



---

**EGZERSİZ YAPAN SIÇANLARDA OKSİDATİF STRES VE  
PARAOKSONAZ ENZİMİ**

**I. Dicle DEMİRAYAK**

**Haziran-2007  
DENİZLİ**

**EGZERSİZ YAPAN SIÇANLARDA OKSİDATİF STRES VE  
PARAOKSONAZ ENZİMİ**

**Pamukkale Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Yüksek Lisans Tezi  
Biyokimya Anabilim Dalı**

**I. Dicle DEMİRAYAK**

**Danışman: Prof. Dr. Bünyamin KAPTANOĞLU**

**Haziran-2007  
DENİZLİ**

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza

:

Öğrencinin Adı

: I. Dicle DEMİRAYAK

## TEŞEKKÜR

Eğitim hayatım boyunca emeği geçen bütün hocalarıma; bu çalışmanın gerçekleőmesindeki yardımlarından dolayı **Doç. Dr. Gnfer TURGUT**' a; çalışmanın her aşamasında bilgi ve deneyimlerinden yararlanma imkanı bulduğum **Doç. Dr. Süleyman DEMİR**, **Yrd. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ** ve danıőmanım **Prof. Dr. Bünyamin KAPTANOğLU**' na; birlikte çalıőmaktan mutluluk duyduğum arkadaőım **Ecz. Neslihan TORTOP** ve ailesine; yardımlarından ötürü **Biyolog Kadriye HEKİM**' e ve bütün asistan arkadaőlarıma; maddi,manevi desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen aileme; bu süreçte sabır ve özveri ile hep yanımda olan sevgili eőime sonsuz teşekkür ederim.

**ÖZET****EGZERSİZ YAPAN SIÇANLARDA OKSİDATİF STRESS VE PARAOKSONAZ ENZİMİ**

**Demirayak, I. Dicle**  
**Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya A.B.D.**  
**Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Bünyamin KAPTANOĞLU**

**Haziran 2007, 90 sayfa**

Serbest radikaller, reaktif metabolitler ve bu ürünleri üreten bütün kaynaklar oksidan olarak tanımlanır. Antioksidan savunma, oksidatif strese karşı hücrel homeostazisi korur. Oksidan-antioksidan arasındaki hassas dengenin oksidanlar yönünde bozulması oksidatif stres olarak isimlendirilir. Fiziksel aktivite serbest oksijen radikali (ROS) üretimini arttıran faktörlerden biridir. İnsan serum paraoksonazı (PON)  $Ca^{+2}$  a bağımlı 45-kDa' luk bir glikoprotein olup HDL ile ilişkilidir ve HDL' nin antioksidan aktivitesinden sorumludur. Bu çalışmada, sıçanlarda düzenli egzersizin oksidatif stres ve PON aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmalar 18 Wistar sıçanda yürütülmüştür. Sıçanlar rasgele olarak, egzersiz (n=9) ve kontrol (n=9) grubu olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Egzersiz grubuna günde 30 dakika olmak üzere haftanın 5 günü toplam 4 hafta koşu bandı egzersizi uygulanmıştır. Karaciğer, kalp, böbrek ve akciğer dokularında MDA tayini, MDA' nın tiyobarbitürik asitle reaksiyonuna dayalı yöntem ile yapılmıştır. MDA ile beraber oksidasyona duyarlılık tayini de yapılmıştır. Paraoksonaz enzim aktivitesi iki sentetik substrat kullanılarak -paraokson ve fenil asetat- ölçülmüştür. Enzimin farklı iki substrata gösterdiği aktiviteler karşılaştırılmıştır. Sonuçlar Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.

Egzersiz ve kontrol grubunun MDA seviyelerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır. Fakat karaciğer oksidasyon kapasitesinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür ( $p<0,05$ ). Egzersiz ve kontrol grubunun PON seviyelerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır. Aril esteraz aktivitesinin egzersiz yapan grubun akciğer dokusu hariç diğer tüm dokularında anlamlı şekilde azaldığı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Düzenli egzersiz ile antioksidan enzim seviyesinin artması doku MDA değerlerinde anlamlı bir fark çıkmamasının sebebi olabilir. Karaciğerin antioksidan enzim seviyesinin yüksek olması, karaciğer dokusunun oksidasyona duyarlılığının az olmasını sağlamış olabilir. Egzersizin PON enzim ekspresyonunu düşürdüğü böylece aril esteraz aktivitesinin azaldığını söyleyebiliriz.

**Anahtar Kelimeler: Oksidatif stres, antioksidanlar, paraoksonaz, egzersiz**

**ABSTRACT****OXIDATIVE STRESS AND PARAOXONASE ACTIVITY WITH EXERCISE IN RATS**

**Demirayak, I. Dicle**  
**M. Sc. Thesis in Biochemistry**  
**Supervisor: Prof. Dr. Bünyamin KAPTANOĞLU**

**June 2007, 90 pages**

Free radicals, reactive metabolites and the substances producing these products are called oxidants. Antioxidant defences can protect the cellular homeostasis against oxidative damage. The disturbance in the delicate oxidant –antioxidant balance is named oxidative stress. Physical activity is the one of the factors that induce the production of reactive oxygen species (ROS). Human serum paraoxonase (PON1) is a  $\text{Ca}^{+2}$  dependent 45-kDa glycoprotein associated with HDL and it is primarily responsible for the antioxidative activity of HDL. In this study, the effects of regular exercise on oxidative stress and PON status were evaluated in rats. The experiments were carried out on 18 Whistar rats. Rats were divided into two groups randomly, control group (n=9) and exercise group (n=9). The exercise group rats were exposed to treadmill training exercise for 30 minutes per day, 5 days a week for 4 weeks. MDA levels of the liver, heart, kidney and lungs were determined according to the method in which MDA reacts with thiobarbituric acid. Oxidation sensitive of tissues were determined with MDA. Paraoxonase activities were assayed by two synthetic substrates –paraoxon and phenyl acetate-. The paraoxonase and arylesterase activities were compared. Results were evaluated by the Mann-whitney U test.

There were no significant difference in the exercise and the control group's MDA levels. But the oxidation sensitive of liver was found to be significantly decreased in exercise group, compared to control group ( $p<0,05$ ). There were no significant difference in the exercise and the control group's paraoxonase activity. Arylesterase activity of all tissues except lungs were found to be significantly decreased in exercise group, compared to controls ( $p<0,05$ ).

Increasing of antioxidant enzyme status which is caused by regular exercise can be the reason of nonsignificant difference results in MDA levels. Lower oxidation sensitive of liver can be caused by livers high level antioxidant enzyme status. In conclusion, it was decided that PON enzyme expression can decrease because of regular exercise training. And this can cause the decreasing of arylesterase activity.

**Keywords: Oxidative stress, antioxidants, paraoxonase, exercise.**

## İÇİNDEKİLER

<i>Teşekkür</i> .....	i
<i>Özet</i> .....	ii
<i>Abstract</i> .....	iii
<i>İçindekiler</i> .....	iv
<i>Şekiller Dizini</i> .....	vi
<i>Tablolar Dizini</i> .....	vii
<i>Simge ve Kısaltmalar</i> .....	viii
<b>1.GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR</b> .....	4
2.1. Serbest Radikaller.....	4
2.2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri.....	5
2.2.1. Süperoksit.....	10
2.2.2. Hidrojen Peroksit.....	11
2.2.3. Hidroksil Radikali.....	11
2.2.4. Singlet Oksijen.....	12
2.2.5. Hipokloröz Asit.....	13
2.2.6. Nitrik Oksit.....	13
2.3. Serbest Radikal Kaynakları.....	14
2.3.1. Endojen Serbest Radikal Kaynakları.....	14
2.3.1.1. Mitokondrial Elektron Transferi.....	14
2.3.1.2. Enzimler ve Proteinler.....	14
2.3.1.3. Mikrozomal Membran Elektron Transfer Zincirleri.....	15
2.3.1.4. Peroksizomlar.....	16
2.3.1.5. Fagositik Hücreler ve Araşidonik Asit Metabolizması.....	16
2.3.1.6. Küçük Moleküllerin Otooksidasyonu.....	17
2.3.2. Egzojen Serbest Radikal Kaynakları.....	17
2.4. Serbest Radikallerin Etkileri.....	19
2.4.1. Oksidatif Stres.....	19
2.4.1.1. Membran Lipitleri Üzerine Etkileri.....	20
2.4.1.2. Proteinler Üzerine Etkileri.....	23
2.4.1.3. Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri.....	24
2.4.1.4. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri.....	26
2.5. Antioksidan Savunma Mekanizmaları.....	26
2.5.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	29
2.5.1.1. Süperoksit Dismutaz.....	29
2.5.1.2. Katalaz.....	31
2.5.1.3. Glutatyon Peroksidaz.....	31
2.5.1.4. Glutatyon S-transferaz.....	33
2.5.1.5. Glutatyon Redüktaz.....	34
2.5.1.6. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz.....	34
2.5.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	34
2.5.2.1. Glutatyon.....	34
2.5.2.2. E Vitamini.....	36
2.5.2.3. C Vitamini.....	37
2.5.2.4. Karotenoidler.....	37

2.5.2.5. Flavonoidler.....	38
2.5.2.6. Ürat.....	39
2.5.2.7. Bilirübin.....	39
2.5.2.8. Albümin.....	40
2.5.2.9. Seruloplazmin.....	40
2.5.2.10. Transferrin.....	40
2.5.2.11. Melatonin.....	40
2.5.2.12. Sistein.....	41
2.6. Paraoksonaz.....	42
2.7. Egzersiz ve Oksidatif Stress.....	46
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>52</b>
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler.....	52
3.2. Egzersiz Protokolü.....	52
3.3. Deneyin Sonlandırılması ve Örneklerin Toplanması.....	53
3.4. Homojenizasyon.....	53
3.5. Lowry Metodu ile Protein Tayini.....	53
3.6. MDA Tayini ve Oksidasyona Duyarlılık.....	55
3.7. PON Enziminin Paraoksonaz Tayini.....	58
3.8. PON Enziminin Aril Esteraz Tayini.....	60
3.9. İstatistiksel Metot.....	62
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>63</b>
4.1. MDA Değerleri.....	63
4.2. Bakır Tetikli MDA Değerleri.....	64
4.3. Paraoksonaz Aktivitesi Değerleri.....	66
4.4. Aril Esteraz Aktivitesi Değerleri.....	67
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>69</b>
<b>6. SONUÇ.....</b>	<b>76</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>77</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>90</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Oksijenin atom ve moleküler halinin elektron konfigürasyonu.....	6
Şekil 2.2. Serbest radikal oluşum mekanizması.....	9
Şekil 2.3. Oksidatif stres oluşumu ve etkileri.....	20
Şekil 2.4. Lipit molekülü C-H bağ disiasasyon enerjileri .....	22
Şekil 2.5. Lipit peroksidasyonunun kimyasal yolu.....	22
Şekil 2.6. Glutatyon sentezi ve siklusu.....	33
Şekil 2.7. PON1 proteininin üç boyutlu yapısı .....	42
Şekil 2.8. Paraoksonazın paraoksonu hidrolizi.....	44
Şekil 3.9. Protein standart eğrisi.....	54
Şekil 3.10. MDA standart eğrisi.....	56
Şekil 3.11. PON enzimi paraoksonaz aktivitesi standart grafiği.....	59
Şekil 3.12. PON enzimi aril esteraz aktivitesi standart grafiği.....	61
Şekil 4.13. MDA değerleri.....	64
Şekil 4.14. Tetikli MDA değerleri.....	65
Şekil 4.15. PON enzimi paraoksonaz aktivitesi değerleri.....	67
Şekil 4.16. PON enzimi aril esteraz aktivitesi değerleri.....	68

**TABLULAR DİZİNİ**

Tablo 2.1. O <sub>2</sub> 'nin farklı formlarının 2p orbital elektronları konfigürasyonu.....	7
Tablo 2.2. Reaktif oksijen türleri .....	10
Tablo 2.3. ATP tüketimi bakımından aerobik ve anaerobik sistemlerin karşılaştırılması.	48
Tablo 2.4. Dayanıklılık yönünden aerobik ve anaerobik sistemlerin karşılaştırılması.....	48
Tablo 4.5. MDA değerleri.....	63
Tablo 4.6. Tetikli MDA değerleri.....	65
Tablo 4.7. PON enzimi paraoksonaz aktivitesi değerleri.....	66
Tablo 4.8. PON enzimi aril esteraz aktivitesi değerleri.....	68

## SİMGE VE KISALTMALAR

AE	Aril Esteraz
ADP	Adenozindifosfat
AMP	Adenozinmonofosfat
Apo A1	Apolipoprotein A1
ATP	Adenozintrifosfat
C <sub>o</sub>	Oksidan kapasite
C <sub>a</sub>	Antioksidan kapasite
Ca <sup>+2</sup>	Kalsiyum
CCl <sub>4</sub>	Karbontetraklorür
cAMP	Siklik adenozinmonofosfat
Cys	Sistein
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
FADH <sub>2</sub>	Flavin adenin dinükleotit (indirgenmiş form)
Fe <sup>+2</sup>	Ferröz demir
Fe <sup>+3</sup>	Ferrik demir
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	Redükte glutasyon
GSSG-R	Glutasyon redüktaz
GST	Glutasyon S-transferaz
G6PD	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
HDL	Yüksek dansiteli lipoprotein
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojenperoksit
HOCl	Hipokloröz asit
HOX	Hipohaloz asit
HQ	Semikinon radikali
KAT	Katalaz
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
LOOH	Lipit hidroperoksit
MDA	Malondialdehit
MET	Metiyonin
mRNA	Mitokondrial ribonükleik asit
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamidadenin dinükleotit
NADPH	Nikotinamidadenin dinükleotit fosfat
NOS	Nitrik oksit sentaz
NO	Nitrik oksit
NO <sub>2</sub>	Nitrojendiksit
O <sub>2</sub>	Oksijen molekülü
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Peroksi anyonu
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singlet oksijen
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Süperoksit radikali
O <sub>3</sub>	Ozon
•OH	Hidroksil radikali
ONOOH	Peroksinitrit
PON	Paraoksonaz

PUFA	Çoklu doymamış yağ asidi
RO•	Alkoksil radikali
ROO•	Peroksil radikali
ROS	Reaktif oksijen türleri
R-NH-X	N-Halojenli aminler
SOD	Süperoksit dismutaz
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler
Tf	Transferrin

## 1.GİRİŞ

Oksijen renksiz, kokusuz ve tatsız bir gaz olup 3 milyar yıl kadar önce oksijen üreten fotosentetik canlıların evrimleşmesi ile birlikte dünya atmosferinde birikmeye başlamıştır. Günümüzde moleküler oksijen (dioksijen olarak da isimlendirilir) dünya kabuğunda bulunan en yaygın element olup, atmosferin %21' ini meydana getirmektedir (Philis 1997).

Oksijen ilk kez 1770'li yıllarda Priestley, Lavoisier ve Scheele tarafından moleküler oksijen olarak tanımlanmıştır (Halliwell 1989). Dünya sistemi içerisinde sürdürülebilir aerobik yaşamın temel esasını, canlının su ya da havadan alınan oksijen yardımıyla, karbon ve hidrojen içeren besin maddelerinin organizmada bol miktarda yakılması ile elde edilen kimyasal ve termal enerji oluşturur (Gutteridge 1995, Karlsson 1997). Yaşamın sürdürülmesinde büyük önem taşıyan bu kimyasal tepkimelerin bazı basamaklarında oksijen indirgenir ve reaktif oksijen türleri olarak tanımlanan ara ürünler oluşur. Reaktif karakterli bu tür metabolitlerin oluşumuna yol açan maddelerin tamamına prooksidan veya oksidan madde, bu maddelerin organizmadaki kaynaklarının toplamına ise oksidasyon kapasitesi denir (Karlsson 1997, Mecoci 1997). Reaktif karakterli ürünler, aslında aerobik yaşamın vazgeçilmez fizyolojik olaylarında (mitokondrial oksidasyon, oksijenin hemoglobinlerce taşınması gibi) hücresel homeostazisin sağlanmasının doğal bir sonucudur (Freeman 1982, Gutteridge 1995, Karlsson 1997).

Reaktif madde miktarındaki artışların hücresel homeostazisi olumsuz etkilemesini vücut sıvılarında ve hücre membranlarında bulunan ve antioksidan olarak isimlendirilen bazı faktörler önleyebilir. Antioksidanlar bu amaçla reaktif maddeleri ve reaksiyonlarını bir dengede tutabilmek üzere sürekli aktivite gösterirler (Byung 1994). Sonuç olarak organizma doğuştan kazandığı çok hassas bir donanım sayesinde, fizyolojik aktivitenin doğal sonucu olan serbest radikal nitelikte biyokimyasal ürünleri, oksidan-antioksidan

denge olarak tanımlanabilecek bir çizgide tutmayı başarır. Tehlikeli olan durum, radikallerin varlığından daha çok oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki bu dengenin herhangi biri lehine bozulmasıdır (Aalt vd 1991, Karlsson 1997).

Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasından endojen faktör olarak mitokondrial oksijen hareketleri sorumlu tutulmaktadır (Freeman, 1982). Yok edilemeyen oksidanlar hücre içindeki nükleik asit, protein ve lipit gibi makromolekülleri değişikliğe uğrattırır (Halliwell 1989, Pal 1994). Bu hücrenel bileşenlerin oksidasyonu, oksidan ve antioksidanlar arasında dengenin bozulması ile (oksidatif stres) meydana gelir (Buettner 1993). Organizmaya ani ve aşırı oksijen girişinin artması; egzersiz, gebelik, yaşlılık gibi fizyolojik haller; kimyasal çevre kirliliğinin yoğun olduğu ortamlarda uzun süre yaşam, yoğun stres, sigara ve alkol kullanımı, diyetle doymamış ve kolay peroksilenebilen yağların fazla miktarda bulunması, antioksidan savunma sistemi yetmezlikleri veya savunma duvarının aşılması gibi durumlarda hassas olan oksidan-antioksidan denge, oksidanlar lehine bozulabilir. Bu olgu serbest radikallerin artışından ya da antioksidan aktivitesinin yetersizliğinden ileri gelebilir (Augustin 1997, Karlsson 1997).

Fiziksel aktivite ve egzersiz sırasında artan kas kontraksiyonları ve enerji tüketimi metabolik aktiviteyi önemli ölçüde hızlandırmaktadır (Alessio 1993, Clarkson 1995, Jenkins 1988, Salminen vd 1983). Metabolik aktiviteye bağlı olarak kullanılan oksijen ve mitokondriyel elektron transport zincirinden elektron sızıntısı artmakta sonuçta süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali başta olmak üzere birçok reaktif oksijen türü ortaya çıkmaktadır (Dernbach vd 1993).

Hücre; membranı ve diğer komponentleri ile serbest radikal atakları ve peroksidasyon için potansiyel bir hedefdir. Özellikle membranların fosfolipit tabakası lipit peroksidasyonunun oldukça sık olduğu bir ortamdır (Pal 1994, Mead 1989). Lipit peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin radikaller ile oksidasyonu sonucu başlayan ve otokatalitik zincir reaksiyonları şeklinde uzayan, lipit peroksitlerinin aldehit türevleri, hidrokarbon radikalleri ve uçucu bazı ürünlere çevrilmesi şeklinde sonlanan bir süreçtir. (Gutteridge 1995, Murray vd 1996) Lipit peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan çeşitli aldehitlerden en iyi bilineni malondialdehit (MDA)'dir. MDA ölçümü ile lipit peroksidasyonu değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Plazma lipoproteinleri ve

özellikle düşük dansiteli lipoproteinler de oksidasyona uğrayabilirler. Okside lipoproteinler hücre fonksiyonlarının bozulmasına aracılık edebilirler (Nair vd 1986, Rice-Evans vd 1991).

Paraoksonaz (PON) karaciğerde sentezlenen, organik fosforlu bir insektisit olan parationun aktif metaboliti paraoksonu hidroliz etme yeteneğine sahip bir serum esterazdır (Juretic vd 2001, Li vd 1993). İnsan serum paraoksonazı 43 kDa molekül ağırlığında 354 aminoasitlik bir protein olup, fiziksel olarak HDL ile bağıntılıdır (Primo-Parma vd 1996, Mackness 1996). PON'un başlıca iki fonksiyonu vardır: Pestisit olan paraokson gibi organofosfatlı bileşiklerin detoksifikasyonuna katılmak ve ayrıca lipit peroksitleri hidrolize ederek LDL'yi oksidasyondan korumak (Mackness vd 1998). PON ayrıca aktivite polimorfizmi göstermeyen arilesteraz aktivitesine de sahiptir (Eckerson vd 1983). Arilesteraz aktivitesinin, PON aktivitesindeki değişikliklerden bağımsız olarak asıl protein konsantrasyonunun bir göstergesi olduğu bildirilmektedir (Mackness vd 1997).

Bu çalışmada Wistar sıçanlar kullanılmış, sıçanlar egzersiz (n=9) ve kontrol (n=9) olmak üzere rasgele iki gruba ayrılmış, egzersiz yapan grupta koşu egzersizleri, elektrikli motor sürücülü beş yollu koşu bandında orta şiddette haftanın 5 günü ve her gün 30 dakika olacak şekilde, 4 hafta süreyle gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda sıçanlardan anestezi yardımıyla alınan karaciğer, böbrek, akciğer ve kalp doku örneklerinde egzersiz sonucunda oluşabilecek serbest radikallerin meydana getireceği oksidatif stresin etkilerinin araştırılması; Paraoksonaz ve aril esteraz aktiviteleri ile MDA seviyelerinin ölçülerek karşılaştırılması ve aradaki ilişkinin incelenmesi hedeflenmiştir. MDA' nın tiyobarbitürik asitle reaksiyonuna dayalı yöntem ile tayini yapılmış, Paraoksonaz aktivitesi iki sentetik substrat kullanılarak (paraokson ve fenil asetat) ölçülmüş ve sonuçlar Mann-whitney U testi ile değerlendirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR

### 2.1. Serbest Radikaller

Atomlar proton ve nötrondan oluşan pozitif yüklü bir çekirdek ve çekirdeğin etrafında bulunan negatif yüklü elektronlardan oluşurlar. Elektronlar hem partikül hem de dalga özelliğine sahip olduklarından çekirdek etrafında ışık hızı ile hareket ederler ve bu yüzden çekirdek etrafındaki yerleri tam olarak tarif edilemez. Yalnızca bulunma olasılığının en fazla olduğu yerden bahsedilebilir. Belirli elektronların bulunma olasılığının en yüksek olduğu yer 'Orbital' olarak adlandırılır. Her orbital zıt spinli ( $\uparrow\downarrow$ ) olmak üzere iki elektron içerebilir. Sayılarına göre farklı enerji seviyelerindeki elektronlar, farklı orbitalleri doldururlar. Elementlerin bir kısmı, atomik yapılarında paylaşılmamış elektron içerdiklerinden, doğada atomları şeklinde değil; molekülleri şeklinde bulunurlar (Kılınç ve Kılınç 2002). Atom ve moleküller, yörüngelerindeki elektronlar eşleşmiş ve ters pozisyonda yer aldıklarında kararlı bir yapı gösterirler. Bu kararlı yapı eşleşmemiş elektron bulunduklarında bozulur (Halliwell 1987).

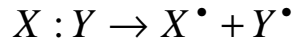
Dış orbitallerinde eşleşmemiş elektron bulunan kısa ömürlü atom ve moleküller 'Serbest Radikal' olarak isimlendirilir. (Floyd 1993) Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Serbest radikaller bu ortaklanmamış elektronlardan dolayı oldukça reaktif olup çevrelerindeki atom ve moleküllere adeta saldırırlar. Çünkü bir radikal çiftleşmemiş elektronunu başka bir moleküle vermek veya başka bir molekülden elektron koparmak zorundadır. Bunun sonucu olarak da elektron alışverişi yaptığı molekül bir radikal haline gelir. Bu serbest radikallere özgü bir reaksiyondur ve bir radikal başka bir radikale sebep olur (Halliwell 1989). Kısa ömürlü olmalarına rağmen; bir dizi zincir reaksiyonu başlatıp birçok radikal oluşturmalarından dolayı oldukça



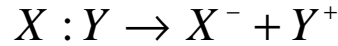
tehlikeli olan serbest radikaller, ortaklanmamış elektronun belirtilmesi amacıyla üst kısımlarına yazılan bir nokta ( $X^\bullet$ ) ile gösterilirler (Akkuş 1995).

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle hücrel koşullarda ciddi miktar ve çeşitlilikte radikaller üretilmektedir (Cheeseman ve Slater 1993). Nerede ve nasıl üretildiklerine bakılmaksızın radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşurlar:

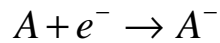
a. Kovalent bağların homolitik kırılması ile: Kovalent bağlı normal bir molekülün bağ yapısındaki iki elektronun her birinin ayrı ayrı atomlar üzerinde kalarak bölünmesidir. Her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır.



b. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile: Radikal özelliği olmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa, radikal formu oluşur.



c. Normal bir moleküle elektron transferi ile: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşturuluyorsa, bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir.

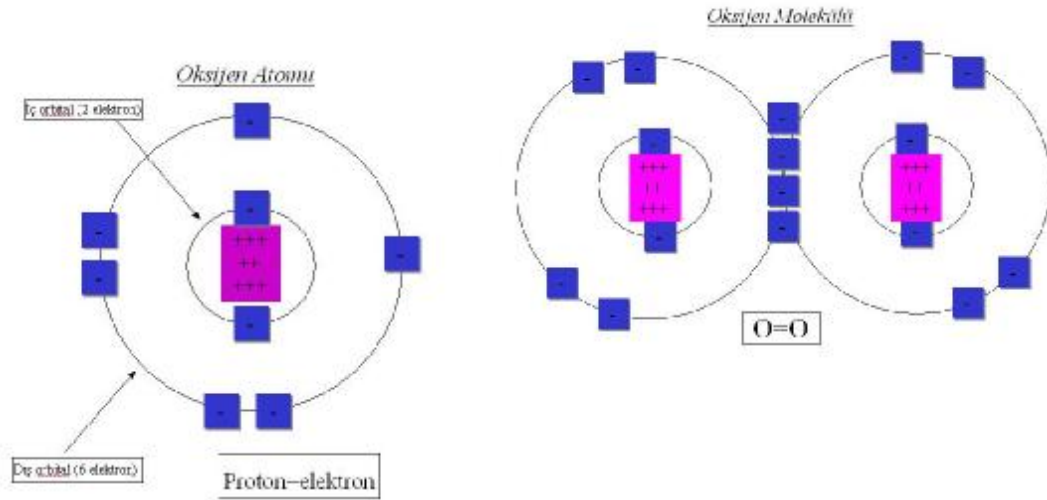


Radikaller aerobik hücrelerin tüm fraksiyonlarında, metabolizma sırasında veya patolojik durumlarda birer yan ürün olarak meydana gelebilir ve hücrelerde tersinir ya da tersinmez değişikliklere sebep olabilirler (Ames vd 1993). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşmuş radikallerdir (Cheeseman ve Slater 1993).

## 2.2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri

Moleküler oksijen (atmosferik oksijen) dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu elektronlar spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken minimum enerji seviyesindedirler (Kılınç ve Kılınç 2002). Oksijen atomunun dış yörüngesini oluşturan p

orbitalinde iki elektron eksik olduğundan ‘diradikal’ olarak değerlendirilir. (Cheeseman ve Slater 1993). Oksijenin atom ve moleküler haldeki elektron dağılımları Şekil 2.1.’ de verilmiştir.

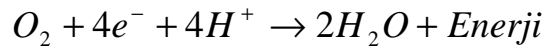


**Şekil 2.1** Oksijenin atom ve moleküler halinin elektron konfigürasyonu

Diradikal yapıya sahip oksijenin tepkimeye gireceği molekülün de farklı orbitallerde spinleri aynı yönde elektron içermesi gerekir. Oysa başta organik moleküller olmak üzere atom ve moleküller orbitallerinde elektronları antiparalel ve eşleşmiş olarak içerler veya paylaşılmamış elektronlar kovalent bağlara katılmışlardır. Bu sebeple oksijenin diğer moleküllere olan reaktivitesi son derece kısıtlanmıştır. Bu kısıtlama ‘spin kısıtlaması’ (spin restriction) olarak isimlendirilir. Canlıların oksijeni kullanabilmesi için oksijene elektron transferi yaparak spin kısıtlamasını aşmaları gerekir. Bu işlem için canlılar geçiş elementleri sınıfından bazı metal iyonlarından yararlanırlar. Fe, Cu, Mn, Zn, Co ve Mo vücudun gereksinim duyduğu başlıca eser elementlerden olup, bu elementler dış orbitallerinde bir veya daha fazla sayıda paylaşılmamış elektron içerirler. Spin kısıtlamasının aşılabilmesi ve bu sayede oksijenin dış orbital elektronlarının mevcut durumunun değiştirilebilmesi için; oksijene elektron transferi yapılır veya enerji absorpsiyonu ile uyarılmış oksijen formu elde edilir (Kılınç ve Kılınç 2002). Oksijenin spin kısıtlaması aşılmış formları Tablo 2.1’ de verilmiştir.

