, CAT, GSH-Px aktiviteleri Tablo 3.2'de sunulmuştur.

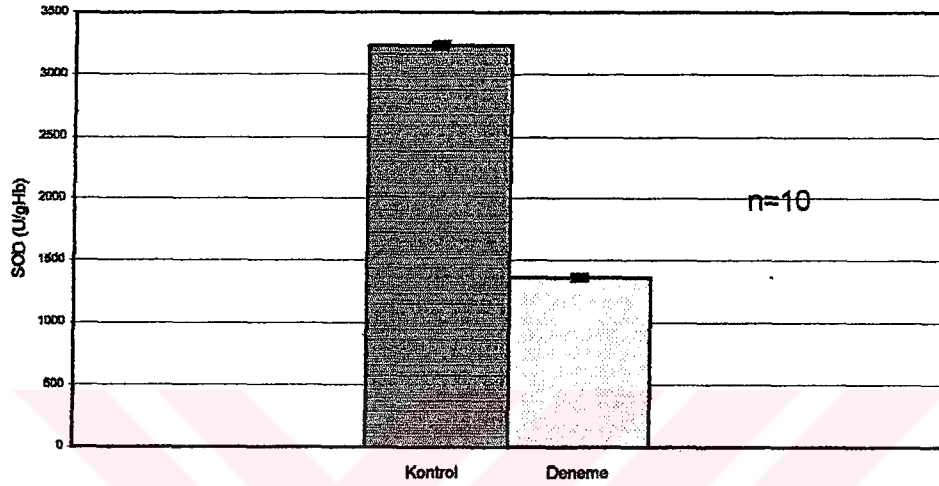
Tablo 3.2. Kontrol ve deneme grubuna ait eritrosit SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri

	SOD (U/gHb)		CAT (k/gHb)		GSH-Px (U/gHb)	
	Kontrol	Deneme	Kontrol	Deneme	Kontrol	Deneme
1	3276,51	1469,53	20,89	27,32	78,1939	111,644
2	3157,63	1437,32	25,65	28,30	89,4142	101,751
3	3147,13	1262,47	28,42	33,08	98,0285	115,659
4	3391,53	1415,82	26,32	31,27	78,5761	100,229
5	3344,71	1273,12	19,38	25,19	77,2174	107,178
6	3192,55	1248,16	24,19	29,22	74,9146	105,076
7	3218,00	1397,85	22,28	29,38	86,8071	111,644
8	3198,63	1478,88	24,19	28,15	96,7308	115,162
9	3291,17	1306,25	25,23	29,67	77,3661	99,239
10	3127,17	1369,32	26,03	31,48	74,2228	109,365
($\bar{X} \pm S\bar{X}$)	3234,5 \pm 27,9	1365,9 \pm 27,7 ***	24,26 \pm 0,86	29,31 \pm 0,72 ***	83,15 \pm 2,8	107,69 \pm 1,9***

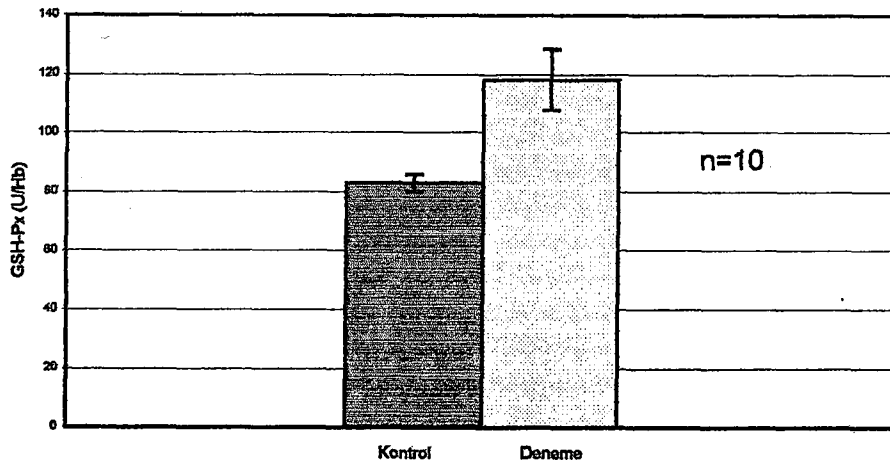
*** p<0.001

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında deneme grubu SOD aktivitesinde istatistiki olarak düşme ($p<0,001$) gözlenirken, GSH-Px ve CAT aktivitelerinde yükselme ($p<0,001$) tespit edilmiştir.

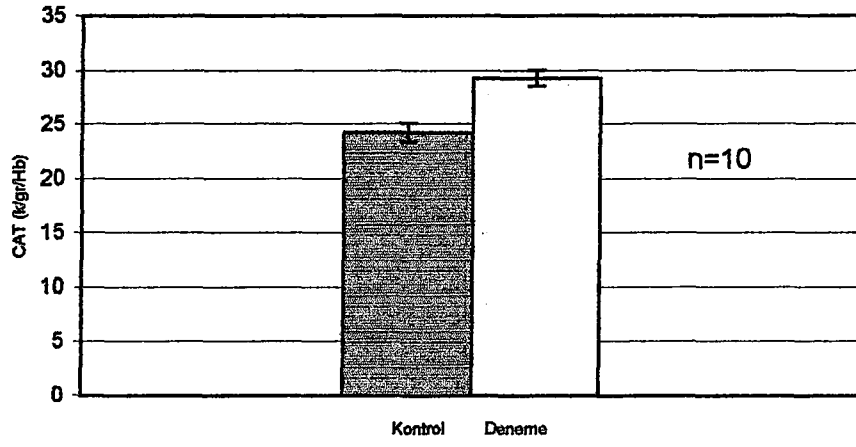
Bu enzimlere ait değişimler sırasıyla Grafik 3.4, 3.5 ve 3.6'da verilmiştir.



