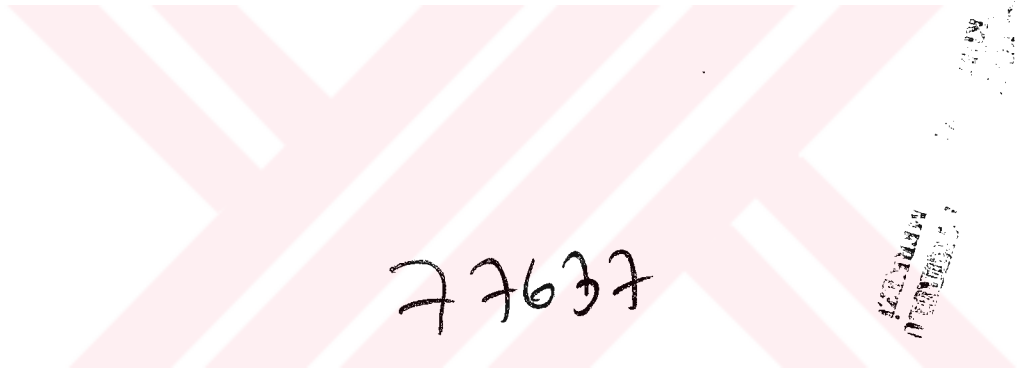


77637



77637

ÖZET**YÜKSEK LİSANS TEZİ****7,12-DMBA’NIN KARACİĞER ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ İLE
ANTIÖKSİDAN VİTAMİN E - Se’ UN KORUYUCU ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ****Kadir BATCIOĞLU****FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI****1998, Sayfa : 49**

Serbest radikal biyokimyası son yıllarda birçok yönleri ile dikkatleri üzerinde yoğunlaştırmıştır. Serbest radikaller yapıları,fiziksel ve kimyasal özellikleri hücrel kaynakları,rol oynadıkları tepkimeler ve etkileri ile klinik durumların patogeneğinde önemli rol oynarlar.

Organizmada enerji elde etmek amacıyla oksijen yardımıyla glukozun karbondioksit ve suya kadar parçalandığı metabolik reaksiyonlar sırasında hidrojen atomları elektronlarla birlikte oksijen molekülüne taşınır ve su oluşur. Canlı organizmada bu işlem sırasında moleküller tekil oksijen,hidroksil,süperoksit anyonu vb. adlar alan ve reaktif oksijen türevleri olarak bilinen serbest radikaller oluşturmaktadır. Bu radikallerin tümünün bazı faydalı işlevlerinin yanı sıra biyolojik sistemler için oldukça zararlı oldukları bilinmektedir. Çünkü bu radikaller protein inaktivasyonuna, DNA’da oksidatif hasara ve lipid peroksidasyonuna neden olup hücrenin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü bozarak hücreye zarar verirler.

Canlı organizmayı oluşturan her hücrede adı geçen bu radikallere karşı süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-PX), glutatyon

redüktaz (GSSGR) vb. enzimlerden oluşan radikal süpürücü enzim sistemi adı verilen bir savunma mekanizması ile A,E,C gibi antioksidan vitaminler ve melatonin gibi yardımcı savunma sistemleride mevcuttur. Bu savunma mekanizmaları oksidatif stres yaratan kirli hava, sigara, radyasyon gibi faktörlerle beraber dış ve iç etkenler karşısında bazı durumlarda yetersiz kalabilmektedir. Bunun sonucunda kanser, diabetes mellitus, aterosklerozis, keshan hastalığı, akciğer rahatsızlıkları vb. patolojik durumlar ortaya çıkabilmektedir.

Bu çalışmanın konusu, kanserojen bir madde olan 7,12-DMBA'nın (Dimetil benzantrasen) farelere enjeksiyonu sonucunda antioksidatif savunma sisteminde meydana gelebilecek değişikliklerin ortaya konması karsinogenezisin enzimatik ilişkisinin araştırılması ve sonuçta antioksidatif savunma mekanizmasında rol alan radikal süpürücü enzim düzeylerindeki değişimin vitamin E-Se kombinasyonu ve melatoninin enjeksiyonuna bağlı olarak izlenmesi ve aralarındaki muhtemel bir ilişkinin araştırılmasıdır.

Çalışmalarımızın sonucunda ;

GSH-Px aktivite ölçüm sonuçları ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein) kontrol, vitamin E + Se, DMBA ve melatonin grupları için sırasıyla 0.8999 ± 0.0659 ; 0.6130 ± 0.0383 ; 0.4230 ± 0.0620 ; 0.6700 ± 0.0688 olarak bulundu. Grupların tümü kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Ayrıca vitamin E + Se ve melatonin grubu DMBA grubuyla da karşılaştırıldı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı($p<0,05$).

CAT aktivite ölçüm sonuçları ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein) kontrol, vitamin E + Se, DMBA, ve melatonin grupları için sırasıyla 136.4130 ± 9.5454 ; 115.3830 ± 5.4976 ; 118.4800 ± 5.1699 ; 138.7030 ± 19.0014 olarak bulundu. Benzer şekilde grupların tümü kontrol grubuyla karşılaştırıldı ve vitamin E + Se grubu ile melatonin grubu DMBA grubuyla da karşılaştırıldı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu($p<0.05$).

SOD aktivite ölçüm sonuçları ($\mu\text{g}/\text{mg}$ total protein) kontrol, vitamin E + Se, DMBA ve melatonin grupları için sırasıyla 2.4035 ± 0.2016 ; 1.6210 ± 0.0584 ; 1.8790 ± 0.1069 ; 2.2630 ± 0.2447 olarak bulundu. Yine grupların tümü kontrol grubuyla ve vitamin E + Se ile melatonin grupları benzer şekilde DMBA grubuyla karşılaştırıldı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu($p<0,05$).

Mevcut bulgular ışığında řu sonuca varılabilir; 7,12-DMBA gibi güçlü bir karsinogen madde enjeksiyonu fare karaciğeri antioksidan enzimlerinde belirgin bir azalmaya neden olmaktadır. Bunun yanısıra koruyucu olarak vitamin E + Se kombinasyonu ve melatonin enjekte edilen gruplarda bu azalma önemli ölçüde önlenebilmektedir.

Anahtar Kelimeler : Serbest Radikaller, Antioksidanlar, Kanser.



ABSTRACT

Ms Thesis

**EXAMINING THE EFFECTS OF 7,12-DMBA ON LIVER ENZYMES ACTIVITIES
AND PREVENTIVE PROPERTIES OF ANTIOXIDANT VITAMIN E-Se**

Kadir BATCIOĞLU

Firat University

Graduate School of Natural And Applied Sciences

Department of Chemistry

1998, Page : 49

Free radical biochemistry has drawn attention recently. Free radicals have important roles on pathogenesis of clinical situations with their structure; physical and chemical properties, resources of cells and the reactions they take place and their effects.

Glucose is scattered as carbon-dioxide and water in the organism in order to obtain energy. During these metabolic reactions hydrogen atoms with electrons are carried over oxygen and water comes about. In a living organism, during this process molecules make up free radicals known as derivatives of reactive oxygen such as singlet oxygen, hydroxyl, superoxide anions. It is known that, besides their useful sides all of these radicals are quite harmful for biological systems. Because these radicals cause protein inactivation, oxidative harm, on DNA and lipid peroxidation. So, they harm the cell by destroying the structural and functional integrity.

However, in any cell, which makes up living organism, against the radicals that mentioned above a defence mechanism which is called as a radical sweeper enzymes which consists of some enzymes like SOD, CAT, GSH-PX, GSSGR eg.; and some assistant defence systems like vitamins A, E, C and melatonin exist. These defence

systems can be insufficient in some cases especially against some internal and external factors like dirty air, cigarette, radiation, which make up oxidative stress. At result, some pathological situations like cancer, diabetes mellitus, atherosclerosis, Keshan disease and lung diseases may appear.

The subject of our study is to search for the changes on the antioxidative defence system after injecting 7,12-DMBA which is a carcinogen substance into mice and the enzymatic relationship of carcinogenesis and as a result the changes in the levels of radical sweeper enzyme which a role in antioxidative defence system depending on Vitamin E –Se combination with melatonin's injection and a possible relationship between them.

At the result of our study;

Measurement results of GSH-Px activity ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein) control groups for Vitamin E +Se, DMBA and melatonin were subsequently $0,8999 \pm 0,0659$; $0,6130 \pm 0,0383$; $0,4230 \pm 0,0620$; $0,6700 \pm 0,0668$. All the groups were compared to control group. Moreover, Vitamin E+Se and melatonin groups were compared to DMBA group and statistically significant results were found. ($p < 0,05$).

CAT activity measurement results ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein) for Vitamin E+Se, DMBA and melatonin control groups were subsequently $136,4130 \pm 9,5454$; $115,3830 \pm 5,4976$; $116,4800 \pm 5,1699$; $138,7030 \pm 19,0014$.

SOD activity measurement results were ($\mu\text{g}/\text{mg}$ total protein) control group for Vitamin E+Se, DMBA and melatonin were subsequently $2,4035 \pm 0,2016$; $1,6210 \pm 0,0584$; $1,870 \pm 0,01060$; $2,2630 \pm 0,2447$. All the groups were compared to control group and ; Vitamin E+Se and melatonin groups were similarly compared to DMBA group. Statistically significant results were found between them ($p < 0,05$). Using those available findings we can reach that consequence; Injecting 7,12-DMBA which is a carcinogen substance causes a prominent decrease of antioxidant enzyme in the liver of a mouse. Besides, injecting preventive Vitamin E+Se combination and melatonin prevent this decrease a great deal.

Key Words: Free Radicals, Antioxidants, Cancer.

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleşmesinde yardımlarını esirgemeyen, her konuda desteğini ve hoşgörsünü gördüğüm danışman hocam Doç.Dr.Sait elik’e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın deneysel aşaması boyunca sağlamış olduğu laboratuvar imkanları ve deneyler sırasında karşılaştığım her sorunda göstermiş olduğu yakın ilgiden dolayı Yrd.Doç.Dr.Alev Karagözler’e teşekkür ederim.

Sonuçların istatistiksel hesaplarının yapılmasındaki yardımlarından dolayı Yrd.Doç.Dr.Metin Genç’e teşekkür ederim.

Bu çalışmaya maddi destek sağlayan FÜNAF saymanlığına teşekkür ederim.

Son olarak tüm çalışmam boyunca bana sabırla katlanan aileme teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER	Sayfa
1.Giriş	1
1.1.Serbest radikaller hakkında genel bilgiler.....	1
1.2.Serbest radikallerin biyolojik kaynakları.....	4
1.3.Serbest radikallerin reaksiyonları ve etkileri.....	6
1.3.1.Oksijen radikallerinin biyolojik sistemlerdeki etkileri.....	8
1.4.Lipid peroksidasyonu.....	10
1.5.Serbest oksijen radikalleri-Kanser ilişkisi.....	11
1.6.Organizmanın antioksidan savunma mekanizmaları.....	15
1.7.Süperoksit Dismütaz.....	18
1.8.Katalaz.....	19
1.9.Glutatyon Peroksidaz.....	19
1.10.Glutatyon Redüktaz.....	22
1.11.Glutatyon	22
1.12. Vitamin E.....	23
1.13. Vitamin A.....	25
1.14. Vitamin C.....	26
1.15.Melatonin.....	27
1.16.Çalışmanın Amacı.....	28
2.Deneysel Bölüm	29
2.1.Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	29
2.2.Materyal-Metod.....	29
2.2.1.Materyal.....	29
2.2.2.Metod.....	29
2.2.3.Protein Tayini.....	30
2.2.4.Katalaz Aktivite Tayini ve Hesaplaması.....	31
2.2.5.Glutatyon Peroksidaz Aktivite Tayini ve Hesaplaması.....	32
2.2.6.Süperoksit Dismütaz Aktivite Tayini ve Hesaplanması.....	33
3.Bulgular	34
3.1.GSH-Px Aktivite Sonuçları.....	35
3.2.CAT Aktivite Sonuçları.....	37
3.3.SOD Aktivite Sonuçları.....	38

4.Sonuçlar ve Tartışılması	40
KAYNAKLAR	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Guaninin Hidroksilasyonu.....	13
Şekil 2: NO Aracılığı ile Guanilat Siklaz Aktivasyonu.....	14
Şekil 3: Oksidan Streses karşı enzimatik savunma.....	18
Şekil 4: GSH-Px Aktivite Değerleri	35
Şekil 5: CAT Aktivite Değerleri	37
Şekil 6:SOD Aktivite Değerleri	38

TABLolar DİZİNİ:

Tablo 1:Reaktif oksijen türlerinin ortalama yarıömürleri.....	3
Tablo 2:Serbest radikallerin organizmadaki kaynakları.....	5
Tablo 3:Potansiyel sitotoksik oksijen radikalleri.....	6
Tablo 4:Serbest radikallerin rol aldığı patolojik durumlar.....	9
Tablo 5:GSH-Px Aktivitesi Yönünden Grupların Karşılaştırılması.....	35
Tablo 6:Grupların GSH-Px Aktivite Ortalamaları.....	35
Tablo 7:GSH-Px Post Hoc Matriks Tablosu.....	36
Tablo 8:CAT Aktivitesi Yönünden Grupların Karşılaştırılması.....	37
Tablo 9:Grupların CAT Aktivite Ortalamaları.....	37
Tablo 10:CAT Post Hoc Matriks Tablosu.....	38
Tablo 11:SOD Aktivitesi Yönünden Grupların Karşılaştırılması.....	38
Tablo 12:Grupların SOD Aktivite Ortalamaları.....	38
Tablo 13:SOD Post Hoc Matriks Tablosu.....	39

SİMGELER VE KISALTMALAR:**ADP:**Adenozin difosfat**ATP:**Adenozin trifosfat**GTP:**Guanozin trifosfat**FAD:**Flavin adenin dinükleotid(okside)**NADPH:** β -Nikotinamid adenin dinükleotid 3'-fosfat(redükte)**NADH:**Nikotinamid adenin dinükleotid(redükte)**cAMP:**Siklik adenozin monofosfat**cGMP:**Siklik guanozin monofosfat**MPO:**Miyeloperoksidaz**EPO:**Eozinofil peroksidaz**PUFA:**Poli doymamış yağ asidi**MDA:**Malondialdehit**EDTA:**Etilen diamintetraasetik asit**DTPA:**Dietilen triaminpentaasetik asit**DMBA:**Dimetilbenzantrasen**DTNB:**5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit)**BSA:**Bovin serum albumin**3-MC:**3-Metil kolantren**DMSO:**Dimetil sülfoksid**PAH:**Polisiklik aromatik hidrokarbon**LDL:**Low density lipoprotein**TF:**Doku faktörü**PBS:**Fosfat tamponu**SOD:**Süperoksit Dismutaz**GSH-Px:**Glutasyon Peroksidaz**CAT:**Katalaz**GSSGR:**Glutasyon Redüktaz**GSSG:**Okside glutasyon**GSH:**Redükte glutasyon**Cyt-c:**Sitokrom c**Cyt-P 450:**Sitokrom P 450 **Δ OD:**Optik Dansite Farkı

1.GİRİŞ:

Bu çalışmada 7-12DMBA'nın fare karaciğeri antioksidan enzim düzeylerine olan etkileri ile antioksidan vitamin E - Se'un koruyucu özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Deney materyali olarak Musmus culus türü dişi deney fareleri kobay olarak kullanılmış ve tüm enzim aktiviteleri spektrofotometrik yöntemlerle tayin edilmiştir. Çalışma 10 aylık bir süreçte gerçekleştirilmiş olup FÜNAF tarafından 264 nolu proje ile desteklenmiştir.