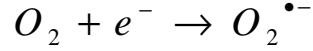
Tablo 2.1. O <sub>2</sub> ' nin farklı formlarının 2p orbital elektronlarının konfigürasyonu (Kılınç ve Kılınç 2002)					
$\sigma$ *2p	—	—	—	—	—
$\pi$ *2p	↑ ↑	↑↓ ↑	↑↓ ↑↓	↑ ↓	↑↓ —
$\pi$ 2p	↑↓ ↑↓	↑↓ ↑↓	↑↓ ↑↓	↑↓ ↑↓	↑↓ ↑↓
	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
	O <sub>2</sub> Moleküler Oksijen	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> Süperoksit Anyonu	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> Peroksi Anyonu	<sup>1</sup> O <sub>2</sub> Singlet Oksijen	<sup>1</sup> O <sub>2</sub> Singlet Oksijen

Soluduğumuz oksijen organizmada metabolize edilirken; %85-90' ı mitokondride elektron transfer zinciri tarafından, kalan %10-15' i ise kimyasal oksidasyon reaksiyonları ve oksidaz-deoksidaz enzimleri tarafından kullanılır. Elektron transfer zincirinin son bölümünde sitokrom oksidaz enzimi 4 indirgenmiş sitokrom molekülünün her birinden 1 elektron alır ve onları yükseltir. 4 elektronu oksijene ekleyerek suya dönüşmesini sağlar. Bu olay; mitokondride elektron transfer zincirinin kullandığı oksijenin %95-98' inin kullanılması anlamına gelir. Geriye kalan %2-5' lik oksijen ise reaktif oksijen türleri şeklinde isimlendirilen metabolitlere indirgenir (Halliwell 1999).

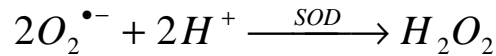


Oksijen metabolizmada en son suya indirgenirken, kısmi olarak indirgenmesi ile de çok sayıda reaktif oksijen türleri oluşmaktadır (Cheeseman ve Slater 1993).

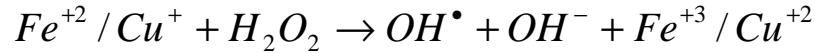
Enzimler genel olarak oksijenin çoklu elektron indirgenmesinde her defasında bir elektron kullanırlar. Tek elektron kabul edildiğinde elektron bağ yapmayan orbitale girmelidir (Leeuwenburgh ve Heinecke 2001). Oksijen serbest radikalleri sonlarına -i veya -il eki getirilerek isimlendirilirler. Bir oksijen molekülüne bir elektron eklenmesi ile 'süperoksit radikali' oluşur (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>).



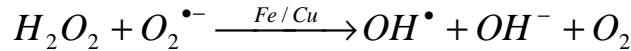
Süperoksit 'dismutasyon' adı verilen süreç sırasında iki elektron ve iki hidrojen iyonu alarak hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) dönüşür (Pal 1994). Bu reaksiyon süperoksit dismutaz tarafından katalizlenir. Süperoksit dismutaz (SOD) memeli hücrelerinde bolca bulunur ve kendiliğinden gerçekleşen dismutasyonu fizyolojik pH' da  $10^9$  kez hızlandırır (Clauda Dornelles Schneider vd 2004).



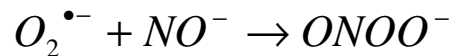
Hidrojen peroksitin tek elektronla indirgenmesi ile hidroksil radikali ( $\bullet OH$ ) oluşur. Bu ara ürünlerin en reaktif olanıdır. İlk olarak en yakındaki hücresel yapılarla reaksiyona girip onları değiştirmeye çalışır ve sonuç olarak enzim, membran ve nükleik asitleri etkiler (Jenkins 1988). Hidroksil radikali  $H_2O_2$ ' nin demir veya bakır iyonlarıyla reaksiyona girmesiyle de oluşabilir. (Fenton reaksiyonu)

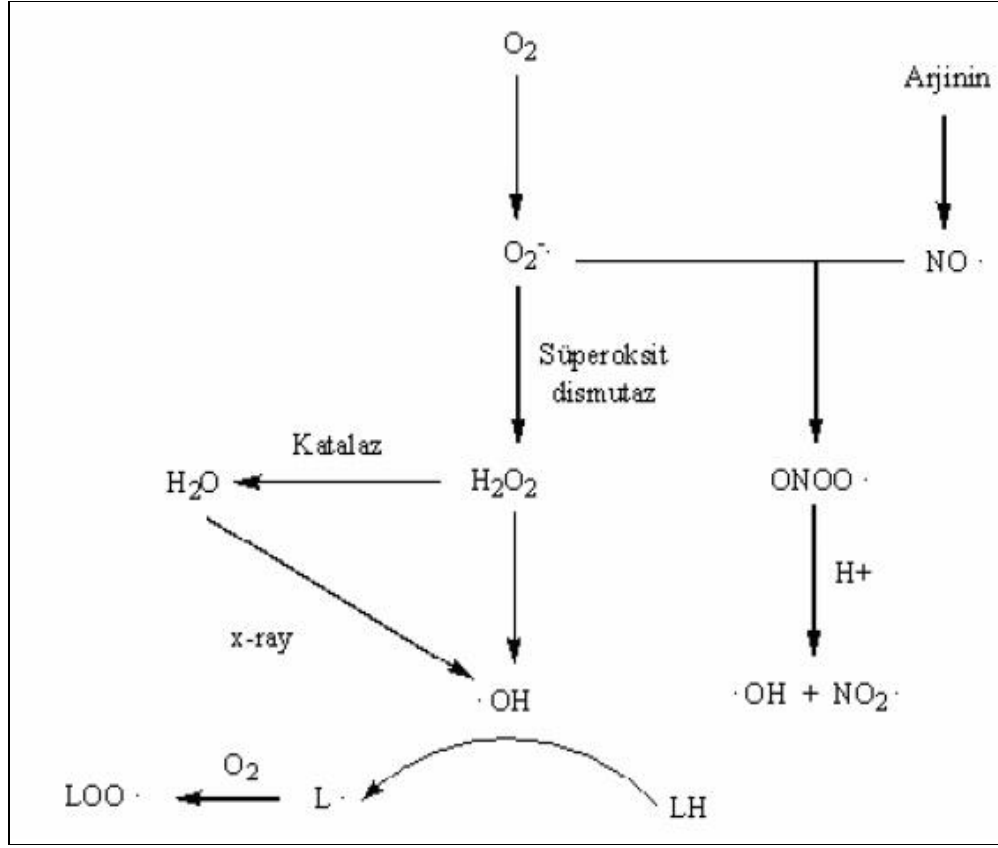


Geçiş metal iyonları hidrojen peroksit ve süperoksit arasında reaksiyon katalizleyebilir ve hidroksil radikali oluşumuna sebep olabilir (Haber Weiss reaksiyonu) (Clauda Dornelles Schneider vd 2004)



Süperoksit radikali NO ile oldukça hızlı bir reaksiyona girerek güçlü yükseltgeyici ve nitratlayıcı radikal olmayan bir ara ürün olan  $ONOO^-$  yi oluşturur. Bu reaksiyonun canlılarda reaktif nitrojen türleri oluşumunun ana ara basamağı olduğu düşünülmektedir (Leeuwenburgh vd 2001).





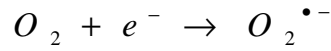
Şekil 2.2. Serbest Radikal Oluşum Mekanizması (Stahl vd 2002)

Reaktif oksijen türleri, maruz kalınan süre ve miktara bağlı olarak hücre fonksiyonlarını bozarlar (Battal vd 1995). Oksijen serbest radikali teriminin  $O_2^{\bullet-}$  ve  $\bullet OH$  gibi radikallerin yanı sıra  $H_2O_2$  ve  $^1O_2$  gibi reaktif ancak radikal olmayan türlerin ifadesi için de kullanılması doğru değildir. Bunun yerine daha genel olan *Reaktif Oksijen Türleri* teriminin kullanılması daha uygundur (Bast vd 1997). Reaktif oksijen türleri Tablo 2.2' de gösterilmiştir.

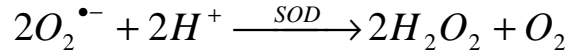
Tablo 2.2. Reaktif oksijen türleri			
Radikaller		Radikal Olmayanlar	
Süperoksit radikali	( $O_2^{\bullet-}$ )	Hidrojen peroksit	( $H_2O_2$ )
Hidroksil radikal	( $\bullet OH$ )	Lipit hidroperoksit	( $LOOH$ )
Peroksil radikal	( $ROO\bullet$ )	Hipohaloz asit	( $HOX$ )
Alkoksil radikal	( $RO\bullet$ )	N-Halojenli aminler	( $R-NH-X$ )
Semikinon radikal	( $HQ$ )	Singlet oksijen	( $^1O_2$ )
Hemoproteine bağlı serbest radikaller		Ozon	( $O_3$ )
		Azotdioksit	( $NO_2$ )

### 2.2.1. Süperoksit ( $O_2^{\bullet-}$ )

Serbest süperoksit radikal anyonu ( $O_2^{\bullet-}$ ) hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir (Jıalal ve Fuller 1993).



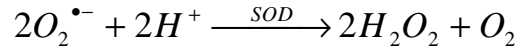
Hem çevresel etkenler, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikali, süperoksit radikali. Esas önemi, hidrojen peroksit kaynaklık etmesi ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Uzun bir yarı ömre sahiptir ve lipofilik özellik gösterir. Bu özelliğinden dolayı da oluştuğu yerden uzak bölgelere difüzyonla yayılabilmektedir. Ancak doğrudan hasar yapıcı etkisi çok fazla değildir. En çok mitokondri, endoplazmik retikulum ve kloroplast gibi hücrel organellerde, elektron transport zincirinin çeşitli komponentlerinden  $O_2$ ' ye elektron sızması ile olur (Ünal 1999). Süperoksit aldığı elektronu metal iyonuna, sitokrom c' ye veya bir radikale verirse tekrar oksijene oksitlenir. Oksijenden daha oksitleyici olan süperoksit bir elektron daha alırsa peroksi anyonuna indirgenir. Aerobik canlılarda süperoksitlerin  $H_2O_2$ ' ye çevrilmesi, katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenir ve SOD enziminin yüksek katalitik aktivitesi sebebiyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez (Kılınç ve Kılınç 2002).



### 2.2.2 Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit meydana gelir. Peroksit molekülü de iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi oluşturur (Cheeseman ve Slater 1993).

SOD tarafından katalizlenen reaksiyon sonucunda ortaya çıkar ve reaksiyon sonucu radikal türler meydana geldiğinden bu reaksiyon bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir.



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' nin pK' sı 10.6 olduğundan nötral ve asidik koşullarda net yük taşımaz, biyolojik zarlardan kolayca geçebilir. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir. Hidrojen peroksidin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin sebebi Cu, Fe gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalinin öncüsü gibi davranmasıdır (Kılınç ve Kılınç 2002).

### 2.2.3. Hidroksil Radikali (·OH)

Hidroksil radikali, kimyada en reaktif radikal olarak bilinir. Bu nedenle in vivo oluşan bir hidroksil radikali hemen her moleküle saldırır ve oluştuğu yerde de büyük hasara neden olur. Nonradikal biyolojik moleküllerle zincirleme reaksiyonları başlatır (Halliwell 1987, Cheeseman ve Slater 1993, Jialal ve Fuller 1993, Tekkes 2006).

Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilebilen hidroksil radikali canlılarda iki mekanizma ile oluşabilir. Bunlardan ilki iyonlaştırıcı radyasyonun etkisi ile sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşmasıdır. Oluşan hidroksil radikali canlılarda radyasyonun toksik etkisinden sorumlu başlıca türdür. İkincisi ise hidrojen peroksidin

eksik indirgenmesidir ve bu vücutta en önemli hidroksil radikali kaynağıdır. Hidrojen peroksidin geçiş metalleri varlığında indirgenmesi (Fenton Reaksiyonu) ve hidrojen peroksidin süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucu (Haber-Weiss Reaksiyonu) meydana gelen hidroksil radikali; organik ve inorganik bileşiklerde elektron transfer tepkimelerine neden olur. Ancak normalde  $\cdot\text{OH}$  radikali oluşmaz. Çünkü  $\cdot\text{OH}$  oluşumu için moleküler oksijenin üç değerlikli olarak indirgenmesi gerekir ki bu oldukça zordur.  $\cdot\text{OH}$  radikali oluşabilmesi için süperoksit ve serbest metal iyonları gereklidir. Süperoksit radikali  $\text{H}_2\text{O}_2$ ' nin de öncülü olduğu ve proteinlere bağlı metallerin indirgenip serbest kalmasına neden olabildiğinden biyolojik koşullarda süperoksit yapımının arttığı ortamda  $\cdot\text{OH}$  radikali oluşumu kaçınılmazdır. Metal iyonlarının proteinlere bağlı formda tutulmaları hidroksil radikali yapımını önlemenin en güvenli yoludur. (Wheler ve Salzman, 1990; Ames vd 1993; Frei, 1994; Kılınç ve Kılınç, 2002).

#### 2.2.4 Singlet Oksijen ( $^1\text{O}_2$ )

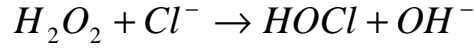
Oksijenin eşleşmemiş elektronlarından birinin verilen enerji sonucu bulunduğu orbitalden başka bir orbitale veya kendi spininin ters yönüne yer değiştirmesi ile oluşur (Cross ve Halliwell 1987, Ames vd 1993). Singlet oksijenin delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır (Akkuş 1995). Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunda spin kısıtlamasının kaldırılmış olması sebebiyle reaktivite çok yüksektir. Aldığı enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde verip oksijene geri dönebilir. Diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır (Kılınç ve Kılınç 2002). Singlet oksijen in vivo ortamda sitokrom  $\text{P}_{450}$ , endoperoksit sentetaz ve myelo peroksidaz reaksiyonları ile oluştuğu gibi iyonize radyasyonla da oluşabilir. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur.

#### 2.2.5. Hipokloröz Asit

Enzimatik olarak nötrofiller tarafından üretilir, güçlü bir oksidandır. Fagositik hücrelerce bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynar. Aktive olan nötrofiller,



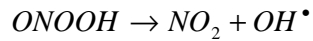
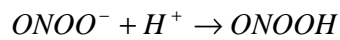
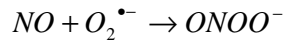
makrofajlar ve eozinofiller süperoksit üretirler. Özellikle nötrofiller, içerdikleri myeloperoksidaz enzimi aracılığı ile süperoksitin dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksiti klorür iyonu ile birleştirilerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan hipokloröz asit (HOCl) e dönüştürür (Southorn ve Powis 1988).



### 2.2.6. Nitrik Oksit

Nitrik oksit yüksek yapılı canlılarda amaçlı olarak ve 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 delokalize olması nedeni ile tam radikal özelliği taşımaz. Bunun sonucu, bilinen diğer radikallere göre reaktivitesi baskılandığında oldukça uzun ömürlüdür (Kılınç ve Kılınç 2002).

Bu lipofilik serbest radikal, damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz enzimi aracılığı ile L-arjininden sentezlenir. Kolayca düz kasa geçerek guanilat siklaz enziminin hem demirine bağlanır ve cGMP sentezini uyarıp damar gevşemesini uyarır. NO, aynı zamanda tiyol gruplarını S-nitrozilasyona uğratarak protein ve reseptör fonksiyonlarını da değiştirir. NO, oluşmuş olan ROS' ları ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOOH) oluşturmakta ve bunun da ileri dekompozisyonu ile  $\bullet OH$  radikali oluşumuna yol açmaktadır (Southorn ve Powis 1988, Cochrane 1991).



## **2.3. Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları**

### **2.3.1. Endojen Serbest Radikal Kaynakları**

Normal metabolizma sırasında çeşitli basamaklarda serbest radikal yapısına sahip ara ürünler meydana gelmektedir. Metabolik oluşumun ilerleyebilmesi için bu bileşiklerin ara ürün olarak oluşmaları kaçınılmazdır (Freeman ve Crapo 1982).

#### **2.3.1.1. Mitokondriyal Elektron Transferi**

Mitokondriyal elektron transport zinciri memeli hücrelerinde ATP' nin temel kaynağıdır. Bu yüzden yaşam için esansiyeldir. Enerji transdüksyonu sırasında küçük bir miktar elektron oksijene zamansız sızarak bir oksijen serbest radikali olan süperoksiti meydana getirir (Kovacic vd 2005, Valko vd 2004). Süperoksit oluşumu hücrede çoğunlukla mitokondride meydana gelir.

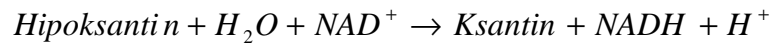
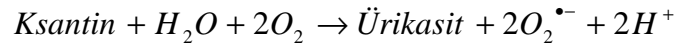
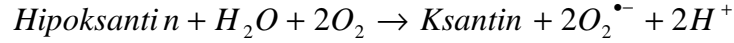
Mitokondrial solunum zinciri sırasında NADH, FADH<sub>2</sub> gibi indirgeyicilerin elektronlarının moleküler aktarılması sırasında, solunum zinciri taşıyıcılarının indirgenmesi sonucu serbest radikal yapısına sahip ürünler oluşmaktadır (Freeman ve Crapo 1982, Grisham ve Granger 1989, Basaga 1990) .

#### **2.3.1.2. Enzimler ve Proteinler**

Birçok enzimin katalitik siklusları arasında da serbest radikaller ortaya çıkar. Ksantin oksidaz, aldehit oksidaz ve triptofan dioksijenaz böyle enzimlerden olup, süperoksit oluşumuna sebep olurlar (Akkuş 1995).

Ksantin oksidaz özellikle barsak, akciğer, karaciğer, böbrek gibi dokularda yaygın olarak bulunur ve ksantin dehidrogenaz olarak sentezlenir. Enzimin bu tipi sağlıklı bir dokuda toplam aktivitenin % 90'ını oluşturur. Dehidrogenaz, süperoksit veya hidrojen peroksit oluşturmak üzere elektronları moleküler oksijene transfer edemez (Bast vd 1991).

Ksantin oksidaz normalde NAD-bağımlı dehidrogenaz olarak etki eder ve herhangi bir serbest radikal üretimine sebep olmaz. Fakat in vivo olarak oluşturulan iskemi, enzimin dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşmesine ve süperoksit radikalinin üretimine sebep olur. Ksantin oksidaz enzimi oksijen varlığında hipoksantini ksantine veya ksantini ürik aside oksitler. Bu reaksiyonda elektron alıcısı moleküler oksijendir (Southorn ve Powis 1988).



İskemi sonrası, dokuların ksantin oksidaz ve hipoksantin ile perfüzyonu doku zedelenmesin arttırmaktadır (Halliwell ve Gutteridge 1984, Guemouri vd 1991).

Aldehit oksidaz yapı itibariyle ksantin oksidaza benzer ve substratlarının çoğu aynı olup, süperoksit radikali üretir. Benzer şekilde flavoprotein dehidrogenaz, amino asit oksidaz ve triptofan dioksijenaz gibi enzimler de radikal oluşumuna sebep olurlar (Halliwell 1987, Hraishi ve Terano 1992, Prasad ve Lee 1992, Ames vd 1993, Kuzuya vd 1993).

### 2.3.1.3. Mikrozomal Membran Elektron Transfer Zinciri

Endoplazmik retikulum ve golgi kompleksinin yer aldığı mikrozomal membran sistemi, birçok sentez ve yıkım enzimleri yanında flavoprotein (NADH-sit c redüktaz ve NADH- sit b5 redüktaz) ve hemoprotein (sit b5, sit p450)' lerin yol aldığı iki elektron transport sistemi içerir (Freeman ve Crapo 1982).

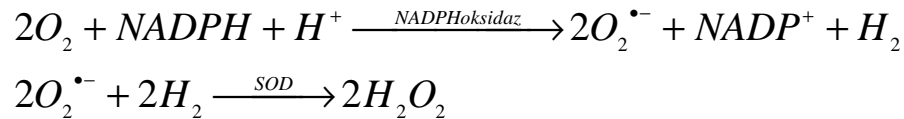
Mikrozomlarda yer alan bu elektron transport sistemleri, bir yandan normal metabolizma sonucu oluşan nonpolar bileşikleri hidroksillenmiş türevlerine dönüştürüp bunlara daha polar özellik kazandırırken, diğer yandan organizmaya yabancı maddeleri de metabolize ederler (Grisham ve Granger 1989).

### 2.3.1.4. Peroksizomlar

Peroksizomlar, fizyolojik şartlarda  $H_2O_2$  üretirler ancak  $O_2^{\bullet-}$  üretmezler. Peroksizomlar hücrede oksijenin tüketildiği majör bölgelerdir ve oksijenin kullanıldığı pek çok metabolik fonksiyona katılırlar. Oksijen tüketimi daha sonra pek çok molekülün oksidasyonunda kullanılan  $H_2O_2$  üretimine öncülük eder. Bu organel ayrıca hidrojen peroksit parçalayan katalaz da içermektedir. Böylece peroksizom relatif konsantrasyon veya aktivitedeki enzim ile reaktif oksijen türlerin net bir şekilde oluşmamasını garantiye alarak hassas bir dengeyi devam ettirir. Peroksizomun bu dengeyi nasıl sağladığı bilinmemektedir. Peroksizomlar hasar gördüğünde ve  $H_2O_2$ 'leri enzim downregülasyonunu etkisiz hale getirdiğinde oksidatif strese sebep olan  $H_2O_2$ 'ler sitozole dağılır (Valko vd 2007).

### 2.3.1.5. Fagositik Hücreler ve Araşidonik Asit Metabolizması

Fagositik hücreler (nötrofiller, monositler, makrofajlar ve eozinofiller), çeşitli biyolojik hücrelerin parçalanmasına sebep olan ve enfeksiyona karşı hücrel cevabı başlatan hücrelerdir. Solunum patlaması esnasında fagositik hücrelerde diğer reaktif oksijen ürünleri ile beraber süperoksit radikali de oluşmaktadır. Nötrofillerde süperoksit radikali plazma membranının dış yüzeyine yerleşmiş bulunan NADPH oksidaz aracılığı ile olur. Uygun bir uyarı ile fagositik hücre uyarıldıktan sonra NADPH oksidaz aktive olur. NADPH' dan iki elektron alınarak iki molekül oksijene aktarılır. Böylece iki molekül süperoksit oluşur (Winrow vd 1993, Akkuş 1995).



Serbest radikallerin önemli bir kaynağı da fagositik hücre membranında NADPH oksidaza bağlı serbest radikal üretimidir. Fagositik hücrelerin uyarılması fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranında araşidonik asidin salınımına yol açar. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu da çeşitli serbest radikal ara ürünler meydana gelebilir. Mikrozomal ve plazma membranı tarafından radikal üretiminin önemli enzimleri olan lipoksijenaz ve siklooksijenaz (araşidonik asit metabolizması)

aktivitesi, serbest radikaller için önemli kaynaklardır (Akkuş 1995, Freeman ve Crapo 1982)

### 2.3.1.6. Küçük Moleküllerin Otooksidasyonu

Nötral ortamda tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidrobiopterin gibi pek çok bileşik otooksidasyon ile serbest radikalleri oluşturur. Tüm bu bileşikler ile ilk önce  $O_2^{\bullet-}$ , daha sonra da  $O_2^{\bullet-}$ 'nin reaksiyonları ile diğer radikaller meydana gelir (Freeman ve Crapo 1982, Akkuş 1995, Marsden vd 1996).

### 2.3.2. Ekzojen Serbest Radikal Kaynakları

Çevresel kimyasal ajanlara maruz kalma, hücrelerde radikal oluşumu ve reaksiyonlarını arttırarak oksidatif strese yol açmaktadır (Aslan vd 1997, Thomas 1995). Hava kirliliği (Aslan vd 1997), kimyasallara maruz kalma (Aslan vd 1996), organik yanık madde (yanmış gıdalar, sigara dumanı gibi) alımı (Şekeroğlu vd 1997) ve iyonize edici radyasyon başlıca ekzojen radikal kaynaklarıdır (Thomas 1995).

*Nitrojen Dioksit:*  $NO_2$  bir yandan çift bağlarla bağlanırken diğer yandan otooksidasyonu başlatan labil hidrojen atomlarını ayrıştıran reaktif bir moleküldür (Acton ve Myrvik 1972). Oksijen redüksiyonunun  $NO_2$ 'ye maruz kalması durumunda araşidonik asit metabolizması  $NO_2$ 'nin konsantrasyonuna bağlı olarak değişir. Bu nedenle makro düzeyde  $NO_2$ , bu metabolizmayı büyük oranda arttırır (Robison vd 1993).

*Organik Yanık Maddeler ve Sigara Dumanı:* Kimyasal ve organik maddelerin yanması ile açığa çıkan maddeler, radikallerin önemli kaynakları ve taşıyıcılarıdır (Şekeroğlu vd 1997) ve en sık maruz kalınan yanık madde ürünü sigara dumanıdır. Katran ve gaz olmak üzere iki fazda tanımlanan sigara dumanı, akciğerlere alınan yanmış organik materyallerin en önemlisidir. Sigara dumanı gaz fazı okside edici bir karışım olmasına karşın, bu fazdan izole edilen katran indirgeyici (antioksidan) karakterdedir (Maeda vd 1987, Şekeroğlu vd 1997). Solunum ve dolaşıma etkileri açısından sigara dumanı ile gelişen patolojiler, kirli havadan  $NO_2$  salınması ile oluşan vakalara benzetilebilir. Ancak araştırmacıların çoğuna göre gelişen yıkım, sigara

dumanı kökenli serbest radikallerden kaynaklanmaktadır (Church ve Prior 1985, Maeda vd 1987, Thomas 1995).

*Pestisidler:* Serbest radikaller, pestisidlerin ve çevresel kimyasalların toksisitelerinde önemli rol oynarlar. Pestisidler, oksidatif strese, serbest radikal üretimine, antioksidanlarda değişime yol açabilirler. Lipit peroksidasyonu, pestisidlerin neden olduğu zehirlenmelerde zehirlenme mekanizmalarından biri olarak belirtilmiştir (Kehrer 1993).

*Metaller:* Metal iyonları, süperoksit anyonları ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile biyolojik sistemlerde hidroksil serbest radikali ve metal-oksijen kompleksleri gibi çok reaktif türleri üretmek için reaksiyona girerler ve sonuçta oksidatif DNA hasarı oluşur. Kimyasal karsinogenezde, metallerin aracılık ettiği oksidatif DNA hasarı önemli rol oynar (Kawanishi vd 2002, Urani vd 1998). Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki asıl önemleri lipit peroksidasyonundaki etkileridir. Geçiş metalleri lipit peroksidasyonu başlatmaktan ziyade sentezlenmiş olan lipit hidroperoksitlerinin parçalanmalarını ve lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize ederek serbest radikallerin zararlarını artırır (Akkuş 1995). Demir (Fe), Fenton reaksiyonu üzerinden güçlü serbest radikallerden biri olan hidroksil radikallerinin oluşmasını sağlarken, stabil lipit hidroperoksitlerinin peroksi ve alkoksi radikallerine dönüşümünü hızlandırır. Çoklu doymamış yağ asitleri membran lipitlerinde bulunur ve peroksidasyona duyarlıdır (Seymen vd 1999). Bakırın (Cu) insan vücudunda önemli fonksiyonları vardır. Hücreleri lipit peroksidasyondan koruyan enzimlerden SOD'un yapısında bulunur, mitokondrial sitokrom oksidazların önemli elementidir. Serbest Cu organizmada hücre membranları üzerine prooksidan ajan olarak rol oynamaktadır (Seymen vd 1999).

*Alışkanlık yapan maddeler (Alkol):* Alkol tüketiminin karaciğer ve karaciğer dışı dokularda oksidatif stresi indükleyerek lipit peroksidasyonuna yol açtığı, bu durumun kompleks ve interaktif bir süreç olduğu ileri sürülmektedir (Ishii vd 1997, Nordman vd 1992). Genellikle karaciğerde meydana gelen etanol metabolizmasının erken fazında tam oksidasyon ile açığa çıkan oksijen ve NO radikalleri, asetaldehit artışı hücre içi redoks durumunu belirgin olarak değiştirmektedir (Zima vd 2001). Ayrıca etanol ve başlıca metaboliti asetaldehitin metabolize olamadığı diğer dokularda serbest radikal

türlerinin oluşumuna yol açabildiği ve bu dokularda prooksidan etki sonucu alkolle ilişkili toksisite ve hasardan sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (Nordmann vd 1990, Nordmann 1994).

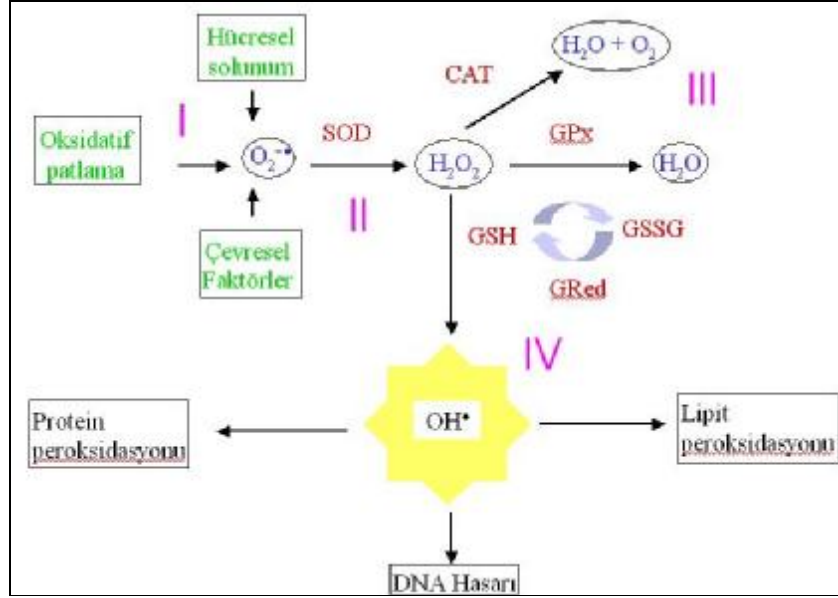
*Stres:* Streste katekolamin düzeyi artar. Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır (Guemouri vd 1991, Akkuş 1995)

*İyonize radyasyon ve Antineoplastik Ajanlar:* İyonize radyasyon ya direkt olarak DNA zincirinde kırılmalar oluşturur ya da hücre içindeki moleküllerle etkileşerek oksijen radikalleri oluşumunu sağlar ve bu oksijen radikalleri DNA bileşenleri ile etkileşerek zincirde kırılmalar (baz hasarı, tek ve çift zincir kırılmaları) ve diğer tip bozulmalara yol açarlar. Her hücre tipinin radyasyona duyarlılığı farklıdır (Yaren ve Karayılıanoğlu 2005). Diğer yandan antineoplastik ajanlar serbest radikallerin biyolojik kaynaklarındandır. Bu ajanlar sitotoksik etkilerine bağlı olarak lipit peroksidasyonunu artırmaktadırlar (Dülger vd 2002).