Grafik 3.4. Kontrol ve deneme grubunda eritrosit SOD aktivitelerindeki değişimler



Grafik 3.5. Kontrol ve deneme grubunda eritrosit GSH-Px aktivitelerindeki değişimler



Grafik 3.6. Kontrol ve deneme grubunda eritrosit CAT aktivitelerindeki değişimler

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doğal ya da endüstriyel yollarla florun yüksek dozda ve uzun süreli alımı kronik florozise neden olmaktadır (86,32). Bu da önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır (22,39,88). Florun fazla alımı enzimler üzerinde olumsuz etkiler yaratmakta, aktivatör veya inhibitör etki oluşturabilmektedir (56,94). Ayrıca yüksek düzeydeki flor konsantrasyonu OH^- , O_2^- , H_2O_2 radikallerinin de üretimini artırmaktadır (75,80,99). Bu çalışmada florozis oluşturulmuş Tuj ırkı koyunlarda eritrosit SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri araştırılmıştır.

İçme sularındaki flor konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak idrar flor konsantrasyonunda da artış olduğu 1944'ten beri bilinmektedir (54). Florozisin klinik tanısında, klinik bulgular yanında idrar flor konsantrasyonu ölçümlerinin de güvenli ve hassas bir yöntem olarak kullanılabilceği önerilmektedir (88). Kronik florozis oluşumunun idrar flor konsantrasyonu takip edilerek belirlenen bu çalışmada günlük 4 ppm NaF içme sularına katılması sonucu ortalama 0.9 ppm idrar flor düzeyinin ortalama 16 ppm'e çıktığı bulunmuştur.

Keçeci ve Özdemir (39), Elazığ bölgesindeki florit madenlerinin ve kiremit fabrikalarının bulunduğu endüstriyel florozisli bölgedeki sığır ve koyunlarda yapmış oldukları çalışmada kontrol grubu koyunların idrar flor düzeyini ortalama 0,59 ppm ölçmüşlerdir. Ergun ve ark. (20) ise normal koyun idrar flor düzeyini ortalama 1,4 ppm olarak bildirirken, Fidancı ve ark. (21) İç Anadolu Bölgesinde doğal ve endüstriyel florozis çalışmasında kontrol koyunlarında idrar flor konsantrasyonunu ortalama 1ppm olarak saptamışlardır. Florozis gözlenmeyen ve kontrol gruplarını oluşturan koyunların idrar flor düzeyleri Van/Çaldıran'da ortalama 0,5 ppm, Eskişehir/Kızılcıören'de 1,67 ppm, Muğla/Yatağan'da ortalama 1,45 ppm olarak ölçülmüştür (5). Ayrıca Kaya ve ark. (38) ise Kars ve yakın çevresinde

Tuj ırkı koyunların idrar flor düzeyini ortalama 0,91 ppm olarak ölçmüşlerdir. Yapılan araştırmada da kontrol ve deneme grubu koyunların başlangıç idrar flor konsantrasyonu 0,9 ppm ölçülmüş olup, bu sonuçlarla uyum göstermektedir.

Doğu Anadolu Bölgesinde Ağrı ve Van il merkezi, ilçe ve köylerinde endemik florozis görülmektedir. Tendürek dağının kuzey ve güney yamaçlarında volkanik arazi üzerinde bulunan ve doğal su kaynaklarının çok olduğu bu yöre flor bakımından oldukça zengindir (88). Bu bölgelerde yapılan çalışmalarda Ergün ve ark. (20) koyunların idrar örneklerinde ortalama flor konsantrasyonunu 8,13 ppm olarak tespit ederken, Şendil ve Bayşu (88) 3,8-30,6 ppm olarak bildirmişlerdir. Muğla/Yatağan termik santrali çevresindeki endüstriyel florozis görülen koyunlardaki idrar flor konsantrasyonu ortalama 5,33 ppm olarak ölçülmüştür (5).

Milhaud ve ark. (60) yaptıkları deneysel çalışmada içme sularına 4 ay süresince 3,5 mg/kg/gün dozda flor katılan koyunlarda dental florozisin şekillendiğini bildirmişlerdir.

Mansfield'in (54) yapmış olduğu bir çalışmada da idrar flor konsantrasyonunun 4 ppm düzeyine çıktığı durumlarda sistemik florozise işaret ettiği kaydedilmiştir.