1.1.SERBEST RADİKALLER HAKKINDA GENEL BİLGİLER:

Bir molekülde negatif yüklü elektronların sayısı çekirdekdeki pozitif yüklü protonların sayısına eşit değilse bu tür moleküllere serbest radikaller denir. Bu moleküllerin ortak temel kimyasal özellikleri dış yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içermeleridir(1). Bu moleküller organik ya da anorganik yapıli moleküller olabilir. Stabil olmayıp sisteme yoğun bir kararsızlık veren yük dengesizliklerini giderebilmek için yani elektron konfügrasyonlarını pozitif yüke dengeleyebilmek için oldukça aktif bir yapı özelliği gösterirler. Radikallerin aktif olma özelliği başlıca difüzyon mesafesi ile ilişkilidir. Ancak hidroksil (OH.) radikali son derece yüksek aktif özellikte olduğundan meydana geldiği hücre bölümünden daha uzağa difüzyona gerek kalmadan oluştuğu yerde derhal reaksiyona girer. Buna karşılık süperoksit radikali, hidroksil radikalinden daha az reaktif olduğu için açığa çıktığı hücre bölümünden daha uzak noktalara rahatlıkla diffüze olabilir. Ancak bu difüzyon hücre içindeki SOD'ın yüksek konsantrasyonu ile sınırlıdır. Hidrojen peroksit ise mitokondriyal membranlar, peroksizomal membranlar ve plazma membranından kolayca difüze olarak toksik etkisini açığa çıktığı noktadan daha uzak hücre bölümlerinde gösterebilir (2,3).

Çok kısa yaşam süreleri olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleri ile kolayca etkileşebilme özelliğine sahiptirler.

Serbest radikaller hücrenin tüm fraksiyonlarında oluşabilme özelliğindedir. Radikal oluşumu hücre tiplerine göre değişiklik göstermesine rağmen tüm aerobik hücrelerde belirli düzeylerde radikal oluşmaktadır (4).

Oksijenin dış moleküler yörüngesine bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektronların eklenmesi yaygın şekilde bulunan bu molekülü güçlü bir toksine bir serbest oksijen radikaline dönüştürür. Aslında normal hücre biyokimyasının bir

parçası olan serbest oksijen radikalleri zararlı etkileri yanısıra transport ve hücre büyümesinin regulasyonu gibi normal hücreysel olaylarda da rol oynar.

Serbest radikallere yaygın birkaç örnek olarak merkezinde oksijen bulunan süperoksit anyonu (O_2^-), kükürt bulunan tiyil (RS.), karbon bulunan triklorometil (CCl_3) ve çiftleşmemiş elektronun her iki atom arasında delokalize olduğu nitrikoksit (NO) verilebilir. Formüllerdeki noktalar bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektronun olduğunu göstermektedir.

Serbest oksijen radikalleri oksijenin belirli koşullarda kısmen indirgenmesi sonucu oluşan çok kısa ömürlü ve güçlü oksidan nitelikli oksijen metabolitleri olan hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (OH.) ve singlet oksijendir(5).

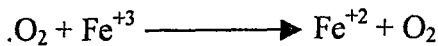
Metabolik olayların normal sıralanımında oksijen toplam dört elektron kabul edebilir. Oksijene bir elektron eklenmesi süperoksit anyonu, iki elektron eklenmesi hidrojen peroksit, üç elektron eklenmesi hidroksil radikali, dört elektron eklenmesi su oluşumuna neden olur (6).

Oksijen kökenli ara ürünlerin birbirleri ile ilişkili oldukları bilinmektedir. Bunların göreceli konsantrasyonları endojen gidericilerin (scavenger) ve katalitik metal iyonların varlığına bağlıdır (7). Süperoksit anyonu sulu ortamda fazla reaktif değildir, yarı geçirgen hücre membranlarında kolayca geçebilir, olasılıkla iyon kanalları aracılığı ile intrasellüler kaynağından dışarıya diffüze olabilir (8,9).

Serbest oksijen radikalleri arasında en reaktif ve en sitotoksik olanlar hidroksil radikali ve singlet oksijendir. Bu iki radikal serbest demir iyonunun yardımıyla hidrojen peroksit ve süperoksit anyonunun birbirleri ile reaksiyona girmelerinden oluşur.(Haber-Weiss Reaksiyonu sonucu oluşur)(6).



Bununla birlikte fizyolojik pH'da bu reaksiyonun hız sabiti demir tarafından katalizlenen aşağıdaki iki reaksiyonla karşılaştırıldığında çok yavaştır(10,11).



Ferrik demir (Fe^{+3}) önce süperoksit anyonu ile reaksiyona girerek ferröz demir'e (Fe^{+2}) ardından hidroksil radikal'i oluşturmak için yeniden H_2O_2 ile oksitlenmektedir. Bu iki basamaklı reaksiyon süperoksit ile oluşan Fenton Reaksiyonu olarak bilinir(12). Hemoglobinin invitro olarak oksidan strese maruz kaldığında katalitik demiri salıvererek bir biyolojik Fenton Reaktifi olarak etki gösterebileceği bilinmektedir(13).

Aslında serbest radikal oluşumunun normal hücre biyokimyasının bir parçası olduğu ve bazı olaylar sonucu dokularda oluştuğu bilinmektedir. Örneğin pek çok flavin enzimleri flavin radikalleri ile etki gösterirler ve süperoksit ksantin oksidaz tarafından purin bazlarının normal metabolizması sırasında oluşur(14).

Serbest oksijen radikalleri zararlı etkileri yanı sıra transport ve hücre büyümesinin regulasyonu gibi normal hücresel işlevlerde rol oynarlar. 50 nmol/L 50µmol/L arasındaki düşük dozlarda H_2O_2 prostanooidlerin oluşumunu stimüle eder(15).

Ayrıca sitolitik olmayan konsantrasyonlarda endotel hücrelerinde cGMP üretimini uyarır. Hem prostanooidler hem de cGMP vasküler tonusun regulasyonu ve hücreler arası iletişimde etkilidirler(3,16). Son zamanlarda gelişme sırasında dokularda oluşturulan reaktif oksijen türlerinin hücre iskeleti, membran polaritesi kalsiyum ve diğer iyon akımları üzerindeki etkileriyle dokuların gelişimini ve organogenezi etkileyebilecekleri ileri sürülmüştür(17).

TABLO .1:Reaktif Oksijen Türlerinin Ortalama Yarı Ömürleri :

Molekül Formülü	Molekülün adı	Yarı Ömrü(sn)
HO.	Hidroksil radikali	1×10^{-9}
RO.	Alkoksil radikali	1×10^{-6}
ROO.	Peroksil radikali	7
H_2O_2	Hidrojenperoksit	Enzimatik
O_2^-	Süperoksit anyonu	Enzimatik
O_2	Singlet oksijen	1×10^{-6}
Q	Semikinon	Günler
NO.	Nitrikoksit	1-10
ONOO.	Peroksinitrit	0,05-1

1.2. SERBEST RADİKALLERİN BİYOLOJİK KAYNAKLARI

Aerobik organizmalar için serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Normal metabolizmada moleküler oksijenin %98'i oksidaz yoluyla suya indirgenirken kalanı oksijenaz yoluyla potansiyel olarak toksik reaktif türlere dönüştür(18).

Oksijenin bir elektron alarak redüksiyonu ve aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonu sırasında negatif yüklü bir ara ürün olan,orbitalinde çiftleşmemiş elektron içeren süperoksit anyon radikali açığa çıkar. Sitoplazmadaki O₂'nin başlıca kaynağı endoplazmik retikulumdaki sitokrom P450 sistemidir(19,20). Çok toksik etkili olmayan süperoksit radikali asıl etkisini,daha güçlü oksijen metabolitlerinin açığa çıkmasına yol açarak gösterir.

Hidrojenperoksit ise serbest bir radikal değildir,ancak yüksek konsantrasyonlarda güçlü oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına yol açarak toksik etki gösterebilir.



O₂'nin protonlanmasıyla da hidroperoksil (HO₂.) radikali oluşur. Bu radikalin herhangi bir biyolojik sistemde sitotoksik rolü kanıtlanmamasına rağmen biyolojik membranları kolayca geçebilmesi ve yağ asitleriyle direk etkileşime girebilmesi yönünden önemlidir(21,22).

Diğer bir fizyolojik serbest radikal nitrik oksittir (NO.), kan basıncını düzenleme ve hücreler arası sinyal oluşumu gibi yararlı fonksiyonlarının yanı sıra fazla nitrikoksit radikali toksik etkili olabilmektedir. NO. septik şok oluşumunda önemli bir doku hasar mekanizmasıdır.

Hücrede zara bağlı veya serbest olarak bulunan değişik enzimlerin etkisi ile serbest radikaller oluşmaktadır. Bu oluşum,

- a)Mitokondrideki elektron transport zinciri reaksiyonlarını
- b)Endoplazmik retikulumdaki karma fonksiyonlu oksidaz sistemini
- c)Ksantin oksidaz,dopamin β-hidroksilaz, D-amino asit oksidaz,üreat oksidaz gibi enzimlerin etkinliğini
- d)Hücre zincirine bağlı NADPH oksidaz, prostoglandin sentez ve lipoksijenazların etkinliğini
- e)Peroksizomlarda ve lizozomlardaki metabolik olayları kapsamaktadır.

İzole edilmiş mitokondrilerde yapılan çalışmalarda organizmanın temel radikal kaynağının iç membranda yerleşen solunum zinciri olduğu anlaşılmıştır. Normal süperoksit ve hidrojenperoksit yapımı mitokondriyal oksijen sarfının yaklaşık %1-2 kadarını oluşturmaktadır.

Peroksizomlar H_2O_2 'nin hücredeki en önemli kaynağıdır. Peroksizomlarda bulunan D-aminoasit oksidaz L- α -hidroksi asid oksidaz enzimleri H_2O_2 açığa çıkarıcı özelliğe sahiptirler(23,24)

Çözünabilir özelliği olan ve nötral sıvı ortamda oksidoredüksiyon reaksiyonlarına girebilen hücre bileşenlerinin çoğu serbest radikalleri açığa çıkarırlar. Tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler ve tetrahidroproteinler bu gruba dahildirler(25).

Tabii kaynaklar dışında serbest radikaller endüstriyel işlemler sırasında da oluşmaktadır. Organik maddelerin havada çürümesi, plastiklerin işlenmesi, boyaların kuruması sırasında serbest radikaller üretilmektedir. Ayrıca ısı, ağır egzersiz, radyasyon, hava kirliliği, sigara, pestisidler, karsinojenler, asbestos, fenobarbital, bazı kanser ilaçları, diyet yağlar gibi birçok faktör radikal oluşumunu başlatabilir(26,27)

TABLO 2:Serbest Radikallerin Organizmadaki Kaynakları::

- Galaktoz oksitaz
- Siklooksijenaz
- Lipooksijenaz
- Monoamin oksidaz
- Endojen kaynaklar
- Mitokondriyal elektron transport zinciri
- Mikrozomal “ “ “
- Kloroplast “ “ “
- Oksidan enzimler
- Ksantin oksidaz
- İndolamin dioksijenaz
- Fagositik hücreler
- Nötrofiller
- Monositler ve makrofajlar
- Eosinofiller
- Endotel hücreler
- Otooksidasyon reaksiyonları (Örneğin demir,epinefrin gibi)
- Eksojen kaynaklar

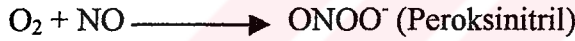
- Redox siklusu yapan maddeler (Örneğin parakuat,dikuat,alloksan,doksozobisin)
- İlaç oksidasyonları (Örneğin parasetamol,CCl₄)
- Sigara dumanı
- İyonize radyasyon
- Güneş ışığı
- Isı şoku
- Glutasyonu oksitleyen maddeler
- Kanserojen maddeler
- Alkol

TABLO .3:Potansiyel Sitotoksik Oksijen Radikalleri :

O ₂	: Süperoksit anyon radikali
HO ₂	: Hidroperoksil radikali
H ₂ O ₂	: Hidrojenperoksit
OH	: Hidroksil radikali
RO	: Peroksit radikali (R:Lipid)
O ₂	: Singlet oksijen
NO	: Nitrik oksit radikali

1.3.SERBEST RADİKALLERİN REAKSİYONLARI VE ETKİLERİ:

İki serbest radikal karşılaştığında eşleşmemiş elektronlarını birleştirerek bir kovalent bağ oluşturur. Bu şekilde süperoksit ve nitrik oksit çok hızlı reaksiyonlaşır,



Fizyolojik pH'da peroksinitril direk olarak proteinlerde hasar oluşturur (DNA mutasyonları) ve nitronium iyonu (NO²⁺), nitrojen dioksit gazı ve OH gibi toksik etkili bileşiklere parçalanır. Bu şekilde fazla NO'nun toksisitesi O₂ ile etkileşimine bağlıdır.

Bir radikalin,radikal olmayan başka bir madde ile reaksiyona girmesine serbest radikal zincir reaksiyonu denir ve yeni radikaller oluşur.

Serbest radikal reaksiyon zinciri atom transferlerini içerir.Yağ asitleri ve aromatik halkalarda olduğu gibi doymamış bağlara radikal eklenmesi de hücre içinde gerçekleşen diğer bir radikal reaksiyonudur(28,29,30).

Çeşitli patolojik durumlarda normalden daha fazla miktarda serbest oksijen radikali oluşmasıyla veya organizmanın antioksidan sisteminin yetersiz kalmasıyla artan serbest radikaller hücrenin çeşitli bileşenleri ve hücre dışı makromoleküller ile

etkileşerek hücrede yapısal ve fonksiyonel bozukluğa neden olurlar. Oksijen radikallerinden etkilenebilecek başlıca vücut biyokimyasal bileşenleri arasında proteinler (enzimler, kollojen), nörotransmitterler, nükleik asitler, DNA ve hücre membranlarının başlıca bileşenleri olan yağ asitleri bulunmaktadır(31,32,33).

Serbest radikallerin proteinleri etkileme derecesi aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Proteinin hücre lokalizasyonuna ve radikalın toksisite gücüne göre protein harabiyetinin boyutları değişir. Sülfür içeren moleküllerin serbest radikallere duyarlılığı dah fazladır. Sistin, histidin, metionin, triptofan ve tirozin içeren proteinler oksidanlara karşı en duyarlı olanlardır. Serbest radikaller aminoasitlerin oksidasyonu yanında peptid bağlarının hidrolizi disülfüt bağları oluşumu ve çapraz bağlanmalara yol açabilirler(34,35).

Enzimler fonksiyon kaybına uğrayabilirler. Ca-ATPaz ve Na-K-ATPaz enzimlerinin tiyol gruplarının oksidasyonu aktive kaybına neden olurlar. Hücre içi ve dışı iyon dağılımı bozulur. Serbest radikaller glutamin sentetaz, piruvat kinaz, kreatin kinaz LDH gibi enzimlerde de aktivite kaybı ve buna bağlı metabolik fonksiyonel bozukluklara yol açarlar(36,37).

Serbest radikaller α 1-antitripsin ve α 2-makroglobin gibi hücre dışı proteinlerde de aktivite kaybı sonucu doku hasarına yol açarlar. Serbest radikallerin oluşturduğu harabiyetten en çok etkilenen hücre dışı doku bileşenleri kollajen ve hyaluranik asittir. Kollajen süperoksit radikalının jelasyonu engellemesi sonucu tahrip olur(38,39).

Nötrofiller ve diğer aktive olmuş fagositik hücreler bakterileri öldürmek üzere oksijen radikalleri üretirler. Bu radikaller enfeksiyona bağlı doku hasarında rol oynarlar. Nötrofilleri enfeksiyon veya doku hasarı olan bölgeye yönlendiren kemotaktik madde üretmek için plazma faktörüyle reaksiyona giren serbest radikaller akut enflamatuvar cevabın oluşumunda etkilidirler(40).