## **2.4. Serbest Radikallerin Etkileri**

### **2.4.1. Oksidatif Stres**

Reaktif oksijen türleri kontrolsüz bir şekilde üretildiğinde, nükleik asit, protein ve lipit gibi biyomolekülleri oksitler ve genetik bilginin (DNA) değişmesine, protein yapısının bozulmasına, enzim aktivitesinin engellenmesine ve hücrel membranların zedelenmesine neden olur ve oksidatif stresi meydana getirir (Packer 1997, Matsuo ve Kaneko 2000, Clarkson ve Thompson 2000). Oksidatif stres, oksidan öncülü hücrel ürünlerin, reaktif maddeleri (türleri) inaktif hale getiren sistemin fizyolojik kapasitesini aştığı durum olarak tanımlanabilir (Bloomer ve Goldfarb 2004). Biyolojik sistemde oksidan ( $C_o$ ) ve antioksidan kapasite ( $C_a$ ) arasındaki dengenin bozulması ve dengenin oksidanlar yönüne kayması durumunda, oksidatif stres meydana gelir. Oksidatif stres şu şekilde ifade edilebilir; " $C_o > C_a$ " (Matsuo ve Kaneko 2000, Inal vd 2001). Oksidatif stres oluşumu ve meydana getirdiği etkiler Şekil 2.3' de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Oksidatif stres oluşumu ve etkileri

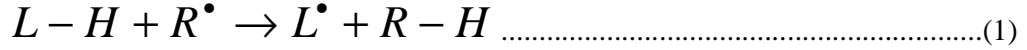
#### 2.4.1.1. Membran Lipitleri Üzerine Etkileri

Tüm biyomoleküller serbest radikal atağına maruz kalır ancak bunların içinde lipitler en kolay etkilenenlerdir (Cheeseman ve Slater 1993). Hücre, membranı ve diğer komponentleri ile serbest radikal atakları ve peroksidasyon için potansiyel bir hedefdir (Pal 1994, Mead 1989). Tüm biyolojik zarlar çoklu doymamış yağ asitleri ile amfipatik lipitler ve zar proteinlerinin birleşmesinden oluşur. Lipit peroksidasyonu serbest oksijen radikalleri tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidasyonunu içeren kimyasal bir otokatalitik zincir reaksiyonu olup, lipit peroksitlerinin aldehit türevleri, hidrokarbon radikalleri ve uçucu bazı ürünlere çevrilmesi şeklinde sonlanır (Gutteridge 1995, Murray vd 1996, Niki vd 1991, Tekkes 2006).

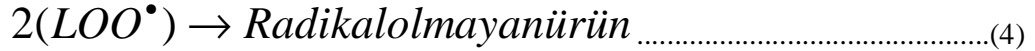
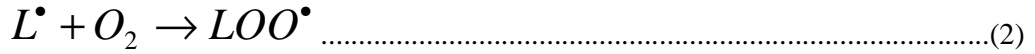
Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Lipit peroksidasyonu membranlara yakın bölgelerde ortaya çıkan  $^{\cdot}OH$  radikalinin membran fosfolipitlerinin yağ asidi yan zincirlerine saldırması ile oluşur (Craig vd 1986, Akkuş, 1995).



Lipit peroksidasyonu üç temel aşamadan meydana gelir (Porter 1984, Gardner 1989, Barclay 1993) : Başlangıç (1), çoğalma (2,3) ve sonlanma (4).

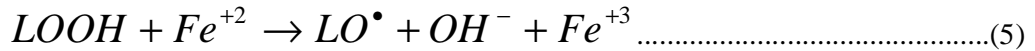


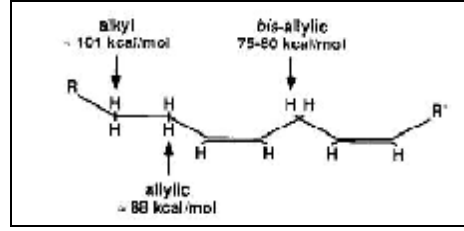
LH genellikle çoklu doymamış yağ asidi (PUFA)' dir. Başlangıçta yüksek enerjili bir elektronlu ( $^{\bullet}\text{OH}$  gibi) radikal yağ asidi zincirinden bir hidrojen çekerek karbon merkezli bir radikal ( $L^{\bullet}$ ) oluşturur. Oluşan lipit radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğraması ile molekül içi çift bağların değişmesi sonucu konjuge dien yapıları oluşur. Oluşan değişikliklerin ardından lipit radikali hemen dioksijenle reaksiyona girer ve lipit peroksil radikalini oluşturur (2).  $\text{LOO}^{\bullet}$  çoğalma turlarının zincir taşıyıcı radikalidir (3) (Gutteridge 1995, Hasegawa ve Patterson 1978, Buetterner 1993).



Lipit peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek yeni karbon merkezli radikaller oluştururken, kendileri de açığa çıkan H parçacığı ile birleşerek lipit hidroperoksitlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder (Gutteridge 1995).

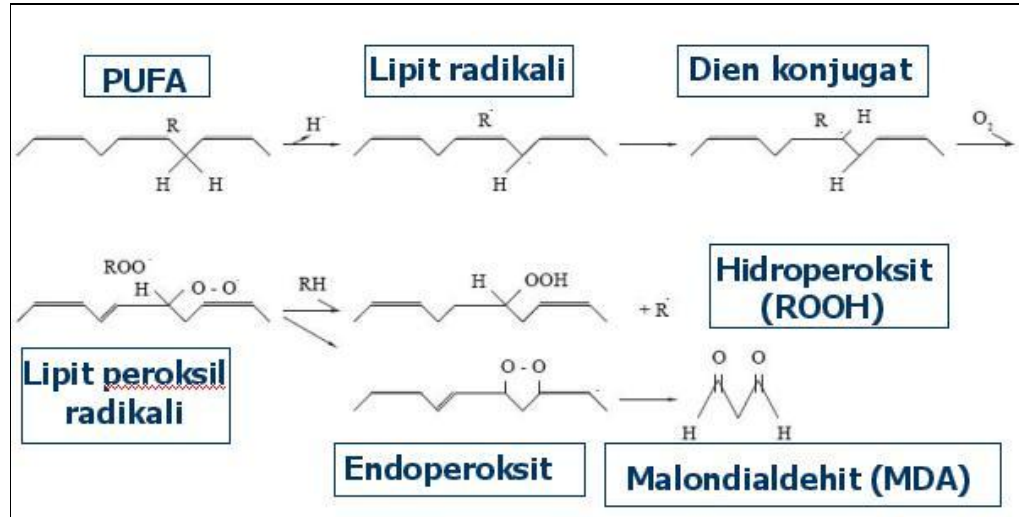
Lipit hidroksit formu başlangıca veya zincir dallanmasına öncülük yapacak şekilde hareket eder (5). Bu yüzden lipit peroksidasyonu kompleks, dallanan bir serbest radikal zincir reaksiyonudur.





**Şekil 2.4.** Lipit molekülü C-H bağ disiasasyon enerjileri (Wagner vd 1994)

Çoğalma evresi lipit zincirdeki çeşitli C-H bağ disiasasyon enerjileri tarafından yönlendirilir. En zayıf C-H bağı bis-allilik metilen pozisyonundadır (Gardner 1989, Koppenol 1990). Şekil 2.4' de lipit molekülünün C-H bağ disiasasyon enerjileri verilmiştir. Teorik olarak lipit zincirde ne kadar çok bis-allilik metilen pozisyonu var ise o kadar çok oksidasyona uğrayabilir (Porter 1984, Gardner 1989, Barclay 1993).



**Şekil 2.5.** Lipit peroksidasyonunun kimyasal yolu

Lipit peroksidasyonu ya toplayıcı antioksidan reaksiyonlarla sonlandırılır yada otokatalitik yayılma tepkimeleri ile devam eder (Gutteridge 1995). Şekil 2.5' de lipit peroksidasyonu şematik olarak gösterilmiştir (Murray vd 1996).

Lipit hidroperoksitlerinin membranlarda birikimi sonucu, membran fonksiyonları bozulur ve hücre kollebe olur. Ayrıca lipit hidroperoksitleri geçiş metalleri katalizi ile yıkıldığında çoğu zararlı olan aldehytler oluşurlar. Lipit peroksidasyonu sonucu ortaya

çıkan çeşitli aldehitlerden en iyi bilinenleri MDA ve 4-hidroksinonenaldır. MDA ölçümü ile lipit peroksidasyonu değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu bileşikler ya hücrel olarak metabolize olurlar ya da başlangıçta etkili oldukları bölgeden diffüze olup hasarı hücrenin diğer bölgelerine yayarlar. Lipit radikallerinin hidrofobik yapıda olması dolayısı ile reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Peroksil radikalleri ve aldehitler, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Böylece membranlarda, reseptörleri ve membrana bağlı enzimleri inaktive etmek suretiyle membran proteinlerinde de ciddi hasarlar meydana getirebilirler. İyon transportunu etkileyebilirler. Plazma lipoproteinleri ve özellikle düşük dansiteli lipoproteinler de oksidasyona uğrayabilir. Okside lipoproteinler hücre fonksiyonlarının bozulmasına aracılık edebilirler (Nair vd 1986, Rice-Evans vd 1991, Akkuş 1995).

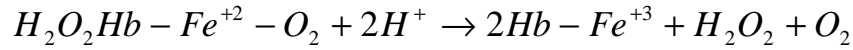
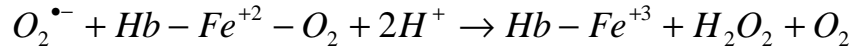
Araşidonik asit metabolizması sonucu lipitlerden serbest radikal üretimine 'enzimatik lipit peroksidasyonu', diğer radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna ise 'enzimatik olmayan lipit peroksidasyonu' adı verilir (Craig vd 1986, Akkuş 1995, Gutteridge 1995).

#### **2.4.1.2 Proteinler Üzerine Etkileri**

Proteinler oksidanlara maruz kaldıklarında birçok kovalent değişikliğe uğrar. Bu değişikliklerden bazıları serbest radikallerin protein molekülleri üzerine direkt etkileri sonucu oluşabildiği gibi, bazıları da oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent olarak bağlanması ile meydana gelir (Shacter 2000, Dalle-Donne vd 2003). Proteinlerin radikal aracılı hasarı; elektron kaybı, metal-iyon katalizli reaksiyonlar, lipit ve şekerlerin otooksidasyonu ile başlatılabilmektedir. Bu ürünlerin oluşum hızının artması veya temizleyici mekanizmaların yetersiz kalması, proteinlerde dahil olmak üzere diğer hücrel moleküllerdeki oksidatif modifikasyonların artışına yol açar (Shacter 2000; Dalle-Donne vd 2003).

Oksidatif protein hasarı sonucunda protein yapısında meydana gelen değişiklikler; agregasyon ile fragmentasyonda artış, sekonder ve tersiyer yapının değişikliğe uğraması olarak sıralanabilir. Bu değişiklikler sonucunda proteolize yatkınlık ve normal fonksiyonda azalma meydana gelir (Butterfield vd 1998).

Proteinlerin serbest radikallere karşı hassasiyeti lipitlerden daha azdır. Etkilenme dereceleri içerdikleri amino asit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren aminoasitlerden (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir. Bu karbon merkezli radikallerden karbonillerin ölçülmesi ile proteinlerin oksidatif hasarı ölçülebilir. Serbest radikallerin meydana getirdiği hasar sonucunda proteinlerde fragmentasyon, çapraz bağlanmalar ve proteinlerin agregasyonu meydana gelir. Yapıları bozulan proteinler normal fonksiyonlarını meydana getiremezler. Enzimler protein yapısında olduklarından enzim aktivitelerinde değişiklikler meydana gelir. Hem proteinleri de radikallerden önemli zarar görürler. Özellikle oksihemoglobin  $O_2^{\bullet-}$  veya  $H_2O_2$  ile reaksiyona girmesiyle methemoglobin oluşur (Rice-Evans vd 1991, Akkuş 1995, Tekkes 2006).



#### 2.4.1.3. Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri

İyonize edici radyasyona bağlı hücre ölümünün başlıca nedeni nükleik asitlerin reaktif oksijen türleri ile reaksiyonudur. Reaktif oksijen türleri DNA çift sarmalının ayrılmasına veya nükleik asit baz değişimlerine sebep olabilir. Bu da kromozal mutasyonlar ve sitotoksosite ile sonuçlanır (Halliwell 1984, Ames vd 1993, Frei 1994, Halliwell 1994).

Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da, tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir. DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli kationları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur.  $Fe^{2+/3+}$  ve  $Cu^{1+/2+}$  iyonları negatif yüklü DNA'ya sürekli bağlı bulunabildikleri gibi oksidatif stres altında hücre içinde bulunan demirli ve bakırlı proteinlerden serbestleşerek de DNA'ya bağlanabilmektedirler. Redoks aktif transisyon

metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü  $H_2O_2$ 'in hedefi haline getirmektedir. DNA'ya bağlı metal iyonları ile  $H_2O_2$ 'in DNA üzerinde reaksiyonlaşmasından oluşan  $\cdot OH$  radikalleri,  $\cdot OH$  radikal temizleyicileri tarafından uzaklaştırılmamaktadır. Ayrıca,  $\cdot OH$  radikal temizleyicilerinin oluşturduğu radikaller de DNA'ya hasar verebilmektedir (Burçak ve Ancidan 2004).

Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (Halliwell 1987, Oğuz 1990, Ames vd 1993, Halliwell 1994, Akkuş 1995, Tekkes 2006).

Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazı bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Eğer hidroksil radikali DNA' nın yakınında meydana gelirse pürin ve pirimidin bazlarına atak yapabilir ve mutasyonlara sebep olabilir. Hidroksil radikali, nükleik asitlerde doymuş karbon atomlarından hidrojen çıkarır veya çift bağlara katılma tepkimeleri ile sonuçlanan tepkimelere girer. Singlet oksijenin nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha sınırlıdır. Süperoksit anyonu güçlü bir oksitleyici olduğundan guanin gibi yüksek elektron yüklü yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay tepkimeye girer (Halliwell ve Gutteridge 1984).

DNA'da oksidatif hasar ile ilk oluşan lezyon dal kırıklarıdır. Dal kırıkları DNA onarımı sırasında nukleaz aktivitesi ile de oluşabileceğinden her zaman oksidatif DNA hasarını göstermemektedir. Tek dal kırıklarında, diğer daldaki bilgi doğru okunarak 'hasarlı dal onarıcı enzimlerle' onarılabildiğinden çift dal kırıkları daha önemlidir.  $\cdot OH$  radikali pürin ve pirimidin bazlarında modifikasyonlar meydana getirmektedir. Örneğin bir pürin olan guaninin 4, 5 veya 8 pozisyonlarındaki C atomlarına veya adeninin 4, 5, 6 pozisyonlarındaki C atomlarına  $\cdot OH$  radikali katılarak çeşitli ürünler oluşmaktadır. Günümüzde 100 kadar oksidatif DNA baz hasarı tanımlanmıştır (Dizdaroğlu 1992)

#### 2.4.1.4. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Glukoz otooksidasyonu, taşıyıcı metallerin katalizlediği reaksiyonlar sonucunda glukozun kısmen radikal olan anyonları oluşturması ile meydana gelir. Bu radikaller, daha sonra  $O_2$ 'i indirgeyerek  $O_2^{\bullet-}$  anyonunu meydana getirirler. Bu da diğer ROS'ların oluşumunu tetikler. Proteinlerin glikolizasyonu, glukozun proteinlerin amino grubuna bağlanmasıyla başlar. Bunun ardından bir seri kimyasal modifikasyon geçirerek, daha kararlı bir yapı olan protein-glukoz kompleksine dönüşür. Biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda oluşan glikolize proteinler ise, Cu ve Fe varlığında,  $O_2$ 'ye elektron vererek ROS'ların oluşmasına neden olurlar (Bonfont-Rousselot vd 2000, Robertson vd 2003).

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucunda  $H_2O_2$ , peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı çeşitli hastalıkların patolojisinde önemli rol oynarlar ( Akkuş 1995, Tekkes 2006).

#### 2.5. Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Bu işlevleri yapan maddelerin tümüne birden genel olarak *Antioksidanlar* denir (Ames vd 1993, Frei 1994, Akkuş 1995, Bast vd 1997).

Etkilerini; lokal oksijen konsantrasyonunu azaltarak, hidroksil radikallerini temizleyip lipit peroksidasyonunun başlamasını önleyerek, geçiş metal iyonlarını bağlayıp etkisizleştirerek, peroksitlerin alkol gibi nonradikal ürünlere dönüşümünde etkin rol oynayarak ve zincir reaksiyonlarına neden olan tüm radikaller ile reaksiyona girip zinciri kırarak gösteren antioksidanlar; intraselüler ve ekstraselüler olmak üzere iki grupta incelenirler. En belirgin özellikleri okside olan substratlara oranla çok daha az

konsantrasyonlarda bile substratın oksidasyonunu geciktirmeleri ve inhibe etmeleridir (Halliwell ve Gutteridge 1990).

Antioksidanlar etkilerini şimdiye kadar tespit edilen altı değişik mekanizma ile gösterirler (Cross ve Halliwell 1987, Halliwell 1990, Gueumori vd 1991, Ames vd 1993, Tekkes 2006). Bu mekanizmalar birbirinden bağımsız veya bir arada işleyebilmektedirler.

I. Oksijen ile reaksiyona girerek ya da onun yerini alarak lokal oksijen konsantrasyonunu azaltırlar.

II. Hidroksil radikali yapısında yer alan hidrojen atomları bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyerek peroksidasyonun başlamasını önleyebilirler.

III. Membran lipitlerine direk etkileyerek peroksit oluşturabilen singlet oksijeni baskılayabilir veya temizleyebilirler (Halliwell ve Gutteridge 1990).

IV. Metal iyonlarını bağlamak yoluyla reaktif grupların ( $\cdot\text{OH}$ , ferril ya da  $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}/\text{O}_2$  kompleksleri gibi) ve/veya lipit peroksitlerden peroksil ve alkoksil radikallerinin oluşumunu önleyebilirler. Membranlarda lipit peroksidasyonunun başlamasına hangi reaktif ürünlerin neden olduğu tartışılmaktadır, ancak hem başlangıç hem de oluşan lipit peroksitlerin dekompozisyonu için transisyonel metal iyonlarına ihtiyaç olduğuna dair genel bir kanı vardır.

V. Peroksitleri, alkol gibi nonradikal ürünlere çevirebilirler. Örneğin; GPx, peroksitleri bu yolla temizleyen bir antioksidandır.

VI. Zincir kırabilirler yani; zincir oluşumuna neden olabilen serbest radikallerle reaksiyona girebilirler ve yağ asidi zincirlerinden sürekli hidrojen iyonu salınımını önleyebilirler. Zincir kırıcı antioksidanlar için de fenoller,

aromatik aminler ve en yaygın olan  $\alpha$ -tokoferol yer almakla birlikte başka lipit solubl zincir kırıcı antioksidanlar da vardır (Halliwell 1990).

Lipit peroksidasyonunu yukarıdaki mekanizmalardan ilk dört tanesi ile önleyenler ‘Koruyucu Antioksidanlar’ olarak kabul edilmektedir. Dördüncü mekanizma ile etki edenler reaksiyon sırasında tüketilmezler. Beşinci mekanizma ile etki eden antioksidanlar ise koruyucu olmakla birlikte reaksiyon sırasında kimyasal karakterlere göre, tüketilebilir veya tüketilemezler. Altıncı mekanizma ile etki eden zincir kırıcı antioksidanlar ise zincir uzama reaksiyonlarına neden olan radikallerle kompleks yaptıklarından kırma reaksiyonu sürecinde tüketilirler. Burada özellikle vurgulanması gereken nokta antioksidanların pek çoğunun tek bir mekanizma üzerinden etki etmediği, birden fazla mekanizma ile asıl etkisini oluşturduğudur. Ek olarak oksidatif hasarın hızlı tamiri ki bu, peroksidize yağ asitlerinin membran lipitleri arasından temizlenmesi şeklinde olur, lipit peroksidasyonunu yavaşlatabilir. Membrandaki yapısal değişiklikler de peroksidabiliteye etki edebilir. Antioksidanlar sadece lipitlerin değil, belki okside olmaları çok daha zararlı olabilen DNA ve proteinlerin de korunmasında etkilidir (Craig vd 1986, Halliwell 1987, Halliwell ve Gutteridge 1990, Jialal ve Fuller 1993, Halliwell 1994, Akkuş 1995, Maxwell 1995, Tekkes 2006).

Antioksidan savunma; radikal metabolit üretiminin önlenmesi, üretilmiş radikallerin temizlenmesi, oluşan hücre haraplanmasının onarılması, sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması ve endojen antioksidan kapasitenin artırılması olarak ayrımlanan beş değişik blokta yürür (Gutteridge 1995). Bazı otoriteler antioksidan savunmayı komponentlerin enzimsel olup olmamasına bakarak, katalaz, SOD ve GSH-Px’in rol aldığı antioksidan aktiviteleri *Enzimatik antioksidan savunma* ;  $\alpha$ -tokoferol, askorbat, glutatyon, ürik asit, glukoz gibi maddelerle gerçekleştirilen deoksidasyon işlemlerini *Enzimatik olmayan antioksidan savunma* olarak tanımlar (Byung 1994). Öte yandan, antioksidanlara daha spesifik rollerin yüklendiği çalışmalarda, antioksidan savunma; selüler, mambransel ve extraselüler olarak sınıflandırıldığı görülmektedir (Maccord ve Fridowich 1969).

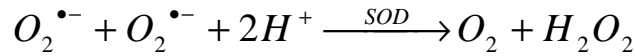


## 2.5.1. Enzimatik Antioksidanlar

### 2.5.1.1 Süperoksit Dismutaz (SOD)

Antioksidan savunmanın ilk basamağı süperoksitin  $H_2O_2$ ' e dismutasyonunun katalizleyen SOD (EC 1.15.1.1) enzimidir (Mc Cord ve Fridovich 1969, Fridovich 1975, Henry vd 1976, Flohe ve Otting 1984, Gonzales ve ark 1984, Cerutti vd 1988 Wheeler 1990 Bast vd 1997).

Süperoksit radikallerinin  $H_2O_2$  ve  $O_2$ ' ne dismutasyonunu sağlayan süperoksit dismutaz enzimi ilk olarak inek eritrositlerinden saflaştırılmıştır (Mc Cord ve Fridovich 1969). SOD aerobik hücrelerde oksijen radikalının zararına karşı intraselüler savunmada büyük rol oynar ve aktivitesinde yaşlanmaya bağlı olarak bir azalma olmaktadır (Criolo 1991).



SOD enzimi kofaktör olarak içerdiği metal iyonu tipine göre üç sınıfta toplanır (Fridovich 1975, Asada vd 1980, Allen vd 1984, Rousseau 1990, Smirnoff ve Palanca 1995). İnsanda SOD' un iki tipi bulunmaktadır. Bunlar; sitozolde bulunan dimerik Cu ve Zn içeren izomer (Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik Mn içeren izomerdir (Mn-SOD). Prokaryotlarda bulunan ve Fe içeren bir izomeri daha vardır (Fe-SOD). Ayrıca 1982 yılında glikoprotein yapısında olan ekstraselüler SOD (EC-SOD) tanımlanmıştır (Marklund 1984).

Sitozolik SOD yapısında bakır ve çinko (CuZn-SOD), mitokondrial SOD yapısında mangan (Mn-SOD) bulunmaktadır (Matsuo ve Kaneko 2000). Çinkonun stabiliteyi sağladığı ve bakırın ise aktiviteden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Deby ve Goutier 1990).

SOD izoformlarının dağılımı dokudan dokuya farklılık gösterir. İskelet kasında toplam SOD aktivitesinin %15-35 kadarı mitokondride iken geriye kalan %65-85 'lik kısmı sitozoldedir (Leeuwenburg ve Jı 1996) .

Cu-Zn SOD, ilk defa 1969 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır. Cu-Zn SOD, hayvansal hücrelerin sitozolünde yer alan enzimin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 32000 daltondur. Birbirinin aynı olan iki alt ünitelerden meydana gelir. Her subünitede bir Cu atomu, bir Zn atomu, bir zincir içi disülfür köprüsü, bir sülfidril grubu ve bir asetillenmiş terminal amino grubu bulunduğu tespit edilmiştir (Freeman ve Crapo 1982).

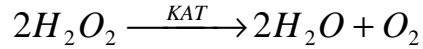
Mn-SOD; prokaryotik hücrelerde molekül ağırlığı 40000 dalton olan, birbirinin aynı olan iki alt birimden oluşan ve enzimin alt birimi başına birer atom Mn bağlı olan bir dismutaz içerirler. Mitokondri dismutazı da diğer prokaryotik hücrelerdeki dismutaza benzer, ancak 80000 dalton molekül ağırlığında tetramer yapıdadır. Mitokondri ve diğer prokaryotların dismutazlarının primer yapıları da birbirine çok benzer. Mitokondri dismutazının bu özelliği, mitokondrinin prokaryotik orijinli olup, ökaryotik hücre içine girerek simbiyotik bir yaşam oluşturduğuna kanıt kabul edilir. Aynı tepkimeyi katalizlemeleri dışında Mn-SOD ile Cu-Zn SOD arasında hiçbir ortak yapısal özellik yoktur (Halliwell 1990).

Bazı bakteriler birden fazla SOD içerirler. Bunlardan biri bütün prokaryotlarda bulunan Mn-SOD olup, hücre stoplazmasında bulunur. Bazı bakteriler periplazmik bölgelerinde demir içeren bir SOD (Fe-SOD) bulundurlar (Breckta 1984). Bu dismutaz faktörü dışında Mn-SOD' a benzer. Bu tip mikroorganizmalarda matrix enziminin (Mn-SOD) endojen  $O_2^{\bullet-}$  radikallerine karşı demir içeren dismutazın ise çevreden gelen radikallere karşı koruyucu fonksiyon gördüğü kabul edilmektedir (Kılınç 1985). Mn-SOD ve Fe-SOD enzimlerinin biri ya da her iki birden prokaryotlarda bulunur.

SOD enziminin canlılardaki dağılımı katalaz ile birlikte incelenmelidir. Çünkü SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan ürün, oksijenin toksik ürünlerinden biridir ve katalaz tarafından birikimi önlenmektedir (Breckta 1984).

### 2.5.1.2. Katalaz

Katalaz (KAT, EC 1.11.1.6), tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan, dört hem grubu içeren bir hemoproteindir. Molekül ağırlığı 248000 daltondur. Hidrojen peroksiti moleküler oksijen ve suya katalizler (Tudhope 1967, Palmer 1990, Akkuş 1995). Demir ( $Fe^{+3}$ ), enzimin aktif bölgesine bağlanması gereken bir kofaktördür (Halliwell ve Gutteridge 1989).

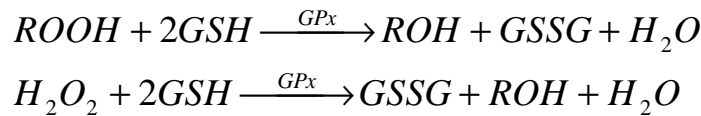


Katalaz hücre içinde büyük çoğunlukta peroksizomlarda bulunur ama mitokondrilerde de az miktarda blunmaktadır (Halliwell ve Gutteridge 1989). KAT' ın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ile metil ve etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipit hidroperoksitlerine etki etmez. Kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır (Tudhope 1967, Gonzales vd 1984, Rice-Evans vd 1991, Rachmilewitz vd 1994, Akkuş 1995, Bast ve ark 1997)

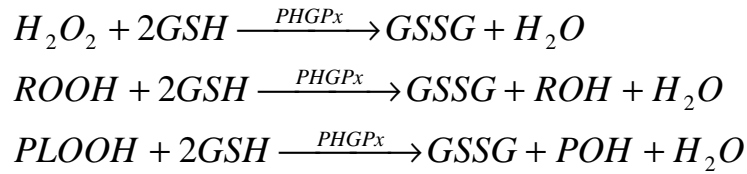
KAT ve glutatyon peroksidaz aynı fonksiyona sahip fakat substrat olan  $H_2O_2$ ' ye farklı affinite gösteren enzimlerdir. Memeli glutatyon peroksidazı, katalaz ile karşılaştırıldığında düşük konsantrasyonlarda bile  $H_2O_2$ ' ye daha yüksek afinite göstermektedir (Powers vd 1999).