Yapılan bu çalışmada 13. haftaya kadar idrar flor düzeylerinde artış meydana gelmemiş, 13. haftadan sonra ise idrar flor düzeyleri artmaya başlamıştır. 26. haftada ortalama 8 ppm düzeyinin üzerine çıkmıştır. Çalışmanın sonlandırıldığı 38. haftada ise idrar flor düzeyi ortalama 16 ppm olarak saptanmıştır. Denemenin ilk 10 gününde değişiklik bulunmamış, 12. haftaya kadar ise ancak ortalama 1,78 ppm değerine ulaşması sebebiyle ilk 12 haftada her gün flor ölçümü yerine 15 gün aralıklarla ölçüm yapılması yeterli olabilir. Denemenin sonundaki ortalama 16 ppm değeri doğal ve endüstriyel florozis gözlenen bölgelerde yetiştirilen koyunların idrarlarında

saptanan flor düzeyleri ortalamasının üzerindedir. Bu nedenle araştırma materyalini oluşturan koyunlarda kronik florozisin şekillendiğine dair bir kanaat oluşması açısından yeterli görülmüştür.

Yapılan bu çalışmada başlangıç idrar pH değerleri ortalama 7.2 iken çalışma sonunda ortalama 7.9'a kadar çıkmıştır. Bu da Şendil ve Bayşu'nun (88) Ağrı ili Doğubeyazıt ilçesi köylerinde ve Van ili Muradiye ilçesi köylerinde yapmış oldukları araştırma sonucu buldukları idrar pH 7.5-7.9 değeri ile uyumluluk göstermektedir. Bu durumun floroid reabsorpsiyonunun azalması sonucu idrarla flor atılımının artmasına bağlı olabilir (18).

Yapılan bu çalışmada kontrol grubu koyunların eritrosit SOD aktivitesi ortalama $3234,5 \pm 27,9$ U/gHb olarak bulunurken, kronik florozis oluşturulmuş deneme grubunda $1365,9 \pm 27,7$ U/gHb bulunmuştur. SOD aktivitesindeki bu düşüş, Bo ve ark.'nın (8) endemik florozisli sığırlarda yaptıkları çalışmada buldukları eritrosit SOD aktivitesindeki azalma ile benzerlik göstermektedir. Shivaroshankara ve ark. (80) kronik florozis oluşturulan ratlarda eritrosit, beyin ve karaciğer dokularında SOD aktivitesinde azalma olduğunu kaydetmişlerdir. Benzer şekilde Vani ve ark. (94) kronik florozisli fare beyin ve gastronemius kasında, Liu ve ark.'ları (49) florozis oluşturulmuş ratların karaciğer ve böbrek dokularında, Shivarajashankara ve ark.'ları da (79) endemik florozisli çocukların eritrosit SOD aktivitesinde anlamlı bir azalma kaydetmişlerdir. Bu da yapılan çalışma ile paralellik göstermektedir.

Fe^{+2} , Haber-Weiss reaksiyonlarına katılarak H_2O_2 , $\cdot O_2$, $OH\cdot$ 'lerin artmasını sağlar. Florun en reaktif element olması ve bir çok iyonun yerine geçmesi sebebi ile floroziste de bu radikallerin arttığı bildirilmiştir. Ayrıca florun fazla alınması solunum patlamasını artırmakta ve dolayısı ile $\cdot O_2$ ' in daha fazla üretilmesine neden olmaktadır (75) $\cdot O_2$ direkt olarak zarar vermez fakat H_2O_2 kaynağı olması sebebi ile zararlı etkileri vardır. H_2O_2 membran lipidlerinde lipid peroksidasyonuna, enzim inaktivasyonuna, DNA hasarına neden olmaktadır (3,19,34,50). Solunum patlaması sırasında artan H_2O_2 , $\cdot O_2$, $OH\cdot$

radikalleri, özellikle H_2O_2 SOD'un inhibisyonuna (75,99), dolayısıyla SOD aktivitesinde azalmaya neden olmaktadır.

Bunun yanı sıra Akdoğan ve ark. (2) kronik florozis oluşturdukları tavşanların karaciğer dokusunda 10 ppm düzeydeki uygulamada SOD aktivitesinde artma, 40 ppm düzeydeki uygulamada ise önemli derecede düşüş olduğunu bildirmişlerdir.

Deneysel kronik florozisli ratlarda serum SOD aktivitesinde herhangi bir değişiklik olmadığını (105) veya artma olduğunu bildirenlerde vardır (102).

Bu çalışmada kontrol grubu eritrosit GSH-Px aktivitesi ortalama olarak $83,1 \pm 2,8$ U/gHb deneme grubunda ise $118,2 \pm 10,4$ U/gHb olarak bulunmuştur. Eritrosit GSH-Px aktivitesindeki bu artış Shivarajashankara ve ark. (80) buldukları rat eritrosit GSH-Px aktivitesindeki artışla paralellik göstermektedir. Aynı şekilde Yu ve ark. da (102) kronik florozis oluşturulmuş rat eritrositlerinde, Shivarajashankara ve ark. (79) kronik florozisli çocuklarda eritrosit GSH-Px aktivitesinde artış tespit etmişlerdir. Eritrositlerde GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller (3). Florozisde solunum patlaması meydana gelmekte, bu nedenle H_2O_2 radikali artmaktadır (75). GSH-Px' deki bu artış, florozisde artan H_2O_2 ' in azaltılmaya çalışmasına bağlı olabilir.