Serbest radikallerin hücre çekirdeğinde ve DNA'da etkileri genotoksik ve mutajenik değişikliklere yol açar. DNA'ya yakın bir yerde OH. radikali oluşumu purin ve pirimidin bazlarının modifikasyonuna veya DNA ipliklerinin kırılmasına neden olur. Serbest radikaller DNA polimerazı inhibe ederler. Oksijen radikallerinin kansere primer etkisinin tümörün ilerleyici basamağında olduğu başlangıç ve ilerleme basamağında etkinin kısmen daha az olduğu bildirilmiştir. O_2 ve H_2O_2 , DNA ve kromozom kırılmasına onkojen aktivasyonuna sebep oldukları için karsinogeneze önemlidir.(41)

T lenfositleri genelde serbest radikal saldırısına karşı daha hassasdırlar. İnvitro deneylerde serbest oksijen radikallerinin, T-süpresör hücreleri için T-helper hücrelerine göre daha sitotoksik oldukları gösterilmiştir. Bu bulgular,serbest radikal reaksiyonlarının, immün süpresör hücrelerinin otoimmün reaksiyonları kontrol etmelerini engelleyebilecekleri tarzındaki görüşü desteklemektedir.(42)

Hidroksil radikalleri ters bağlanma yolu ile siklooksijenaz enzimini inhibe ederek prostoglandin oluşum zincirini bozarlar(43).

Stres ülseri, etanol nonsteroid antienflamatuar ilaçlara bağlı mide mukoza hasarının oluşumundaki faktörlerden biri serbest oksijen radikalleridir(44).

Serbest radikaller potansiyel sitotoksik mekanizma ile ilişkilidirler. Serbest radikallerin kan damarlarında kasıcı etkisi vardır(45).

Oksijen kaynaklı serbest radikaller egzersiz metabolizmasına bağlı olarak da artış gösterebilirler. Egzersizler süre ve şiddetlerine göre metabolik hızı artırarak serbest radikal oluşum hızını savunma mekanizmalarının kapasitelerini aşan oranlarda arttırabilirler. Serbest radikal oluşum hızı dokuların oksijen kullanımı ile paraleldir. Egzersizin ubisemikinon ve süperoksit dolanımını hızlandırarak süperoksit seviyesinde artışa yol açtığı bilinmektedir(46).

1.3.1.Oksijen Radikallerinin Biyolojik Sistemlerdeki Etkileri :

Lipitler : Plazma membranı ve organellerde bulunan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu

Proteinler :Oksidasyon reaksiyonları ile yapısında sülfidril içeren enzimlerin ve hormonların inaktivasyonu

Karbohidratlar : Polisakkarit depolimerizasyonu

Nükleik Asitler : Protein,nükleotid ve yağ asitleri sentezinin inhibisyonu ve mutasyon

TABLO 4: Serbest Radikallerin Rol Aldığı Patolojik Durumlar

1-İnflamasyon	
2-Karsinogenez	
3-Myokard reperfüzyon hasarı	
4-Şok	
5-Ateroskleroz	
6-Diabet	
7-Kas hastalıkları	Egzersize bağlı kas hastalıkları Musküler distrofi Malign hipertermi Alkolik myopati
8-Akciğer hastalıkları	
9-Karaciğer hasarı	CCl ₄ zehirlenmesi Demir toksisitesi Etanol toksisitesi
10-Beyin hasarı	Beyin travması Parkinson hastalığı Multiple skleroz Alzheimer demansı Lipofuscinosis
11-Böbrek hastalıkları	
12-Yaşlanma	
13-Prematüre hastalıkları	Kronik akciğer hastalığı Retinopati İntraventricüler hemoraji

1.4.LİPİD PEROKSİDASYONU:

Lipit peroksidasyonu zar fosfolipidlerindeki çok doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece zar lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan bir olaydır(21,47).

Biyolojik hasarla karakterize radikal reaksiyonlar arasında en belirgin olanı lipid peroksidasyonudur. Hücre membranlarının oksijen radikallerine maruz kalması lipid peroksidasyon reaksiyonlarını uyarır. Peroksidasyona en duyarlı olanlar doymamış yağ asitleridir.

Lipid peroksidasyonu organizmada oluşan kuvvetli bir radikal etkisiyle zar yapısında bulunan konjüge olmayan çok doymamış yağ asit zincirindeki α -metilen gruplarından bir hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlamaktadır(48,49).

Serbest radikal etkisi ile çok doymamış yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması bu yağ asidi zincirinin radikalleşmesine neden olmaktadır. Oluşan lipid radikali (L.) dayanıksız bir yapıya sahip olduğundan bir dizi spontan değişikliğe uğramaktadır. Önce molekül çift bağ aktarımıyla 233 nm.'de karakteristik UV absorbandsı veren konjüge dienler oluşmaktadır. Lipid radikalinin moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu lipid peroksit radikali (LOO) meydana gelmektedir. Bu radikaller de zar yapısındaki diğer çok doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumunu sağlamakta kendileri de açığa çıkan H_2 atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşmektedir. Bu otokatalitik reaksiyonlar lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşikleri ile etan pentan gibi uçucu gazlara dönüşmesi ile sona ermektedir(24,50).

Lipid peroksitler hücresel hasara yol açan metabolizmayı değiştiren ve dokulardaki kan akımını azaltan güçlü kimyasal maddelerdir(52).

Lipid peroksidasyonunun zar lipid yapısındaki değişiklikler nedeni ile zar işlevinin bozulması ile oluşan serbest radikallerin enzimler ve diğer hücre bileşenleri üzerine etkisi son ürünler olan aldehitlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden olduğu düşünülmektedir. Her üç olayın da eşit derecede veya birlikte etkili olacağı ileri sürülmektedir. Bununla birlikte aldehit yapılı bileşiklerin uzun yaşam süreli ve zarları geçebilme özelliğinde olması lipid peroksidasyonunun hedef organlardaki etkilerinden bu bileşiklerin sorumlu olduğunu düşündürmektedir(53)

Şu ana kadar edinmiş olduğumuz bilgiler ışığında serbest radikallerin hücre ve dokularda yol açabileceği zararları şöyle sıralayabiliriz:

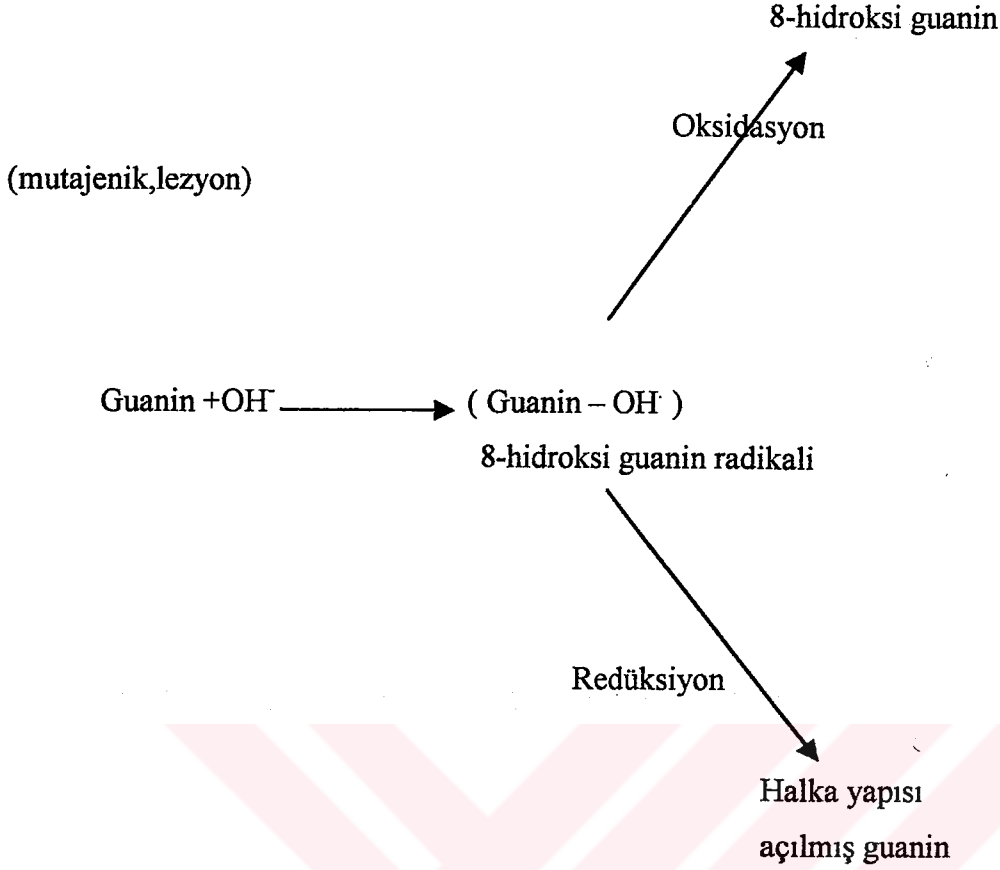
- 1)DNA'nın tahrip olması
- 2)Nükleotid yapılı koenzimlerin yıkımı
- 3)Tiollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması hücre ortamının tiol/disülfid oranının değişmesi
- 4)Protein ve lipidlerle kovalan bağlanması
- 5)Enzim aktivitelerinde ve lipid metabolizmasındaki değişiklikler
- 6)Mukopolisakkaritlerin yıkımı
- 7)Proteinlerin tahrip olması
- 8)Lipid peroksidasyonu zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi
- 9)Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması
- 10)Seroid ve yaş pigmenti denilen bazı maddelerin birikimi

11)Kollajen ve elastin gibi uzun ömürlü bileşiklerdeki oksido-redüsiyon olaylarının bozularak kapillerde aterofibrotik değişikliklerin oluşması

Genel olarak reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu oksidatif hasar oksidan stres olarak tanımlanır ve peroksidan-antioksidan dengenin peroksidan yönünde değişmesiyle karakterizedir(54)

1.5.SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ KANSER İLİŞKİSİ:

Serbest oksijen radikalleri,karsinogenezisin ilerleme basamağında çok daha fazla etkin rol oynamaktadırlar. Çeşitli klinik epidemiyolojik çalışmalar,serbest oksijen radikalleri, lipid peroksidasyonu ve peroksidasyon ürünleri ile karsinogenezis arasında bir ilişki bulunduğunu göstermiştir. Birçok karsinogen maddenin hücre etrafındaki oksidatif stresi artırarak kansere sebep olduğu anlaşılmıştır. Bu maddeler, SOD, GSH-Px ve CAT aktiviteleri dahil hücrenin antioksidan savunmasında ani ve sürekli bir azalmaya sebep olurlar. Serbest radikaller,kanserin başlangıç,ilerleme ve gelişme safhalarında etkili olmakla beraber bu etki ilerleme safhasında daha belirgin diğer safhalarda ise nisbeten azdır(55). Serbest radikal etkisi sonucu DNA ve kromozomlarda kırılma ve onkogenlerde aktivasyon meydana gelir. Süperoksid üretimi özellikle mitokondride fazla olduğundan mitokondrial DNA daha fazla hasar görür. DNA yakınlarında sentezlenen hidroksil radikalleri pürin ve pirimidin bazlarına saldırarak mutasyonlara sebep olurlar. Oksidatif stresten en çok etkilenen bazlar, DNA'daki Guanin ve Sitozindir. Deoksiguanozindeki 8 nolu karbona bir oksijen atomunun bağlanması ile 8-hidroksiguanozin oluşturur. Bu bileşik fizyolojik pH'da 8-oxoguanozin'e dönüşür ki bu da DNA'da anormal baz dizilişine ve böylece mutasyonlara neden olur. Aynı şekilde oksidatif şartlarda deoksisitozinden 5-hidroksisitozin meydana gelir(56).



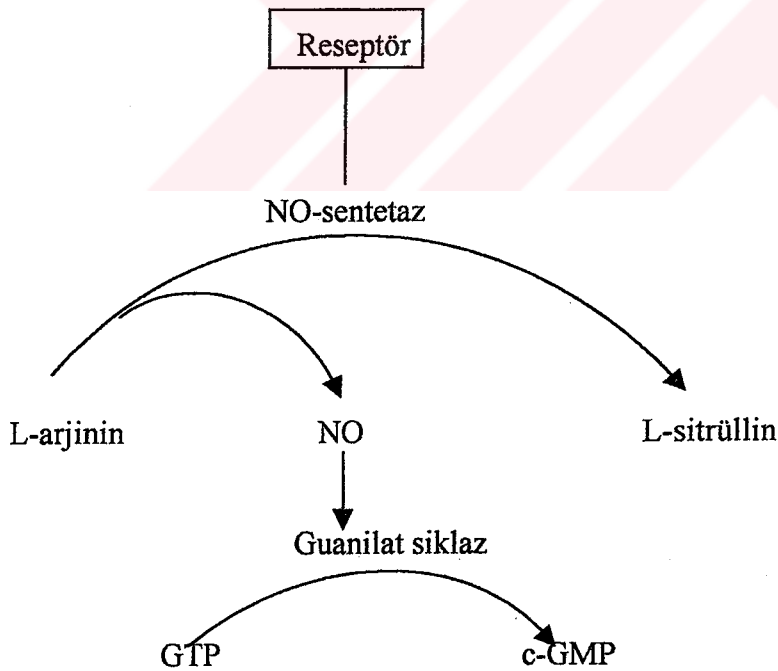
Şekil 1: Guaninin hidroksilasyonu

Guanindeki halka yapısının açılması DNA replikasyonunu durdurur ve bu bileşiğin DNA'yı tamir edici enzimler tarafından ortadan kaldırılması yeni hatalara sebep olur. Süperoksit radikali proteinlerdeki bütün aminoasitlerle tepkimeye girebilir. Örneğin, organik radikal (R-S) aracılığı ile disülfid oluşumuna neden olur.

Sistein aminoasitlerinin pekçok protein aktivitesi ve konformasyonu için önemli fonksiyon gördüklerinden, bu tip bir oksidasyon proteinlerin yapı ve fonksiyonunun bozulmasına neden olur. Sistein bağımlı enzimlere, cAMP hücre bölünmesinin önemli bir düzenleyicisidir. Pek çok tümör sisteminde bu iki enzim aktivitesinin ve cAMP düzeyinin, normal hücrelerle karşılaştırıldığında anormal olduğu bilinmektedir. Proteinlerde protein-disülfid redüktaz aktivitesinin artması O₂⁻.'nin neden olduğu disülfid artışının bir sonucudur. Süperoksit, oksitleyici bir bileşik olmasının yanı sıra, aldığı tek elektronu alıcısına vererek indirgeyici olarak da davranabilir. Süperoksit, özellikle metal iyonlarını indirgeyerek hücrede metal

iyonlarının oksidasyon-redüksiyon düzeyini bozar. Örneğin, ferrik demiri ferroz formuna indirger(19).