### 2.5.1.3. Glutatyon Peroksidaz

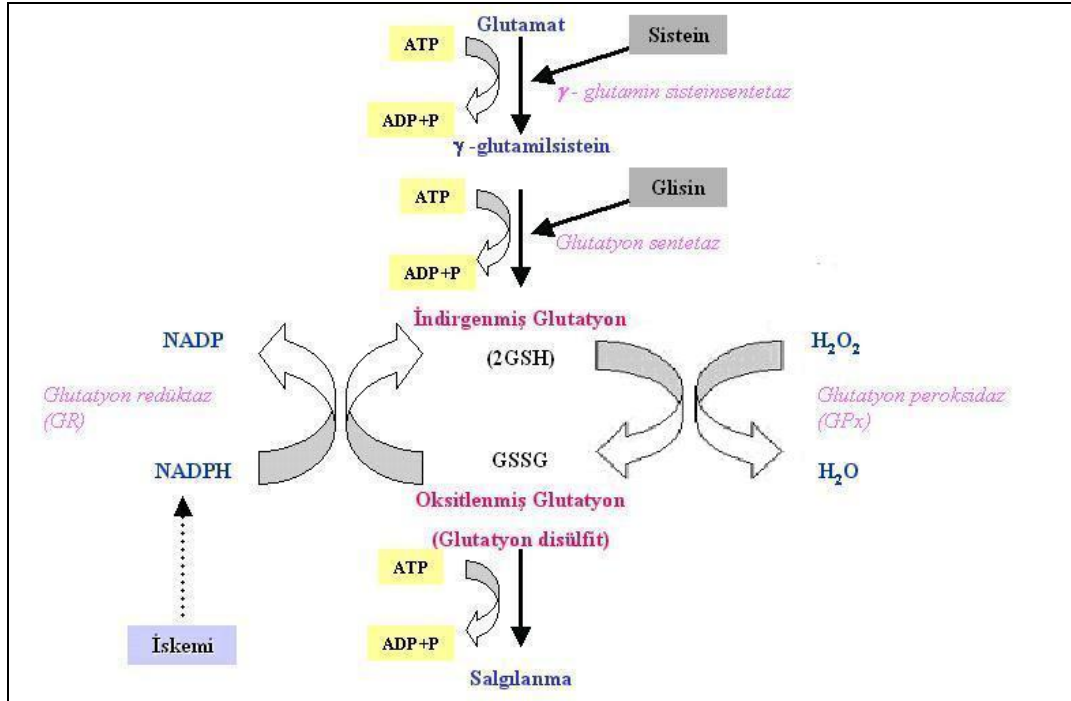
Selenyum içeren peroksidazlara iyi bir örnek olan glutatyon peroksidaz (EC 1.11.1.19), GSH' ı kullanarak çeşitli hidroperoksitlerin ( $ROOH$  ve  $H_2O_2$ ) redüksiyonunu katalizler ve bu sayede memeli hücrelerini oksidatif hasara karşı korur.



Memelilerde en az beş çeşit GPx izoenzimi bulunmaktadır. Her dokuda bulunmalarına karşın, her izoformun miktarı doku tipine göre değişir. Sitozolik ve mitokondrial glutatyon peroksidaz (cGPx veya GPx1), yağ asidi hidroperoksitlerini ve hidrojen peroksidi GSH kullanarak indirir. GPx1 ve fosfolipit hidroperoksit glutatyon peroksidaz GPx4 (veya PHGPx) da çoğu dokuda bulunur. GPx4 hem sitozolde hem de membran fraksiyonlarında lokalizedir. PHGPx peroksidize membran ve oksidize lipoproteinlerde oluşan fosfolipit, yağ asidi ve kolesterol hidroperoksitlerini direk indirgeyebilir (Imai vd 1998). GPx1 daha çok eritrosit, böbrek ve karaciğerde bulunurken; GPx4, renal epitel hücre ve testislerde bulunur. Sitozolik GPx2 (veya GPx-G1) ve ekstraselüler GPx3 (ya da GPx-P)' e sırasıyla gastrointestinal sistem ve böbrek dışındaki çoğu dokuda az rastlanır. Bu aileye yeni katılan ve fare epidermisinde rastlanan GPx5' in selenyum bağlı olmaması ise ilginçtir.



GPx'in molekül ağırlığı 80000 Dalton'dur. Dört identik subünitesinin her birinde enzim aktivitesi için esansiyel olan bir selenosistein (Sec) kalıntısı içerir (Ding vd 1998). GPx substratını ( $H_2O_2$ ) katalazla paylaşmasına rağmen, lipit ve diğer organik peroksitlerle etkili şekilde tek başına reaksiyona girer. Glutatyon redoks döngüsü düşük seviyeli oksidatif stres için ana savunma kaynağıdır ama KAT şiddetli oksidatif strese karşı korumada daha önemlidir (Yan ve Harding 1997). KAT' ın  $H_2O_2$ ' ye düşük afinitesinin GPx' den daha düşük olması yüzünden uzun bir süre, hayvan hücrelerinde ve özellikle insan eritrositlerinde  $H_2O_2$ ' nin detoksifikasyonunda esas antioksidan enzimin GPx olduğu düşünülmüştür. Şekil 2.6.' da GSH oluşum mekanizması ve GPx'in GSH üzerine etkisi gösterilmiştir.

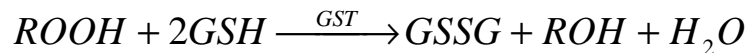


Şekil 2.6. Glutatyon sentezi ve siklusu

#### 2.5.1.4. Glutatyon S-Transferaz

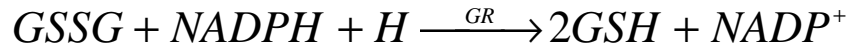
Dimer yapıda, molekül ağırlığı 50000 dalton olan, yedi farklı formda alt ünite taşıyan ve sekiz izoenzimi olan bir proteindir (Ketterer vd 1987, Mills 1957). Selenyuma bağlı olmayan glutatyon peroksidaz olarak adlandırılır (EC 2.5.1.18). Membran lipit peroksidasyonunu yalnızca fosfolipaz A2' nin varlığında inhibe eder. Öncelikle araşidonik asit ve lineolat hidroperoksidleri olmak üzere lipit peroksidlere karşı Se bağımsız GSH peroksidaz gibi aktive göstererek antioksidan etki gösterir (Mannervik 1985, Akkuş 1995).

İnsanda birçok dokuda geniş dağılıma sahip, çok işlevli ve geniş spektrumlu substrat özelliği olan bir enzimdir (Peters 1988). Glutatyon s-transferaz (GST) bu özelliği ile potansiyel toksik kimyasallara maruz kalan canlı organizmada savunma görevi görür. Detoksifikasyon görevini glutatyonun -SH grubu ilgili bileşiklerin elektrofilik bölgelerini nötralize ederek gerçekleştirir. Oluşan ürün suda çözünen merkaptürik asittir ve idrar ile vücuttan atılır (Vermeulen 1990, Snel vd 1993, Zhao vd 1993).



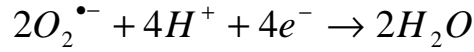
### 2.5.1.5. Glutasyon Redüktaz

Glutasyon redüktaz (EC 1.6.4.2) molekül ağırlığı 120000 dalton olan 2 alt birimli bir proteindir (Carlberg ve Mannevik 1985, Mann 1932). Hidroperoksitlerin redükte olması esnasında meydana gelen okside glutasyon (GSSG), GR' nin katalizlediği reaksiyonla tekrar redükte hale (GSH) dönüşür. Reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH' a ihtiyaç vardır (Carlberg ve Mannevik 1985, Mann 1932, Rice-Evans vd 1991, Akkuş 1995, Akyol 2004).



### 2.5.1.6. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, superoksidi detoksifiye eden enzimdir.



Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli devam eden normal bir reaksiyondur ve bu yolla yakıt maddelerin otooksidasyonu tamamlanarak enerji sağlanır (Frei 1994, Halliwell 1994, Akkuş 1995, Smirnoff ve Palanca 1995, Bast vd 1997).

## 2.5.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

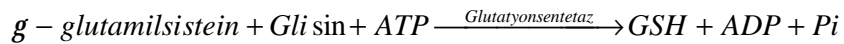
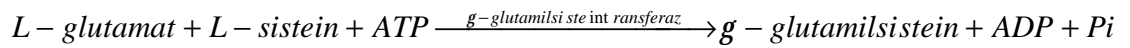
### 2.5.2.1. Glutasyon

Redükte glutasyon (GSH); glutamik asit, sistein ve glisin içeren bir tripeptit olup, aktif bir sülfidril (-SH) grubuna sahiptir. Hemen hemen bütün hayvan hücrelerinde ve bazı bakterilerde bulunur (Meister ve Anderson 1983, Meister 1995). GSH' ın hücrel antioksidan savunmada birçok rolü vardır (J1 1995, J1 1996, Lu vd 1991, Meister ve Anderson, 1983, Meister 1995). En önemli antioksidan görevi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve organik peroksitleri (lipit peroksit gibi) selenyum bağımlı enzim GPx ile katalizleyip yok ederek

sırasıyla su veya alkole dönüşmesidir. Bir çift hidrojen iyonu vererek GSSH' a yükseltgenir, GSSH ise glutatyon redüktaz tarafından katalizlenir. Bu reaksiyon GPx ile oluşur, böylece GSH' ın meydana gelebilmesi için bir redoks döngüsü sağlanmış olur (Flohe 1981, Meister 1995). Gerekli olan NADPH dokuya göre ya heksozmonofosfat şantından ya da izositrat dehidrojeniz ve malik enzim tarafından katalizlenen reaksiyon sonucunda oluşur (Jı 1995, Jı 1996; Meister 1995).

En önemli görevi, enzim ve proteinlerin tiyol gruplarının indirgenmesi ile redükte formlarının yeterli düzeylerde kontrolünü sağlamaktır. Tiyol grubuna sahip birçok enzim düşük hızda fakat okside olarak ya da oksijenin direk etkisi ile hızla aktivitelerini yitirirler. İşte GSH kendisi okside olup tiyol gruplarını tekrar indirgeyerek bunların aktivasyonunu sağlar. Özellikle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' nin elemine edilmesinde GSH' ın oksitlenebilirliğinden faydalanılır (Calberg ve Mannervik 1985, Akkuş 1995).

GSH hücrede en çok bulunan kısa zincirli peptid olup hücrenin protein olmayan tiyol kaynağıdır (Meister ve Anderson 1983, Meister 1995). Hücredeki GSH konsantrasyonu milimolar oranlarda olup, organların fonksiyon ve oksidatif kapasitesine göre farklı organlarda farklı miktarlarda bulunur. Karaciğer GSH' ın vücutta en yüksek konsantrasyonda olduğu organdır. Ayrıca gözün lens kısmında da GSH konsantrasyonu yüksektir (Halliwell ve Gutteridge 1989). Akciğer, böbrek, kalp gibi organlarda da 2-3 mM GSH bulunur. Kırmızı kan hücreleri, plazma ile karşılaştırıldığında daha fazla GSH' a sahip oldukları ve oksidatif strese karşı daha koruyucu oldukları görülür (Jı vd 1982, Lew vd 1985). Şekil 2.6.' da GSH oluşum mekanizması gösterilmiştir.



### 2.5.2.2. a-Tokoferol (E vitamini)

Sadece zarlarda aktif bir antioksidan olan vitamin E (Gutteridge 1995), lipit peroksidasyonunun erken aşamasında serbest radikal türlerini yok ederek ya da oluşumlarını engelleyerek zar fosfolipitlerindeki poliansature yağ asitlerini oksidanların zararlı etkilerinden koruyarak oksidatif strese karşı ilk savunma hattını oluşturur (Jialal ve Fuhler 1993, Thomas 1995).

E vitamini ‘Tokoferoller’ ve ‘Tokotrienoller’ olmak üzere iki ana grupta toplanabilen, altı kromonal türevleri olan sekiz doğal bileşiği içerir. Bu bileşikler molekülün kromonal halkasındaki metil gruplarının sayısı ve pozisyonuna göre  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  tokoferoller olarak adlandırılırlar (Fritsma 1983).

Yapısında bulunan fenolik hidroksil grubuna ait aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır.  $\alpha$ -tokoferol dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. En yüksek vitamin E konsantrasyonları, mitokondri ve mikrozoimler gibi membrandan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur. E vitamini; süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipit peroksi radikallerini ve diğer radikal örneklerini indirger (Rice-Evans vd 1991, Akkuş 1995, Tanakol 1998).

Vitamin E serbest radikalleri stabile ederek peroksidasyon zincirini kırar ve bu olgu singlet oksijenin çoğunlukla hidroksil radikale ya da süperoksit radikale indirgenmesi ile gerçekleştirilir (Jialal ve Fuhler 1993). Vitamin E, radikallerin yok edilmesi (Van Der Meulen 1997), zincirin kırılması (Thomas 1995), baskılama (Byung 1994), bozulan yapıların onarılması (Evelson 1997) ve endojen savunma sistemlerinin güçlendirilmesi gibi (Freeman 1982, Van Der Meulen 1997) mekanizmaların tamamını kullanarak antioksidan görevini yerine getirdiğinden antioksidan kapasitesi çok geniş ve yüksektir. Alveoler zarlar ve eritrosit zarlarında olduğu gibi vitamin E'nin antioksidan rolü, oldukça yüksek moleküler oksijen konsantrasyonlarında bile etkili olabilmektedir (Halliwell 1995, Jialal ve Fuhler 1993, Stratton 1997, Thomas 1995).



Vitamin E' nin hücre zarında gösterdiği antioksidan etkiyi, hücre içerisinde genelde glutatyon peroksidaz (GPx) üzerine alır. GPx metalloenziminin aktivasyonu için selenyum gereklidir. (Dündar ve Aslan 1999).

### **2.5.2.3 Askorbik Asit (C Vitamini)**

Askorbat, altı karbonlu bir laktondur ve pek çok memeli türünde karaciğerde glukozdan sentezlenir. Ancak insanda askorbik asidin sentezlenmesi için esansiyel olan glukolakton oksidaz enzimi bulunmaz ve bu sebeple sentezi gerçekleşemez (Nishikimi 1994, Nishikimi ve Yagi 1996).

C vitamini elektron donorü ve dolayısıyla indirgeyici ajandır. Bilinen bütün fizyolojik ve biyokimyasal hareketleri elektron donorü olmasından kaynaklanır.

Su bazlı ortamlarda geniş antioksidan kapasitesi ile vitamin C, lipit ortamların güçlü antioksidanı olan vitamin E' nin antioksidan etkisini andıran bir rol üstlenerek kan ve diğer vücut sıvılarının primer antioksidan savunmasını gerçekleştirir. Askorbik asit, süperoksid ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girip onları temizleyen bir antioksidan olmasının yanı sıra tokoferoksil radikalının tekrar tokoferole dönüşmesini sağlar. Bu esnada kendisi de dehidroaskorbata okside olur. C vitamini yetersizliği durumlarında oluşan tokoferoksil radikalleri tokoferole dönüşmek için GSH ile reaksiyona girdiğinden hücredeki GSH miktarını azaltacaktır. Vitamin C' nin singlet oksijen süperoksid hidroksil, hidroperoksil, lipit peroksil ve lipit alkoksil radikallerini ortamdaki temizleyerek antioksidan etkisini gösterdiği bilinmektedir. Lipit moleküllerinin oksidasyonu ile oluşturduğu lipit peroksitlerinin sulu ortamlarda çözünmesinin de vitamin C' nin antioksidan etkisiyle olduğu ileri sürülmektedir. Bazı biyolojik sistemlerde lipozomal metil linoat misellerinin oksidasyonunu baskılayan antioksidan aktivitenin de vitamin C' den oluştuğu söylenmektedir (Dündar ve Aslan 1999).

### **2.5.2.4. Karotenoidler**

Karotenoidler; bitki, hayvan ve insanlarda oluşan yeşil ve kırmızı renkli pigmentler grubuna girerler. Fizyolojik olarak oldukça önemlidirler. Reaktif oksijen türleri ile güçlü bir etkileşime girerek, bitkisel ve hayvansal organizmalarda potansiyel serbest

radikal giderici, singlet oksijen yakalayıcı ve lipit antioksidanları olarak görev yaparlar (Ladislav vd 2005).

Karotenoidler; uzun, alifatik, konjuge çift bağılı sistemlerdir. Hidrokarbondan oluşan bir kısım içerirler ve bu genelde sekiz izopren birimden oluşur. Molekül formülü  $C_{40}H_{56}$ ' dır (Ladislav vd 2005).

Karotenoidler  $\cdot OH$ ,  $O_2\cdot$  ve peroksil radikalleri ile etkileşime geçerek mükemmel bir radikal süpürücüsü olarak iş görürler. Yapılarındaki çift bağların yerleşik olmayan eşleşmemiş elektronlara bağlanması sonucu antioksidan aktivitesi gösterirler (Mortensen ve ark 2001). Yüksek konsantrasyonlarında lipitleri peroksidasyon zararından korurlar. Serbest radikaller ile karotenoidler arasındaki etkileşimin açıklanmasında genel olarak üç mekanizma ileri sürülmektedir: Serbest radikallere yeni bir radikal ekleme, yapısından bir  $H^+$  kopararak radikali etkisiz hale getirme ve yapısından bir elektron transfer ederek radikali yüksüzleştirme şeklindedir (El-Agemey vd 2004).

$\beta$ -karoten, doğal yollarla oluşan karotenoidlerin bir sınıfıdır. Altı yüzden fazla doğal oluşan karotenoid tespit edilmiştir ve bunların yaklaşık 50 tanesi A vitamini aktivitesi gösterir. A vitamininin metabolik ön maddesi olan  $\beta$ -karotenin, singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksi radikalleri ile direkt etkileşerek antioksidan olarak işlev yaptığı bulunmuştur (Akkuş 1995, Frei 1994, Di Mascio vd 1991)

#### **2.5.2.5. Flavonoidler**

Flavonoid'ler; üç karbonlu zincir ile bağılı iki benzen halkasını içeren  $C_6-C_3-C_6$  iskeletinde bileşiklerdir. Flavonoidler kırmızı, mavi pembe bitki pigmentleri, antosiyaninler, sarı antonsaktinler ve renksiz kateşinler' den oluşurlar. Diğer bir ifade ile bu bileşiklerin oluşturduğu sınıfın genel ismidir (Keskin 1981, Tekman ve Öner 1981, Ağaoğlu vd 1987). Çeşitli fenolik yapılarda doğal substratları olan bir gruptur ve sebze, meyve, şarap, çay vb'de bulunurlar (Middleton 1998). 4000'den fazla flavonoid

çeşidi tanımlanmıştır (Groot ve Raunen 1998). Moleküler yapılarına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilirler (Rica-Evans vd 1996).

Flavonoidler, 3'-4' dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahiptir. Fenolik antioksidan, lipit radikallere hızla hidrojen vermesi şeklinde lipit peroksidasyonu ile etkileşir. Görevi  $ROO^{\bullet}$  ve  $RO^{\bullet}$  radikalini parçalamak ve böylece lipit peroksidasyonunu sonlandırmaktır. Ayrıca bakır iyonları ile kompleks oluşturabilirler; bu durum antioksidan etkilerine bağlanabilir (Nijveldt vd 2001).

#### **2.5.2.6. Ürat**

Ürik asit, nükleer materyalin katabolizması sonucu açığa çıkan adenzin ve guanozin bazlı pürinlerin metabolizmasının son ürünüdür. Vücuttaki ürik asit endojen (özellikle kas hücrelerinin nükleik asitlerinin dönüşümü ile oluşan) ve eksojen (gıdalar) kaynaklı olabilir (Champe ve Harvey 1994). Pürin nükleotidleri; nükleotidi oluşturan bileşenlerin sırayla ayrılması sonucu yıkılır. İnsan organizması ürikaz enzimi içermediğinden bu yıkımın son ürünü ürik asittir (Dantzler 1996).

Süperoksit, hidroksil, peroksi radikallerini ve singlet oksijeni temizler; C vitamini oksidasyonunu engeller. Demir ve bakır iyonlarını bağlayarak etkisizleştirir ancak lipit radikalleri üzerine etkisizdir (Akkuş 1995).

#### **2.5.2.7. Bilirubin**

Hem proteinlerinin yıkım ürünü olan bilirubin aynı zamanda çok etkili bir lipit antioksidandır. Bilirubin mikromolar konsantrasyonlarda bile peroksil radikalini yakaladığı ve zincir kırıcı antioksidan olarak davrandığı gösterilmiştir (Gutteridge 1995, Krinsky 1988).

### 2.5.2.8. Albümin

Albumin vücutta birçok fonksiyonuna ek olarak bakır iyonunu bağlama yeteneğine de sahiptir ve böylece bakır iyonuna bağlı lipit peroksidasyonunu ve hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder. Albumin kandaki yağ asitlerini de taşır, ayrıca bilirubin de albumine bağlanır. İnvivo ortamda bilirubin, lipit peroksidasyonunda antioksidan olarak rol oynar. Muhtemelen in vivo ortamda bilirubin, albumine bağlı yağ asitlerinin peroksidasyonunu önleyebilmektedir (Çavdar vd 1997).

### 2.5.2.9. Seruloplazmin

Plazmada bakır taşıyan seruloplasmin, demir metabolizmasında da rol oynamaktadır. Ayrıca antioksidan özelliği de vardır. Seruloplasmin ferooksidaz aktivitesine sahiptir. 2 değerlikli ferro demiri, 3 değerlikli ferri demire okside eder. Seruloplasminin ferro-oksidad aktivitesi demir iyonuna bağlı lipit peroksidasyonunu inhibe eder

### 2.5.2.10. Transferrin

Transferrin demir metabolizmasında ana rol oynar. Çünkü nerede demire ihtiyaç varsa oraya taşır. Hücrelerin çoğu demiri plazmadan transferrin aracılığı ile alır. Transferrin (Tf) molekül ağırlığı 80 000 olan  $\beta$ 1 globulindir. Karaciğerde sentez edilen bir glikoproteindir. Yarı ömrü 8 gündür. Çok az miktarda süt bezlerinde, testislerde santral sinir sisteminde lenfosit ve makrofajlarda üretilmektedir. Transferrinin 20'den fazla polimorfik formu bulunmuştur (Murray vd 1996).

### 2.5.2.11. Melatonin

Melatonin (MEL), karanlıkta pineal bezden salgılanan; uyku, üreme, immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur. MEL' in bir antioksidan olduğu, literatürde ilk kez 1991 yılında Ianas ve ark tarafından öne sürülmüş ve daha sonra yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla desteklenmiştir. MEL' in  $\bullet$ OH,  $H_2O_2$  gibi oksidatif strese yol açabilen serbest radikalleri detoksifiye ettiği ve böylece onların biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini önleyebildiği

bildirilmektedir MEL'in antioksidan özelliği, yapısında bulunan pirol halkasından kaynaklanmaktadır. (Yazıcı ve Köse 2004).

Farmakolojik ve muhtemelen fizyolojik düzeylerdeki MEL' in; SOD gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını ya da aktivitelerini artırdığı ve bu yolla oksidatif stresi baskıladığı bildirilmektedir. Ayrıca MEL' in bazı prooksidan enzimleri inhibe ederek, serbest radikal oluşumunu azalttığı ve bu yolla da antioksidan sistemi desteklediği öne sürülmektedir. Bunların dışında MEL hem suda ve hem de lipit fazda çözünebildiğinden, organizmada çok geniş alanda antioksidan etki gösterebilmektedir. Kolaylıkla kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçebilen MEL için, bilinen hiçbir morfofizyolojik bariyerin olmaması, MEL' in tüm intraselüler komponentlere rahatlıkla ulaşabilmesini sağlamaktadır. Böylece MEL, hücre zarını, organelleri ve çekirdeği etkin bir şekilde serbest radikal hasarından koruyabilmektedir. Hücre membranı ile temas ettiğinde, fosfolipit tabakanın dış yüzeyine tutunan MEL, radikallerle membrandan önce temasa geçerek onları detoksifiye eder ve membranı korur. MEL varlığında, mitokondriyal solunum zincirinden kaynaklanan radikallerin üretimi de azalmaktadır. Çekirdeğe kadar ulaşabilme özelliği, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında, MEL' e bir üstünlük sağlamaktadır. Daha da önemlisi, diğer antioksidanların aksine, çok yüksek dozlarda (300 mg/gün) ve 5 yıl gibi uzun süre kullanımda bile, MEL' in toksik bir etki göstermemesidir (Yazıcı ve Köse 2004).

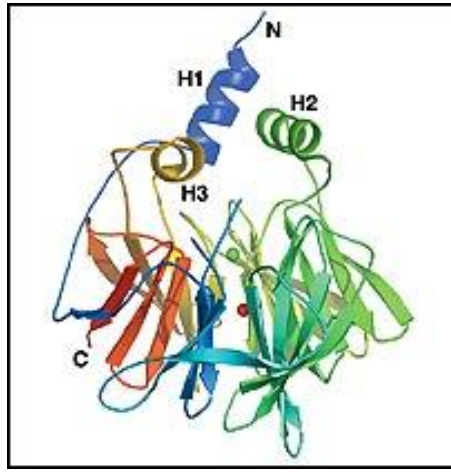
#### **2.5.2.12. Sistein**

Sistein, protein sentezi için kritik bir substrat, GSH ve taurin sentezi için hız belirleyici bir belirteçtir; aynı zamanda, hücre dışı indirgeyici ajan olarak önemli rol oynar. Sisteinin türevi olan N-asetilsistein, sistenin GSH'ye çevrilmesinde bir ara kademe veya üründür. Endojen olarak yapılabilen ve besinlerde bulunan NAC, serbest radikalleri temizleyebilen sülfidril gruplarına sahiptir. Ayrıca, hücresel redükte GSH konsantrasyonunu artırarak doğal antioksidan savunmayı güçlendirir (Parcell 2002).

N-asetil sistein, bir tiyol molekül mukolitik ajan olup L-sistein ve indirgenmiş glutatyonun prekürsörüdür. N-asetil sistein hücrelerde sülfidril gruplarının kaynağı olup, hidroksil radikali gibi reaktif oksijen radikalleriyle etkileşerek serbest radikalleri temizler (Zafarullah vd 2003).

## 2.6. Paraoksonaz

İnsan serum PON1'i (EC 3.1.8.1), 43 kDa molekül ağırlığında, 354 aminoasitten oluşan bir glikoproteindir (Gan vd 1991). Total ağırlığının %15.8' ini oluşturan üç karbonhidrat zinciri içerir. İzoelektrik noktası 5.1'dir. Aminoasit içeriği, yüksek miktarda bulunan lösin dışında bir özellik göstermez. Yapısında bulunan üç sistein aminoasidinden 284. pozisyondaki serbest iken, diğer ikisi (Cys 42-352) arasında disülfid bağı bulunur. Serbest sistein, substrat tanınması ve bağlanması için gereklidir (Lourdes vd 2001).



Şekil 2.7 . PON1 proteininin üç boyutlu yapısı (web\_1).

Maksimum PON1 aktivitesi için kalsiyum gereklidir. Üç boyutlu yapıda  $\beta$ -tabakaların merkezinde 7.4 Å aralıklı iki adet kalsiyum iyonu bulunmaktadır (Harel vd 2004). Bunlardan bir tanesi yapısal kalsiyum olup yapıdan uzaklaştırılması, tersinmez denatürasyona neden olmaktadır. Diğeri ise katalitik etkinlikte görev alan kalsiyumdur. PON1 proteinin 3 boyutlu yapısı şekil 2.7' de verilmiştir. Molekölün ortasındaki küreler kalsiyum iyonlarını temsil etmektedir. PON1'in organofosfat substratlarına karşı hidrolitik aktivitesi kalsiyuma bağımlı iken, lipit peroksitlerin birikimini önlemede kalsiyumun gerekli olmadığı bildirilmektedir (Khersonsky ve Tawfik 2005).

Paraoksonaz enzimi, organik fosforlu insektisit olan parathionun oksidatif desülfürasyonu ile oluşan paraoksonu hidroliz ederek p-nitrofenol ve dietilfosfat oluşumuna yol açar. Paraokson oluşumu karaciğer ve diğer dokularda mikrozomal

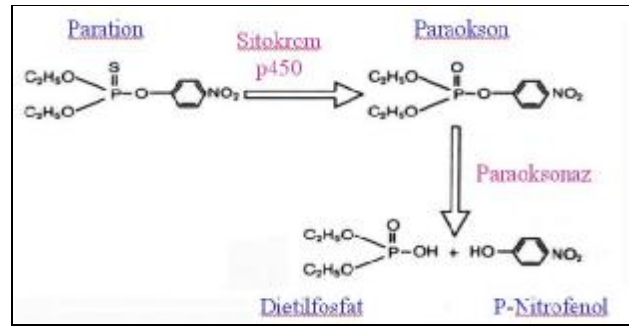
sitokrom p-450 enzim sistemi ile kataliz edilmektedir. Serum paraoksonaz enziminin, aromatik karboksilik asit esterlerini, sarin ve soman gibi sinir gazlarını, paraokson ve diazookson gibi organofosfat türevlerini detoksifiye ettiği pek çok çalışma ile gösterilmiştir. Paraoksonaz enzimi, paraoksondaki O-P ester bağının hidrolizinden sorumlu olan esterazdır (Ekmekçi vd 2004). PON, membrana bağlı iken fenilasetata karşı aktivite göstermekte ancak HDL artışı ile beraber bu aktivite azalmaktadır (Deakin ve James 2004).

Karaciğerde sentezlenen ve dolaşıma verilen PON1'in HDL yapısında yer aldığı bilinmektedir. PON1, hidrofobik N-terminal bölgesi aracılığıyla HDL lipitlerine kolayca bağlanabilmektedir. PON1'i bağlayan HDL alt birimleri, apolipoprotein AI (Apo AI) ve Apo J (klusterin) proteinlerini de içerdiğinden, Apo AI ve Apo J'nin bağlanmada rol oynayabileceği düşünülmektedir (Deakin ve James 2004).