Bunun yanında Akdoğan ve ark.'nın (2) florozisli tavşanlarda yapmış olduğu çalışmada 10 ppm düzeyinde flor verilen tavşanların karaciğer dokusunda GSH-Px aktivitesinde artma, 40 ppm düzeyinde flor verilen tavşanların karaciğer dokusunda GSH-Px aktivitesinde ise azalma kaydedilmiştir.

Buna karşın Liu ve ark. (49) florozisli ratlarda yapmış oldukları çalışmada karaciğer ve böbrek dokularında GSH-Px aktivitesinde azalma tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Zhi-Zhang ve ark. (105) florozisli ratlarda kan

GSH-Px aktivitesinde düşüş olduğunu rapor etmişlerdir. Bo ve ark. da (8) florozisli sığırlarda yapmış oldukları çalışmada kanda GSH-Px değerinde azalma kaydetmişlerdir.

Kontrol grubu koyunların eritrosit CAT aktivitesi ortalama $24,26 \pm 0,86$ k/gHb, deneme grubu koyunlarında $29,31 \pm 0,72$ k/gHb olarak bulunmuştur. Akdoğan ve ark.'nın (2) tavşanlarda yapmış oldukları çalışmada 10 ppm düzeyinde flor verilen grupta karaciğer CAT aktivitesinde bu çalışmaya benzer şekilde artış tespit edilirken, 40 ppm düzeyinde flor verilen grupta CAT aktivitesinde azalma rapor edilmiştir.

Bo ve ark. (8) sığır kanında, Vani ve ark. (94) ise fare beyin ve gastrocnemius kasında CAT aktivitesinde azalma bildirmişlerdir.

CAT'ın görevi H_2O_2 ' i suya ve oksijene parçalamaktır (51). Artan flor konsantrasyonunda H_2O_2 yoğunluğu da artmaktadır (75). H_2O_2 konsantrasyonundaki bu artışa bağlı olarak CAT'ın H_2O_2 yoğunluğunu azaltmaya çalışması nedeni ile CAT aktivitesinde artış meydana gelmiş olabilir.

Florun H_2O_2 , $\cdot O_2$, $OH\cdot$ radikallerini artırması sebebi ile H_2O_2 'in eritrosit SOD aktivitesini inhibe ettiği, artan H_2O_2 'i ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla GSH-Px ve CAT aktivitelerinin artmış olabileceği sonucuna varıldı.

5. ÖZET

Bu çalışmada deneysel kronik florozis oluşturulmuş Tuj ırkı koyunlarda eritrosit süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Araştırmanın hayvan materyalini ortalama 1 yaşında ve canlı ağırlığı ortalama 31 ± 2 kg olan 20 adet sağlıklı Tuj ırkı koyun oluşturdu. Deneme grubundaki koyunların içme suyuna 4 ppm NaF ilave edildi. Çalışma süresince kuru ot ve içme suyu *ad libitum* olarak verildi. Kronik florozis oluşum sürecinin saptanması amacıyla günlük olarak idrar flor konsantrasyonu ve idrar pH'sı ölçüldü. 38 haftalık çalışma sonucunda idrar flor konsantrasyonu ortalama 16 ppm düzeyine ulaştıktan sonra uygulama sonlandırıldı.

Kontrol grubu koyunların eritrosit SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri sırasıyla 3234.5 ± 27.9 U/gHb, 24.26 ± 0.86 k/Hb, 83.1 ± 2.8 U/gHb; deneme grubu koyunların ise sırasıyla 1365.9 ± 27.7 U/gHb, 29.31 ± 0.72 k/Hb, 118.2 ± 10.4 U/gHb olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında deneme grubu SOD aktivitesinde azalma ($p < 0,001$), CAT ve GSH-Px aktivitelerinde artış ($p < 0,001$) saptanmıştır.

Florun hidroksil ($\cdot\text{OH}$), süperoksit ($\cdot\text{O}_2^-$), hidrojen peroksit (H_2O_2) radikallerini artırması sebebi ile H_2O_2 'in eritrosit SOD aktivitesini inhibe edebileceği, artan H_2O_2 'i ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla GSH-Px ve CAT aktivitelerini artırmış olabileceği sonucuna varıldı.

6. SUMMARY

Aim of this study was to investigate the süperoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroksidase (GSH-Px) activities of erythrocytes of Tuj sheep that were placed under chronical experimental fluorosis.

For that purpose, one-year-old 20 healthy Tuj sheep, with a mean body weight of 31 ± 2 kg, were used. Experimental sheep received 4 ppm NaF in daily prepared drinking water. Water and hay were provided *ad libitum* throughout the study period. For the observation of progress of chronic fluorosis, daily measurements were carried out in urine samples for the determination of level of fluor and pH. Addition of NaF into the drinking water was terminated when urine fluorine concentration reached up to mean 16 ppm after a study period of 40 weeks.

For the control group, SOD, CAT and GSH-Px activities of erythrocytes were 3234.5 ± 27.9 U/gHb, 24.26 ± 0.86 k/Hb, 83.1 ± 2.8 U/gHb and for the experimental group they were 1365.9 ± 27.7 U/gHb, 29.31 ± 0.72 k/Hb and 118.2 ± 10.4 U/gHb, respectively. Mean SOD activites in the experimental group, comparing with those of control group, werw found to be lower ($p < 0,001$); however, mean CAT and GSH-Px activites werw significantly higher ($p < 0,001$).