Hücrede pek çok enzim kofaktör olarak metal iyonlarını(demir ve bakır) kullandıklarından kofaktörlerin oksidasyon-redüksiyon düzeyindeki değişimi onların aktivitelerini de etkiler. Metal iyonlarından özellikle demir'in oksidasyon düzeyinin kanserde önemli olduğunu gösteren deliller vardır. Ayrıca Fe^{2+} , hücrede H_2O_2 ile O_2^- arasındaki tepkime ile (Fenton Tepkimesi) tekil oksijen ve hidroksil radikalının oluşumunu katalizler. Bu iki radikalın da tümör hücrelerinde üretildikleri bilinmektedir. Hidroksil radikali ile tepkimeye girerek onu ortamdan uzaklaştıran dimetilsülfoksit, lösemi ve nöroblastoma hücrelerinde biyokimyasal ve morfolojik farklılaşmayı önler. Hidroksil radikalının GTP'den cGMP sentezini katalizleyen guanilat siklaz enzimini aktive ettiği bulunmuştur. cGMP, cAMP gibi hücre bölünmesinin regülasyonunda fonksiyonu olan bir bileşiktir. Çeşitli kötü huylu tümörlerde guanilat siklaz aktivitesi ve cGMP düzeyinin yüksek olduğu bulunmuştur.(57)



Şekil 2: NO aracılığıyla Guanilat siklaz enziminin aktivasyonu

Ayrıca, kısa ömürlü ve oldukça reaktif bir oksijen türevi olan nitrik oksit (NO.), hücredeki haberci moleküllerden birisi olup, muskarinik veya histamin reseptörleri gibi çeşitli reseptörlerin aktivasyonu sonucu NO-sentetaz tarafından L-arjininden sentezlenir(58). Nitrik oksit, biyolojik sistemlerde artık bir medyatör olarak tanımlanmaktadır. Endotelde oluşan ve relaksasyon faktörü olarak tanımlanan maddenin NO olduğu anlaşılmıştır. NO bir nörotransmitterdir, trombosit agregasyonunu önler ve makrofaj fonksiyonunda önemli bir rolü vardır. Guanilat siklaz'a etki ederek guanozin trifosfattan (GTP) siklik guanozin monofosfat (cGMP) sentezini sağlar ve bu molekül aracılığı ile etki eder. NO, Fe-S proteinlerinden demiri çıkararak yerine kendisi bağlanır. Böylece fenton tepkimesini uyarır ve bu mekanizma ile karsinogenezisde rol oynar (19).

Araşidonik asit metabolizmasının inhibitörleri ile tümör ilerlemesi durdurulmuştur. Bu da lipid peroksidasyonu ile karsinogenezis arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Nitekim araşidonik asidin hidroperoksi yağ asitleri gibi bazı metabolik ürünlerinin tümör oluşumuna götürebileceği kaydedilmiştir. Linoleik ve araşidonik asidin ilk otooksidasyon ürünlerinin (hidroperoksi ve hidroksi yağ asitleri gibi) kolon mukoza DNA sentezini ve ornitin dekarboksilaz aktivitesini artırdığı saptanmıştır(59)

Kimyasal karsinogenezisde, karsinojen maddelerin elektrofilik metabolitlerinin kritik bir öneme sahip oldukları gösterilmiştir. Özellikle bu kimyasallardan aromatik aminlerin bir kısmı öncül bir kısmı da esas karsinojen madde özelliğindedirler. Esas karsinojen formda olanlar, hücre bileşenlerini etkileyerek neoplastik transformasyona neden olurlar ve birçok metabolik yolun son ürünleridir. Kimyasal karsinojenlerin metabolizmaları sonucunda enzimatik veya nonenzimatik olarak üretilen serbest radikal türevleri yüksüz ve ortaklanmamış elektrona sahip olduklarından dolayı aşırı reaktiftirler. Birçok genin aktivitesi redoks tepkimeleri ile kontrol edilmektedir. Serbest radikaller de redoks tepkimelerini başlattıklarından dolayı oksidatif stres, bazı genlerin aktive olmasına sebep olur(21,47). Sonuçta serbest radikaller proonkogenleri aktive ederek hücre çoğalmasını artırır. Nitekim hücre çoğalması ve farklılaşmasında rol alan transkripsiyon faktörlerini kodlayan c-fos, c-myc, c-jun ve b-aktin genleri ile bir transkripsiyon faktörü olan NF κ B geni serbest radikaller tarafından aktive edilirler. Buna ilaveten tümör supressör genlerinin serbest radikaller tarafından inaktive edilmesi karsinogenezisin başlamasına sebep olabilir. Çeşitli kimyasal

karsinojenlerle yapılan çalışmalarda oluşan serbest radikallerin, direkt DNA'ya etki ederek kanser oluşmasına sebep oldukları anlaşılmış ve bu kimyasal karsinojenlerin özellikle binlerce kimyasalın bulunduğu sigara dumanında çok fazla bulunduğu (Özellikle polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), aza-erenler, aromatik aminler, N-nitrosoaminler, aldehydler) belirtilmiştir (9,55). Kalsiyum homeostazisinin serbest radikaller tarafından bozulması da karsinogenezi çok önemli rol oynar(60).

Hücre zarının normal yapısının serbest radikal etkisi sonucu bozulması hücre içi kalsiyum miktarının artmasına sebep olur. Kalsiyum-kalmodulin etkileşimi birçok protein kinaz enzimini aktive eder. Protein kinazlar da S6 kinazı aktive ederler. S6 kinaz, protein sentezinin aktivasyonunda ve hücre çoğalmasında rolü olduğu sanılan ribozomal S6 proteinini fosforile ederek aktifleştirir. Böylece hücre çoğalması artırılır. Buna ilaveten, hücre çoğalması ve farklılaşması dahil birçok hücre içi olayı düzenleyen protein kinaz C'de oksidatif stresle aktifleşir.

Tümörlerde oksijen metabolizmasının normal olmayıp, oksijen toksisitesinin başlıca sebebinin antioksidan savunma mekanizmasındaki yetersizlik olabileceği ileri sürülmüştür. Tümörlerde SOD ve diğer antioksidan enzimlerin aktivitelerinde genelde azalma gözlenmiştir.

1.6.ORGANİZMANIN ANTİOKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI:

Hücrelerde ve ekstrasellüler sıvıda sitotoksik oksijen radikallerini zararsız duruma getirmeye çalışan antioksidan savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmaların başlıcaları şunlardır :

A)Reaktif oksijen radikallerini daha az toksik ürünlere dönüştüren antioksidan enzim sistemleri; Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve glutatyon redox siklusu enzimleri (glutatyon peroksidaz, GSH redüktaz, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz vb.)

B)Radikalleri yakalayıp nötralize eden antioksidan maddeler; Alfa-tokoferol (vitamin-E) ve askorbik asit (vitamin C) antioksidan vitaminler olarak fonksiyon gösterirler.

Ayrıca indirgenmiş glutatyon (GSH), ürik asit, beta-karoten (provitamin A),taurin ve yükek molekül ağırlıklı antioksidanlar olan mukus ve albumin de bu gruba dahil edilebilirler (4,51).

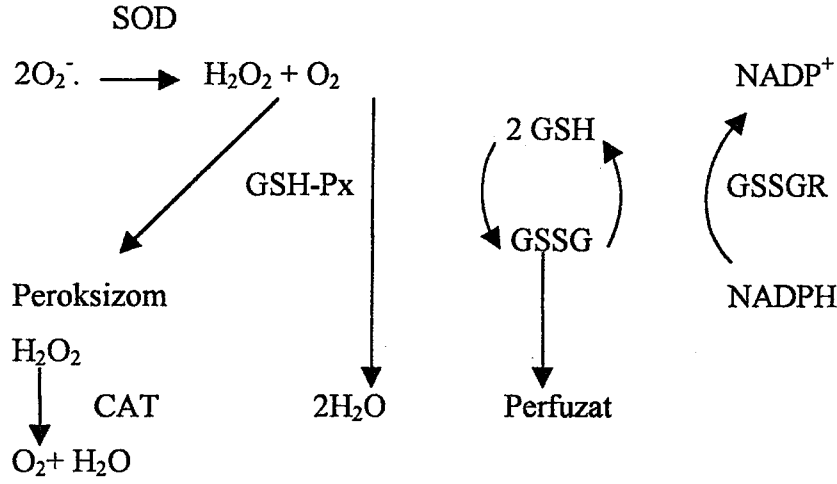
C) Reaktif oksijen radikallerinin oluşmasını önleyen ve oluşanın yayılmasını engelleyen sistemlerdir ki bunlar; H_2O_2 ve süperoksit anyonundan hidroksil radikali oluşmasını sağlayan Haber-Weiss reaksiyonunu katalizleyen demir ve bakır iyonlarını plazmada ve hücrede bağlayan bakır transport proteinin seruloplazmin ile ferritin,transferrin,laktoferrin ve mitokondrilerde doğal olarak oluşan serbest radikalleri suya indirgeyen mitokondriyel sitokrom oksidazdır(5). Ayrıca bu grupta yer verebileceğimiz insan plazmasında extrasellüler antioksidan savunma mekanizmaları olarak bilinen diğer maddeler haptoglobin-hemopeksin,glukoz ve tuarin,yüksek dansiteli lipoprotein (HDL), alfa 1-antitripsin, Gc globulin, fibronektin ve immünoglobulin G'dir(52).

İnsan organizmasında hücrel boyutta oksidan ürünlere karşı koruma üç prensip çerçevesinde gerçekleşmektedir;

- 1-Oluşan radikallerin detoksifikasyonu
- 2-Radikal reaksiyonların sona erdirilmesi
- 3-Radikal oluşumunun sınırlandırılması
- 4-Hedef moleküllerinde oluşan hasarların tamiri.

Oksijen radikallerine karşı öncelikli savunma sistemi enzim sistemleridir. Bu sistem içinde görev alan enzimlerin aktivitesi serbest radikallerin sentez ve yıkılma hızına beslenme ve eser elementlerin (Mn,Se,Fe,Zn,Cu) alınmasına bağlıdır(53,54).

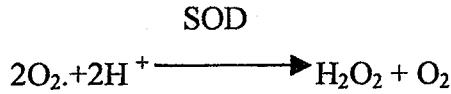
Ayrıca proteinlerin sülfhidril gruplarının antioksidan kapasitesine anlamlı katkıda bulundukları ileri sürülmüştür(56).



Şekil 3: Oksidan strese karşı enzimatik savunma

1.7.SÜPEROKSİT DİSMÜTAZ (SOD) :

Serbest radikallere karşı organizmada ilk savunma SOD enzimiyle gerçekleşir. SOD, katalaz ve glutatyon peroksidazdan farklı olarak serbest radikali substrat olarak kullanır. SOD süperoksidin H_2O_2 ve O_2 'ye dismutasyonunu katalize eden bir metalo enzimdir.



Bu reaksiyon için $pH=7.12$ 'de hız sabiti $k=2.10 \times 10^5 \text{ l/M.S.'dir}$.

Ökaryotik hücrelerde SOD'nın üç izoenzimi identifiye edilmiştir. Sitoplazmada ve membranlar arası boşlukta bulunan 32.000 molekül ağırlığı olan SOD Cu ve Zn kapsar (CuZn SOD), iki alt birimden oluşur. Primer olarak mitokondrial matriksde yerleşim gösteren 80.000 molekül ağırlıklı SOD Mn kapsar (Mn SOD). Tetramerik glikoprotein yapısı ile hücre içinde bulunan izoenzimlerden farklı olan 135.000 molekül ağırlığında olan SOD Cu ve Zn içerir, hücre dışı sıvılarda bulunduğu için hücre dışı SOD (EC-SOD) olarak da adlandırılır (57,58).

Cu,Zn- SOD enziminin siyanür ile inhibe olmasına karşın, Mn- SOD enzimi siyanüre karşı dirençlidir.

SOD enziminin bütün izoenzimlerinde enzimin aktif merkezinde bulunan metalin kelat yapıcı ajanlar ile uzaklaştırılması katalitik kaybına yol açar; metalin yerine konmasıyla aktivite yeniden kazanılmaktadır. Cu,Zn-SOD enziminde Cu'nın katalitik, Zn'nin ise esas olarak yapısal fonksiyonu vardır(59).

Süperoksit radikalleri spontan olarak dismutasyona uğrayabilirler. SOD enzimi dismutasyon hızını 10 kere artırır. Böylece O_2 'nin başka substratlarla reaksiyonlaşması ve daha toksik .OH radikallerinin oluşumu SOD tarafından engellenir.

Süperoksit dismutazın süperoksit anyonuna olan etkisi şu şekildedir; Süperoksit anyonu Cu^{2+} ve bir arjinin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır. Bu bağlanma sonucunda süperoksitden bir elektron Cu^{2+} 'ye transfer olurken Cu^+ ve moleküler oksijen meydana gelir. İkinci bir süperoksit anyonu Cu^+ 'den bir elektron, bağlanma ortağından ise iki proton alarak hidrojenperoksidi oluştururken enzim tekrar Cu^{2+} formuna dönmüş olur. Bilindiği gibi süperoksit radikalleri kendiliğinden dismutasyona uğrayabilir. Bu nedenle süperoksit radikalleri sulu ortamda fazla birikmezler ve bu nedenle SOD ile katalizlenen dismutasyon önemsiz gibi görülebilir. Oysa iki önemli faktör enzimatik katalizin önemini belirgin şekilde ortaya koyar. Birincisi SOD ile enzimatik dismutasyonun hız sabiti $pH=7.4$ 'de 2×10^9 1/M.s'dir. Bu da kendiliğinden dismutasyondan 10.000 kez daha hızlı bir dismutasyon avantajı sağlar. İkinci bir avantaj ise hücrelerde SOD derişiminin O_2 radikallerinin steady state derişiminden yaklaşık 100.000 kez daha fazla olmasıdır(60,61).

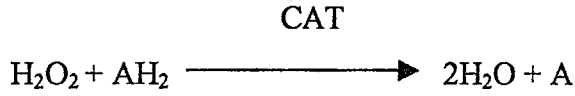
Organizmada oksidan stresin arttığı klinik durumlarda SOD enzimi aktivitesini artırarak koruyucu etkinliğini devam ettirir. Özellikle antioksidan etkili diğer enzimlerin aktivitelerinde azalmanın söz konusu olduğu klinik durumlarda SOD enziminin aktivitesinin arttığı çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir(21).

1.8.KATALAZ(CAT):

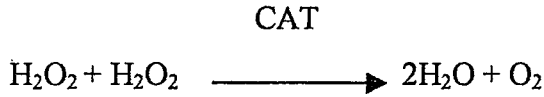
Katalaz tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan bir hem enzimdir. % 20 oranında sitoplazmada ve % 80 oranında peroksizomlarda lokalizedir. Molekül ağırlığı 240.000 olup 4 alt birimden oluşmaktadır. Her bir alt birim aktif merkeze bağlı bir hem grubu içerir. Molekülün alt birimlerinin ayrılması

enzim aktivitesinin azalmasına yol açar. Asid, siyanür, 3-amino-1,2,4-triazol, indirgenmiş glutatyon ve ditiyotreitöl katalazı inhibe ederler(19,57,58).

Katalaz H_2O_2 'in oluşum hızının düşük olduğu veya elektron vericisinin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu durumlarda peroksidatik reaksiyonla;



H_2O_2 'nin oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik reaksiyonla;



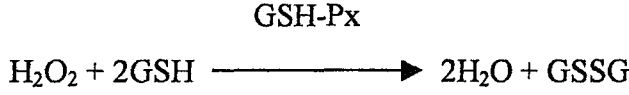
Kono ve Fridovich süperoksit radikallerinin katalazı inhibe ettiğini göstermişlerdir. İndirgenmiş glutatyonunda doza bağımlı olarak katalazı inhibe ettiği bildirilmiştir(85)

1.9.GLUTATYON PEROKSİDAZ (GSH-PX):

Normal koşullarda hücrede bulunan H_2O_2 'nin detoksifikasyonundan esas olarak glutatyon peroksidaz sorumludur. GSH-Px lipid peroksidasyonun başlamasını ve gelişmesini engelleyici özellikte olan bir enzimdir. Selenyuma bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki farklı tipi vardır. Selenyuma bağımlı olan GSH-Px hem H_2O_2 'i hem de lipid hidroperoksitlerini metabolize ettiği halde; hücrenin mitokondri (%30) ve sitozol (%70) fraksiyonlarında lokalize olan selenyumdan bağımsız GSH-Px ise yalnızca lipid hidroperoksitlerini metabolize edebilmektedir(19,20,58). Aktivitesi selenyuma bağımlı olmayan GSH-Px enzimleri GSH-S transferazlardır. Bu enzimler biyotransformasyon yolu ile oluşan çeşitli elektrofil bileşiklerle glutatyon (GSH) arasındaki konjugasyonu sağlarlar. GSH ile bağlanan bu bileşikler bir dizi reaksiyonla merkapturik aside dönüşürler. Molekül ağırlığı 50.000 olan GSH-S transferazların 7 farklı alt birimi ve 8 izoenzimi vardır.