Serum PON1 aktivitesi, yeni doğan ve prematüre infantlarda erişkin düzeyin yarısı kadardır. Erişkin düzeylerine doğumdan bir yıl sonra ulaşılır, ancak yapılan çalışmaların çoğunda ileri yaşta PON1 aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir. Serumdaki PON1 düzeyi ve aktivitesi bireyler arasında çok değişkendir. Bunun bir nedeni PON1 geninin kodlama ve promotor bölgelerinde çok sayıda polimorfizm göstermesidir. Bir diğer faktör ise beslenme şeklidir. Proaterojenik diyetin PON1 aktivite ve derişiminde önemli bir azalmaya neden olduğu saptanmış, flavonoid antioksidanların enzim aktivitesini %20 arttırdığı gösterilmiştir. Sigara içiminin PON1 derişimi ve aktivitesini azalttığı ve bu etkisinin geri dönüşümsüz olduğu saptanmıştır. Serum PON1 düzeyleri ayrıca akut faz reaktanları, gebelik ve Apo AI metabolizmasını etkileyen bozukluklardan etkilenir. Lipit düşürücü statin ve fibrat grubu ilaçlarla yapılan in vitro (hücre kültüründe) ve in vivo çalışmalarda ise çelişkili sonuçlar elde edilmiş, bir kısmında PON1 sentezi ve aktivitesi artarken diğerlerinde azaldığı gözlenmiştir (Deakin ve James 2004, Costa vd 2005).

Organofosfat bileşiklerinden parathionun (parathion) aktif katabolik metaboliti olan paraokson (o,o-dietil-o-p-nitrofenil fosfat), enzime adını verdiği gibi, aktivite tayininde de en çok kullanılan substratlardan birisidir. PON1'nin en iyi bilinen koruyucu fonksiyonu, organofosfat nörotoksinleri, aromatik karboksilik asit esterlerini ve insektisidleri hidroliz etme yeteneğidir. Toksik organik molekülleri hidroliz etmesi,

PON1'in tanımlanan ilk fizyolojik fonksiyonudur. PON1 enziminin paraoksonaz aktivitesiyle açığa çıkan p-nitrofenol veya aril esteraz aktivitesiyle açığa çıkan fenolün konsantrasyonu üzerinden, PON1 aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edilebilmektedir. Aromatik karboksilik asit esterlerinden fenil asetat, enzimin arilesteraz aktivitesinin tayininde sıklıkla kullanılmaktadır. EDTA varlığında, plazma ve karaciğer dokusu PON1 aktivitesinin inhibe olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle aktivite tayini heparinli plazmada ve tercihan serumda yapılmaktadır. Plazma ve karaciğer PON1 aktivitesi, p-hidroksimerküri benzoat veya civa varlığında nonkompetitif olarak inhibe olmaktadır. Önceleri organofosfat bileşiklerini hidroliz etme özelliği nedeniyle toksikoloji alanında üzerinde çalışılan PON1, son yıllarda antioksidan etkileri nedeniyle güncellik kazanmıştır (Başkol ve Köse 2004, Mackness vd 1996). Şekil 2.8' de paraoksonazın paraoksonu hidrolizi gösterilmiştir.



**Şekil 2.8.** Paraoksonazın paraoksonu hidrolizi

PON1'in belirlenen ikinci biyolojik fonksiyonu antiaterojenik aktiviteye sahip olmasıdır. Serum PON1 plazmada HDL ile birlikte bulunur ve plazma lipoproteinlerinin oksidasyonunu önlemede rolü olduğu düşünülmektedir. PON1 enzimi eksik olan fareler diyet ile indüklenen ateroskleroza duyarlı hale gelir. Bu enzimin plazmada her zaman HDL ile birlikte bulunmasının HDL' nin antiaterojenik etkilerine önemli katkısı vardır. Peroksidasyona uğramış olan lipitler bu enzim tarafından metabolize edildiğinden, lipit peroksitlerin hem HDL'de hem de LDL'de birikimi önlenir. Bu özelliği nedeniyle, HDL'nin LDL'yi oksidasyona karşı koruyucu etkisinden PON1 sorumludur ve bu açıdan A ve E vitaminlerinden daha etkilidir (Mackness vd 1991, Rousselot vd 1999).

Serum PON1'in ateroskleroz sürecinin başlangıç evresinde LDL fosfolipitlerini oksidasyona karşı korumada önemli olduğu ilk olarak 1991 yılında Mackness ve



arkadaşları tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir. Bu araştırmacılar, HDL'nin bakırla inkübe edilen LDL'de, lipit peroksit oluşumunu %90 oranında inhibe ettiğini, HDL'den saflaştırılan PON1'in tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddelerin (TBARS) düzeylerini ve lipoperoksit oluşumunu önlediğini göstermişlerdir (Mackness vd 1991).

PON1, lipit peroksitlerin yanı sıra hidrojen peroksit üzerine de etkilidir. Aterojenez sırasında arter duvarı hücrelerince üretilen majör toksik oksijen metaboliti olan hidrojen peroksit, oksidatif koşullarda daha potent ürünlere dönüşerek LDL oksidasyonuna neden olur. PON1'in okside LDL'deki kolesteril linoleat hidroperoksitlerini ve hidroksitleri indirgemesi nedeni ile peroksidaz benzeri aktivitesi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, lipopolisakkarid inaktivasyonu yolu ile bakteriyel endotoksinlere karşı koruma sağlamaktadır (Aviram vd 1998).

PON2, hücre içi hidroperoksitlerin üretimini azaltarak ve hücre-aracılı LDL oksidasyonunu önleyerek antiaterojenik fonksiyon göstermektedir. PON2, PON1'den sonra tanımlanmış ve daha az çalışılmış olmasına rağmen, endotel ve vasküler duvar hücrelerinde ekspresyonu ve bu hücrelerde antioksidan aktivite göstermesi nedeniyle büyük ilgi odağı olmuştur (Martinelly 2004). PON-2'nin karaciğer, böbrek, kalp, beyin, testis dokularında özellikle endotel tabakasında bulunduğu ve aortik düz kas hücrelerinde de yer aldığı immünohistokimyasal yöntemle gösterilmiştir (Bayraklı vd 2005). PON2 ve PON3'ün 105. pozisyonda lizin rezidüsü bulunmadığından paraoksonu hidroliz edemedikleri öne sürülmüştür (Ekmekçi vd 2004). PON3 esas olarak karaciğerde sentez edilir ve serumda HDL ile birlikte bulunur. PON1'in aksine PON3'ün arilesteraz aktivitesi sınırlıdır ve PON aktivitesi yoktur (Reddy 2001). Fakat hızla statin gibi laktonları hidroliz eder. Tavşan serum PON3'ünün bakırla indüklenen oksidasyondan LDL'yi korumada PON1'den daha etkin olduğu bildirilmiştir. PON1 mRNA ekspresyonu tavşanlarda akut faz yanıtı süresince baskılanmasına rağmen PON3 mRNA ekspresyonu değişmemektedir. Bu nedenle PON1 ve PON3 aterosklerozun önlenmesinde farklı roller oynuyor olabilir (Hong-Liang vd 2003).

İnsan serum paraoksonaz enziminin iki genetik polimorfizmi bulunmaktadır. Bu iki polimorfizm 55. ve 192. pozisyonlardaki aminoasitlerin değişimi ile ortaya çıkar. 192. pozisyonundaki glutamin (Q aleli) ile arginin (R aleli) değişince birinci polimorfizm; 55.

pozisyonundaki metionin (M aleli) ile lösün (L aleli) değişince 2. polimorfizm oluşur. 192. pozisyonda glutamin varlığında PON1, A Tipi; 192. pozisyonda arginin varlığında ise, B Tipi şeklinde ifade edilir. Ancak son zamanlarda A Tipi, Q izoenzimi ; B Tipi ise R izoenzimi olarak ifade edilmektedir ve PON1'in hem Q hem de R izoenzimlerinin LDL'yi oksidasyona karşı koruma özelliğine sahip oldukları gösterilmiştir. Ancak Q izoenzimi paraoksone karşı düşük afiniteye sahip iken, R izoenzimi yüksek afiniteye sahiptir (Ekmekçi vd 2004).

## 2.7. Egzersiz ve Oksidatif Stress

Son yıllarda egzersizin; radikal üretimi ve antioksidan sisteme etkisi üzerinde yoğun bir çalışma dikkat çekmektedir. Konu üzerindeki araştırmaların yoğunlaşmasında en önemli faktör, fiziksel aktivite ve egzersiz sırasında serbest radikallerin arttığına saptanmış olmasıdır (Aslan ve Şekeroğlu 1996). Fiziksel egzersizin, sağlık üzerine birçok yararlı etkisi olduğu kabul edilmektedir (Packer 1997), buna karşın egzersiz sırasında serbest radikal üretimin arttığını ve kas, karaciğer, kan ve belki de diğer dokularda oksidatif hasarın meydana geldiğini gösteren kanıtlar vardır (Witt vd 1992, Sanchez-Quesada vd 1995, Packer 1997). Egzersiz sırasında meydana gelen en belirgin biyolojik değişim, oksijen tüketim oranının artmasıdır (Ji ve Hollander 2000).

Sportif açıdan vücudun fiziksel iş yapabilme yeteneği, enerjiyi mekanik kullanıma çevirebilmesi ile ilgilidir (Açıkada ve Ergen 1990). Bu enerji, hareketin ortaya konulmasında görevli birimler olan kas hücrelerinde depolamış durumda bulunan ATP moleküllerinin parçalanması ile açığa çıkmaktadır (Açıkada ve Ergen 1990).

Anaerobik enerji yolu, çalışma için gereken enerjinin tamamını oksijenin olmadığı bir ortamda sağlanması temin eden yoldur (Açıkada ve Ergen 1990). Anaerobik enerji yolu kendi içinde iki bölümü ayrılır:

I. Laktik Olmayan Anaerobik Enerji Yolu: Her çeşit hücre aktivitesi gibi kas aktivitesi de enerjiye ihtiyaç duyar. Kas kimyasal enerjiyi mekanik enerjiye çeviren bir yapıdır (Hortobagyı vd 1991). Karbonhidrat ve lipit metabolizması yolu ile enerji meydana getirirken organik fosfat bileşikleri, örneğin ATP bütün hücrelerde bulunan bir kimyasal bileşiktir.

Her bir fosfat kökünün ayrılması ile 7,3 kkal enerji açığa çıkar. ATP'den bir fosfat kökünün ayrılması ile bileşik adenozin difosfat'a (ADP) çevrilir, ikinci fosfat kökünün ayrılması ile de adenozin monofosfat'a (AMP) dönüşür (Açıkada ve Ergen 1990). Kaslarda ATP'ye bağlı maksimum kas gücü ancak 5-6 saniye sürdürülebilecek düzeyde bir depo sağlamaktadır (Açıkada ve Ergen 1990, Noble 1986). Kasta ATP'den başka yüksek enerjili bir fosfat bileşiği daha vardır ki, bu da Kreatin Fosfat'tır (CP). Enerji kaynağı olarak kas tarafından doğrudan doğruya ATP gibi kullanılamaz, fakat CP, fosfatını kolayca ADP'ye aktarabilir ve kısa yoldan ATP yapımını sağlar.

II. Laktik Anaerobik Enerji Yolu: Anaerobik glikolizde, glukoz veya glikojen oksijene ihtiyaç göstermeden laktik asite kadar parçalanır ve meydana gelen enerji ile 4 molekül ATP sentezlenir (Açıkada ve Ergen 1990, Noble 1986).

Aerobik Enerji Yolu ise, mitokondrilerde besin maddelerinin enerji sağlamak üzere oksidasyonudur. Bir başka deyişle; glukoz, yağ asitleri ve amino asitler bazı ara işlemlerden sonra oksijenle birleşerek AMP ve ADP'nin ATP'ye çevrilmesinde, tüketilecek büyük miktarda enerji serbestleştirirler (Açıkada ve Ergen 1990, Noble 1986) Güç üretiminin maksimum hızı yönünden, aerobik sistemle, laktik anaerobik ve laktik olmayan anaerobik sistemleri ATP tüketimi ve dayanıklılık yönünden değerlendirilmeleri sırası ile Tablo III ve Tablo IV' de verilmiştir (Açıkada ve Ergen 1990, Noble 1986).

<b>Tablo 2.3.</b> ATP tüketimi bakımından aerobik ve anerbik sistemlerin karşılaştırılması (Açıkada ve Ergen 1990, Noble 1986)	
Aerobik sistem	1 mol ATP/dk
Laktik anaerobik sistem	2.5 mol ATP/dk
Laktik olmayan anaerobik sistem	4 mol ATP/dk

<b>Tablo 2.4.</b> Dayanıklılık yönünden aerobik ve anerbik sistemlerin karşılaştırılması (Açıkada ve Ergen 1990, Noble 1986)	
Laktik olmayan anaerobik sistem	10-15 saniye
Laktik anaerobik sistem	30-40 saniye
Aerobik sistem	sınırsız (besinler bulunduğu sürece)

Görüldüğü gibi fosfajen sistemi (laktik olmayan anaerobik yol) kaslarda ani güç deşarjı gerektiren patlayıcılık, sürat ve büyük kuvvet gerektiren çok kısa süreli çalışmalarda dominant olurken, laktik anaerobik yol, kuvvet ve süratte dayanıklılık gerektiren dallarda dominant; aerobik yol ise 3 dk üzerindeki çalışmalarda dominanttır (Açıkada ve Ergen 1990, Noble 1986). Aerobik ve anaerobik enerji yollarının bir egzersiz sırasında tam olarak birbirinden bağımsız olduğundan söz edilemez (Noble 1986).

Kas aktivitesi sırasında enerji ihtiyacı dinlenme durumuna oranla 35 kat artar. Fiziksel egzersiz sırasında, aktivitenin devamını sağlayabilmek için ATP molekülünün sürekli olarak sentezlenmesi gerekir ve artan enerji ihtiyacını karşılayabilmek için kan akımı, oksijen alımı ve tüketimi özellikle aktif dokuda artmaktadır. Aerobik egzersiz sırasında tüm vücuttaki oksijen tüketiminin, dinlenme durumuna göre 10 ile 20 kat arttığı gösterilmiştir (Inal 2001). Örneğin; 70 kg'lık yetişkin bir erkek dinlenme sırasında 3,5 ml/kgdk veya 352,8 L/gün veya 14,7 mol/gün O<sub>2</sub> kullanır. Kullanılan oksijenin %1 'inin O<sub>2</sub><sup>•-</sup> 'e dönüştüğü varsayıldığında, yaklaşık olarak 0,147 mol/gün veya 53,66 mol/yıl veya  $\cong$  1.7 kg/yıl 'lık süperoksit oluşumu söz konusu olacaktır (Halliwell ve Gutteridge 1999).

Reaktif oksijen türlerin üretimindeki artış, metabolik sızıntı veya kaçak olarak da tanımlanır, mitokondride süperoksit ve hidrojen peroksit üretimindeki artışı da

beraberinde getirir (Inal 2001). Oluşan kaçak (ROS üretimi) normalde toplam oksijen tüketiminin %2-5 oranında gerçekleşir (Singh 1992). Bu oran bazı kaynaklarda %2-3 olarak verilmektedir (Andrade 2000). Aerobik egzersiz sırasında enerji metabolizmasının hızlanması, hücre içinde reaktif oksijen radikallerin (ROS) konsantrasyonunu artırır. ROS üretimindeki artış, lipit peroksidasyon hızını artırır ve kasta hasara neden olur (Sen 1995). İskelet kasında egzersiz sonrası dönemde lipit peroksidasyonunun arttığını gösteren çalışmalar vardır (Radak vd 1995).

Fiziksel aktivite özellikle aşırı yapıldığı zaman organizmada ROS oluşumunu indükleyen faktörlerden biridir (Allessio 1993, Clarkson 1995, Dernbach vd 1993, Jenkins vd 1988, Salminen ve Vihco 1983). Egzersizde radikal oluşumunda, artmış oksidatif fosforilasyonun yanı sıra aşağıdaki mekanizmalar da önemlidir. Bu mekanizmalar:

I. Kalsiyum bağımlı ( $Ca^{++}$ ) ATP pompasının geçici olarak durması, kalsiyumun hücre içi konsantrasyonunun artmasına, bu da egzersiz sırasında ksantin oksidaz yolunun aktive olmasına sebep olur. Ağır egzersiz sırasında kas içi kalsiyum konsantrasyonunun artması ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza çeviren kalsiyum bağımlı proteazlarının aktivasyonuna yol açar. Ksantin oksidaz, elektron alıcı olarak  $NAD^+$  yerine moleküler oksijen kullanır ki, bu da süperoksit radikali oluşuna sebep olur.

II. Ağır egzersiz, kas kasılma ve gevşeme döngüsü sırasında meydana gelen geçici hipoksi ve reoksijenasyonu sebebiyle oksidatif stresi arttırabilir. Kasılma sırasındaki vasküler basınç iskemiyi ve böylece hipoksiyi kanıtlar niteliktedir. Gevşeme ile reperfüzyon ve bunun sonucunda reoksijenasyon meydana gelir. Hipoksi durumunda indirgenen ekivalent mitokondri elektron transfer zincirinde birikir ve redüktif stres adı verilen olay meydana gelir. Reoksijenasyonda mono elektronik indirgenmeler patlaması moleküler oksjeni süperoksit radikaline çevirebilir.

III. Lökosit aktivasyonu, egzersizin sebep olduğu kas hasarına karşı savunma mekanizmasının serbest radikal üretimini uyarır. Nötrofiller, dinlenme durumunda inaktif halde bulunan NADPH oksidaz aracılığı ile moleküler oksijeni süperoksite çevirir. Monosit ve eozinofillerin de benzer yöntemleri kullandığı gözlenmiştir.

IV. Kalsiyum konsantrasyonundaki artış fosfolipitlerden araşidonik asit salınımından sorumlu enzim fosfolipaz A<sub>2</sub>' yi aktive edebilir. Siklooksigenaz, araşidonik asit ile reaksiyonu sonucu hidroksil radikali oluşturur.

V. Hipoksi durumunda nitrik oksit radikallerinin oluşumuna önderlik eden nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesinde artış olduğu gösterilmiştir. Bu radikaller kendi başlarına zayıf prooksidan etkiye sahiptirler veya süperoksitle birleşerek peroksi nitriti oluşturur, böylece daha güçlü bir oksidan ajana dönüşür.

Reaktif oksijen türlerin üretimi, moleküler oksijen kullanan tüm yaşayan organizmalarda görülen bir olaydır (Ji 1993). Fiziksel egzersiz (aktivite), genelde reaktif oksijen türlerine dönüşen metabolik ihtiyaçların artmasına neden olmaktadır. Fiziksel egzersiz sırasında, reaktif oksijen türlerin temel kaynağının aktif kas mitokondrilerinin olduğu düşünülmektedir (Sen 1995). Egzersiz sırasında reaktif oksijen türlerin (ROS) aşırı üretimi ciddi bir şekilde antioksidan savunmayı engelleyebilir ve hücrel homeostasin değişmesine neden olabilir (Child vd 1999, Marzatico vd 1997, Mena vd 1991); böylece lipitleri, proteinleri ve nükleik asitleri etkileyen ve farklı hücrel hasarlara neden olan oksidatif stresi başlatabilir (Sen 1995). Defalarca tekrarlanan uyarıdan dolayı çok iyi kontrol edilen aerobik antrenman, genleri aşırı uyarabilir ve böylece farklı antioksidan enzimlerin aktivitesini (Mena vd 1991, Robertson vd 2003) ve glutasyon durumunu (Robertson vd 2003) artırabilir. Bu artan aktivite, sonuç olarak egzersizin neden olduğu stresin büyüklüğünü azaltır ve egzersiz sırasında meydana gelen hücrel hasarı azaltabilir (Margaritis vd 1997).

Yüksek miktarda oksijen kullanan dokularda antioksidan enzimlerinin miktarının da fazla olduğu bulunmuştur. En fazla antioksidan enzim seviyesinin karaciğerde olduğu, bunu dalak ve beyin izlerken, iskelet kası ve kalpte bu seviyenin diğerlerinin ancak yarısı kadar, eritrositte ise bunlardan daha az olduğu gösterilmiştir (Ji 1995).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler:

##### *Cihazlar:*

Homojenizatör (Art-micra D-8) , Elektronik hassas tartı (Sartorius) , Santrifüj (max. Rpm 6000) (Nüve NF 1215) , Soğutmalı santrifüj (Hettich Micro22-R), Dondurucu (-20°C) ve Soğutucu (+4°C), Ayarlanabilir otomatik pipet (Biohit Proline 100 mikrolitre, Eppendorf Research 1000 mikrolitre) , Sıcaklığı ayarlanabilir su banyosu ( BM402 Nüve), ph metre (pH Meter WTW), Vorteks (Combi-Spin Biosan), Spektrofotometre (Shimadzu UV-visible Spectrophotometer UV-1601).

##### *Kimyasal Maddeler:*

Serum fizyolojik (%0,9 NaCl, Polifarma), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck), Tiyobarbitürik asit (TBA) (Sigma), Trikloro asetik asit (Merck), CuSO<sub>4</sub> (Merck), Etanol ( %95) (Merck), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck), Na-K Tartarat (Merck), NaOH (Merck), Folin-Ciocalteu Fenal Reaktifi (Merck), Tris-HCl (Sigma), CaCl<sub>2</sub> (Merck), Paraokson (Sigma), p-nitrofenol (Merck), Fenil asetat (Sigma), Fenol Merck, NaCl (Merck)

#### 3.2. Deney Hayvanları ve Egzersiz Protokolü

Araştırmamızda, Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları merkezinden sağlanan, 18 adet 10 aylık erişkin, 250-300 gram ağırlığında erkek Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar 23 ± 2 °C sabit sıcaklıkta bir odada tutulmuşlardır. Standart yem ile beslenen ve musluk suyu verilen hayvanlar, serbest yem ve su tüketimine bırakılmışlardır. Sıçanlar rastgele olarak aşağıda gösterildiği şekilde 2 gruba ayrılmıştır.



I.Kontrol Grubu (n=9)

II.Egzersiz grubu (n=9)

Egzersiz yapan grubun koşu egzersizleri, elektrikli motor sürücülü beş yollu koşu bandında (MAY-TME 9805, Commat, Türkiye) 1.2 km/s hızda, 0° eğimde haftanın 5 günü ve her gün 30 dakika olacak şekilde, 4 hafta süreyle gerçekleştirilmiştir. Seçilen koşu egzersizi, orta-hafif şiddette %50-65 VO<sub>2</sub> maksimuma denk gelmektedir. Egzersiz yapan hayvanlar, egzersiz protokolüne başlamadan önceki bir hafta boyunca en düşük şiddetten başlamak üzere hedeflenen koşu hızına ulaşılan kadar günde toplam 10 dakikayı geçmeyecek şekilde koşu egzersizine ve koşu bandına alıştırmışlardır. İlk günler sıçanların ani yorgunluğunu engellemek amacıyla, koşu egzersizleri iki seferde yaptırılırken, protokol başlamadan önceki gün sıçanların hedeflenen hızda 10 dakika boyunca sorunsuz koşabildiği gözlenmiştir. Protokol süresince sıçanlar akım geçen ızgaralardan çoğunlukla uzak dururlarken, durmayanların ise elle uyarılarak koşmaları sağlanmıştır.

### 3.3. Deneyin Sonlandırılması ve Örneklerin Toplanması

4 hafta sonunda Ketamin (90mg/kg) / Xylazin (10mg/kg) anestezisi altında, sıçanların kalp, akciğer, karaciğer, böbrek dokuları çıkartılarak, ölçümler için kullanılmak üzere -20 C°' ye kaldırılmıştır..

### 3.4. Homojenizasyon

Tartılan dokular, 5 kat serum fizyolojik ile sulandırılıp sürekli buz içinde tutularak homojenize edilmiştir. İyice homojenize olan doku örnekleri 6.000 rpm'de +4 C° de 5 dakika santrifüj edildikten sonra supernatantlar ayrı bir tüpe alınarak enzim aktiviteleri ölçülmek üzere soğutucuya kaldırılmıştır.

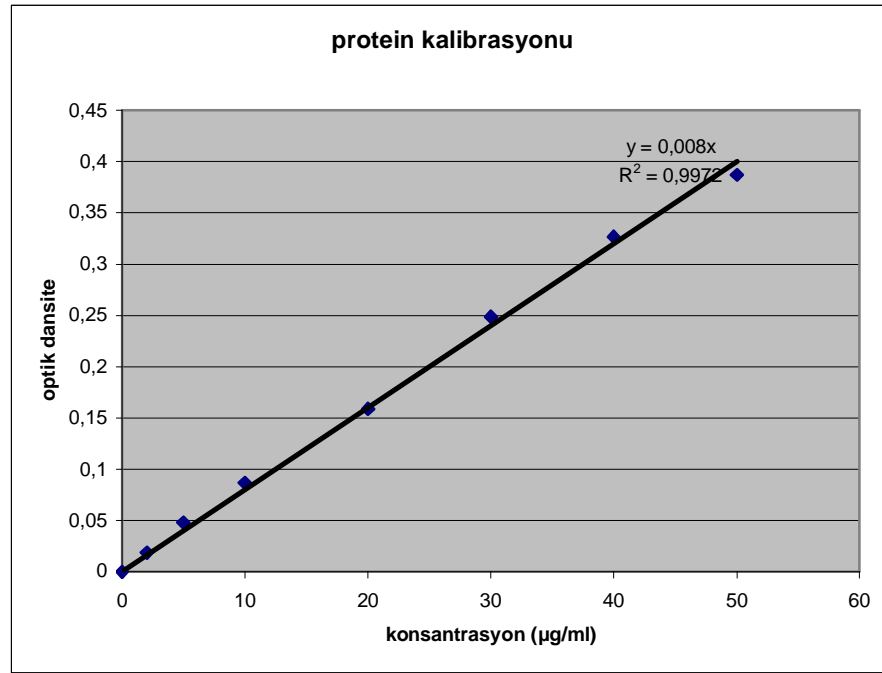
### 3.5. Lowry Metodu ile Protein Tayini

Fosfotungstik asit-fosfomolibdik asit reaktifinin fenolik grup içeren çeşitli kimyasal maddelerle reaksiyonu mavi renk vermektedir. Proteinlerin alkali ortamda bakırla

inkübasyonunu bu reaksiyonu 3-15 kat artırır. Mavi renk fosfotungstik asit ve fosfomolibdik asitin, bakır-protein kompleksi ile proteinlerin triptofan ve tirozin içeren rezidüleri tarafından, molibden mavisini ve tungsten mavisine dönmesiyle oluşmaktadır. Triptofan ve tirozin rezidüleri bakır yokluğunda da renk verirler ancak proteinin geri kalan kısmı bakır yokluğunda değil varlığında renk oluşumuna katkıda bulunur ve oluşan rengin % 75'i bakırın varlığında ortaya çıkmaktadır. (Daughaday 1952)

Protein Ölçümü için Standart Eğrisinin Hazırlanması:

Sığır serum albümininden, konsantrasyonları 2-50 µg aralığında olan standartlar hazırlandıp deney protokolüne uygulanmıştır. Elde edilen optik dansitelerin konsantrasyona karşı grafiği çizilerek elde edilen grafik eğimi protein hesaplamalarında kullanılmıştır.



Şekil 3.9. Protein standart grafiği

Protein Değerlerinin Hesaplanması:

$$\text{Protein Miktarı} = (\text{OD}_N - \text{OD}_K) / 0.008 \times 200 / 1000$$

OD<sub>N</sub> : Numune tüpünün optik dansitesi

OD<sub>K</sub> : Kör tüpünün optik dansitesi

200 : 25 µl numune 5 ml reaksiyon karışımına konduğunda seyreltme faktörü

1000 : Standart eğrisindeki birimin (  $\mu\text{g}$  )  $\text{mg}$ 'a dönüştürülmesi

0.008 : Standart eğrisinin eğimi (OD / konsantrasyon)

Kullanılan Reaktifler:

*Alkalın Tartarat Reaktifi:* 20 gr  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ve 0.5 gr Na-K Tartarat 1 litre 0.1 N NaOH çözeltisinde çözülür.

*Alkalın Tartarat-Bakır Reaktifi:* % 0.1 (w/v)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi hazırlanır. Her deneyden önce 5 ml bu çözeltiden alınıp 45 ml alkalın tartarat çözeltisi ile karıştırılır.

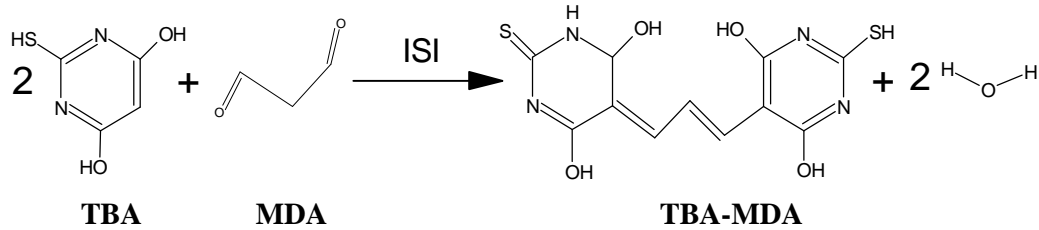
*Folin-Ciocalteu Reaktifinin Dilüsyonu:* 1ml reaktif distile suyla 50 ml'ye tamamlanır.

Protein Ölçüm Yöntemi:

	KÖR	NUMUNE
DİSTİLE SU	25 $\mu\text{l}$	---
ALKALİN BAKIR TARTARAT	4.5 ml	4.5 ml
NUMUNE (Suparnatan)	---	25 $\mu\text{l}$
TÜPLER KARIŞTIRILIR VE 15 DK BEKLETİLİR		
FOLİN CİOCALTEU REAKTİFİ	0.5 ml	0.5 ml
30 dk BEKLETİLİR ve 700 nm' de OKUNUR		

### 3.6. Malondialdehit Tayini ve Oksidasyona Duyarlılık

Malondialdehit (MDA) düzeyleri tayini lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA'nın asit ortamda tiyobarbitürik asitle (TBA) reaksiyona girerek görünür bölgede 532 nm de absorbans veren MDA-TBA kompleksi oluşturmasına dayanan spektrofotometrik yöntemle saptanmıştır (Dahle 1962).