In conclusion, as it is known that fluor increases hydrokxyl ($\cdot\text{OH}$), süperoxide ($\cdot\text{O}_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2) radicals in the cells, all of these radicals, especially H_2O_2 , might inhibit SOD activity of erythrocytes. Additionally, increased GSH-Px and CAT activites might be due to an attempt to scavange increased H_2O_2 .

7. KAYNAKLAR

1. Aebi, H.: Catalase in vitro assay methods. *Methods in Enzymology*. 105:121-126, 1984.
2. Akdoğan, M., Bilgili, A., Karaöz, E., Gökçimen, A., Yarsan, E., Eraslan, G.: İçme suyu ile belirli dozlarda flor verilen tavşanların karaciğer dokusundaki yapısal ve biyokimyasal değişiklikler. *Fırat Üniv. Sağlık Bil. Derg.*, 16(1):41-46, 2002.
3. Akkuş, İ.: Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yay., Konya, 1995.
4. Al-Hiyasat, A.S., Elbetiha, A.M., Darmani, H.: Reproductive toxic effects of ingestion of sodium fluoride in female rats. *Fluoride*, 33(2): 79-84, 2000.
5. Altıntaş, A., Fidancı, U.R., Sel, T., Duru, Ö., Başsatan, A.: Doğal ve endüstriyel florozisli koyunlarda böbrek fonksiyonu ve serum protein elektroforezi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 47: 105-114, 2000.
6. Anonim: Review of water fluoridation and fluoride intake from discretionary fluoride supplements. National Health and Medical Research Council 1999 report.
7. Beckman, K.B., Ames, B.N.: The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.*, 78(2): 547-581, 1998.
8. Bo, H., Manyu, L., Yan, S.: Studies on the toxicology of endemic fluorosis in cattle. XXII World Buiatrics Congress 18-23 August, Hannover, Germany, 2002.

9. Chen, X.Q., Machida, K., Ando, M.: Effect of fluoride aerosol inhalation on mice. *Fluoride*, 32 (3): 153-161, 1999.
10. Chinoy, N.J., Mehta, D.: Beneficial effects of the amino acids glycine and glutamine on testis of mice treated with sodium fluoride. *Fluoride*, 32(3): 162-170, 1999.
11. Chinoy, N.J., Mehta, D.: Effects of protein supplementation and deficiency on fluoride-induced toxicity in reproductive organs of male mice. *Fluoride*, 32(4): 204-214, 1999.
12. Chinoy, N.J., Patel, T.N.: Reversible toxicity of fluoride and aluminium in liver and gastrocnemius muscle of female mice. *Fluoride*, 32 (4): 215-229, 1999.
13. Chinoy, N.J., Sharma, A.: Amelioration of fluoride toxicity by vitamins E and D in reproductive functions of male mice. *Fluoride*, 31(4): 203-216, 1998.
14. Choubisa, S.L.: Endemic fluorosis in Southern Rajasthan, India. *Fluoride*, 34(1): 61-70, 2001.
15. 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. Internal Med.*, 107: 526-545, 1987.
16. Davies, K.J.A., Delsignore, M.E., Lin, S.W.: Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *Biol. Chem.*, 262(20): 9902-9907, 1987.
17. Dröge, W.: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 82: 47-95, 2002.

18. Dunipace, A.J., Brizedine, E.J., Wilson, M.E., Zhang, W., Katz, B.P., Stookey, G.K.: Chronic fluoride exposure does not cause detrimental, extraskeletal effects in nutritionally deficient rats. *Nutrition*, 128 (8): 1392-1400, 1998.
19. Einsele, H., Clemens, M.R., Remmer, H.: In vitro aging of red blood cells and lipid peroxidation. *Arch. Toxicol.*, 60: 163-166, 1987.
20. Ergun, H.S., Russel-Sinn, H.A., Bayşu, N., DüNDAR, Y.: Studies, on the fluoride contents in water and soil, urine, bone and teeth of sheep, and urine of human from Eastern and Western parts of Turkey. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 94: 416-420, 1987.
21. Fidancı, U.R., Salmanoğlu, B., Maraşlı, Ş., Maraşlı, N.: İç Anadolu bölgesinde doğal ve endüstriyel florozis ve bunun hayvan sağlığı üzerindeki etkileri. *Tr. J. Vet. Anim. Sci.*, 22: 537-544, 1998.
22. Fidancı, U.R., Sel, T.: The industrial fluorosis caused by a coal-burning power station and its effects on sheep. *Tr. J. Vet. Anim. Sci.*, 25: 735-741, 2001.
23. Fridovich, I.: Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xantine oxidase. *Biol. Chem.*, 245(16): 4053-4057, 1970.
24. Fridovich, I.: Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 23: 239-257, 1983.
25. Foulkes, R.,G.: The XXII nd conference of the ISFR an appreciation. *Fluoride*, 32(1): 2-6, 1999.
26. Gümrukçuoğlu, A.: Serbest radikaller.
www.genetikbilimi.com/gen/serbest_radikaller.htm