İnsan eritrositleri sadece GSH-S-T-Pi kapsarlar. GSH-S-T-Pi düşük aktiveli bir transferazdır. En önemli fonksiyonu ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu ve karsinogenlerin detoksifikasyonudur.

H_2O_2 ve çeşitli organik hidroperoksitlerin GSH-Px ile indirgenmeleri reaksiyonunda indirgenmiş GSH kosubstrat olarak görev alır.



Katalitik reaksiyon sonucu H_2O ve oksitlenmiş glutatyon disülfid (GSSG) oluşur.

Hücrel GSH'ın eksikliğine yol açan GSSG eflusu GSH-Px aktivitesindeki artışın bir sonucudur. Eritrosit veya karaciğer hücrelerinde oluşan GSSG'nin minör bir konsantrasyonu hücreler tarafından atılır. Bu miktar hidroperoksid metabolizması sırasında yükselir. GSSG'nin hücre içinde birikimi ve eflusu hücrel NADPH/NADP⁺ redox oranı ile ilişkilidir. Sitozolik NADPH/NADP⁺ oranını azaltan metabolik olaylar GSSG/GSH oranını artırarak hücreden GSSG eflusunun hızlanmasına yol açarlar(63).

İodoasetat, siyanür ve süperoksit radikali GSH-PX enziminin inhibitörleridir. H_2O_2 'nin sitotoksik etkinliği büyük ölçüde hücre içi katalaz ve peroksidaz aktivitelerinin ve H_2O_2 'i hidroksil radikaline indirgeyebilen geçiş metallerinin bir fonksiyonudur.

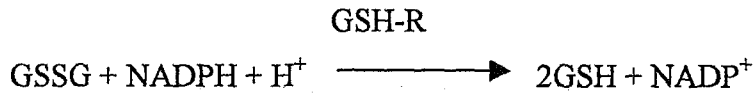
GSH-PX ve katalaz enzimleri hücrenin farklı bölümlerinde lokalize olmalarından dolayı karaciğerde endojen oluşan H_2O_2 seviyesini düzenlemede birlikte etkinlik gösterirler.

Eritrositlerde GSH-Px aktivitesinin azalması prematüre bebeklerde hemolitik anemi ile ilişkilidir. Eritrosit GSH-Px aktivitesi selenyum statüsünün bir indeksidir. Se eksikliği olan kişilerde kanda GSH-Px aktivitesindeki düşüklüğüne bağlı olarak kalp rahatsızlıkları siktir.

E vitamini takviyesi, demir eksikliği, ağır metal iyonları toksisitesi ve hormonal denge GSH-Px aktivitesini etkileyen parametrelerdir.

1.10.GLUTATYON REDÜKTAZ (GSH-RED):

Antioksidan savunmanın etkinliğini sürdürebilmesi için oksitlenmiş glutatyonun tekrar indirgenmiş şekle dönüşmesi gerekir. Glutatyonun redüktaz NADPH varlığında oksitlenmiş glutatyonun indirgenme reaksiyonunu katalizler. Bu oksidoredüksiyon enziminin koenzimi NADPH, prostetik grubu ise FAD'dır. Dimerik bir yapıda bulunan GSH-red'in molekül ağırlığı yaklaşık 104.800'dür. Sitozol ve mitokondride lokalizedir. GSH-red bir flavin enzimi olup FAD ile aktive edilir. GSH-red oksitlenmiş glutatyonun indirgenme reaksiyonunu katalizlerken elektronlar önce NADPH'dan FAD yolu ile GSSG'ye daha sonra ise iki sistein kalıntısı arasındaki disülfid bağlarına en son ise oksitlenmiş glutatyona transfer olmaktadır(23).



Sitoplazmik araürünler olan NADPH ve GSH konsantrasyonları hücrenin redox durumunun akut değişikliklerini yansıtır. NADPH/NADP⁺ ve GSH/GSSG oranlarındaki değişiklikler akut prooksidan stres ile antioksidan savunma arasındaki dengesizliğin belirtisidirler.

Oluşan NADP⁺'nin NADPH'a dönüşmesi için Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimine gerek duyulur. PH=7.8'de ve iyonik gücün 0.1 olduğu koşullarda insan eritrositlerinde bulunan Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi molekül ağırlığı 210000 D olan tetramer yapı ile molekül ağırlığı 105.000 olan dimer yapı arasında bir denge halinde bulunur. Kelat yapıcı ajanlar ve steroid hormonlar Glukoz-6-fosfatdehidrogenaz enzimini inhibe ederler(33).

1.11.GLUTATYON (GSH):

GSH organizmanın tüm hücrelerinde bulunan hücrenin protein yapısı dışındaki sülfidril grubu içeriğinin % 90'nını oluşturan bir tripeptiddir. Glutamik asit sistein ve glisin aminoasitlerinden gama-glutamil sistein sentetaz ve glutatyon sentetaz enzimleriyle oluşur.

Serbest bir sülfhidril grubuna sahip olan indirgenmiş GSH hücreiçi bir sülfhidril tamponu olarak etkilidir ve hücreleri oksidatif ve toksik etkilere karşı

korur. Eritrositlerde bulunan indirgenmiş GSH hemoglobinin sistein gruplarını ve diğer hücre proteinlerinin tiol gruplarını indirgen şekilde tutar. Böylece hemoglobini oksidasyondan koruyarak hücrenin bütünlüğünü sağlar(16).

Nükleofilik bir yapıya sahip olan indirgenmiş glutatyon elektrofilik karakterde karbon atomları ve Zn, Cd ,Hg, Cu, Pb gibi atomlarla kompleks oluşturarak ağır metal iyonlarının vücuttan atılmasına yardımcı olur.

GSH bazı aminoasitlerin hücre içine taşınmasına yardımcı olur. Bu sırada hücre membranından transloke olan GSH- γ - glutamil transferaz enzimiyle parçalanır.

GSH biotransformasyon ile oluşan zehirli maddelerin detoksifikasyonunda rol oynar;zehirsizleştirme reaksiyonlarına doğrudan katıldığı gibi bazı enzimlerin aktivatörü veya substratı olarak görev yapar(64).

1.12.VİTAMİN E:

E vitamini terimi yapısal olarak birbiri ile bağlantılı bir grup bileşiği kapsar. Bunlar temelde 2-metil-kroman halkası içerirler ve 2.karbona bağlı 16 karbonlu fitil yan zincir kapsarlar. Vitamin E benzeri etkiye sahip bileşikler iki grupta toplanırlar. Birinci grup tokoferoller ikinci grup tokotrienoller olarak adlandırılır(65).

Tokoferoller alfa,beta,gama ve sigma olmak üzere 4 çeşit molekül ve bunların stereoizomerlerinden oluşur. Vitamin E membranda düşük konsantrasyonda bulunmasına rağmen lipidde çözünen zincir kırıcı başlıca antioksidanlardandır. Biyolojik membranlarda Vit E'nin koruyucu fonksiyonu yağ asitlerindeki peroksil radikalleri ile reaksiyonlaşarak kromanoksil radikali oluşturmasıdır(48).

Vitamin E'nin halka yapısındaki oksijenin 2p-tip elektron çiftleri aromatik düzeye ne kadar dik bulunursa türevin antioksidan özelliği o derece artar. Bu durumda hidrofuranlar dihidropiranlardan daha aktiftirler. Aromatik halkanın ve 2.karbonun elektrondan zenginliği antioksidan etkiyi artırır. E Vitamini türevlerindeki reaktivite farklılıkları fenol O-H bağının enerjisini kontrol eden steroelektronik etkilerin sonucudur.

Tekil oksijenin tokoferol homologları tarafından tutulma hızları alfa,beta,gama,sigma sırasıyla azalmaktadır. Kroman halkanın 6.pozisyonunda bulunan serbest hidroksil grubu singlet oksijeni yakalama gücünü belirler. 6.pozisyonunda bulunan ester veya eter türevi ise aktiviteyi yok eder(40).

Tokoferol homologlarının tekil oksijen ile belirgin kimyasal reaktivitesi daha düşük hızda ve alfa,beta,gama,sigma azalan sırasıyla gerçekleşir. Tokoferollerin biyolojik oksidasyon ürünleri de antioksidan aktivite gösterir.

Önemli bir endojen ve eksojen antioksidan olarak hücrel ve hücrealtı membranların bütünlüğünün korunması alfa-tokoferolün başlıca fonksiyonlarından biridir.

Lipidde çözünürlüğün yüksek olması nedeniyle kolayca membran fosfolipidlerine difüze olabilmekte ve 20 karbonlu doymamış yağ asitlerini indirgeyerek serbest oksijen radikallerinin biomembranlarda oluşturabileceği lipid peroksidasyonunu önlemektedir. Böylece eikosooid oluşumu başlangıç aşamasında engellenmektedir.

Membranların E Vitamini miktarı mikrozomal membranların,LDL'nin, hepatositlerin ve/veya organların perokside edici ajanlar (hidroksil,alkoksil ve peroksil radikalleri,singlet oksijen,oksijen-metal kompleksleri) tarafından hasarını belirler. Bu ajanların etkisiyle oluşan lipidhidroperoksitler alkoksil ve organik peroksil radikallerine parçalanarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonuna yol açarlar. Tokoferoller bu reaksiyonun yayılma basamağını engellerler;peroksil radikallerini yakalayarak lipidleri korurlar(38).



Vitamin E radikali nisbeten stabil reaktivitesi az olan bir radikaldir. Vitamin E midede nitritlerin nitrozaminlere dönüşümünü engelleyerek antikanserojen olarak etki eder.Kanser insidansını ve tümör hücrelerinin gelişimini azaltır.

E vitamini takviyesi ile artritte görülen serbest radikal konsantrasyonundaki artışın engellendiği deneysel çalışmalarda gösterilmiştir.

İn vivo ve in vito çalışmalar alfa-tokoferol ve glutatyon peroksidaz arasındaki karşılıklı bağımlılığı göstermişlerdir. İnsan ve hayvan deneyleri doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu engellemek ve membran bütünlüğünü sağlamak için her iki antioksidanın gerekliliğini göstermişlerdir (40).

Bitkisel kaynaklı yağlarda tabii olarak bulunan tokoferol ve tokotrienler esansiye diet bileşenleridir.

1.13. A VİTAMİNİ:

A vitamini ön maddesi olan beta- karoten önemli bir singlet oksijen ve radikal tutucu antioksidandır. Beta-karoten ve diğer biyolojik karotenoidlerin singlet oksijeni tutmaları difüzyon kontrolüne yaklaşan hız sabitinde gerçekleşir. Beta -karotenin açık zincirli analogu olan likopenin hız sabiti en yüksektir. Biyolojik kaynaklı karotenoidler arasında en etkin singlet oksijen tutucu likopendir (37,41).

Karotenoidlerin serbest radikal reaksiyonlarını inhibe ettiği gösterilmiştir. Beta- karoten çok etkin olarak triklorometilperoksil radikallerini indirger. Fizyolojik şartlarda dokuların çoğunda hakim olan düşük kısmi O₂ basıncında ve düşük O₂ konsantrasyonlarında beta- karoten tetralin ve metil linoleatın oksidasyonunu peroksil radikalleri ile inhibe eder. Beta-karotenin bu antioksidan aktivitesi rezonansla stabilize karbon merkezli bir radikal oluşumuna dayanır ve membranların lipid peroksidasyonundan korunmasına yardımcı olur. Beta- karotenin sağladığı antioksidan savunma normal fizyolojik oksijen basıncı sınırlarında bulunan herhangi bir dokuda gözlenir. Beta-karotenin otooksidasyonu beta iyonunun halkasında yerleşik epoksidlerin, ketonların ve aldehitlerin oluşumuna yol açar. Son yıllarda yapılan çalışmalar beta karotenin peroksil radikal serbestleştiricisi ile inkibasyonun polien zincirinin merkezi çift bağında epoksid oluşumuna yol açtığını göstermiştir.(66).

Beta- karotenin vitamin E'den farkı düşük O₂ basıncında daha etkili olmasıdır. Bu şekilde yüksek oksijen basıncında etkili olan alfa-tokoferolün antioksidan etkisini tamamlar. Beta-karoten LDL partikülü içinde taşınır ve oksidatif hasara karşı LDL' ye savunma bağlar, LDL' de bulunan alfa-tokoferolün konsantrasyonu beta - karotenden 20 kere daha fazla olmasına karşın LDL oksidasyonunu inhibe etmede beta-karoten 2 kat daha güçlüdür. Beta-karoten aterosklerotik lezyonun gelişmesini engeler.

Beta-karotenin yalnız koroner olaylarda değil tüm damarsal problemlerde etkili olduğu gösterilmiştir(42).

LDL'yi oksidatif hasara karşı savunmada en etkin antioksidan terapinin suda çözünen askorbat ile yağda çözünen alfa-tokoferolün ve beta - karotenin birlikte verilmesi olduğu ileri sürülmüştür.

1.14.VİTAMİN C (Askorbikasit):

Kimyasal yapı bakımından monosakkaritlere benzeyen C Vitamini 2-Ketoglukono laktonun okside edilmesiyle oluşmaktadır. Askorbik asit dayanıklı değildir. Bir heknozik asit olan L- Askorbik asitin gama -laktonu 2. ve 3. karbon atomunda bir enodiol yapısı gösterir. Bu yapı gayet kararsızdır ve okside olarak 1-dehidroaskorbik asit meydana getirmektedir .

Askorbik asit ihtiva ettiği endiol gurubundan dolayı hem asid özellik gösterir, hem indirgendir. Askorbik asit indirgen olarak etki ettiği zaman endiol gurubundaki 2 H atomunu vererek dehidroaskorbik asid yükseltgenir ve dehidro askorbik asit de askorbik aside indirgenebilir. Buna göre dehidroaskorbik asit ile askorbik asid bir redox sistemi oluştururlar. Dehidroaskorbik asid kolaylıkla askorbik aside çevrildiğinden C Vitamini gibi etki eder. Dehidroaskorbik asid alkali çözeltilerde dayanıksız olup lakton halkasının açılmasıyla hidrolize uğrar ve biyolojik bakımdan etkisiz olan 2,3-diokso L- gulonik asid meydana gelir. Hayvan organizması bunu tekrar laktone dönüşüm türemez parçalanmasıyla okzalik asid oluşur. Oksalit asid hava oksijeni karşısında tersinmez olarak yükseltgendiği ve bu yükseltgenme ısı ile artığı için besin maddelerinin havanın oksijeni karşısında pişirilmesinde içerdikleri askorbik asidin büyük bir kısmı kaybolur. Askorbik asid özellikle meyve ve sebzelerde bol bulunur. Limon, portakal, çilek, domates, yeşil biber, vb. fazla miktarda askorbik asid içerir.

Vitamin C ' nin herhangi bir kofaktör etkisi bilinmediği halde , bilinmediği hücre içi oksidoredoksion reaksiyonlarında hidrojen taşıyıcılığı ödevi ile ilgisi olduğu sanılmaktadır. C Vitamininin metabolizmadaki etki tarzı henüz tam olarak aydınlatılmış olmamakla beraber bağ dokusu, dentin, kemik dokusu, vb ' nin proteini olan kollajenin ön maddesi prokollajenden biyosentez için gerekli olduğu bilinmektedir. Günlük C vitamini ihtiyacı 50-100mg kadardır.

Askorbik asit insanlar, maymunlar, ve kobaylar tarafından sentez edilmez. Askorbik asidin insanlar tarafından uzun süre alınmaması durumunda İskorbit hastalığı ortaya çıkar. Askorbit asid eksikliği organizmanın enfeksiyonlara karşı direncinin azalması da neden olur.(67).