2 molekül tiyobarbitürik asit 1 molekül MDA ile asit ortamda kaynatıldığında birleşerek TBA- MDA kompleksini oluşturmaktadırlar.

Kullanılan Reaktifler:

*Fosfat Tamponu (pH: 6 ; 100 mM):* 2.13 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve 11.56 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tartılıp distile suyla 1 litreye tamamlanır.

*TCA (Trikloro asetik asit):* % 20 TCA 0.6 N HCl.

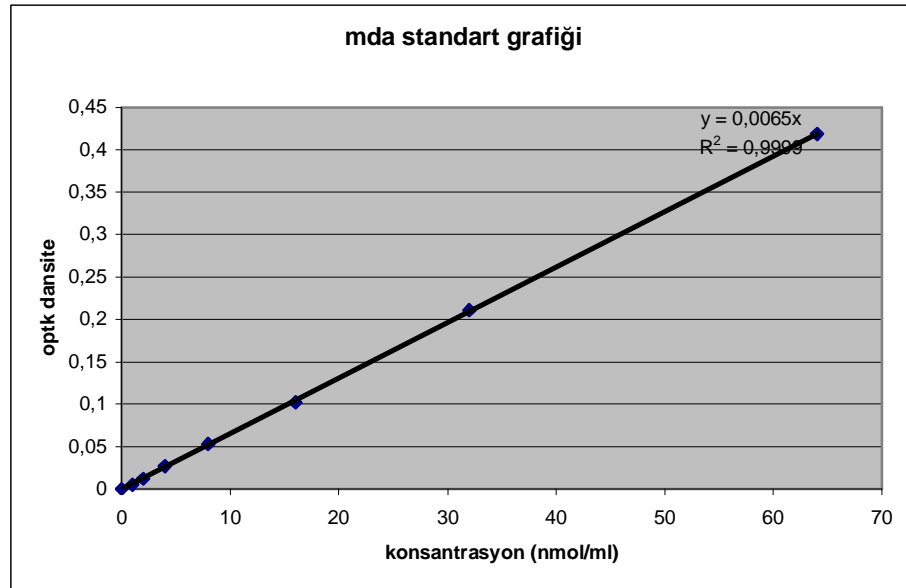
*TBA (Tiyobarbitürik Asit):* %2 w/v

*$\text{CuSO}_4$  çözeltisi:* 100  $\mu\text{M}$

*Etanol:* % 95

MDA Standart Eğrisinin Elde Edilmesi:

Standart eğri, MDA'dan hazırlanan 2-64 nmol/ml aralığındaki standart konsantrasyonlarından deney protokolündeki örneklerde olduğu gibi 100  $\mu\text{l}$  hacmin kullanılmasıyla elde edilmiştir. 2-64  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında 5 ölçüm yapılarak elde edilen değerler grafiğe yerleştirilmiştir. Grafikten eğrinin eğimi bulunarak bu değer ölçümlerde MDA konsantrasyonunun hesaplanmasında kullanılmıştır.



**Şekil 3.10.** MDA standart grafiği

MDA ölçüm yöntemi:

	BAZAL	TETİKLİ	KÖR
Numune (suparnatan)	100 µl	100 µl	100 µl
CuSO <sub>4</sub>	---	100 µl	---
37°C da 1 saat süreyle inkübe edilmiştir.			
Etanol	1 ml	1 ml	1 ml
Fosfat Tamponu	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml
TCA	1 ml	1 ml	1 ml
TBA	1 ml	1 ml	1 ml
Distile Su	0.1 ml	---	0.1 ml
Musluk altında soğutulduktan sonra 6000 rpm de 20 dk süreyle santrifüj edilmiş ve 532 nm de distile suya karşı okunmuştur.			

Oksidasyona Duyarlılık:

Örneklerin oksidasyona duyarlılığı ve MDA tayini aynı deney setinde yapılmıştır. 100 µl örnek eşit miktarda 100 µM CuSO<sub>4</sub> çözeltisi ile 37°C da 1 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında her örnek için birisi kör , diğeri bazal MDA ve üçüncüsü tetikli MDA (oksidasyona duyarlılık) olmak üzere 3 tüp çalışılmıştır. MDA değerleri, bazal MDA optik dansitesinden körün optik dansitesi çıkarılarak, oksidasyona duyarlılık ise tetikli MDA optik dansitelerinden bazal MDA optik dansiteleri çıkarılarak hesaplanmıştır.

MDA ve Oksidasyona Duyarlılığın Hesaplanması:

MDA Değerleri:

$$\text{MDA} = (\text{OD}_{\text{MDA}} - \text{OD}_{\text{K}}) / 0.0065 / \text{mg protein} : \text{nmol MDA} / \text{mg protein}$$

Oksidasyona Duyarlılık (OS):

$$\text{OS} = (\text{OD}_{\text{T}} - \text{OD}_{\text{MDA}}) / 0.0065 / \text{mg protein} : \text{nmol MDA} \cdot (\text{mg protein})^{-1} \cdot \text{saat}^{-1}$$

OD<sub>K</sub> : Kör tüpünün optik dansitesi

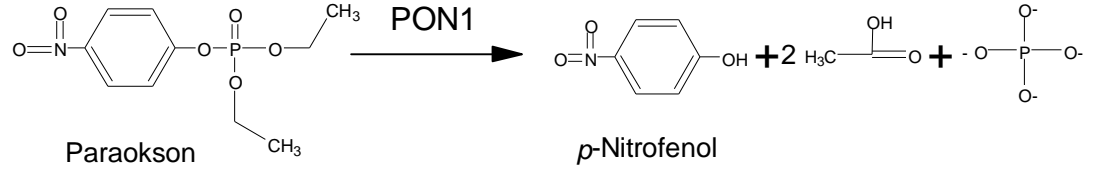
OD<sub>MDA</sub> : Numune (MDA) tüpünün optik dansitesi

OD<sub>T</sub> : Bakırla indüklenmiş numunenin optik dansitesi

0.0065 : Standard eğrinin eğimi (OD / Numune Konsantrasyonu)

### 3.7. PON Enzimi Paraoksonaz Aktivitesinin Ölçümü:

PON enziminin paraoksonaz aktivitesi ölçümünde paraokson substrat olarak kullanılmıştır. PON enzimi aşağıdaki reaksiyonu katalizlemektedir.



Reaksiyon sonucunda oluşan *p*-nitrofenol 405 nm de görünür bölgede absorbands vermektedir. Bu ürünün absorpsiyonu ölçülerek enzimin aktivitesine bakılmıştır.

#### Kullanılan Reaktifler:

*Tris-HCl Tamponu* (pH:8, 20 mM)

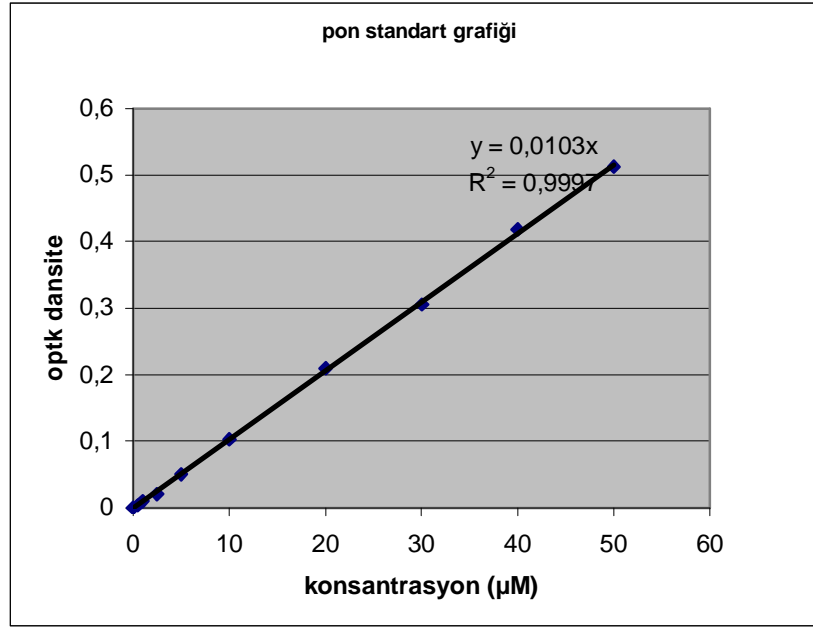
*CaCl<sub>2</sub>* (1 mM)

*Paraokson* (1 mM)

*p-nitrofenol* (0,1 mM)

#### Paraokson Standart Grafiği:

0,1 mM *p*-nitrofenolden 0.5-50 µM final konsantrasyonu verecek şekilde hazırlanan standart çözeltilerin optik dansiteleri okunarak grafik elde edilmiş ve grafiğin eğimi paraoksonaz aktivitesinin hesaplanmasında kullanılmıştır.



**Şekil 3.11.** PON enzimi paraoksonaz aktivitesi standart grafiği

Toplam 1 ml reaksiyon karışımında 20 mM tris-HCl (pH:8), 1 mM CaCl<sub>2</sub> ve 1 mM paraokson varlığında 10 µl suparnatan örneğinin aktivitesi ölçülmüştür. İlk ölçüm 10. dk' da, ikinci ölçüm 25. dk' da yapılmıştır. İlk ölçüm hesaplamalarda kör olarak kullanılmıştır. Sonuçlar bir dakikada oluşan ürün miktarı olarak hesaplanmıştır.

Enzim Aktivitesinin Hesaplanması:

$$\text{Enzim Aktivitesi} = (\text{OD}_2 - \text{OD}_1) / 0.0103 \times 100 / 15$$

nmol ürün . dk<sup>-1</sup> . ml<sup>-1</sup> serum ( mIU/ml)

OD<sub>2</sub> : 25. dakika sonunda optik dansite

OD<sub>1</sub> : 10. dakika sonunda optik dansite

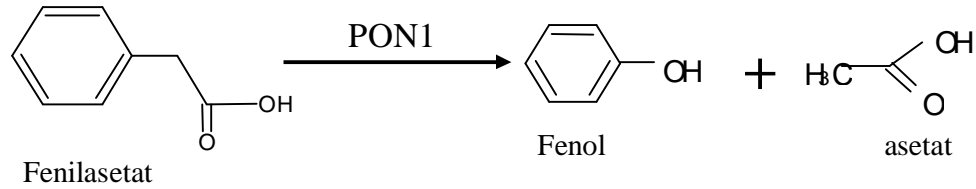
0.0103 : Standart eğrisinin eğimi ( OD / Konsantrasyon )

100 : Seyreltme faktörü 1ml serum için

15 : 1 dakikalık aktiviteyi elde etme

### 3.8. PON Enzimi Aril Esteraz Aktivitesinin Ölçümü

PON enziminin Aril esteraz aktivitesinin ölçümü için fenil asetat substrat olarak kullanılmıştır. Deneyin prensibi PON enziminin fenil asetatı fenol ve asetik aside parçalamasıyla oluşan fenolün 270 nm de absorbensinin ölçülmesine dayanmaktadır.



#### Kullanılan Reaktifler:

*Tris-HCl Tamponu* (pH:8, 20 mM)

*CaCl<sub>2</sub>* (1 mM)

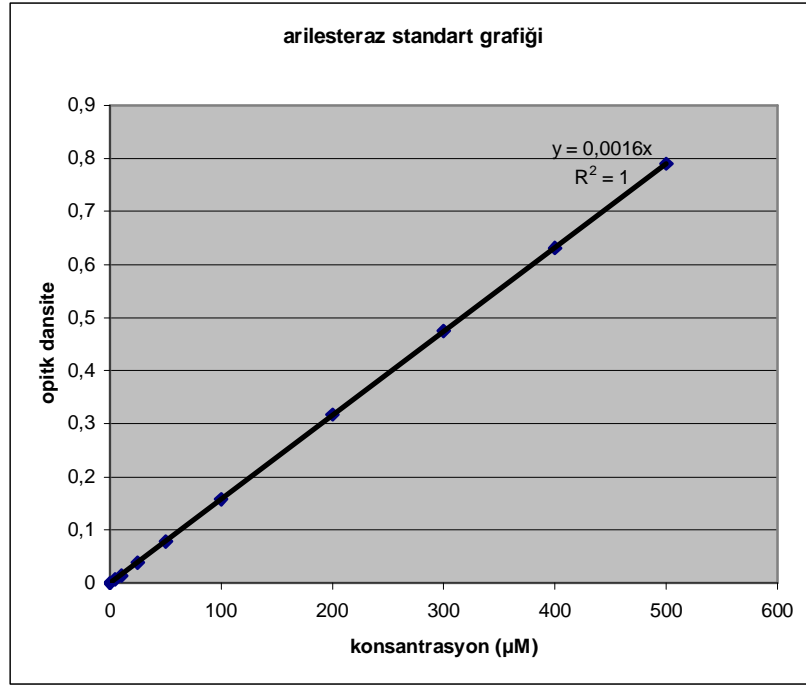
*Fenil asetat* (1 mM)

*Fenol* (0,1 mM)

#### Aril esteraz Standart Grafiği:

Aril esteraz aktivitesi için kalibrasyon eğrisi 1 mM fenol stoğundan 3-900 µM son konsantrasyon olacak şekilde 10 değişik konsantrasyonda hazırlanan standart çözeltiler kullanılmıştır. Elde edilen optik dansitelerin konsantrasyona göre grafiği çizilerek grafiğin eğimi bulunmuş ve enzim aktivitesini hesaplamak için kullanılmıştır.





**Şekil 3.12.** Arilesteraz standart grafiği

Reaksiyon toplam 3 ml hacimde 20 mM Tris-HCl (pH:8), 1 mM CaCl<sub>2</sub> ve 1 mM fenil asetat varlığında gerçekleşmiştir. 10 µl suparnatan reaksiyon tüpüne eklendikten 15 saniye sonra 1. optik dansite ölçümü, 75. saniyede ikinci okuma yapılmıştır. Birinci optik dansite hesaplamalarda kör olarak kullanılmıştır. Okumalar quartz küvetlerde yapılmıştır.

*PON1 Enzimi Aril Esteraz Aktivitesinin Hesaplanması:*

$$\text{Enzim Aktivitesi} = (\text{OD}_2 - \text{OD}_1) / 0.0016 \times 300 / 1000$$

µmol ürün . dk<sup>-1</sup> . ml<sup>-1</sup> serum ( IU/ml)

OD<sub>2</sub> : 1dk15 saniye sonunda optik dansite

OD<sub>1</sub> : 15 saniye sonunda optik dansite

0.0016 : Standart eğrisinin eğimi ( OD / Konsantrasyon )

300 : Seyreltme faktörü 1ml serum için

1000 : 1 ml deki ürün miktarı µmol olarak

### 3.9. İstatistiksel Analiz

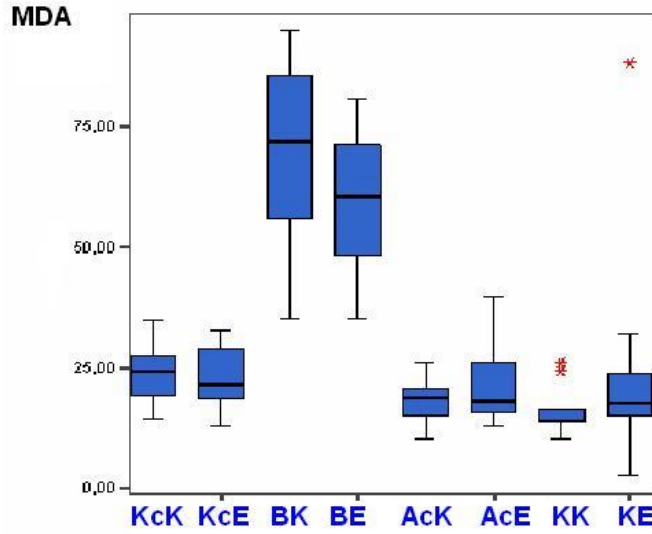
Bütün değerler ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde verilmiştir. İstatistiksel değerlendirme SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 10.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Bütün parametreler için, ikili grupların karşılaştırılması Mann-Whitney U testi ile yapılmış ve  $p < 0,05$ ' den kk değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. MDA Değerleri

Doku MDA seviyeleri nmol MDA / mg protein cinsinden bulunmuş olup, değerler sırası ile karaciğer kontrol grubunda  $23,69 \pm 6,30$  nmol/mg protein iken egzersiz grubunda  $23,47 \pm 6,75$  nmol/mg protein; böbrek kontrol grubunda  $69,36 \pm 19,68$  nmol/mg protein iken egzersiz grubunda  $59,02 \pm 15,37$  nmol/mg protein; akciğer kontrol grubunda  $18,42 \pm 5,06$  nmol/mg protein iken egzersiz grubunda  $21,94 \pm 10,24$  nmol/mg protein; kalp kontrol grubunda  $16,06 \pm 5,69$  nmol/mg protein iken egzersiz grubunda  $17,35 \pm 7,78$  nmol/mg protein şeklindedir. Doku örneklerinin kontrol ve egzersiz grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Tablo 4.5. MDA Değerleri				
Gruplar	N	Ölçülen Parametrelerin Bulunan Değerleri		p
		Kontrol nmol/mg protein ort $\pm$ std sapma	Egzersiz nmol/mg protein ort $\pm$ std sapma	
Karaciğer	9	$23,69 \pm 6,30$	$23,47 \pm 6,75$	0,965
Böbrek	9	$69,36 \pm 19,68$	$59,02 \pm 15,37$	0,174
Akciğer	9	$18,42 \pm 5,06$	$21,94 \pm 10,24$	0,958
Kalp	9	$16,06 \pm 5,69$	$17,35 \pm 7,78$	0,200



**Şekil 4.13.**

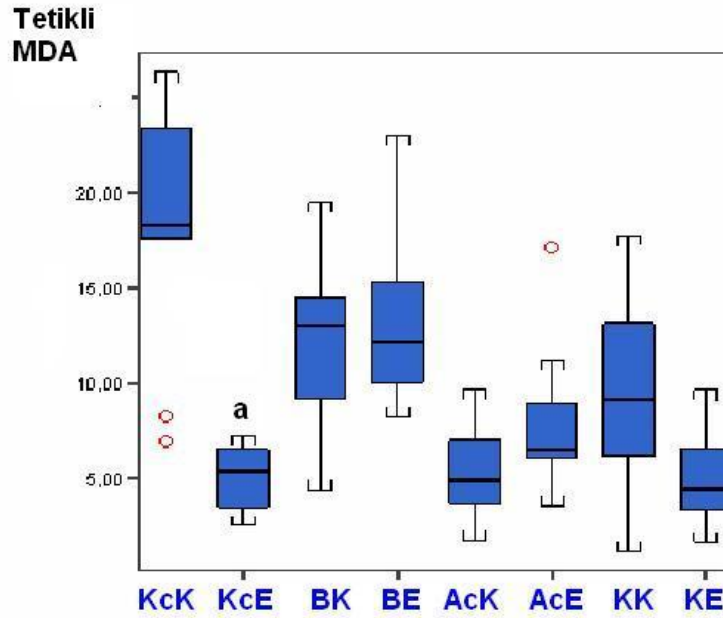
MDA Değerleri (ort±std sapma, n=10)

(KcK:Karaciğer kontrol, KcE: Karaciğer egzersiz, BK: Böbrek Kontrol, BE: Böbrek Egzersiz AcK: Akciğer Kontrol AcE: Akciğer Egzersiz KK: Kalp Kontrol, KE: Kalp Egzersiz)

#### 4.2. Tetikli MDA Değerleri

Doku Tetikli MDA seviyeleri nmol MDA / mg protein cinsinden bulunmuş olup, değerler sırası ile karaciğer kontrol grubunda  $18,11 \pm 6,71$  nmol/mg protein iken egzersiz grubunda  $5,07 \pm 1,81$  nmol/mg protein; böbrek kontrol grubunda  $12,31 \pm 4,75$  nmol/mg protein iken egzersiz grubunda  $13,78 \pm 4,96$  nmol/mg protein; akciğer kontrol grubunda  $5,33 \pm 2,20$  nmol/mg protein iken egzersiz grubunda  $8,16 \pm 4,56$  nmol/mg protein; kalp kontrol grubunda  $9,43 \pm 5,37$  nmol/mg protein iken egzersiz grubunda  $5,00 \pm 2,51$  nmol/mg protein şeklindedir. Egzersiz yapan grubun karaciğer Tetikli MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı ( $p < 0,05$ ) bulunmuştur, ancak diğer gruplar arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır.

Tablo 4.6. Tetikli MDA Değerleri				
Gruplar	N	Ölçülen Parametrelerin Bulunan Değerleri		p
		Kontrol nmol/mg protein ort±std sapma	Egzersiz nmol/mg protein ort±std sapma	
Karaciğer	9	18,11 ± 6,71	5,07±1,81	0,001
Böbrek	9	12,31 ± 4,75	13,78 ± 4,96	0,821
Akciğer	9	5,33 ± 2,20	8,16 ± 4,56	0,560
Kalp	9	9,43 ± 5,37	5,00 ± 2,51	0,068



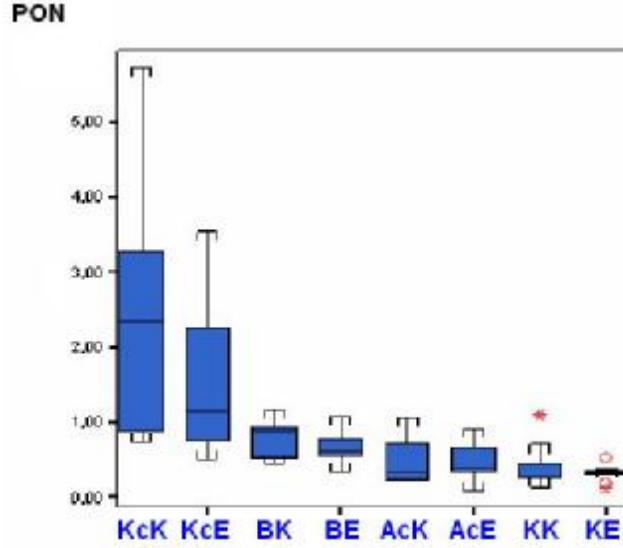
**Şekil 4.14.** Tetikli MDA Değerleri (ort±std sapma, n=10, a: p<0,05 karaciğer kontrole göre)

(KcK:Karaciğer kontrol, KcE: Karaciğer egzersiz, BK: Böbrek Kontrol, BE: Böbrek Egzersiz AcK: Akciğer Kontrol AcE: Akciğer Egzersiz KK: Kalp Kontrol, KE: Kalp Egzersiz)

### 4.3. PON Enzimi Paraoksonaz Aktivitesi Değerleri

Doku paraoksonaz aktivitesi gram protein başına düşen aktivitenin U (nmol/ml /dk) şeklinde hesaplanmasıyla bulunmuştur. Bulunan değerler mU/gram protein cinsinden sırası ile; karaciğer kontrol grubunda  $2,46\pm 1,70$  mU/gram protein iken egzersiz grubunda  $1,54\pm 1,06$  mU/gram protein; böbrek kontrol grubunda  $0,85\pm 0,22$  mU/gram protein iken egzersiz grubunda  $0,45\pm 0,38$  mU/gram protein; akciğer kontrol grubunda  $0,42\pm 0,33$  mU/gram protein iken egzersiz grubunda  $0,46\pm 0,26$  mU/gram protein; kalp kontrol grubunda  $0,42\pm 0,30$  mU/gram protein iken egzersiz grubunda  $0,31\pm 0,11$  mU/gram protein şeklindedir. Egzersiz yapan grubun böbrek paraoksonaz aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı ( $p<0,05$ ) bulunmuştur. Ancak diğer gruplar arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır.

<b>Tablo 4.7. PON Enzimi Paraoksonaz Aktivitesi Değerleri</b>				
Gruplar	N	Ölçülen Parametrelerin Bulunan Değerleri		p
		Kontrol mU/gram protein ort±std sapma	Egzersiz mU/gram protein ort±std sapma	
Karaciğer	9	$2,46\pm 1,70$	$1,54\pm 1,06$	0,229
Böbrek	9	$0,85\pm 0,22$	$0,45\pm 0,38$	0,216
Akciğer	9	$0,42\pm 0,33$	$0,46\pm 0,26$	0,757
Kalp	9	$0,42\pm 0,30$	$0,31\pm 0,11$	0,860



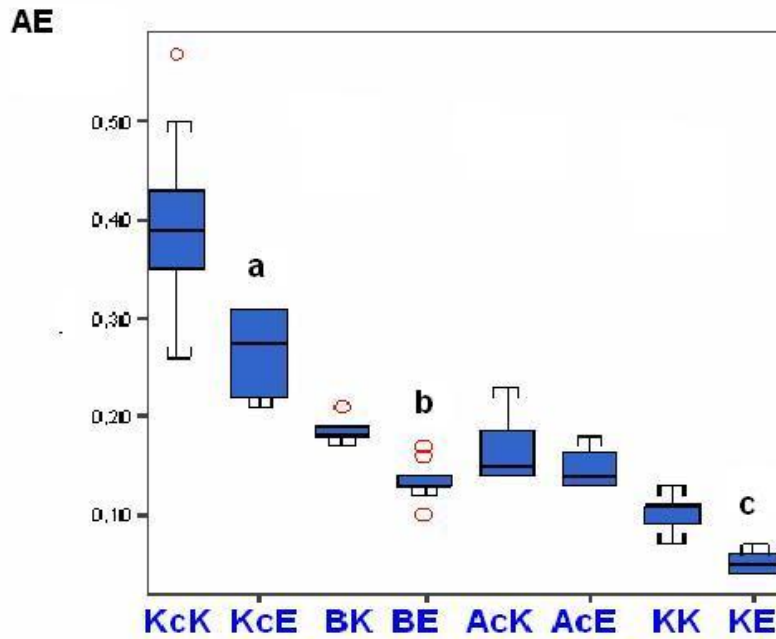
**Şekil 4.15.** PON Değerleri (ort±std sapma, n=10)

(KcK:Karaciğer kontrol, KcE: Karaciğer egzersiz, BK: Böbrek Kontrol, BE: Böbrek Egzersiz AcK: Akciğer Kontrol AcE: Akciğer Egzersiz KK: Kalp Kontrol, KE: Kalp Egzersiz)

#### 4.4. PON Enzimi Aril Esteraz Aktivitesi Değerleri

Doku paraoksonaz aktivitesi gram protein başına düşen aktivitenin U (nmol/ml/dk) şeklinde hesaplanmasıyla bulunmuş olup, değerler U/mg protein cinsinden verilmiştir. Sonuçlar sırası ile karaciğer kontrol grubunda  $0,39 \pm 0,10$  U/mg protein iken egzersiz grubunda  $0,27 \pm 0,045$  U/mg protein; böbrek kontrol grubunda  $0,17 \pm 0,06$  U/mg protein iken egzersiz grubunda  $0,12 \pm 0,05$  U/mg protein; akciğer kontrol grubunda  $0,14 \pm 0,07$  U/mg protein iken egzersiz grubunda  $0,15 \pm 0,02$  U/mg protein; kalp kontrol grubunda  $0,10 \pm 0,02$  U/mg protein iken egzersiz grubunda  $0,06 \pm 0,01$  U/mg protein şeklindedir. Egzersiz yapan grubun karaciğer, böbrek ve kalp dokularında aril esteraz aktivitelerinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı ( $p < 0,05$ ) bulunmuştur.

Tablo 4.8. PON Enzimi Arilesteraz Aktivitesi Değerleri				
Gruplar	N	Ölçülen Parametrelerin Bulunan Değerleri		p
		Kontrol U/mg protein ort±std sapma	Egzersiz U/mg protein ort±std sapma	
Karaciğer	9	0,39±0,10	0,27±0,045	0,007
Böbrek	9	0,17±0,06	0,12±0,05	0,002
Akciğer	9	0,14±0,07	0,15±0,02	0,884
Kalp	9	0,10±0,02	0,06±0,01	0,000



**Şekil 2.12.** AE Değerleri (ort±std sapma, n=10, a:  $p<0,05$  karaciğer kontrole göre, b:  $p<0,05$  böbrek kontrole göre, c:  $p<0,05$  kalp kontrole göre)

(KcK:Karaciğer kontrol, KcE: Karaciğer egzersiz, BK: Böbrek Kontrol, BE: Böbrek Egzersiz AcK: Akciğer Kontrol AcE: Akciğer Egzersiz KK: Kalp Kontrol, KE: Kalp Egzersiz)



## 5. TARTIŞMA

Serbest radikaller bir orbitalinde paylaşılmamış elektron taşıyan oldukça reaktif atom ve moleküllerdir (Cross vd 1987, Stohs 1995). Biyolojik sistemlerde sürekli oluşan serbest radikaller antioksidan savunma mekanizmaları ile nötralize edilerek zararlı etkileri engellenmeye çalışılır (Halliwell 1987). Serbest radikallerin üretimi ve antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki denge bozulduğunda serbest radikallerin düzeyi artar ve lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve DNA gibi biyolojik moleküllerde oksidatif hasar meydana gelir (Sözmen 2002).