27. Hill, D.R.: Fluoride: risks and benefits? Calgary's Operation and Environment Committee, 10th September, Alberta, Canada, 1992.
28. Hiraishi, H., Terano, A., Razandi, M., Sugimoto, T., Harada, T., Ivey, K.J.: Role of cellular superoxide dismutase against reactive oxygen metabolite injury in cultured bovine aortic endothelial cells. *Biol. Chem.*, 267(21): 14812-14817, 1992.
29. Hirzy, B.: Why epa's headquarters union of scientists opposes fluoridation. *Fluoride*, 32(3): 179-186, 1999.
30. Imai, H., Nakagawa, Y.: Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Biol. Med.*, 34(2): 145-169, 2003.
31. Internet: <http://www.bruha.com/fluoride>
32. Internet: <http://www.hipokrat.org/hnet/menu/tip/tipdal/pediatri/cocflor.html>
33. Jenkins, R.R., Tegri, J.: Catalase activity in sclerol muscle of varying fiber types. *Experimentia*, 37: 67-68, 1981.
34. Joenje, H.: Genetic toxicology of oxygen. *Mutation Res.*, 219: 193-208, 1989.
35. Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlıoğlu, M., Başınar, N., Tiftik, A.M.: *Biyokimya. Selçuk Üniv. Vet. Fak. Basım Ünitesi, Konya, 1998.*
36. Karabulut, A.B., Özerol, E., Temel, İ., Gözükar, E.M., Akyol, Ö.: Yaş ve sigara içiminin eritrosit katalaz aktivitesi ve bazı hematolojik parametreler üzerine etkisi. *İnönü Üniv. Tıp Fak. Derg.*, 9(2): 85-88, 2002.

37. Karagül, H., Ficancı, U.R., Altıntaş, A., Sel, T.: Klinik Biyokimya. Medisan Yay., Ankara, 2000.
38. Kaya, N., Utlü, N., Maraşlı, N., Güldür, T., Maraşlı, Ş.: Kars ve yakın çevresindeki morkaraman ve tuj ırkı koyunların serumlarında T₃, T₄, Na, K, Ca ve P ile idrar ve su numunelerinde F profili. Tr. J. Vet. Anim. Sci., 20: 449-454, 1996.
39. Keçeci, H., Özdemir, H.: Elazığ ve çevresindeki sığır ve koyunların kan serumu, idrar, kemik ve dişlerindeki flor düzeylerinin araştırılması. Fırat Üniv. Sağlık Bil. Derg., 16(2): 187-197, 2002.
40. Kehrer, J.P.: Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Critical Rev. Toxicol., 23(1): 21-48, 1993.
41. Kennedy, D.C.: Pan-Asia-Pacific conference on fluoride and arsenic research. Fluoride, 32(4): 251-254, 1999.
42. Kessabi, M., Hamliri, A.: Experimental fluorosis in sheep: Alleviating effects of aluminium. Vet. Hum. Toxicol., 28(4): 300-304, 1986.
43. Kessabi, M., Hamliri, A., Braun, J.P.: Experimental fluorosis in sheep: fluoride kinetics and alleviating effects of aluminium sulfate. Fluoride, 21(4): 193-200, 1988.
44. Kessabi, M., Hamliri, A., Braun, J.P., Rico, A.G.: Experimental acute sodium fluoride poisoning in sheep: renal, hepatic, and metabolic effects. Fund. Appl. Toxicol., 5: 1025-1033, 1985.
45. Kolodziejczyk, L., Put, A., Grzela, P.: Liver morphology and histochemistry in rats resulting from ingestion of sodium selenite and sodium fluoride. Fluoride, 33(1): 6-16, 2000.

46. Krook, L., Minor, R.R.: Fluoride and alkaline phosphatase. *Fluoride*, 31(4): 177-182, 1998.
47. Li, C.S., Gi, J.C., Fan, J.Y., Yin, W., Liang, X.P.: Relationships between ionic fluoride, total fluoride, calcium, phosphorus and magnesium in serum of fluorosis patients. *Fluoride*, 19(4): 184-187, 1986.
48. Li, C., Tan, Y., Liang, X., Fan, J.: A study of equilibrium between ionic fluoride and nonionic fluoride in serum of monkeys with skeletal fluorosis. *Fluoride*, 22(1): 20-24, 1989.
49. Liu, K., Wang, G., Ma, L., Jang, P., Xiao, B., Zhang, C.: Adverse effects of combined arsenic and fluoride on liver and kidney in rats. *Fluoride*, 32(4): 243-247, 1999.
50. Lunec, J.: Free radicals: their involvement in disease processes. *Ann. Clin. Biochem.*, 27: 173-182, 1990.
51. Lück, H.: Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis.*, 2nd Edition, New York, USA, 1963.
52. Machlin, L.J., Bendich, A.: Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB*, 1: 441-445, 1987.
53. Maiorino, M., Chu, F.F., Ursini, F., Davies, K.J.A., Doroshov, J.H., Esworthy, R.S.: Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is the 18-kda selenoprotein expressed in human tumor cell lines. *Biol. Chem.*, 266(12): 7728-7732, 1991.
54. Mansfield, P.: The distribution of urinary fluoride concentration in the UK. *Fluoride*, 32(1): 27-32, 1999.