1.15.MELATONİN:

Pineal bez beyinde üçüncü ventrikülünün tavanına bir sap ile bağlanmıştır. İnsanda 5-6 mm. kadar uzunlukta ve 1 gramın onda biri kadar ağırlıktadır(68).

Pineal bez hücreleri melatonin adı verilen hormunu salgırlar. Melatonin memelilerin reproduksiyon olaylarını koordine eden bir sinyal görevi yapar. Melatonin iki enzim etkisi ile serotonininden sentezlenir. Enzimlerden birisi N-asetil transferazdır ve serotoninin asetile edilmesini sağlar. Diğer hidroksi indol-O-metil transferazdır ve indol halkasının metile edilmesi ile görevlidir. Pineal bezden başka vücudun hiçbir yerinden melatonin sentezlenmez.

Pineal bezde serotonin miktarı gündüz yüksek,gece düşüktür,ışık şiddeti ve süresi bezdeki serotonin miktarını değiştirir. Bezdeki melatonin miktarı ise serotoninin ritminin aksi yöndedir,yani melatonin sentezi gündüz az, gece çoktur.

Son zamanlardaki araştırmalar melatoninin antioksidal yönü, kanserde immüno-modülatör rolü ve uyku düzenleyici (biyolojik saat) fonksiyonları üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak bu güne kadar yapılan çalışmalar melatoninin tedaviye yönelik etkilerini henüz tümüyle aydınlatamamıştır. Ancak melatoninin çok önemli bir antioksidan savunma elemanı olduğu bilinmektedir. Melatonin oldukça kuvvetli bir antioksidandır ve geniş bir etki alanına sahiptir. Vücudumuzdaki her bir hücreyi ve her bir hücrenin her bir bölümünü oksidatif zararlılara karşı korumaktadır.

Melatonin özellikle en toksik radikal olan hidroksil radikaline karşı etkindir. Melatonin hidroksil radikali ile tepkimeye girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüşür ki bunun da O_2^- (süperoksit) radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterdiği kaydedilmiştir. Melatoninin antioksidan olarak diğer bir önemli özelliğide lipofilik olmasıdır. Dolayısıyla hücrenin hemen hemen bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan beyin bariyerinide kolayca geçer. Böylece hücre çekirdeğine kadar çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir(70).

1.16.ÇALIŞMANIN AMACI:

Bu çalışmada kanserojen bir madde olan 7,12-DMBA indüksiyonuna bağlı olarak vücudun serbest oksijen radikallerine karşı oluşturduğu antioksidatif savunma mekanizmasındaki değişikliklerin gözlenmesi ve özellikle Vitamin E+Se kombinasyonu ile melatoninin antioksidatif savunmada ne kadar destekleyici rol aldığı araştırılması amaçlanmıştır.

Yapılan çalışmada 7,12-DMBA indüksiyonuna bağlı olarak antioksidan karaciğer enzim düzeylerinde bir azalma gözlenirken özellikle melatoninin destekli grupta bu azalmanın belirgin bir şekilde önlendiği saptanmıştır. Bu sonuç melatoninin organizma için önemli bir antioksidan olduğu görüşünü destekler niteliktedir.



2.DENEYSEL BÖLÜM:

2.1.DENEYDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER:

Deneysel çalışmalar süresince kullanılan ksantin, ksantin oksidaz, sitokrom c,GSSG (Okside glutatyon), GSH(Redükte glutatyon), BSA(Bovine serum albumin), SOD(Süperoksit dismutaz), NADPH, NaN_3 , Na_2CO_3 , CuSO_4 , Na,K-Tartarat, Folin-fenol reagent, NaOH, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , EDTA, H_2O_2 , ve 7,12-DMBA Sigma Chemical Company'den temin edildi.

2.2.MATERYAL-METOD

2.2.1.Materyal:

Bu çalışmada deney materyali olarak Elazığ Hayvan Sağlığı ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen Musmus culus cinsi,dişi,10-12 aylık beyaz fareler kullanılmıştır. En az onarlı gruplara bölünen farelere kontrol grubu için sadece mısır özü yağı, kanserojen madde grubu için 20 mg/kg/gün dozda mısır özü yağı içerisinde çözünmüş 7,12-DMBA, Vitamin E + Se grubu için kanserojen maddeye ilaveten 48 saat de bir $1,8 \times 10^{-3}$ mg. Se ve 0,09 mg. Vitamin E içeren Vitamin E + Se kombinasyonu, melatonin grubuna ise kanserojen maddeye ilaveten 4,2 mg/kg/gün dozunda mısır özü yağı içerisinde çözünmüş melatonin intraperitoneal olarak enjekte edildi.

7,12 -DMBA enjeksiyonuna başlanmadan önce bir ön defans oluşturmak amacıyla melatonin grubuna 5 gün boyunca 24 saat de bir sadece melatonin ve Vitamin E + Se grubuna yine 5 gün boyunca 48 saat de bir sadece Vitamin E + Se kombinasyonu enjekte edildi. 5. günden itibaren bu koruyucular 7,12-DMBA eşliğinde verildi. 7,12-DMBA enjeksiyonunun başlamasıyla beraber enjeksiyonlar 3 hafta devam ettirildi ve bu süre sonunda fareler deneye alındı.

2.2.2.Metod:

Yukarıda belirtildiği gibi belirli gruplara ayrılıp 3 hafta boyunca enjeksiyonları yapılan fareler bu sürenin dolmasıyla beraber boyun kemikleri kırılarak öldürüldü ve karaciğer dokuları çıkarıldı. Çıkarılan bu dokular derhal PBS (fosfat tamponu,pH=7.4) tamponuyla perfüze edilip tamamen kanından temizlendikten sonra buz izolasyonu altında kurutma kağıdı ile kurutulup tartıldı. Tartılan karaciğerler 1/5 (w/v) oranında PBS tamponu (pH=7.4) eklenerek yine buz izolasyonu altında PCV Kinematica Status homojenizatörü ile tüm doku

parçalanıncaya kadar homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar VWR Branson Scientific sonifikatörde 20 saniye aralıklarla 4 defa 30 saniye süreli sonifiye edilerek özellikle peroksizom membranının parçalanması neticesinde bu organelde lokalize olan katalaz enziminin açığa çıkarılması sağlanmıştır. Homojenizasyon ve sonifiye işlemlerinin ardından 17.000 rpm.'de +5°C'de 15 dakika Ole Dich 157 MP mikrosantrifüj aletiyle santrifüj işlemi ile tüm enzim aktiviteleri ve protein tayininin yapılacağı süpernatant elde edildi. Süpernatant örnekleri enzim aktivite ve protein tayinleri yapılınca kadar derin dondurucuda -40°C'de saklandı.

2.2.3. Protein Tayini :

Karaciğer dokusundan elde edilen süpernatantlardan enzim aktive tayinleri yapılmadan önce 1 ml süpernatantdaki protein miktar tayini için Lowry yöntemi uygulandı (86). Bu yöntem için çözeltiler ve hazırlanışları aşağıdaki gibidir:

A Çözeltisi

- 100 Hacim : % 2'lik Na_2CO_3 'ın 0.1 N NaOH'teki çözeltisi
- 1 Hacim : % 2'lik Na₂K- Tartarat çözeltisi
- 1 Hacim : % 1'lik Cu SO₄ çözeltisi

A çözeltisi, yukarıda belirtilen her üç çözeltinin ayrı ayrı hassas bir şekilde hesaplarının yapılması ve deneye başlamadan hemen önce belirtilen hacim oranlarında karıştırılmasıyla taze olarak hazırlandı.

B Çözeltisi:

- Folin Fenol Belirteci : 1 Hacim
- Bidestile su : 1 Hacim

BSA Çözeltisi :

Standart protein çözeltisi olarak kullanılan BSA (Bovine Serum Albumin) 1 mg/mL konsantrasyonundaki stok çözeltiden örneklerin çalışma aralığına göre 10,20,30,40,50,... µg/mL'lik çözeltileri hazırlandı.

Protein tayin işlemi ise aşağıda belirtilen sıraya göre yapıldı :

1)Her deney için 2 kör örneğinin çalışma aralığına bağlı olarak değişik konsantrasyonlarda BSA'lar ve numuneler için ayrı tüpler kullanıldı ve her tüpe A çözeltisinden 2.5 mL eklendi.

2)Kör numune tüpleri hariç BSA tüplerine belirtilen hacimlerde BSA çözeltilerinden,numune tüplerine ise deney şartlarına bağlı olarak 2,4,... µL'lik örnek çözeltileri tüpün duvarlarına damlacıklar şeklinde eklendi.

3)İki kez vorteksle karıştırılan bu tüpler 10 dakika bekletildi.

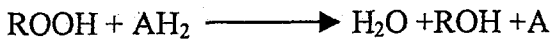
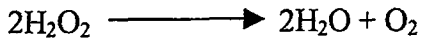
4)1:1 oranında hazırlanan Folin-fenol belirtecinden tüm tüplere 250 µL eklendi. Tekrar vorteksle iki kez karıştırılan bu tüpler,renk oluşumunun sonuçlanması için karanlıkta 45 dakika beklemeye bırakıldı.

5)Bu sürenin bitiminde karanlık ortamdan çıkarılan çözeltilerdeki protein tayinleri Philips PU. 8715 UV/VIS spektrofotometresi kullanılarak 695 nm'deki absorbans değişiminden hesaplandı.

6)Standart BSA çözeltileri ile hazırlanan çalışma (kalibrasyon) grafiğinden yararlanılarak her örnek tüpündeki süpernatanın 1 mL'sindeki protein miktar tayini hesaplandı.

2.2.4.Katalaz Aktivite Tayini ve Hesaplanması

Bütün hayvan ve bitki hücrelerinde bulunan ve aşağıdaki tepkimeleri katalizleyen CAT enziminin aktivite tayini Luck H. (87) yöntemine göre yapıldı.



AH₂ : Değişik substratlar

Gerekli Çözeltiler:

1/15 M konsantrasyonda Na, K-fosfat tamponu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4^- \text{KH}_2\text{PO}_4$) pH=7

Derişik H_2O_2 çözeltisi

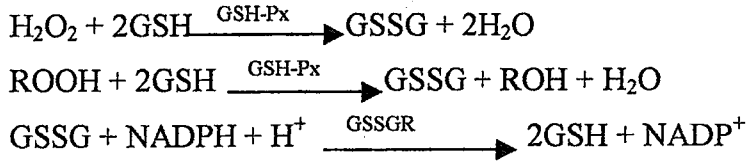
Yöntem :

Hassas olarak hazırlanmış Na-K-fosfat tampon çözeltisinin 100 mL'sine 160 μL H_2O_2 çözeltisi eklendi. Hazırlanan bu çözeltiden 1000 μL alınıp kör olarak kullanıldı. Numunelerin CAT içeriğini saptamak için yapılan aktivite tayinine başlarken, hazırlanan bu karışıma, deney çalışma aralığı dikkate alınarak 15 μL 'den başlayarak gittikçe artan hacimlerde süpernatant eklendi ve bir kez karıştırılıp Philips PU. 8715 UV/VIS spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda 30 saniye süre boyunca absorbans değişimi okundu. Okunan bu optik dansite farkından mL'deki enzim ünite sayısı aşağıdaki gereği hesaplandı.

$$C = \frac{\Delta O_d \times 1 \text{ dk} \times 1000}{0.036 \times \mu\text{L süpernatant}}$$

2.2.5. Glutatyon Peroksidaz Aktivite Tayini ve Hesaplanması

GSH-Px enziminin rol aldığı tepkimeler aşağıdaki gibi olup, aktivite tayini için Lawrance R.A.; ve Burk R.F yöntemi uygulanmıştır(88).

**Gerekli Çözeltiler :**

Tampon Çözelti	:50 mM KH_2PO_4 + K_2HPO_4 + 5 mM EDTA içeren çözelti tampon çözelti olarak kullanılmıştır. pH:7
NaN_3 (Sodyum azid)	: 1 mM
GSH (Redükte glutatyon)	: 2 mM
H_2O_2	: 0.25 mM
NADPH	: 0.2 mM
GSSG Redüktaz	: 1.2 U/mL

Yöntem :

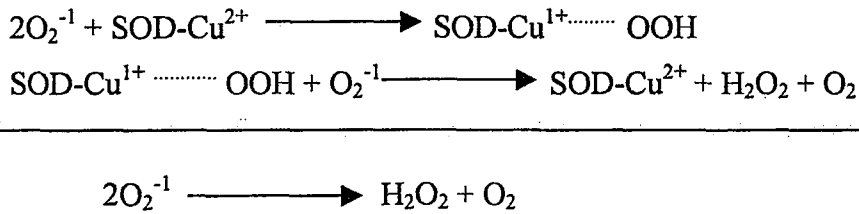
Belirtilen derişimlerde hazırlanan çözeltilerle önce kör ardından da örnek deneyleri yapılmıştır. Bunun için 1 mL tampon, 10 µL NADPH, 10 µL GSH, 10µL NaN₃ ve 2 µL GSSG Redüktaz çözeltileri spektrofotometre küvetine kondu. 37°C’de 5 dakika süre ile inkübasyona tabii tutulan çözelti karışımına H₂O₂ ilave edilerek ve bir kez karıştırdıktan sonra kör deneme için Philips PU. 8715 UV/VIS spektrofotometrede 340 nm’deki absorbans değişimi (1 dakika) gözlendi. Numune deneyleri için ise H₂O₂ eklendikten sonra belirli miktarlarda süpernatant ilave edilerek kör denemeleri için yapılan işlemlerde olduğu gibi 340 nm’deki absorbans değişimi okunarak enzim aktivite tayini şu formülle hesaplandı :

$$C = \frac{\Delta OD}{6220/ml}$$

ΔOD:Optik Dansite Farkı

2.2.6.Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini ve Hesaplanması

Hücrel antioksidatif savunma mekanizmasının en önemli enzimi olan SOD, süperoksit radikallerinin dismutasyonunda görev almaktadır. Ksantin-ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit radikallerinin sitokrom c’yi indirgememesinin SOD tarafından inhibisyonu temeline dayanan enzim aktivite deneyi McCord J.M;Fridovich I yöntemine (85) göre yapılmış olup, detaylar aşağıdaki gibidir.

**Gerekli Çözeltiler :**

A çözeltisi : 0.76 mg (5 μ mol) ksantin'in 10 mL 0.001 N NaOH'daki çözeltisi ve 24.8 mg (2 μ mol) sitokrom c'nin 100 mL 50 mM pH=7.8 ve 0.1 mM EDTA içeren fosfat tamponundaki çözelti karıştırılır. Bu çözelti, +4°C'de 3 gün kararlıdır.

B Çözeltisi : Taze hazırlanan ksantin oksidazın 0.1 mM EDTA'daki çözeltisi 0.2 U/mL.

Yöntem :

- 1)3 mL'lik spektrofotometre küvetine 2.9 mL A çözeltisi eklendi.
- 2)Daha sonra 50 μ L örnek ilave edildi.
- 3)Tepkime 50 μ L B çözeltisinin eklenmesiyle başlatılır.
- 4)Hızlı bir şekilde, Philips PU. 8715 UV/VIS spektrofotometrede 550 nm'deki absorbans değişimi okundu.
- 5)Kör okuması yapılırken örnek yerine 50 μ L bidestile su eklendi.
- 6)Kalibrasyon grafiği çizmek için belli konsantrasyondaki ($5 \cdot 10^{-7}$ M) SOD çözeltisinin 5 μ L, 10 μ L ve 15 μ L'deki bilinen değerlerine karşılık elde edilen % inhibisyon değerleri grafiğe geçirilir. Bu işlem için saf SOD enzimine ihtiyaç vardır. Sonuçta % inhibisyon aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\Delta\text{OD (Örnek)}}{\Delta\text{OD (Kör)}} \times 100$$

3.BULGULAR:

İstatistiksel analize geçmeden önce, her enzim için grupların değerleri normal dağılıma uygunluk yönünden test edilmiş, sonuçta değerlerin normal dağılıma uyduğu görülmüştür. Bu nedenle gruplar arası karşılaştırmada Tek Yönlü Varyans Analizi kullanılmıştır. Gruplar arası farkın analizinde Tukey's HSD Testi kullanılmıştır. Dört grubun GSH-Px,SOD,CAT aktivite değerleri birbiri ile karşılaştırılmış sonuçlar tablo halinde sunulmuştur.