Oksidatif hasarın derecesinin belirlenmesinde serbest radikallerin direkt ölçüm yöntemlerinin zorluğu sebebiyle daha çok serbest radikallerin biyolojik moleküllerle girdiği reaksiyonlar sonucu oluşan ürünlerin ölçülmesi yoluna gidilmektedir (Holley ve Cheeseman 1993). Bu amaçla oksidatif hasarın *in vivo* göstereci olarak en çok kullanılan belirteç serbest radikallerin doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girmesi ile meydana gelen lipit peroksidasyonunun yıkım ürünlerinden birisi olan malondialdehittir. Oksidatif hasar üzerine yapılan çok sayıda çalışma serbest radikallerin aktivitelerinin artışının bir göstereci olarak MDA düzeylerinde belirgin artışlar olduğu kanıtlanmıştır (Aktaş vd 2004).

Egzersizde enerji tüketimi ve oksijen ihtiyacı vardır. Serbest radikaller normal metabolizmanın yan ürünleri olarak ortaya çıkmakta ve egzersiz yapan kasın daha fazla oksijen tüketmesinin sonucunda ROS üretimi artacağı öne sürülmektedir. Enerji tüketiminin temel ilkesi oksidasyondur. Oksidasyon sırasında hidrojen peroksit gibi oksijen ve oksijen türevleri oldukça aktif şekilleri üretilmektedir. Radikaller membranlarındaki çoklu doymamış yağ asidi peroksidasyonuna neden olmakta, membran geçirgenliğini bozmakta ve hücre hasarı ortaya çıkmaktadır. Özellikle akut ve ağır egzersiz oksidatif hasarı tetikleyebilmektedir (Dinçer ve Kayserilioğlu 1995).

Egzersiz sırasında açığa çıkacak oksidan ve antioksidanları oranı egzersiz şiddetiyle değişim gösterir. Ağır ve şiddetli egzersizlerde hasar yapıcı oksidan sistem daha fazla aktive olurken, düzenli ve kısa süreli maksimal olmayan spor faaliyetleri antioksidan sistemleri daha fazla aktive edecektir (Duncan vd 1997, White vd 2001). Kısa süren ve oksidan sistem yerine antioksidan sistemi aktive eden ya da oluşmuş olan oksidan ürünleri süpüren bir sistem gibi egzersiz bir antioksidan mekanizma olarak çalışabilir. Değişik antioksidan enzimlerde egzersiz sonucu olan artışlar bir çok çalışmada gösterilmiştir (Duthie vd 1990, Marzatico vd 1997). Egzersizin oksidatif stres ve antioksidan sistemi üzerine etkisini araştıran çalışmaları incelediğimiz zaman çoğunlukla aerobik egzersiz formunun kullanıldığı görülmektedir (Zergeroğlu vd 1997, Şemin 1998, Bloomer ve Goldfarb 2004, Fatouros 2004).

Kronik aerobik egzersizin antioksidan savunma sistemi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya, 18-21 yaşları arasında sedanter 14 erkek gönüllü olarak katılmıştır. Çalışmaya katılan deneklere 6 hafta boyunca, haftada 3 kez bisiklet ergometresinde maksimal kalp atım sayısının %75'ine 30 dakika süren egzersiz uygulanmıştır. İlk egzersiz öncesi ve sonrası ile 3. ve 6. hafta sonunda uygulanan egzersiz öncesi ve sonrasında alınan kan örneklerinde eritrosit SOD ve KAT enzim aktiviteleri, trombosit MDA düzeyleri incelenmiştir. İlk egzersizden sonra eritrosit SOD ve KAT aktivitelerinde önemli bir fark saptanmamıştır. 3. ve 6. haftanın sonunda egzersiz sonrası eritrosit SOD aktivitesinde önemli derecede artış ( $p < 0,05$ ) kaydedilmiştir fakat eritrosit KAT aktivitesinde ve trombosit MDA düzeyinde önemli bir değişiklik saptanmamıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda, dayanıklılık antrenmanlarının antioksidan savunma sisteminin birinci basamağını güçlendirdiği söylenebilir (Zergeroğlu vd 1997).

Mena ve arkadaşları (1991) sedanter, amatör ve profesyonel bisikletçilerden oluşan 3 grupta antioksidan enzim aktivitelerini incelemişlerdir. Dinlenme durumunda, amatör bisikletçilerin SOD enzim aktivitesi sedanter bireylerden yüksek, profesyonel bisikletçilerin SOD, GPx ve KAT enzim aktiviteleri sedanter bireylerden önemli düzeyde yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Kronik aerobik egzersizin farklı dokularda (kalp kası, karaciğer, iskelet kası) antioksidan enzimler üzerine etkisini inceleyen bir başka çalışmada, sıçanlara sekiz

hafta süreyle şiddeti giderek artan egzersiz yaptırılmıştır. Sekiz haftalık aerobik egzersizlerin (ortalama koşu zamanı  $25 \pm 1$  dakika) kalp kası antioksidan enzim aktivitesi üzerine önemli değişikliklere neden olmadığı, karaciğer enzimlerinden sadece sitozolik ve mitokondrial GPx aktivitesinde anlamlı bir düşüş olduğu kaydedilmiştir. İskelet kasında SOD ve KAT aktivitelerinde antrenmana bağlı anlamlı bir değişimin olmadığı sadece kontrol grubu ile karşılaştırıldığında antrenmanlı sıçanlarda sitozolik ve mitokondrial GPx aktivitesinde anlamlı bir artış olduğu kaydedilmiştir (Ji 1993).

Gönenç ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (1995) 6-11 yaşları arasındaki çocuklar 4 hafta süreyle yüzme kursuna katılmışlar, 4 haftalık kurs sonrasında SOD değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir ( $p < 0,01$ ). Aynı kişilerde GPx değerlerinin arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, MDA değerlerinin ise azaldığı ve bu azalmanın  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar düzenli yapılan egzersizin antioksidan savunmayı güçlendirdiğini göstermektedir.

Kalsiyum verilen ratlarda egzersize bağlı antioksidan enzim seviyesini araştıran Oh-Ishi ve arkadaşları (1997); SOD, GPx ve KAT enzim aktivitelerini ölçmüşlerdir. Egzersiz sonrasında KAT ve GPx aktivitelerinin azalırken, SOD aktivitesinin değişmediğini bulmuşlardır.

Şemin ve arkadaşları (1997), egzersizden sonra farklı dokularda lipit peroksidasyon hasarının olup olmadığını araştırmak amacıyla, fareleri 7 hafta süre ile haftada 5 gün, antrenman süresi giderek artırılarak 5., 6., ve 7. haftalarda 30 dakika, 5 derece eğimde koşturarak antrene etmişlerdir. Fareler son antrenmandan 48 saat sonra 20 m/dk koşu hızında, 5 derece eğimde 60 dakika koşturulmuştur. Egzersizden hemen sonra (1 grup), 3 saat sonra (2 grup), 24 saat sonra (3 grup) ve kontrol grubundan (4 grup) gastroknemius kası, bağırsağın proksimal kısmı ve böbrek alınmıştır. Doku (iskelet kası, böbrek ve barsak dokuları) SOD aktivitelerinde gruplar arası anlamlı fark saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ). Antrene grupların (1,2,3) kas dokusunda TBARS (lipit peroksidasyon) düzeyinin kontrol grubundan yüksek olduğu saptanmıştır ( $p < 0,01$ ). Antrene farelerde 60 dakikalık egzersizden 24 saat sonra lipit peroksidasyon hasarının gözlenmesi, uzun mesafe koşularından 24 -48 saat sonra dayanıklılık sporcularında

tespit edilen hemattüri, melena gibi şikâyetlerin etyolojisinde barsak ve böbrek dokularında gözlenen oksidatif hasarın yer alabileceğini düşündürmüştür.

Bizim çalışmamızda; orta-hafif şiddette koşu egzersizi sonrasında sıçanların egzersiz ve kontrol grubu doku MDA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ( $p < 0,05$ ) bulunmamıştır. Egzersiz sonrasında, artan oksijen ihtiyacına bağlı olarak oluşan radikallerin lipit peroksidasyonunu arttırarak MDA miktarını yükseltmesi kaçınılmazdır. Ancak düzenli egzersizin antioksidan seviyesini arttırdığı göz önüne alındığında, MDA seviyelerinde anlamlı farklılık gözlenmemesi normal karşılanmalıdır. Oksidasyona duyarlılık seviyeleri karşılaştırıldığında ise, kontrol gurubuna oranla egzersiz grubunun sadece karaciğer dokusu Tetikli MDA düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ( $p < 0,05$ ) azaldığı, diğer doku gruplarındaki değişimin ise anlamlı olmadığı bulunmuştur. En fazla antioksidan enzim seviyesinin karaciğerde olduğu bilinmektedir. Düzenli egzersizin antioksidan seviyesini arttırması, doğal olarak en çok karaciğeri etkileyecektir. Bu da karaciğerde oksidasyona karşı direncin diğer dokulara oranla daha yüksek, oksidasyona duyarlılığın ise daha az olmasını açıklar niteliktedir.

İnsan serum paraoksonazı; HDL' nin içerdiği apo A-I ile yakın ilişkileri olan ve lipit peroksidasyon ürünlerinin birikmesini azaltan bir emzimidir. Diğer bir deyişle LDL'deki okside olmuş lipitleri hidroliz eden, antioksidan etki gösterdiği çeşitli kaynaklarda belirtilen ve enzim aktivitesi kalsiyuma bağımlı, karaciğerden sentezlenen bir esterazdır. İnsan serum paraoksonazı amino terminalinde hidrofobik sonlanma nedeniyle diğer lipoproteinlere ve lipit içeren partiküllere sıkı bağlanır. Bu hidrofobik bölge ile HDL'deki fosfolipitlere bağlandığı ortaya konmuştur. Apo A-I' in, paraoksonazın fosfolipitlere bağlanması ve stabilizasyonunda rol oynadığı düşünülmüştür (Mallinckrodt vd 1979).

HDL üzerindeki proteinler enzimatik (genellikle hidrolitik) aktivite gösterirler. Durrington ve ark, LDL üzerinde birikme gerçekleşmeden PON1'in lipit peroksitleri parçalamakla sorumlu olduğu hipotezini gerçekleştirmek için yaptıkları kontrollü çalışmada, saflaştırılmış PON1'in LDL'nin lipit peroksidasyonunu engellemede yüksek oranda etkili olduğunu gözlemlemiştirler (Durrington vd 2002).

HDL bağımlı PON, LDL'yi oksidasyona karşı korur. PON inhibitörlerinin eklenmesiyle, LDL oksidasyonunu artırması, hem PON inaktivasyonuna hem HDL lipitlerinin total lipit peroksit oluşumuna katılmasına bağlıdır (Williams ve Tabas 1995). HDL' ye bağlı olduğu için *invivo* serum PON' un başlıca görevi HDL' yi oksidatif stresin zararlı etkilerinden korumaktır. Bu nedenle, bir çok çalışma HDL bağımlı PON' un yalnız LDL oksidasyonunu değil, aynı zamanda HDL oksidasyonunu da (geçiş metal iyonları ve serbest radikaller aracılığıyla oksidasyon indüklendiğinde) engellediği göstermiştir (Berliner vd 1995) Bu etki PON' un lipoprotein aracılıklı peroksitleri hidroliz edebilme özelliğine bağlıdır. PON paraoksanda bulunan O ve P arasındaki ester bağımlı hidroliz edebilen bir esterazdır. Benzer ester bağı lipoprotein kaynaklı fosfolipit peroksitlerinde ve kolesterol ester peroksitlerinde bulunur. Okside olmuş lipoproteinlerde benzer bir kimyasal yapı HDL-bağımlı PON için fizyolojik substrat olabilir. Okside olmuş HDL' ler üzerine PON etki ettikten sonra, yağ asidi hidroperoksitlerinin birikimi azalır, nitekim bu ürünler hızla metabolize edilirken, PON esteraz aktivitesi azalmamıştır.

Kronik egzersizin lipit parametreleri üzerindeki etkileri, bireylerin özelliklerine ve fizik kondisyonlarına, egzersizin modalitesi, süresi ve yoğunluğuna ve farklı baseline lipit değerlerine göre değişir. Egzersizin lipit profilini düzeltmede kullandığı mekanizmalar, belirsiz olmasına rağmen, trigliseritlerden zengin lipoproteinlerin degradasyonuna yol açan lipolitik enzimlerin, egzersiz tarafından başlatılan aktivitelerinin, bir faktör olduğu görülmektedir (Burtis ve Ashwood 1996, Zubay 1993 ,Baynes ve Dominiczah 1996).

Kronik fizik aktivite artan metabolik ihtiyaca adaptasyonu yansıtan lipoprotein, lipoprotein alt grupları ve apoprotein değişiklikleri ile sonuçlanır. Lipoproteinlerdeki değişiklikler, fizik kondisyon ve egzersizin yoğunluğunun düzeyine göre değişir (Rhoads vd 1986, Favei vd 1998). Gerek kronik dinamik egzersiz gerekse akut egzersiz ile lipoprotein fraksiyonlarında değişiklikler olduğu, ayrıca boyut ve bileşimlerinin de değiştiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Doksan beş çalışmanın metaanalizleri, egzersizin total kolesterolde % 6.3, LDL kolesterolde %10.1, total kolesterol / HDL oranında % 13.4 lük bir azalma ile HDL kolesterolde % 5 lik bir artışa yol açtığı sonucuna varmıştır (Bhagavan 1992). Lipitlerde en büyük değişiklikler, egzersiz programı sırasında kilo kaybı da olan olgularda kaydedilmiştir (Total kolesterol 13.2

mg/dl, LDL kolesterol 11.1 mg/dl azalmıştır). Vücut ağırlığı arttığı zaman lipit düzeyleri olumsuz yönde etkilenmiş, vücut ağırlığı değişmediği zaman intermediate değişiklikler gözlenmiştir.

PON1 ve AE aynı gen tarafından kodlanan ve aktif merkezleri benzer olan esteraz grubundaki enzimlerdir. PON1'in polimorfik değişim gösterdiği bilinmesine karşın AE enzimi genetik polimorfik bir değişim göstermemektedir. Yine iki enzimin doğal substratları farklı olmasına karşın PON1 enzimi AE' nin doğal substratı olan fenil asetatı hidroliz edebilme yeteneğine sahiptir. Ayrıca PON1 ve AE' nin iyi bilinen ortak özellikleri organofosfatları, aril ve alkil halojenürleri hidroliz etme yeteneğidir. PON1 enzimi LDL'yi oksidasyondan koruyucu özelliği ve hidrojen peroksit de dahil olmak üzere diğer radikalleri nötralize etme kapasitesi nedeniyle antioksidan işlevde de bulunmaktadır. AE ise, PON1'deki değişimlerden etkilenmeyen asıl proteinin göstergesi olarak kabul edilmektedir (Çelik vd 2005).

Goldhammer ve arkadaşlarının (2007) yapmış olduğu bir çalışmada, 37 iskemik kalp hastasının 12 haftalık egzersiz programı sonrası serum aril esteraz aktiviteleri ölçülmüştür. Egzersiz programı öncesine göre aril esteraz seviyesinin %16,7 arttığı görülmüştür.

Brites ve arkadaşları (2005) haftada 24 saatlik, 2 hafta süren egzersiz programı sonrasında 18 sporcu erkek ve 18 sedanter bireyin PON1 ve aril esteraz aktivitelerini karşılaştırmışlardır. Polimorfizme bakılmaksızın değerlendirilme yapıldığında AE ve PON1 aktivitelerinde egzersiz yapan ve sedanter bireyler arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Polimorfizme göre karşılaştırma yapıldığında ise PON1 ve AE aktivitelerinin R allelinde azalırken Q allelinde arttığı saptanmıştır.

Önceki çalışmalara bakıldığında; düzenli egzersizin HDL kolesterol seviyesini arttırdığı buna karşın LDL seviyesini azalttığı görülmüştür. Bazı çalışmalarda PON ve AE aktivitelerinin düzenli egzersiz sonrası değişmediği görülürken, bazılarında PON ve AE aktivitelerinin arttığı görülmüştür. Bizim çalışmamızda 4 haftalık egzersiz sonucunda egzersiz yapan grubun PON aktivitesi ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Ancak anlamlı olmamakla birlikte doku aktivitelerinde azalmalar görülmektedir. Egzersiz yapan grubun AE aktivitesinin ise

karaciğer, böbrek ve kalp dokularında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı ( $p<0,05$ ) bulunmuştur. Bu da PON aktivitesindeki azalmalar ile benzerlik göstermektedir. Bir aylık egzersiz sonucunda sıçanların metabolizması egzersize uyum sağlamış, enzim ekspresyonunda azalma meydana gelmiş olabilir. Bu da enzim aktivitesinin düşmesine sebep olmuş olabilir.

## 6. SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamızda;

- ✓ Orta-hafif şiddette aerobik koşu egzersizi sonrasında sıçanların egzersiz ve kontrol grubu doku MDA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ( $p<0,05$ ) bulunamamıştır.
- ✓ Oksidasyona duyarlılık seviyeleri karşılaştırıldığında ise sadece karaciğer dokusu egzersiz grubunun kontrol gurubuna oranla Tetikli MDA düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ( $p<0,05$ ) azaldığı, diğer doku gruplarındaki değişimin ise anlamlı olmadığı bulunmuştur.
- ✓ Orta-hafif şiddette aerobik koşu egzersizi sonrasında sıçanların egzersiz ve kontrol grubu doku PON enzimi paraoksonaz aktivite seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ( $p<0,05$ ) bulunamamıştır
- ✓ Doku PON enzimi AE aktivitesinin karaciğer, böbrek ve kalp dokularında ise anlamlı şekilde azaldığı ( $p<0,05$ ) bulunmuştur.



### KAYNAKLAR

- Aalt, B., Haenen, R. M., Doelman, J. A. (1991) Oxidants and antioxidants: State of the art. *The American Journal of Medicine.*, 91(3):3-13.
- Acton, J. D. and Myrvik, Q. N. (1972) Nitrogen dioxide effects on alveolar macrophage. *Arch. Environ. Health*, 24:482-486
- Abbott, C. A., Mackness, M. I., Kumar, S., Boulton A. J., Durrington, P. N. (1995) Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 15:1812-1818.
- Açıkada, C.,Ergen, E.(1990). Bilim ve Spor. Ankara.
- Ağaoğlu, S., Ayfer, M., Fidan, Y. (1987). Bahçe Bitkileri. Ankara Üniv. No:31 Ankara
- Ağaoğlu, L., Gedikoğlu, G. (1993) Anemiler – Demir eksikliği anemisi. *Pediatrici cilt II Nobel Tıp Kitapevleri İstanbul 16: s:350-371*
- Akkuş, İ. (1995) Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimosza yayınları, Kuzucular ofset, Konya.
- Aktaş, E. O., Koçak, A., Aktaş, S., Yemişçigil, A. (2004) Intercostal variation for age estimation are the standards for the right 4th rib applicable for other ribs? *Coll Antropol.* 2:267-72.
- Akyol, Ö. (2004) Şizofrenide Oksidatif Stres. *Kocatepe Tıp Dergisi*, Cilt 5, Ek Sayı 1.
- Allen, R. G., Farmer, K. J., Newton, R. K., Sohal, R. S. (1984) Effects of paraquat administration on longevity, oxygen consumption, lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides and glutathione in the adult housefly. *Comp Biochem Physiol C*, 78(2):283-8.
- Allesio, H. M. (1993) Exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 25:218-224
- Ames, B.N., Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Sep 1;90(17):7915-22.
- Andrade, F. H. (2000) Reactive Oxygen Species and Skeletal Muscle Function, Free Radicals in Exercise and Aging, (Radak, Z., Eds), *Human Kinetics*, USA, s. 117-120.
- Asada, K. Kanematsu, S., Okada, S. And Hayakawa T. (1980) Chemical and biological aspects of superoxide and superoxide dismutase, Elsevier, Amsterdam, 136-153.
- Aslan, R., Şekeroğlu, M. R. Bayıroğlu, F., Gültekin, F. (1997) Blood Lipoperoxidation and antioxidant enzymes in healthy individuals: Relation to age, sex, exercise, air pollution and life habits. *J. Environ. Sci. Health*, 32(8):2101-2109
- Aslan, S. O., Şekeroğlu, M. R., Aslan, R., ve Bayıroğlu, F. (1996) Pentoklorofenolün tavşanlarda bazı antioksidan enzimler ile laktik asit dehidrogenaz ve kreatin kinaz düzeylerine etkisi. *Yü Vet. Derg.*, 7(1-2):99-101

- Augustin, W., Wiswedel, I. Noack, H., Reinheckel, T., Reichelt, O. (1997) Role of endogenous and exogenous antioxidants in the defence against functional damage and lipid peroxidation in rat liver mitochondria. *Mol. Cell. Biochem.*, 174 (1-2): 199-205.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C. L., Newton, R. S., Primo-Paro, S. L., La Du, B. N. (1998) Paraoxonase inhibits high density lipoprotein oxidation and preserves its functions. *J Clin Invest*, 101:1581-90.
- Aviram M. (1999) Does Paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? *Molecular Medicine Today* 5:381-386.
- Battal, A., Baykal, Y., Erikçi, S., Sağlam, K., Ünal, T., Kocabalkan, F., Aydın, A., Işşimer, A. (1995) Serbest radikal temizleyici süperoksit dismutaz enziminin ve serum, bakır, çinko, selenyum düzeylerinin diabetes mellitus'un kronik komplikasyonları ile ilişkisi. *GATA Bülteni*, 37:218-222.
- Barclay, C. W. (1993) Root resorption: aetiology, classification and clinical management. *Dent. Update.*, 20(6):248-50
- Basaga, H. S. (1990) Biochemical aspects of free radicals. *Biochem. Cell Biol.*, 68:989-998.
- Bast, A., Haenen, G. R. M. M., Cees, J. A. D. (1997) Oxidants and antioxidants: State of the art. *The American Journal of Medicine*, 91,(Suppl 3C),30,3C-2S\_3C-13S.
- Başkol, G., Köse, K. (2004) Paraoksonaz: biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemi. *Erciyes Tıp Fakültesi Dergisi*, 26:75-80.
- Baynes J, Dominiczah MH. Medical Biochemistry. Mosby, 1999.
- Bayraklı, T., Bayrak, A., Demirpençe, E., Kılınç, K. (2005) Yeni bir kardiyovasküler belirteç adayı: paraoksonaz. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 36:147-151
- Berliner, J. A., Navab, M., Fogelman, A. M., et al. (1995) Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 91:2488-96.
- Bhagavan NV. Medical Biochemistry. Jones and Bartlett Publishers, Boston, 1992.
- Bloomer, R. J., and Goldfarb, A. H. (2004) Anaerobic Exercise and Oxidative Stress: A Review. *Can. J. Appl. Physiol.*, 29(3):245-263.
- Bonnefont Rousselot D., Bastard, J. P., Jaudon, M. C., ve Delattre, J. (2000) Consequences of The Diabetic Status on The Oxidant/Antioxidant Balance. *Diabetes and Metabolism*, 26:163-176
- Breckta, A., Greenstock, C. L., Tambo, M. (1984) Advances on oxygen radicals, and radioprotectors: Mavelli, I; Ratalio, G: Enzymatic Protection Against Intracellular Oxidative Processes. p. 65-80.
- Brites, F., Zago, V., Verona, J., Muzzio, M. L., Wikinski, R., Schreier, L. (2006) HDL capacity to inhibit LDL oxidation in well-trained triathletes. *Life Sciences*, 78:3074-3081.
- Buettner, G. R. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* 300:535-543.
- Burçak, G., Andican, G. (2004) Oxidative DNA damage and aging. *Cerrahpaşa J Med*, 35: 159-169.
- Burtis, C. A., Ashwood, E. R. (1996) Fundamentals of clinical chemistry. In: Stein EA, Myers GL, eds. Lipids, Apolipoproteins and lipoproteins. 4th ed. Philadelphia: Saunders Company, 375-401.
- Buttler, T. (1961) Reducing of carbon tetrachloride in vivo and reduction of in vitro tissue and tissue constituents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 134:311-318
- Butterfield, D. A., Koppal, T., Howard, B., Subramaniam, R., Hall, N., Hensley, K., Yatin, S., Allen, K., Aksenov, M., Aksenova, M., Carney, J. (1998) Structural and functional changes in proteins induced

- by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitron and vitamin E. *Ann NY Acad Sci* 854: 448-462.
- Byung, P. Y. (1994) Cellular defenses against damage from reactive species. *Physiological Reviews* 74(1):139-172
- Carlberg I., Mannervik, B. (1985) Glutathione reductase. *Methods Enzyme.*, 113: 448-490.
- Cerutti, A. P., Mc Cord, J. M., Fridovich, I. (Eds) (1988) Oxy-radicals in molecular biology and pathology. Alan R. Liss. Inc. Pages 183-193. New York.
- Champe, P. C., Harvey, R. A. (1994) Nucleotid Metabolism In: *Biochemistry . Lippincott's Illustrated Reviews* , Lippincott Company . 343-356
- Cheeseman, K. H., Slater, T. F. (1993; Jul) An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.*, 49(3):481-93.
- Child, R., Brown, S., Day, S., Donnelly, A., Roper, H. and Saxton, J. (1999) Changes in Indices of Antioxidants Status, Lipid Peroxidation and Inflammation in Human Skeletal Muscle After Eccentric Muscle Actions. *Clin. Sci.*, 96:105-115.
- Church, D. F. and Pryor, W. A. (1985) Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implicants. *Environ. Health Perspect*, 64:111-118
- Clarkson, P. M., (1995) Antioxidants and physical performance. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35:131-141
- Clarkson, P. M., and Thompson, H. S. (2000) Antioxidants: What Role Do They Play In Physical Activity And Health?. *Am. J. Clin. Nutr.*, 72:637-646.
- Claudia Dornelles Schneider et al.(2004; Jul/Ago) Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. *Rev Bras Med Esporte*, Vol. 10, No. 4
- Cochrane, C. G. (1991) Cellular injury by oxidants. *Am J Med.*, 30;91(3C):23-30.
- Costa, L. G., Li W. F., Richter, R. J. et al. (1999) The role of paraoxonase (PON1) in the detoxication of organophosphates and its human polymorphism. *Chem-Biol Interac*, 119-120:429-438.
- Costa, L. G., Vitalone, A., Cole, T. B., Furlong, C. E. (2005) Modulation of paraoxonase (PON1) Activity. *Biochem Pharmacol*, 69:541-50.
- Craig Ve Aust, E.T., Aust, S.D. (1986) Free radicals and environmental toxins. *Annals of Emergency Medicine*, 15,9.
- Criolo, M. R., Fişkin, K., Martino, A. D., Corasaniti, M. T. Et Al. (1991) Age-Related Changes Cu-ZnSOD, Se-Dependent And-Independent Glutathione Peroxidase And Catalase Activities in Specific Areas of Rat Brain. *Mechanism of Ageing And Development* 61:287-197.
- Cross, Ce., Halliwell, B., Borish, Et., Pryor, Wa., Ames, Bn., Saul, Rl., Mccord, Jm., Harman, D. (1987; Oct) Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med.*, 107(4):526-45.
- Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T. (1997) Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji ve Transplantasyon Dergisi*, 3-4: 92-95.
- Çelik, M., Gülcü, F., Ozan, G., Gürsu, M. F. (2005) Paraoxonase and arylesterase Activity Levels in Workers Exposed to Organic Solvents. *Turkish Journal of Biochemistry*, 30 (2); 194-199.
- Dahle, L. K., Hill, E. G., Hollman, R. T. (1962) The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch Biochem Biophys*. 98: 253-261.

- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R. (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*, 329: 23-38.
- Dantzler, W.H.. (1996) Comparative Aspects of Renal Urate Transport .49 (6) : 1549-1551
- Deakin SP, James RW. (2004) Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci*, 107:435-47.
- Daughaday, W. H., Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Fields, W. S. (1952) Determination of cerebrospinal fluid protein with Folin phenol reagent. *J Lab Clin Med*. 39:663-665
- Deby, C. And Goutier, R. (1990) New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem Pharmacol* 39: 399–405.
- Dernbach, A. R., Sherman, W. M., Simonse, F. C., Flowers, K. M. and Lamb, D. R. (1993) No evidence of oxidant stress during high-intensity rowing training. *J. Appl. Physiol.*, 74:2140-2145
- Di Mascio, P., Murphy, M. E., Sies, H. (1991) Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr*. 53(1 Suppl):194S-200S.
- Dinger, C., Kayserilioğlu, A. (1995) Egzersizde oluşan lipid peroksidasyonu ve E vitaminin koruyucu etkisi. *Spor ve Tıp*, 7:20-23.
- Ding L, Z., Liu, Z., Zhu, G., Luo, D., Zhao and J. Ni. (1998) Biochemical characterization of selenium-containing catalytic antibody as a cytosolic glutathione peroxidase mimic. *Biochem J*, 332: 251-255
- Dizdaroglu, M. (1992) Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res*, 75: 331-342.
- Duncan, K., Harris, S., Ardies, C. M. (1997) Running exercise may reduce risk for lung and liver cancer by inducing activity of antioxidant and phase II enzymes. *Cancer Lett.*, 116:151-158.
- Durrington, P. N., Mackness, B., Mackness, M. I. (2002) The hunt for nutritional and pharmacological modulators of paraoxonase [Editorial]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1248-1250
- Duthie, G. G. Robertson, J. D., Maughan, R. J., Morrice, P. C. (1990) Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Arch Biochem Biophys.*, 282(1): 78-83.
- Dülger, H. Alıcı, S., Şekeroğlu, M. R. , Noyan. T., Yalçınkaya, A. (2002; Nisan) Kanserli Hastalarda Kemoterapinin Lipit Peroksidasyonu Üzerine Etkisi. *Van Tıp Dergisi* Cilt:9, Sayı: 2
- Dündar, Y., Aslan, R. (1999) Oksidan Antioksidan denge ve korunmasında vitaminlerin rolü. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 9(1-2) : 32-39.
- Eckerson, H.W, Wyte, C.M, La Du, B.N. (1983) The human serum paraoxonase/ arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet*. 35:1126-1138.
- El-Agamey, A., Lowe, G. M., McGarvey, D. J., Mortensen, A., Phillip, D. M., Truscott, T. G. (2004) Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *ArchBiochem Biophys*, 430, 37–48.
- Evelson, P., Ordonez, C. P., Llesuy, S., Boveris, A. (1997) Oxidative stress and in vivo chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. *J-Photochem-Photobiol-B*. 38(2-3):215-219
- Ekmekçi, Ö. B., Donma, O., Ekmekçi, H. (2004; Nisan-Haziran) Paraoksonaz. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*. 2(35)

- Erhan, Ö. L., Özer, A. B., Gürsu, F., Yılmaz, F., Timurkaan, N., Gülcü, F., Gülbayrak, K. (2004) Halotan İle Oluşan Karaciğer Toksisitesinin Belirlenmesinde Paraoksonazın (PON 1) Yeri *Fırat Tıp Dergisi*, 9(4): 103-107
- Failli, P., Palmieri, L., D'Alfonso, C., Giovannelli, L., Generini, S., Rosso, A. D., et al. (2002) Effect of N-acetyl-L-cysteine on peroxynitrite and superoxide anion production of lung alveolar macrophages in systemic sclerosis. *Nitric Oxide*, 7:277-82.
- Fatouros, I. G., Jamurtas, A. Z., Villiotou, V., Pouliopoulou, S., Fotinakis, P., Taxildaris, K., et al. Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining. *Med Sci Sports Exerc.*, 2004; 36: 2065-72.
- Favei, A. S., Braunwald, E. B., Isselbacher, K. J., Wilson, J. D., Martin, J. M., Kasper, D. L., et al. (1998) Harrison's principles of Internal Medicine. In: Gingsberg HN, Goldberg IJ, eds. Disorders of Lipoprotein Metabolism. 14th ed. Mc Graw-Hill, 2138-48. 16. Iliçin G, Ünal S, Biberöglü K, Akalın S.
- Flohe, L., Otting, F. (1984) Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol*, 105:93-104.
- Flohe, L., Loschen, G. (1981) Mechanism of the therapeutic effect of exogenous superoxide dismutase: findings and prospects. *Eur J Rheumatol Inflamm.* 4(2):183-200.
- Floyd, R.A. (1993) Basic Free Radical Chemistry, Free Radicals in Aging. Edited By B.P. Yu Boca Raton, F.L: Crc P. 39-55.
- Frei, B., Stocker, R., Amans, B. (1988) Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad Sci USA*, 85: 9748- 9752.
- Freeman, B. A., Crapo, J. D. (1982) Free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 47:412-425.
- Freeman, B. A., James, D., Crapo, M. D. (1982) Biology of disease: Free radicals and tissue damage. *Laboratory Investigation*, 5(47):412-423
- Fridovich, I. (1975) Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 44:147-59.
- Fritsma, G.A. (1983) Vitamin E and autooxidation. *Am J Med Technol.*, 49(6):453-456
- Gan, K. N., Smolen, A., Eckerson, H. W., La Du, B. N. (1991) Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metab Dispos*, 19:100-6.
- Gardner, H. W. (1989) *Free Radical Biol. Med.* 7: 65-86.
- Goldhammer, E., Ben-Sira, D., Zaid, G., Biniamini, Y., Maor, I., Lanir, A., Sagiv, M., (2007; May/June) Paraoxonase Activity Following Exercise-Based Cardiac Rehabilitation Program. *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation & Prevention.* 27(3):151-154
- Gonzales, R., Auclair, C., Voisin, E., Gautero, H., Dhermy, D., Boivin, P. (1984) Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer Res. Sep.* 44(9):4137-9.
- Gönenç, S., (1995) Çocuklarda Dört Haftalık Yüzme Egzersizinin Antioksidan Enzimler ve Lipit Peroksidasyona Etkisi, Uzmanlık Tezi, *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı*, İzmir, s. 45.
- Grisham, M.B., Granger, D. N. (1989; Mar) Metabolic sources of reactive oxygen metabolites during oxidant stress and ischemia with reperfusion. *Clin Chest Med.* 10(1):71-81.

- Groot, H., Rauen, U. (1998) Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol*, 12:249–55.
- Guemouri, L., Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G., Siest, G. (1991; Nov) Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem*, 37(11):1932-7.
- Gutteridge, J. M. (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem*, 41(12):1819-1828
- Hall, E. (1996) Lipid peroxidation. *Advances in Neurology*, 71: 247-257.
- Halliwell, B. (1987; Feb) Free radicals and metal ions in health and disease. *Proc Nutr Soc*, 46(1):13-26.)
- Halliwell, B. (1989; Dec.) Tell me about free radicals doctor: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, Volume 82.
- Halliwell, B. (1994; Sep 10) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 344(8924):721-4.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1984; Jun 23) Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet*, 1(8391):1396-7.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1989) Production of hydroxyl radicals in living systems. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford. Clarendon Press, 254-300.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1990; Jul) The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*. 280(1):1-8.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1999) Free radicals in biology and medicine. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Oxford
- Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., et al. (2004) Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and antiatherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol*, 11:412-9.
- Hasegawa, K. Ve Patterson, L. K. (1978) *Photochem. Photobiol*. 28:817-823.
- Henry, L.E.A., Halliwell, B., Hall, D.O. (1976) The superoxide dismutase activity of various photosynthetic organisms measured by a new and rapid assay technique. *Febs Letters*, 66,2.
- Hiraishi, H., Terano, A., Razandi, M., Sugimoto, T., Harada, T., Ivey, K. J. (1992; Jul 25) Role of cellular superoxide dismutase against reactive oxygen metabolite injury in cultured bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem*. 267(21):14812-7.
- Holley, A. E., Cheseman, K. H. (1993) Measuring free radical reactions in vivo. *Br Med Bull*. 49(3):494-505.
- Hong-Liang, L., De-Pei, L., Chihj-Chuan, L. (2003) Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress and diseases. *J Mol Med*, 81:766-79.
- Hong, S. H., Song, J., Min, W. K., Kim, J. Q. (2001) Genetic variations of the paraoxonase gene in patients with coronary artery disease. *Clin Biochemistry*, 34:475-481.
- Hortobagyi, T., et al. (1991). Effects of targeted skill development and plyometric conditioning on long jump performance in 16 years old boys. *J.of Hum.*
- Inal, M., Akyüz, F., Turgut, A., and Getsfrid, W. M. (2001) Effect of Aerobic and Anaerobic Metabolism on Free Radical Generation Swimmers. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 33:564-567.

- Imai H, K. Narashima, M. Arai, H. Sakamoto, N. Chiba and Y. Nakagawa(1998) Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 273:1990-1997
- Ishii, H., Kurose, I., Kato, S. (1997) Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress. *J Gastroenterol Hepatol*, 12: S272-282.
- Jarvik, G. P., Tsai, N. T., McKinstry, L. A., et al. (2002) Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 22:1329-1333.
- Jenkins, R. R. (1988) Free radical chemistry relationship to exercise. *Sports Med.*, 5:156-170
- Jialal, I., Fuller, Cj. (1993; Apr) Oxidized LDL and antioxidants. *Clin Cardiol.*, 16(4 Suppl 1):16-9.
- Ji, L. L., and Hollander, J. (2000) Antioxidant Defence: Effects Of Aging And Exercise, Free Radicals in Exercise and Aging (Radak, Z., Eds), *Human Kinetics*, USA, s.35-72
- Ji, L. L. (1993) Antioxidant Enzyme Response to Exercise and Aging. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 25:225-231.
- Ji, L. L. (1995) Oxidative Stress During Exercise: Implications of Antioxidant Nutrients. *Free Radic. Biol. Med.*, 18:1079-1086.
- Ji, L. L. (1996) Exercise, oxidative stress, and antioxidants. *Am J Sports Med*, 24:20-S24.
- Juretic, D., Tadijanovic, M., Rekić, B., Simean-Rudolf, V., Reiner, E., Baricic, M. (2001) Serum paraoxonase activities in hemodialyzed uremic patients: cohort study. *Clin Sci.*, 42:146-150.
- Karlsson, J. Ronneberg, R., Semb, B. (1997) Vitamins Q and E, Extracorporeal circulation and hemolysis. *Mol. Cell. Biochem.*, 173(1-2):33-41
- Kawanishi, S., Hiraku, Y., Murata, M., Oikawa, S. (2002) The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radical Biol. Med.*, 32: 822-832.
- Kehrer, J. P. (1993) Free radical as mediator of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.*, 23: 21-48.
- Keskin, H. (1981) Besin Kimyası. İstanbul Üniv. Kimya Fak. No:47 İstanbul.
- Ketterer, B., Tan, K.H., Meyer, D.J., Coles, B. (1987) Glutathione transferases: a possible role in the detoxification of DNA and lipid hydroperoxides. In: Mantle, T.J., Pickett, C.B., Hayes, J.D., eds. Glutathione S-transferases and carcinogenesis. New York: Taylor & Francis, 149-163.
- Khersonsky, O., Tawfik, D. S. (2005) Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry*, 44:6371-82.
- Kılınç, K. (1985) Serbest oksijen radikallerinin biyokimyasal etkileri ve metabolizması. *Biyokimya Dergisi*. 2:60-89.
- Kılınç, K., Kılınç, A. (2002) Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 33(2):110-118
- Kleemola, P., Freese, R., Jauhiainen, M., et al. (2002) Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. *Atherosclerosis*, 160:425-432.
- Koppenol, W. H. (1990) *FEBS Lett.* 264:165-167.
- Kovacic, P., Pozos, R. S., Somanathan, R., Shangari, N. And O'Brien, P. J. (2005) Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: Focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Curr. Med. Chem.*, 12: 2601-2623.
- Krinsky, N. I. (1988) Membrane antioxidants. *Ann N Y Acad Sci*, 551:17-32; discussion 32-3.

- Kuzuya, T., Hoshida, S., Kim, Y., Oe, H., Hori, M., Kamada, T., Tada, M. (1993; Jun) Free radical generation coupled with arachidonate lipoxygenase reaction relates to reoxygenation induced myocardial cell injury. *Cardiovasc Res.* 27(6):1056-60.
- Ladislav, F., Vera, P., Karel, tulika and Karel, Volkab (2005) *Current Analytical Chemistry*, Vol. 1, No. 1 Isler, O. (1981) Foreword. In *Carotenoids a.c Colorants and Vitamin APrecursors* (Bauenfcind, J. C., ed) p. xiii, Academic Press, New York
- Leeuwenburg, C., and L. L. Ji. (1996) Alteration of Glutathione and antioxidant status with exercise in unfed and refed rats. *J. Nutr*, 126:1833-1843
- Leeuwenburgh, C. and Heinecke J. W. (2001) Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Current Medicinal Chemistry*, 8:829-838
- Lew, A. S., Ganz, W. (1985)Thrombolysis during acute myocardial infarction. *Acute Care.* 11(1):3-39.
- Li, W.F, Costa, L.G, Furlong, C.E. (1993) Serum paraoxonase status: a major factor in determining resistance to organophosphates. *J Toxicol and Environ Health*, 40:337-346.
- Lourdes, R., Bharti, M., Durrington, P. N., Hernandez, A., Mackness, M. I. (2001)Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J*, 354:1-7.
- Maccord, J. M. ve Fridowich, I. (1969) Superoxide dismutase, an enzymic function of Erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055
- Mackness, M. I, Arrol, S., Durrington, P. N. (1991) Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low density lipoprotein. *FEBS Lett*, 286:152-4.
- Mackness, M. I, Mackness, B., Durrington, P. N, Connely, P. W, Hegele, R. A. (1996) Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipitol*, 7:69-76
- Mackness, M.I, Arroll, S.I, Mackness, B, Durrington, P.N. (1997) Alloenzymes of paraoxonase and effectiveness of high density lipoproteins in protecting low density lipoprotein against lipid peroxidation. *Lancet*, 349:851-852.
- Mackness, B, Mackness, M. I, Arrol, S, Turkei, W, Durrington, P.N. (1998) The effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Letters*, 423: 57-60.
- Maeda, N., Imazizumi, K. And Kon, K. (1987) Kinetic study on functional impairment of nitric oxide exposed rat erythrocytes. *Environ. Health.Perspect*, 73:171-175
- Marklund, S. L. (1984; May 15) Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem J.* 220(1):269-72.
- Mallinckrodt, M., Geldmacher, V., Hommel, G., Dumbach, J. (1979; Sep) On the genetics of the human serum paraoxonase (EC 3.1.1.2). *Hum Genet.*;50(3):313-26.
- Mann, P.J.G. (1932) The reduction of glutathione by a liver system. *Biochem. J*, 26: 785-790.
- Mannervik, B. (1985) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 113:490-5.
- Margaritis, I., Tessier, F., Richard, M. J. and Marconnet, P. (1997) No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. *Int. J. Sports Med.* 18:186:190
- Marsden, Hall, Brenner, (1996) Reactive nitrogen and oxygen intermediates and the kidney. In: Brenner B., Editor, *The Kidney*, fifth edition, Philadelphia, W.B Saunders, 735-753.



- Martinelli, N., Girelli, D., Oliveri, O., et al. (2004) Interaction between smoking and PON2 Ser311Cys polymorphism as a determinant of the risk of myocardial infarction. *Eur J Clin Invest*, 34:14-20.
- Marzatico, F., Pansarasa, O., Bertorelli, L. Somenzini, L., and Della Valle, G. (1997) Blood Free Radical Antioxidant Enzymes And Lipid Peroxides Following Long-Distance And Lactacidemic Performances In High Trained Aerobic And Sprint Athletes. *J. Sports Med. Phys. Fithess.*, 37:235-239.
- Matsuo, M., and Kaneko, T. (2000) The Chemistry of Reactive Oxygen Species and Related Free Radicals, Free Radicals in Exercise and Aging (Radak, Z., Eds), *Human Kinetics*, USA, s. 1-33.
- Mayne, S. T. (1996) Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans *FASEBJ*, 10:690-701
- Maxwell, S. R. (1995; Mar) Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*. 49(3):345-61.
- Mc Cord, Jm., Fridovich, I. (1969; Nov 25) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*. 244(22):6049-55.
- Mecoci, P., Beal, M. F., Polidori, M. C., Cherubini, A., Chiosne, F. (1997) Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged human brain. *Mol. Chem. Neuropatrol*, 31(1):53-64
- Meister, A. (1995) Glutathione metabolism. *Methods in Enzymology*, 251:3-7.
- Meister, A, Anderson, M.E. (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem*, 52: 711–60.
- Mead, J. F. (1989) Free radical mechanism of lipid damage and consequence for cellular membranes. *In Piyor WA, ed. Free Radicals and Biology*. New York. S:176-181
- Mena, P., Maynar, M., Guttierrez, J. M., Maynar, J., Timon, J. ve Campillo, J. E. (1991) Erythrocyte Free Radical Scavenger Enzymes in Bicycle Professional Racers. Adaptation to Training. *Int. J. Sport Med*. 12(6):563-566.
- Mercan, U. (2004) Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet . Fak. Derg.*, 15(1-2) : 91-96
- Middleton, E. J. (1998) Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol*, 439:175–82.
- Mills, G.C. (1957) Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem*, 229: 189-197.
- Mortensen, A., Skibsted, L. H, Truscott, T. G, (2001), The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Arch Biochem Biophys*, 385, 13–19.
- Murray, R. K., Granner, D. K, Mayes, P. A. and Rodwell, V.W. (1996) Harper's Biochemistry. 24th Ed., Connecticut, Appleton and Lange.
- Nair, V., Cooper, Cs., Vietti, De., Turner, Ga. (1986) The chemistry of lipid peroxidation metabolites: crosslinking reactions of malondialdehyde. *Lipids. Jan.*, 21(1):6-10.
- Nijveldt, R. J, Nood, E., Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Norren, K., Leeuwen, P. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications *Am J Clin Nutr.*, 74:418–25
- Niki, E., Yamamoto, Y., Komuro, E., Sato, K. (1991) Membran damage due to lipid oxidation. *Am. J. Clin Nutr.*, 53: 201
- Nishikimi, M., Fukuyama, R., Minoshima, S., Shimizu, N., Yagi, K. (1994) Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonolactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J Biol Chem*, 269:13685–13688.

- Nishikimi, M., Yagi, K. (1996) Biochemistry and molecular biology of ascorbic acid biosynthesis. *Subcell Biochem*, 25:17–39
- Noble, B.J. (1986). Physiology of Exercise and Sport. St. Louis. Times Mirror/Mosb, College Pub. 89-120.
- Nordmann, R., Ribière, C., Rouach, H. (1992) Implication of free radical mechanisms in ethanol induced cellular injury. *Free Rad Biol Med*, 12: 219-240.
- Nordmann, R., Ribière, C., Rouach, H. (1990) Ethanol-induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. *Alcohol Alcohol*, 25: 231-237.
- Nordmann, R. (1994) Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol Alcohol*, 29: 513-22.
- Oğuz, M. (1990) Oksijen radikalleri. *C.Ü.Tıp Fak.Der.*, 12,2.
- Oh-ishi, S., Kizaki, T.,Ookawara, T.,Toshina, K.,Haga, S., Karasawa, F. (1998) The effect of exhaustive exercise on the antioxidant enzyme system in skeletal muscle from calcium-deficient rats.*Eur J Physiol*. 435:767–774
- Packer, L. (1997) Oxidants, Antioxidant Nutrients and the Athlete. *J. Sports Sci.*, 15:353-363.
- Pal Yu B. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species . *Physiol Rev.*, 74: 139-62
- Palmer, T. 1990. Understanding Enzymes.
- Parcell, S. (2002) Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern Med Rev.*, 7:22-44
- Peters, W.H. (1988) Purification and partial characterization of human intestinal glutathione S-transferases. *Biochem. Pharmacol.*, 37(11):2288-2291
- Philis, J. W., Oxygen free radical involvement in cerebral ischemia/reperfusion injury in Thomas, C. E., and Kalyanaraman, B.(Eds), Oxygen Radicals and the Disease Process, pp. 15-41, 1997, *Harwood academic publishers.*)
- Porter, N. A. (1984) *Methods Enzymol*. 105:273-282.
- Powers S. K, Lennon S. L.(1999) Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc.*, 58(4): 1025-33.
- Prasad, K., Lee, P. (1992) Detection of ischemia- reperfusion cardiac injury by cardiac muscle chemiluminescence. *Mol. Cell Biochem.*, 115:49-58.
- Primo-Parma, S.L, Sorenson, R.C, Teiber, J, La Du BN. (1996) The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of multigene family. *Genomics*, 33:498-509.
- Rachmilewitz, D., Karmeli, F., Okan, E., Samuni, A. (1994) A novel antiulserogenic stable radical prevents gastric mucosal lesions in rats. *Gut*, 35:1181-1188.
- Radak, Z., Asano, K., Inoue, M., Kizaki, T., Oh-ishi, S., Suzuki, K., Taniguchi, N., and Ohno, H., (1995) Superoxide Dismutase Derivative Reduces Oxidative Damage in Skeletal Muscle of Rats During Exhaustive Exercise. *J. Appl. Physiol.*, 79:129-135.
- Reddy, S. T., Wadleigh, D. J., Grijalva, V., et al. (2001) Human paraoxonase- 3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 21:542-7.
- Rhoads, G. G, Dahlen, G.,Berg, K., et al. (1986) Lp(a) lipoprotein as a risk factor for myocardial infarction. *J Am Med Assoc* 256:2540.

- Rice-Evans, C. A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 20:933-56.
- Robertson, R. P., Harmon, J., Tran, P. O., Tanaka, Y. ve Takahashi, H (2003) Glucose Toxicity in Cell: Type II Diabetes, Good Radicals Gone Bad, and The Glutathione Connection. *Diabetes*, 52:581-587.
- Robison, T. V., Murphy, J. K., Beyer, L. I., Riechers, A. And Forman, H. J. (1993) Depression of stimulated arachidonate metabolism and superoxide production in rat alveolar macrophage following in vivo exposure to 0,5 Ppm No, Stimulated by A23187. *J. Toxicol Environ Health.* 38:273-279
- Rodrigo, L., Hernandez, A. F., Lopez-Caballero, J. J. , Gil, F., Pla, A. (2001) Immunohistochemical evidence for the expression and induction of paraoxonase in rat liver, kidney, lung and brain tissue implications for its physiological role. *Chem-Biol Interac.*, 137:123-137.
- Rousseau, P., Amstrong, M. (1990) Superoxide Dismutases-Production and Therapeutic Potential Pharmacological Technolooi Loruil.
- Rousselot, D. B., Therond, P., Beaudoux, J. L., Peynet, J., Legrand, A., Delatre, J. (1999) High density lipoproteins and the oxidative hypothesis of atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med.*, 37:939-49.
- Sabitha K. E., Shyamaladevi, C. S. (1999) Oxidant and antioxidant activity changes in patients with oral cancer and treated with radiotherapy. *Oral Oncol.*, 35(3): 273-7.
- Salminen, A., Vihco, V. (1983) Endurance training reduces the susceptibilty of mouse skeletaimuscle to lipid peroxidation in vitro. *Acta Physiol Scand*, 117:109-113.
- Sanchez-Quesada, J. L., Holms-Serrade-sanferm, R., Serrat-Serrat, J., Serra-Grima, J. R., Gonzalez-Sastre, J., and Ordonez- Llanos, J. (1995) Increase of LDL Susceptibility to Oxidation Occuring After Intense, Long Duration Aerobic Exercise. *Atherosclerosis*, 118: 297-305.
- Sebastian J. Padayatty, MRCP, PhD, Arie Katz, MD, Yaohui Wang, MD, Peter Eck, PhD, Oran Kwon, PhD, Je-Hyuk Lee, PhD, Shenglin Chen, PhD, Christopher Corpe, PhD, Anand Dutta, BS, Sudhir K Dutta, MD, FACN, and Mark Levine, MD, FACN (2003) *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1):18-35.
- Sen, C. K. (1995) Oxidants and Antioxidants in Exercise. *J. Appl. Physiol.*, 79:675-686.
- Seymen, H. O., Mengi, M., Özçelik, D., ve ark. (1999) Effect of iron overloading on the plasma copper and the zinc levels. *Cerrahpaşa J Med.* 30 (2): 155-58
- Shacter, E. (2000) Protein oxidative damage. *Methods Enzymol.*, 319: 428-436.
- Singh, V.N. (1992) A Current Perspective on Nutrition and Exercise. *J. Nutr.*, 22:760-765
- Smirnoff, N., Pallanca, J. E. (1995) Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 24:16.
- Snel, C.A.W., Zhao, Y., Mulder, G.J., Pang, K.S. (1993) Methods for the quantitation of bromosulphophthalein and its glutathione conjugate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, 212: 28-34.
- Sogorb, M. A., Vilanova, E. (2002) Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis . *Toxicol Lett.*, 128:215-228.
- Southorn, P. A., Powis, G. (1998) Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc.*, 63(4):381-9.
- Sözmen, E. Y. (2002) Radikal Kavramı ve Oksijen Radikalleri, İnsan Biyokimyası, (Onat, T., Emerk, K. ve Sözmen, E.Y., Eds.), *Palme Yayıncılık*, Ankara, s. 666-673.

- Stahl, W., Sies, H. (2002) Introduction: Reactive oxygen species. Research Monographs, 1-2.
- Stratton, S. P., Liebler, D.C. (1997) Determination of singlet oxygen –specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: effect of beta-carotene and alpha-tocopherol. *Biochemistry*, **21**. 36(42): 12911-12920
- Stohs, S. J. (1995) The role of free radicals in toxicity and disease. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 6(3-4):205-28. Review
- Sutherland, W. W. F., Walker, R. J., De Jong, S. A., et al. (1999) Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19:1340-1347.
- Şekeroğlu, M. R. Aslan, R., Tarakçoğlu, M., Algün, E ve Kara, M. (1997) Sigara kullananlarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan aktivite. *T. Tüber. Toraks. Der. Derg* (Baskıda)
- Şemin, I., Kayatekin, B.M., Gönenc, S., Açıkgöz, O., Uysal, N., Delen, Y., ve Güre, A. (1998) Antrene Farelerde Bir Saatlik Egzersizin İnce Bağırsak, Böbrek ve Kas Dokusunda Lipit Peroksidasyonuna ve Antioksidan Enzimlere Etkisi. *Spor Bilimleri Dergisi Hacettepe J. Sport Sci.*, (9) 4: 33-40.
- Tanakol, R. (1998) Antioksidan vitaminler: Hastalıkta ve sağlıkta önemleri. *Klinik Gelişim*, 11:347-357.
- Tekman, Ş., Öner, N. (1981) Genel Biokimya. İstanbul Üniv. Eczacılık Fak. No:30 İstanbul.
- Tekkes, Y. (2006) Streptozotisin ile diabe oluşturulmuş farelerde aspirin ve e vitamininin dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kahramanmaraş, 66s
- Thomas, D. B. (1989) The Glutathione-s-transferases; An update. *Hepatology*. 9(3): P.486-96.
- Thomas, M. J., (1995) The role of free radicals and antioxidants. How do we know that they are working? Critical Rew. *Food. Sci. And Nutrit.* 35(1-2):21-39
- Tudhope, G.R. (1967) Red cell catalase in health and in disease , with reference to the enzyme activity in anaemia. *Clin. Sci*, 33:165-182.
- Uehleke, H. And Werner, T. H. (1975) A comparative study on the irreversible binding of labeled halothane trichlorofluoromethane. *Arch. Toxicol*. 34:289-294
- Urani, C., Crippa, S., Camatini, M., (1998) Cellular and molecular responses of metal-induced toxicity. *Toxicol. Lett.*, suppl. 1:195.
- Ünal, D. (1999; Mart) Serbest radikaller. *Sendrom*, 68-80.
- Wheeler, C. R., Salzman, J. A. (1990) Automated assays for superoxide dismutase, catalase, Glutathione peroxidase and Glutathione reductase activity. *Analytical Biochemistry*. 184:193-199.
- White, A., Estrada, M., Walker, K., Wisnia, P., Filgueira, G., Valdes, F., Araneda, O., Behn, C. And Martinez, R. (2001) Role of exercise and ascorbate on plasma antioxidant capacity in thoroughbred race horses. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A Molecular and Integrative Physiology*, 128:99-104.
- Witt, E. H., Reznick, A. Z., Viguie, C. A., Starke-Reed, P., and Packer, L. (1992) Exercise, oxidative damage and the effects of antioxidant manipulation. *J. Nutr.*, 122: 766-73.
- William, B.J.. (1980) Glutathione-s-transferases; An overview. enzymatic basis of detoxication, Vol: 1 and 2 Acad. Press, New York.

- Williams, K. J., Tabas, I. (1995) The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:551–61
- Winrow, V. R., Winyard, P. G., Morris, C. J., Blake, D. R. (1993) Free radicals in Inflammation. Second messengers and mediators of tissue destruction. *British Medical Bulletin*, 49(3):506-522.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.*, 266:37–56.
- Van-Der-Meulen, J. H., McArdle, A., Jackson, M. J., Faulker, J. A. (1997) Contraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats: the role of vitamin E. *J. Appl. Physiol.*, 83(3):817-823
- Vermeulen, N.P.E. (1990) Analysis of mercapturic acids as a tool in biotransformation, biomonitoring and toxicological studies. "Glutathione-S-transferases and Drug Resistance" Taylor and Francis London 1: 141-153.
- Yagi, K. (1987) Lipid peroxides and human diseases. *Chem and Phy of Lipids*. 45: 337-351
- Yan, H. and J. J. Harding (1997) Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem J* 328, 599-605
- Yaren, H., Karayılanoğlu, T. (2005) Radyasyon ve insan sağlığı üzerine etkileri. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 4(4)
- Yazıcı, C., Köse, K. (2004) Melatonin: Karanlığın antioksidan gücü *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13(2):56-65.
- Zafarullah, M., Li, W. Q., Sylvester, J., Ahmad, M. (2003) Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.*, 60: 6-20.
- Zergeroğlu, A. M. ve Yavuzer, S. (1997) Supramaksimal Egzersizin Eritrosit Antioksidan Enzimler Üzerine Etkisi. *Spor Bilimleri Dergisi Hacettepe J Sport Sci*, (8) 4,13-24.
- Zergeroğlu, A. M., Ersöz, G. ve Yavuzer, S., (1997) Dayanıklılık Antrenmanlarında Antioksidan Savunma. *Spor Bilimleri Dergisi Hacettepe J. Sport Sci*,(8)4:25-31.
- Zhao, Y., Snel, C. A. W., Mulder, G. J. and Pang, K. S. (1993) Localization of glutathione conjugation activities toward bromosulphophthalein in perfused rat liver: Studies with the multiple indicator dilution technique. *Drug Metab. Dispos.*, 21: 1070-1078.
- Zima, T., Fialova, L., Mestek, O., Janebova, M., Crkovska, J., Malbohan, I., Stipek, S., Mikulikova, L., Popov, P. (2001) Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *J Biomed Sci.*, 8: 59-70.
- Zubay G. Biochemistry. Third edition, Brown Publishers, 1993.
- WEB\_1(2007): <http://news.bbc.co.uk/1/hi/sci/tech/3671827.stm> (12.05.2007)

## **ÖZGEÇMİŞ**

12.03.1979 tarihinde Antakya' da dünyaya gelen I. Dicle DEMİRAYAK, ilk öğretimini İzmir Fevzi Özakat İlkokulu, orta öğretimini İzmir İnönü Lisesi, lise öğretimini ise İzmir Selma Yiğitalp Lisesi' nde tamamladı. Yüksek öğrenimine Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü' nde devam ederek, 2003 yılında lisans diploması almaya hak kazandı ve 2004 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Yabancı dili İngilizce' dir, evlidir.