55. Maraşlı, N.: Normal ve florozis belirtisi gösteren koyunlarda serum tiroksin ve triiyodotrionin düzeylerinin araştırılması. Doktora Tezi. Ankara Üniv. Sağlık Bil. Enst., Ankara, 1991.
56. Marletta, M.A.: Nitric oxide synthase structure and mechanism. *Biol. Chem.*, 268(17): 12231-12234, 1993.
57. Motta, da M.V., Souza, de D.N., Nicolau, J.: Effects of subtoxic doses of fluoride on some enzymes of the glucose metabolism in submandibular salivary glands of fed and overnight-fasted rats. *Fluoride*, 32(1): 20-26, 1999.
58. Meram, İ., Aktaran, Ş.: Serbest radikallerin biyomoleküller üzerine etkileri. *Arşiv*, 11: 299-304, 2002.
59. Milhaud, G.E., Borba, M.A., Krishnaswamy, S.: Effect of fluoride ingestion on dental fluorosis in sheep. *Am. J. Vet. Res.*, 48(5): 873-879, 1987.
60. Milhaud, G., Clauw, M., Joseph-Enriquez, B.: Bioavailability in soil fluoride in sheep. *Fluoride*, 22(4): 188-194, 1989.
61. Milhaud, G., Van Weering, H.J.: Prevention of industrially-induced cattle and sheep fluorosis. *Fluoride* 31(1): 52, 1998.
62. Miller, G.W., Shupe, J.L., Vedina, O.T.: Accumulation of fluoride in plants exposed to geothermal and industrial water. *Fluoride*, 32(2): 74-83, 1999.
63. Minitab Inc., Version 12.1, State Collage, Pennsylvania, USA
64. Mokrzyńska, A.M.: Fluoride in toxicology, medicine, and environment protection. *Fluoride*, 32(4): 248-250, 1999.

65. Moncada, S., Higgs, A., Furchgott, R.: XIV. international union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol. Rev.*, 49(2): 137-141, 1997.
66. Moshage, H.: Nitric oxide determinations: much ado about NO[•]-thing? *Clin. Chem.*, 43(4): 553-556, 1997.
67. Nielsen, F., Mikkelsen, B.B., Nielsen, J.B., Andersen, H.R., Grandjean, P.: Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin. Chem.*, 43(7): 1209-1214, 1997.
68. Nordmann, R.: Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol & Alcoholism.*, 29(5): 513-522, 1994.
69. Oktay, C: Effect of high fluoride containing drinking water on skeletal and dental age. In seminar on "problems of high fluoride waters" 6-10 September, Erzurum, 1977.
70. Ortiz, D., Castro, L., Turrubiartes, F., Milan, J., Diaz-Barriga, F.: Assessment of the exposure to fluoride from drinking water in Durango, Mexico, using a geographic information system. *Fluoride*, 31(4): 183-187, 1998.
71. Paglia, D.E., Valentine, W.N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Lab. Clin. Med.*, 70: 158-169, 1967.
72. Pal, Y.B.: Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.*, 74(1): 139-161, 1994.
73. Piekos, R., Paslawska, S.: Fluoride uptake characteristics of fly ash. *Fluoride*, 32(1): 14-19, 1999.

74. Podczasy, J.J., Wei, R.: Reduction of idonitrotetrazolium violet by superoxide radicals. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 150: 1290-1301, 1988.
75. Rzeuski, R., Chlubek, D., Machoy, Z.: Interactions between fluoride and biological free radical reactions. *Fluoride*, 31(1): 43-45, 1998.
76. Sel, T.: Doğu Anadolu Bölgesinde normal ve florozis belirtisi gösteren koyunlarda serum spesifik karaciğer enzimleri (glutamat oksalasetat transaminaz, glutamat piruvat transaminaz, laktat dehidrogenaz) ve alkalen fosfataz düzeylerinin araştırılması. Doktora Tezi, Ankara Üniv. Sağlık Bil. Enst., Ankara, 1991.
77. Seppa, L., Karkkainen, S., Hausen, H.: Caries frequency in permanent teeth before and after discontinuation of water fluoridation in Kuopio, Finland. *Fluoride*, 32(1): 33-42, 1999.
78. Shivashankara, A.R., Shankara, Y.M.S., Rao, S.H., Bhat, P.G.: A clinical and biochemical study of chronic fluoride toxicity in children of kheru thanda of gulbarga district, Karnataka, India. *Fluoride*, 33(2): 66-73, 2000.
79. Shivarajashankara, Y.M., Shivashankara, A.R., Rao, S.H., Bhat, P.G.: Oxidative stress in children with endemic skeletal fluorosis. *Fluoride*, 34(2): 103-107, 2001.
80. Shivarajashankara, Y.M., Shivarajashankara, A.R., Bhat, P.G., Rao, S.H.: Effect of fluoride intoxication on lipid peroxidation and antioxidant systems in rats. *Fluoride*, 34(2): 108-113, 2001.
81. Shupe, J.L., Olson, A.E., Peterson, H.B., Low, J.B.: Fluoride toxicosis in wild ungulates. *Am. Vet. Med. Assoc.*, 185(11): 1295-1300, 1984.