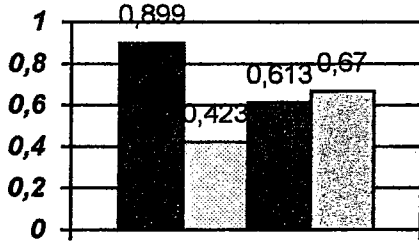
3.1.GSH-Px AKTİVİTE SONUÇLARI :

Tablo 5 : GSH-Px Aktivitesi Yönünden Grupların Karşılaştırılması

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler ortalaması	F Değeri	P
Grupiçi	3	1,1574	0,3858	109,3076	0,0000
Gruplararası	36	0,1271	0,0035		
Toplam	39	1,2845			

Tablo 6 : Grupların GSH-Px Aktivite Ortalamaları

Grup	Denek Sayısı	Aritmetik Ortalama	Standart Sapma
Kontrol	10	0,8999	0,0659
DMBA	10	0,4230	0,0620
Vit E+Se	10	0,6130	0,0383
Melatonin	10	0,6700	0,0668
Toplam	40	0,6515	0,1815



■ Kontrol	0,899
□ DMBA	0,423
■ Vit E+Se	0,613
□ Melatonin	0,67

Şekil 4 : GSH-Px aktivite değerleri ($\mu\text{mol/mg}$ total protein)

Tablo 7 : GSH-Px Post Hoc Matriks Tablosu

Gruplar	Kontrol	DMBA	Vit E+Se	Melatonin
Kontrol	-----	-----	-----	-----
DMBA	*	-----	-----	-----
Vit E+Se	*	*	-----	-----
Melatonin	*	*	-----	-----

*: $P < 0,05$

Matriks tabloda görüldüğü üzere, gruplar arasında GSH-Px enzim aktiviteleri yönünden fark vardır. Bu fark ikili karşılaştırmalarda da gözlenmektedir. Sadece Vit E+Se grubu ile melatonin grubu arasında fark bulunmamıştır ($P > 0,05$). Diğer ikili karşılaştırmaların hepsinde fark bulunmuştur ($P < 0,05$).

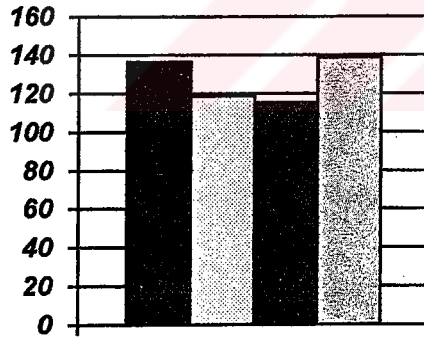
3.2.CAT AKTİVİTE SONUÇLARI

Tablo 8 : CAT Aktivitesi Yönünden Grupların Karşılaştırılması

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler ortalaması	F Değeri	P
Grupiçi	3	4328,7026	1442,9009	11,3366	0,0000
Gruplararası	36	4582,0804	127,2800		
Toplam	39	8910,7830			

Tablo 9 : Grupların CAT Aktivite Ortalamaları

Grup	Denek Sayısı	Aritmetik Ortalama	Standart Sapma
Kontrol	10	136,4130	9,5454
DMBA	10	118,4800	5,1699
Vit E+Se	10	115,3830	5,4976
Melatonin	10	138,7030	19,0014
Toplam	40	127,2448	15,1156



■ Kontrol	136,413
□ DMBA	118,48
■ Vit E+Se	115,383
□ Melatonin	138,703

Şekil 5 : CAT Aktivite Değerleri (µmol/mg total protein)

Tablo 10 : CAT Post Hoc Matriks Tablosu

Gruplar	Kontrol	DMBA	Vit E+Se	Melatonin
Kontrol	-----	-----	-----	-----
DMBA	*	-----	-----	-----
Vit E+Se	*	-----	-----	-----
Melatonin	-----	*	*	-----

*: P<0,05

Matriks tabloda görüldüğü üzere, gruplar arasında katalaz enzim aktivite düzeyleri yönünden fark vardır. Sadece kontrol ile Melatonin grupları arasında ve Vitamin E+Se ile DMBA grupları arasında fark bulunamamıştır(P>0,05). Diğer ikili karşılaştırmaların hepsinde fark bulunmuştur(P<0,05).

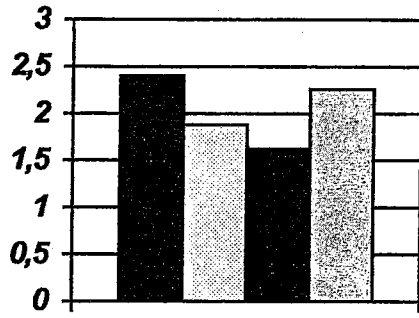
3.3.SOD AKTİVİTESİ SONUÇLARI :

Tablo 11 : SOD Aktivitesi Yönünden Grupların Karşılaştırılması

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler ortalaması	F Değeri	P
Grupiçi	3	3,8333	1,2777	44,3115	0,0000
Gruplararası	36	1,0381	0,0288		
Toplam	39	4,8714			

Tablo 12 : Grupların SOD Aktivite Ortalamaları

Grup	Denek Sayısı	Aritmetik Ortalama	Standart Sapma
Kontrol	10	2,4035	0,2016
DMBA	10	1,8790	0,1069
Vit E+Se	10	1,6210	0,0584
Melatonin	10	2,2630	0,2447
Toplam	40	2,0416	0,3534



■ Kontrol	2,4035
□ DMBA	1,879
■ Vit E+Se	1,621
□ Melatonin	2,263

Şekil 6 : SOD Aktivite Değerleri (µg/mg total protein)

Tablo 13 : SOD Post Hoc Matriks Tablosu

Gruplar	Kontrol	DMBA	Vit E+Se	Melatonin
Kontrol	-----	-----	-----	-----
DMBA	*	-----	-----	-----
Vit E+Se	*	*	-----	-----
Melatonin	-----	*	*	-----

*:p<0.05

Matriks tabloda görüldüğü üzere gruplar arasında SOD enzim düzeyleri yönünden fark vardır. Bu fark ikili karşılaştırmalarda da gözlenmektedir. Sadece Kontrol ve Melatonin grubu arasında fark bulunamamıştır ($P>0,05$). Diğer ikili karşılaştırmaların hepsinde fark bulunmuştur ($P<0,05$).

4.SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI:

Serbest radikaller günümüzde kanser, diyabet, yaşlanma ateroskleroz, iskemik kalp hastalıkları, enflamasyon gibi klinik tablolardan veya bunların gelişmesinden sorumlu tutulabilmektedir(46).

Aerob organizmalarda gerek normal metabolik yolların işleyişi sırasında gerekse doğal yollar dışında vücuda alınan bazı maddelerin metabolizmaları sırasında kuvvetli aktif bileşikler olan serbest radikaller ve elektrofilik maddeler oluşabilmektedir.Bu tip moleküller özellikle kimyasal karsinogeneze çeşitli basamaklarında etkili olabilmekte tümör promotorlarının biyolojik etkilerine taklit edebilmektedir(28).

Deneysel çalışmalar ve epidemiyolojik veriler kanserojen maddelere maruz kalan organizmalarda özellikle karaciğer gibi spesifik dokularda oksidatif stresin arttığı yönündedir. Oksidatif stres sonucu oluşan serbest radikaller karsinogenezisin oluşum ve özellikle de ilerleme basamaklarında oldukça aktif rol almaktadır(24). Bunların yanı sıra canlı organizmayı oluşturan bu radikallere karşı SOD, CAT, GSH-Px gibi enzimlerden oluşan radikal süpürücü enzim sistemi dediğimiz bir savunma mekanizması ile A, E, C gibi antioksidan vitaminler ve melatonin gibi yardımcı savunma sistemleri de mevcuttur. Biz de çalışmamızda, oksidatif stres oluşturmak amacıyla farelere 7,12-DMBA enjekte ettik ve oksidatif strese en hızlı cevap veren organ olan karaciğer dokusunu incelemeye aldık. Böylece kontrol grubu ile kanserojen madde (7,12-DMBA) grubunu karşılaştırma imkanı elde ettik.Bunun yanı sıra farklı gruplara kanserojen maddeye ilaveten vitamin E+Se ve melatonin enjeksiyonları uyguladık ve bu antioksidanların kanserojen maddenin etkilerine karşı ne ölçüde koruyucu rol aldıklarını araştırmayı amaçladık.

Yapılan çalışmalar neticesinde kanserojen madde grubunda SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinde 7,12-DMBA enjeksiyonuna bağlı olarak kontrole nazaran bir azalma ($p<0,05$) saptanmıştır. Melatonin grubunda 7,12-DMBA enjeksiyonuna bağlı olarak enzim aktivitelerinde bir miktar azalma saptanmıştır ($p<0,05$). Ancak bu grubun enzim aktiviteleri kontrol gurubundan düşük bulunurken 7,12-DMBA gurubundan anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur($p<0,05$). Vitamin E+Se gurubundan GSH-Px aktivitesi 7,12-DMBA enjeksiyonuna bağlı olarak kontrolden düşük ($p<0,05$) ancak Vitamin E+Se enjeksiyonuna bağlı olarak da

kanserojen madde grubundan yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Vitamin E+Se grubunun CAT ve SOD sonuçlarında kontrol grubunun yanı sıra kanserojen madde grubuna göre de bir azalma saptanmıştır ki bu bizim için beklenmeyen bir sonuçtur.

Kanser patogenezi ile GSH-Px savunma sistemi arasında bir ilişki olabileceği ileri sürülmektedir(34). Ancak sonuçlar değişkenlik göstermektedir. Roger ve Mark(71) tümör dokularındaki GSH-Px düzeyinde normal dokuya göre bir artış olduğunu bildirirken Cook ve arkadaşları (72) tümörlü doku ile normal doku GSH-Px düzeyinde bir değişiklik olmadığını ileri sürmüşlerdir. Kanserli hastalarda GSH-Px aktivitesi düzeyleri ile ilgili bulgular çelişki taşımaktadır. Butler ve arkadaşları (73) kanser hastalarında eritrosit ve tümör GSH-Px aktivite düzeylerinin arttığını gözlerken Siegers ve arkadaşları (74) tümörün yerleşim yerine göre GSH-Px aktivite düzeyinin azaldığını veya değişmediğini göstermişlerdir. Maruyona ve arkadaşları (75) ratlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında 50 gün boyunca diyetle 7,12-DMBA vererek rat karaciğerlerinde GSH-Px düzeylerini ölçmüşler ve kontrole kıyasla kanserojen madde grubunda anlamlı azalmalar saptamışlardır. Biz de çalışmamızda kanserojen madde grubunun karaciğer GSH-Px düzeylerinde kontrole göre anlamlı bir azalma saptadık($p<0,05$). Vitamin E +Se grubunda bu azalmaya karşı önemli ölçüde direnç olduğu bulgularımız arasında göze çarpmaktadır ki bu da selenyumun GSH-Px'in kofaktörü olması ile ilişkilendirilebilir bir sonuçtur. Bu bulgular genelde literatürle bir uyumluluk göstermektedir. Teorik olarak da uzun süreli oksidatif strese maruz kalan karaciğer dokuları GSH-Px aktivitesinde bir azalma beklemekteyiz. Elimizdeki bazı literatür bulgularında kısa süreli kanserojen madde indüksiyonlarında GSH-Px aktivitesinde bir artma görmekteyiz, ancak bunun organizmanın oksidatif strese karşı ilk cevabı olabileceğini düşünmekteyiz. Kanserli madde indüksiyon süresi arttıkça zamanla antioksidan savunma sistemi enzimlerinde bir azalma ve bu azalmanın sonucu oluşan yetersizlik sonrası da patolojik durumların ortaya çıktığını ileri sürebiliriz.

Süperoksit anyon radikalının dismutasyonundan sorumlu olan SOD enzimi antioksidan savunma sisteminin önemli yapıtaşlarından bir tanesidir. Transforme hücrelerinde SOD aktivitesindeki değişiklik önce in vitro çalışmalarda gözlenmiştir. İlk olarak SV-40 ile transforme edilen hücrelerde Mn-SOD aktivitesinin ve protein elektroforezinde de Mn-SOD protein bandının ya hiç bulunmadığı veya önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (76). Bu bulgulardan sonra in vivo çalışmalar hız kazanmıştır. İn

vivo kanser hücreleri ile yapılan ilk çalışmada da Moris-Hepatoma 3924 A ve Ehrlich ascites tümör hücrelerinin normal düzeyde Cu, Zn-SOD içerdikleri fakat enzimin mitokondri formu olan Mn-SOD 'u hem aktivite hem de protein yönünden içermedikleri bulunmuştur. Enzimin bu formunun tümör hücrelerinde genellikle azaldığı, bazı türlerde ise değişmediği gözlenmiştir (77). Bir başka çalışmada deney hayvanlarında hidralazin ve 3-MC verilerek oluşturulan akciğer tümörü modellerinde tümör dokularında SOD aktivitelerinde anlamlı azalmalar olduğu kaydedilmiştir(78). Campbell ve arkadaşlarının (79) yapmış olduğu bir diğer çalışmada ise 7,12-DMBA indüksiyonu ile meme kanseri oluşturulan ratlardan elde edilen karaciğer dokularında yapılan SOD ölçümleri sonucunda kanserojen madde enjekte edilen grubun enzim aktivite düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde düşük olduğu saptanmıştır. Biz de çalışmamızda kanserojen madde grubunun karaciğer SOD aktivite düzeylerinin kontrol grubuna göre daha düşük bulurken Vitamin E + Se ve melatonin grubunun enzim düzeylerinin biraz düşmüş olmasına rağmen kontrol grubuna daha yakın olduğunu saptamış bulunmaktayız.

Peroksizomlarda lokalize olmuş olan CAT hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalayarak peroksidan aktivitesi gösteren bir diğer önemli antioksidan savunma elemanıdır. Bewlick ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada lenf kanserli hastalarda serum CAT aktivite düzeyleri ölçülmüş ve enzim aktivitelerinde kontrole göre anlamlı azalmalar olduğu kaydedilmiştir (80). Ancak CAT için de literatür bulguları birtakım çelişkili sonuçlar taşımaktadır. Gonzales ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışma da (81) kanserli hastalarda plazma CAT aktivitesi düzeylerinde bir artma olduğu saptanmıştır. Yılmaz ve arkadaşları ratlarda yapmış oldukları bir çalışmada 3-MC enjeksiyonuna bağlı olarak rat karaciğer dokusunda CAT aktivite düzeylerini ölçmüşler ve anlamlı bir artış saptamışlardır. Ancak yine enjeksiyondan kısa süre sonra ratları deneye aldıkları için bu artışın organizmanın ilk tepkisi olduğu düşünülebilir.

Sonuç olarak kanserojen madde enjekte edilen grupta antioksidan enzim düzeylerinde belirgin bir azalma saptanırken kanserojen maddenin yanısıra vitamin E +Se ve melatonin enjekte edilen gruplarda bu azalmanın bir miktar önlendiği saptanmıştır. Elimizdeki literatür bulguları çok önemli yardımcı antioksidan savunma elemanları olan Vitamin E, Se ve melatonin oksidatif hasara karşı güçlü bariyerler oluşturduklarını ortaya koymaktadır. Rao ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada (82) 7,12-DMBA enjekte edilen farelerdeki tümör oluşumunun Vitamin E ve Se tarafından önemli ölçüde inhibe edildiği saptanmıştır. Ayrıca L'Abbe ve arkadaşları

(83) ratlar üzerinde yapmış oldukları çalışmalar tümör oluşum süreci ile Se düzeyleri arasında negatif bir korelasyon olduğunu ortaya koymuşlardır. Bartsch ve arkadaşlarının (84) yapmış oldukları bir çalışmada ilk safhadaki göğüs kanserinin gelişiminin melatonin tarafından önemli ölçüde azaltıldığı saptanmıştır. Çalışmamızda melatonin enjekte edilmesiyle antioksidan savunma sistemi desteklenen grupta radikal süpürücü enzim aktivitelerindeki azalmanın anlamlı olarak önlendiğini saptadık. Benzer şekilde Vitamin E ve Se verilen grupta GSH-Px aktivitesindeki azalmanın belirli ölçüde önlendiğini bulurken bu grubun CAT aktivite düzeylerinde kanserojen madde grubunun CAT enzim düzeylerine göre anlamlı bir fark saptayamadık.

7,12-DMBA gibi kanserojen maddeler SOD, CAT, GSH-Px aktiviteleri dahil hücrenin antioksidan savunmasında ani ve sürekli bir azalmaya neden olmaktadır. Yapmış olduğumuz çalışma sonucunda genel anlamda bu teorik bulguya uygun sonuçlar elde ettik. Özellikle melatonin enjeksiyonlu grupta gözlenen anlamlı antioksidan kapasite artışı oldukça umut vericidir. Bu konuda yapılacak olan çalışmaların önemli bir boşluğu dolduracağı fikrine varmak mümkündür.

Bulgularımızın bundan sonraki çalışmalara ışık tutacağını ümit ediyoruz.

KAYNAKLAR:

- 1) Slater, T.F., 1984, Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem.J.*222,1-15.
- 2) Aust S.D., Svingen B.A., 1982, Free radical in Biology. *Academ.Press*,5,1-28.
- 3) Guemouri L.,Yves A., Herbert B.,1991, Biological variability of SOD, GSH-Px and CAT in blood.*Clin.Chem.*37/11,1932-1937.
- 4)Heribert W.,1987 Singlet oksijen in biological systems. *J.Electoanal.Chem.*232,91-104.
- 5)Elstner E.F.,1991 Oxygen Radicals–Biochemical basis for their efficacy.*Clin.Wochen.*69,949-956.
- 6)Cheeseman K.H.;Slater T.F.,1993, An introduction to free radical biochemistry .*Br.Med.Bul.*49,479-490.
- 7)Halliwell B.; Gutteridge J.M. 1990, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease:An overviev;*Methods Enzymol*,186,1-85.
- 8)Del Maestro R.F., 1992, An approach to free radicals in medicine and biology.*Acta Physiol.Scand.Suppl.*492,153-168.
- 9)Bast A.;Haenen G.R.,1991, Oxidonds and antioxi-donts.State of the art.*Am j. Med.* ,0,1 ,32-33.
- 10)Tanugan G. ; Koldaş M; Uras F, 1994, Serbest radikaller Haseki Tıp Bülteni Cilt:32 , Sayı:4 ,Ekim .Kasım. Aralık, 1994.
- 11)Sies H.,1991 ,Role of reactive oxygen species in biological processes, *Clin. Wochenschr.*69,965-968.
- 12)Southoin ,P.A.;Powis G.,1988, Free radical in Medicine.I. Chemical Nature and Biologic Reactions. , *Mayo Clin. Proc.* 63,381-389.
- 13)Fremann BA ,Crapo JD.,1982, Free radicals and tissue injury . *Lab. Invest* . 47,412-426.
- 14)Van, L.F.,1993, Free radicals , *Analytical Chemistry*.Vol. 65, No:12 June 15,1993
- 15)Akkuş İ. ; Serbest radikaller ve fizyopetolojik etkileri. MIMOZA yayınları, Konya , 1995-08-26
- 16)Halliwell B, Gutteridge JMC,1984, Lipid peroxidation , oxygen radicals , cell damage and antroxidant therogy. *The Cancet* .23,1396-1397 June 1984.

- 17)Evens Plt, 1993, Free radicals in Brain Metabolism and pathology. Br Med Bull. 49(3), 577-587.
- 18)Barber D.A.,Harris S.R, 1994, Oxygen free radicals and antioxidants: A reviews. Amer Pharm. NS: 34(9). 26-35.
- 19)Babs C.F., 1990, Free radicals and the etiology of cancer.;Free Radical Bio Med.8,191-201.
- 20)Joenje H., 1989, Gentic toxicology of oxygen.A Review Mutation Res.219,193-208.
- 21)Adelman R.;Soul L., 1988, Oxidative damage to DNA:Relation to species metabolic rate and life span.Proc. Ntl.Sci.85,2706-2709.
- 22)Ames B.N., 1983, Oxygen radicals and degenerative diseases.Science,221,1256-64.
- 23)Balentine J.D.,1982, Pathology of oxygen toxicity.Academic Press.74 ,58-67.
- 24)Balin A.K.;Goodman B.P., 1992, The effects of oxygen.J.Cell Bio. 74,58-67.
- 25)Lunec J.;Blake D.,1990, Oxygen free radicals :Their relevance to disease processes.The metabolic and moleculer basis of acquired diseases.Balliere Tindall,Lond.189-212.
- 26)Klebanoff S.J.,1980, Oxygen metabolism and toxic properties of phagocytes.Ann Int. Med. 93,480-489.
- 27)Chance B.;Sies H.,1989, Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.Physion Rev.59,527-605.
- 28)Di Guiseppi J.,1984, The toxicology of moleculer oxygen.CRC Crit. Rev. Toxicol.12,315-342.
- 29)Jones D.P.,1988, The role of oxygen concentration in oxidative stress.Academic Press pp.151-195.
- 30)Porter N.A., 1984, Chemistry of lipids peroxidation. Methods In Enzymology,105,273-282.
- 31)Ferrari R.;Ceconi C.,1991, Oxygen free radicals and myocardial damage;potective role of thiol containing agents.The Am J.Med.91,95-105.
- 32)Sun Y., 1990, Free radicals and antioxydant enzymes.Free Radical Biol.Med.8,583-98.

- 33) Mathy .MJ., Ronald A.,1991, Oxygen free radicals and glutathione in hepatic ischemia reperfusion injury. *J.Surg. Res.* 50.398-402.
- 34) Kozumbo WJ.;Trush MA, 1985, Are free radicals involved in tumor promotion *Chem.Biol.* 54;199-207.
- 35) Evans P.H.,1993, Free radicals in Brain Metabolism and Pathology .*Br. Med.Bull.*49(3),577-587.
- 36) Szedlacsek SE,Duggleby R.G. Vlad M.O,1991, enzyme catalysis as a chain reaction .*Biochem J.* 279,855-861.
- 37) Köse K. Doğan P.,1994, Lipid peroxidation and antioxidation activity.*T.J. Med. Science* 22:31-34.
- 38) Isbir T.,1994, Antioxiden sistemler.Entodel , İzmir Tabip Odası Temel Bilimler Kolu Sonbahar Okulu, İzmir Ekim,92-98.
- 39) Pol. G.,1993, Liver Damage Due to free radicals .*Br. Med. Bull.*49(3),604-620.
- 40) Spallholz JE.,1990, Essential nutrient and antioxident component of the immune system.*Adv.Exp. Med. Biol.* 262,145-158.
- 41) Chiarpotto E. , Gcauazza A.,1997, Oxidative damage and transforming growth factor beta 1 expression in pretumoral and tumoral lesions of human intestine .*Free radicals Biol. Med.* 22(5), 889-94.
- 42) David JH., Joan E.M.D. ,1993, A prospective study of the intake of vitamins E and the risk of breast cancer . *N.Eng.J.Med.*22,234-240.
- 43) Coles B. , Ketterer B., 1970, The role of glutathione and glutathione transterases in chemical carcinogenesis.*Biochemistry and molecular biology.*25(1),47-70.
- 44) Burkitt D.P., 1971, Metabolism of cancer of the colon and rectum . *Cancer* 28(1),1-13.
- 45) Slater T.F.,1991, Free radical studies in relation to cancer and liver regeneration .*South African Journal of science* . 87,43-48.
- 46) Sies H.,1986, Biochemistry of oxidative stress .*Angew , Chem.Int.Ed. Engl.* 25,1058-71.
- 47) Niwa Y., Kanoh T., 1987, The ratio lipid peroxides to superoxides dismutase by tumor necrosis factor : Possible protective mechanism.
- 48) A.Slater.,R.S. Morris.,1983, Vitamin E and lipid metabolism .*Adv.lipid Res.*1,183-185.

- 49)Cnad F., And J.Verdetti .,1989, Superoxide dramutase, and lipid peroxidation in the major organs of rats .Free radical Biol. Med. 7,59-63.
- 50)Boveris A., Chance B.,1981, Hydroperoxide metabolism and lipid peroxidation .Physiol. Rev. 63,412-16.
- 51)M.Vani, G.Panduranga, 1990, Superoxide dismutase catalase ,Glutathione peroxidase and lipid peroxidation .Biochemistry International .21,17-26.
- 52)Sawyer D.T.,Valentine J.S.,1991, How super is superoxide .Accounts Chem Res.14,393-400.
- 53)Ansari K.A., Kaplan E., Shoeman D.,1989, Age-related changes in lipid peroxidation and protective enzymes in the central nervous system.Growth, Development and Aging.53,117-121.
- 54)Valenzuela A., Anderson R.,1990, The biological significance of malondialdehyde detemination in the assesment of tissue oxidative stress.Life Scien ,43,301-309.
- 55)Babs C.F.,1990, Free radicals and etiology of cancer.Biol.Med.8,191-200.
- 56)Gold L.S.; Slone T.H.,1992, Rodent carcinogens:Setting priorites.Science 258,261-265.
- 57)Kozumbo W.J.;Trush M.A.;Kensler T.W., 1989, Are free radicals involved in tümöt promotion.Env.Healt Pers.81,55-57.
- 58)Cerutti P.A.,1988, Prooxidant states and tumor promotion .Science 227,375-381.
- 59)Sigmund A.W.;Leo I.G.,1990, Inflammation and cancer:Role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis.Blood, 76(4),655-663.
- 60)Simic M.G.,1991, DNA Markers of oxidative processes in vivo:Revelance to carcinogenesis and anticarcinogenesis.Cancer Res.54,1918-23.
- 61)Irenne C.P.;Annie N.;Clement M.,1992, Age-related changes in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in brains of control and transgenic mice overexpressing SOD.Mutation RES.275,281-293.
- 62)Pigeolet E.;Corbisier P.;Houbion A., 1990, GSH-Px, SOD and CAT inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. Mechanism of Ageing and Development, 51,283-297.
- 63)Richard T.;Lawrence F.; 1976, GSH-Px activity in rat liver.Biochemical and Biophysical Res.71(4)952-960.

64)Fişkın K.;Kandemir S.;Hamamcı D.;1994, Age related changes in CAT,GSH-Reductase activities the amount of GSH in total body of oregon and vestigial.Arch.Geront.(Suppl)4,85-90.

65)Bendich A.; 1990, Antioxidant vitamins and their functions in immune responses.Adv.Exp.Med.Biol.262,35-55.

66)Riemersma R.A.;Wood C.A.;1991, Plasma concentration of Vitamin A and carotene and risk of angina pectoris.The Lancet,8732,1-5.

67)Jacob R.A.;Skala J.H.; 1987, Biochemical indices of human Vitamin C status.Am J. Clin. Nut.46,818-826.

68)Young I.M.;Leone R.M.;1985, Melatonin is metabolized to N-Asetylserotonin and 6-Hydroxymelatonin in man.J. Clin.Endocrin. Metab.60,114-119.

69)Wetterberg I.;Eriksson O.;Friberg Y.;1988, A simplified radioimmunaassay for melatonin and its application to biological fluids;Preliminary observations on the half-life of plasma melatonin in man.;Clic. Chem. Acta.86,169-177.

70)Barstch C.;Barstch A.;Lippert A.;1990, Effect of the mammary carcinogen 7,12-DMBA on pineal melatonin biosynthesis.Neuroendocrinology,52,538-544.

71)Roger R.P.;Mark L.B.; 1993, GSH-Px activity and variability in breast tumors and normal tissue.Cancer ,72(3) 783-787.

72)Cook M.G.;Namara M.C.; 1980, Effect of Vitamin E on dimethylhydrazine induced colonic tumors in mice.Cancer Res.41,4458-61.

73)Butler R.N.;Bbutler W.J.;Moraby Z.;1994, GSH-Px activity in human colonic neoplasm.J.Gastroenterol Hepotol.9,60-65.

74)Siegers C.P.;Younes H.;Thies E.; 1984, GSH and GSH- dependent enzymes in the tumorous and nontumorous mucosa of the human colon rectum.Cancer Res.107,238-241.

75)Maruyama H.;Watansabe K.;Yamamoto I.; 1991, Effect of dietary kelp on lipid peroxidation and GSH-Px activity in livers of rats given breast carcinogen DMBA.Nutrition and Cancer,15,220-228.

76)Yamanaka N.Y.;Deamer D.;1984, SOD activity in WI-38 cell cultures.Effect of age trypsinization and SV-40 transformation.Physiol.Chem.6,95-106.

77)Kılınç K.; 1986, Kanserde oksijen radikalleri ve SOD .Biyokimya Dergisi ,4(3)59-76.

78)He R., 1990,Inhibitory effect of micronutrients and BHA on lung cancer induced in rats.Ching Hua Chung Liu Tsa 12,421-424.

79)Campbell J.S.;Fisher W.F.; 1990, Effect of low copper and high zinc intakes related changes in Cu,Zn-SOD activity on DMBA induced mammary tumorigenesis.Biol.Trace Elements Res.30,65-80.

80)Bewick M.;Coutie W.;Tudhope G.; 1987, SOD, CAT, GSH-Px in the red cells of patients with malignant lymphoma.British J. Haematol.65,347-350.

81)Gonzales R.;Auclair C.;Voisin E.; 1984, SOD,CAT,GSH-Px in red blood cells from patients with malignant diseases.Cancer Res.44,4137-4139.

82)Rao A.R.; Hussain S.P.;1990, Modulatory influences of tamoxifen, tocopherol, retinyl acetate, aminogluthethimide and Se on DMBA induced initiation of mammary carcinogenesis in rats.Indian J. Experimental Biol.28,409-416.

83)L'Abbe M.R.; Ficher F.W.;Trick K.D.; 1988, Effect of dietary Se and tumor status on the retention Se by tissues and mammary tumors of DMBA treated rats.Biol. Trace Elements Res.20,179-195.

84)Bartsch C.;Bellmann O.; 1989, Depression of serum melatonin in patients with primary breast cancer is not due to an increased peripheral metabolism.J. Cancer 67,1680-1688.

85)Fridovich, I; Antioxidant defences in the lung,Ann.Rev.Physiol.;48,693-702,1986.

86)Lowry,O.; Rosebrough, N.J.; 1956, Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent, J.Biol. Chem.; 193,265-275

87)Luck,H.; Methods of Enzymatic Analysis, 2nd edt.; Verlag Cheme, Academic Press, 885-888, 1963

88)Lawrance, R. A.; Burk, R.F.; GSH-Px Activity in Rat Liwer,Biochemical and Biophysical Res. Comm., 71,952-958,1976

89)McCord, J.M.; Fridovich, I; SOD; An Enzymic Function for Erythrocuprein,The Journal of Biol. Chem.,244,6049-6055, 1969