82. Sienko, M.J., Plan, R.A.: Temel Kimya. 3. Baskı, Savaş Kitap ve Yayınevi, Ankara, 1983.
83. Slater, T.F.: Free radicals and tissue injury: fact and fiction. Br. J. Cancer, 55(VIII): 5-10, 1987.
84. Suttie, J.W., Phillips, P.H., Faltin, E.C.: Serum fluoride in the chick. Exp. Biol. Med., 115(3): 575-577, 1964.
85. Suzuki, T., Agar, N.S.: Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase in red blood cells of GSH-normal and GSH-deficient sheep. Experientia, 39: 103-104, 1983.
86. Şanlı, Y.: Metaller ve Diğer İnorganik Maddeler. 61-128. In: Kaya, S. Veteriner Klinik Toksikoloji. 2. Baskı, Medisan Yay., Ankara, 1995.
87. Şanlı, Y.: Metaller ve Diğer İnorganik Maddeler. 221-223. In: Kaya, S., Pirinçci, İ., Bilgili, A. (Eds.) Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. 2. Baskı, Medisan Yay., 2002.
88. Şendil, Ç., Bayşu, N.: İnsan ve hayvanlarda Ağrı ili Doğubeyazıt ilçesi köylerinde görülen flor zehirlenmesi ve bunu Van ili Muradiye ilçesi köylerinde de saptamamızla ilgili ilk tebliğ. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 20(4): 474-489, 1973.
89. Tanırgan, G., Koldaş, M., Uras, F: Serbest radikaller. Haseki Tıp Bült., 32(4): 303-308, 1994.
90. Toma, S., Kreidman, J., Vedina, O., Veliksar, S.: Some observations on fluoride problems in the Moldova Republic. Fluoride, 32(2): 67-70, 1999.

91. Tiwary, S.N., Singh, C.D.N., Jha, G.J.: Pathology of acute fluorine poisoning in sheep. *Indian Vet. J.*, 56: 638-640, 1979.
92. Tiwary, S.N., Singh, C.D.N., Jha, G.J., Sinha, B.K.: Some observations on the pathology of experimental fluorine poisoning in sheep. *Ind. J. Anim. Health*, 17(2): 141-143, 1978.
93. Tokalıoğlu, Ş., Şahin, U., Kartal, Ş.: Determination of fluoride and some metal ion levels in the drinking waters in Kayseri province. *Tr. J.Chem.*, 25: 113-121, 2001.
94. Vani, M.L., Reddy, K.P.: Effects of fluoride accumulation on some enzymes of brain and gastrocnemius muscle of mice. *Fluoride*, 33(1): 17-26, 2000.
95. Vedina, O., Kreidman, J.: Fluoride distribution in burozens of Moldova. *Fluoride*, 32(2): 71-73, 1999.
96. Waldbott, G.L.: The preskeletal phase of chronic fluoride intoxication. *Fluoride*, 31(1): 13-20, 1998.
97. Wang, F.Y., Zhang, D.X., Wang, R.M.: Toxic effects of fluoride on beating myocardial cells cultured in vitro. *Fluoride*, 31(1): 26-32, 1998.
98. Wheeler, S.M., Turner, A.D., Brock, T.B. Teasdale, D.C.: The effect of 30 mg/L fluoride in drinking water on ewes and their lambs and current bone levels of sheep in N.S.W., Australia. *Fluoride*, 21(2): 60-68, 1988.
99. Wilde, L.G., Yu, M.: Effect of fluoride on superoxide dismutase (SOD) activity in germinating mung bean seedlings. *Fluoride*, 31(2): 81-88, 1998.

100. Yılmaz, K., Otlu, A.: Veteriner Hematoloji El Kitabı. Hatiboğlu Yay., Ankara, 1989.
101. Yu, B.P.: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.*, 74(1): 139-162, 1994.
102. Yu, Y.N., Liu, J.J., Wang, S.L.: Study of the free radical and morphological changes in the bone of rats with chronic fluorosis. *Chinese J. Endemiol.*, 19(5): 337-339, 2000.
103. Yurdakul, Z.: Oksijen ve canlılar. www.biyokimya.8m.net/oksijen.html
104. Zhang, Y., Marcillat, O., Giulivi, C., Ernster, L., Davies, K.J.A.: The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *Biol. Chem.*, 265(27): 16330-16336, 1990.
105. Zhi-zhong, G., Pei-si, Y., Nai-den, Y., Zong-jie, Z.: An experimental study of blood biochemical diagnostic indices for chronic fluorosis. *Fluoride*, 22(3): 112-118, 1989.
106. Zumpt, I.: Chronic fluoride poisoning in sheep. *J. South Afr. Vet. Ass.*, 46(2): 161-163, 1975.

8.ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında Sinop'ta doğdu. İlk ve orta öğrenimini Samsun'da tamamladıktan sonra 1991 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne girerek 1996 yılında mezun oldu. 1997 yılında Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı ve halen bu görevine devam etmektedir.



9.TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm aşamalarında hiçbir zaman yardımını esirgemeyen, yaptığı olumlu eleştirilerle bana yön veren tez danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Ayla Özcan'a, tez konumun belirlenmesinde ve şekillenmesinde destek olan ilk danışman hocam Prof. Dr. Nalan Bayşu'ya, eğitimim süresince büyük yardımlarını gördüğüm hocam Prof. Dr. Necati Kaya ve Doç. Dr. Şaban Maraşlı'ya, çalışmama maddi destek sağlayan Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na ve hayvan materyalinin temininde, barındırılmasında yardımcı olan Kafkas Üniversitesi Eğitim, Uygulama ve Araştırma Çiftliği Müdürlüğü'ne teşekkürü bir borç bilirim.

