

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİGARANIN SERUM MALONDİALDEHİT, ERİTROSİT
GLUTATYON PEROKSİDAZ ENZİM AKTİVİTESİ İLE
YÜKSELTGENMİŞ VE İNDİRGENMİŞ GLUTATYON
MİKTARINA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nilgün NURAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

ELAZIĞ- 2005

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİGARANIN SERUM MALONDİALDEHİT, ERİTROSİT GLUTATYON
PEROKSİDAZ ENZİM AKTİVİTESİ İLE YÜKSELTGENMİŞ VE
İNDİRGENMİŞ GLUTATYON MİKTARINA ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Nilgün NURAL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

Bu tez, .../.../2005 tarihinde, Aşağıda Belirtilen Jüri Tarafından Oybirliği/
Oyçokluğu İle Başarı / Başarısız Olarak Değerlendirilmiştir.

Danışman : Doç Dr. Fikret KARATAŞ

Üye : Doç. Dr. İhsan HALİFOĞLU

Üye : Doç. Dr. Öküz YILMAZ

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
.19../.10../2005 tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

2005/36-1

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

**SİĞARANIN SERUM MALONDİALDEHİT, ERİTROSİT GLUTATYON
PEROKSİDAZ ENZİM AKTİVİTESİ İLE YÜKSELTGENMİŞ VE İNDİRGENMİŞ
GLUTATYON MİKTARINA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nilgün NURAL

Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
2005, Sayfa: 35+VII

Bu çalışmada sigara kullanan 26 kişi ile sigara kullanmayan 30 kişinin eritrosit glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitesi UV-spektrofotometresi kullanılarak belirlendi. Aynı kişilerin eritrosit yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) miktarları ile serumlarında lipid peroksidasyon bir ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarları da yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlendi.

Sigara kullanan kişilerin MDA miktarları kontrol grubuna göre yüksek ($p<0.01$) bulundu. Ayrıca GSSG miktarları ile GSH-Px aktiviteleri de kontrol grubuna göre yüksek ($p<0.05$) iken sigara kullanan kişilerin GSH miktarlarının kontrol grubundan farklı olmadığı ($p>0.05$) görüldü.

Sonuç olarak sigaranın MDA miktarında ve antioksidan aktivitede artış oluşturmaya oksidatif stres ile açıklanabilir.

Anahtar Kelimeler: MDA, GSH-Px, GSSG, GSH, Sigara

ABSTRACT

Master Thesis

THE INVESTIGATION OF EFFECT THE LEVELS OF MDA IN SERUM, OXIDE AND REDUCTE GLUTATHIONE AMOUNTS AND GLUTATHIONE PEROXIDASE ACTIVITY IN ERYTHROCYTE OF SMOKE

Nilgün NURAL

Firat University

Graduate School of Naturaland Applied Sciences,

Department of Chemistry

2005, Page: 35+VII

In this study, glutathione peroxidase enzyme activity (GSH-Px) in erythrocyte of 26 smoked cigarette person and 30 nonsmoker persons taken as control group were determined by using UV-spectrofotometer. Besides oxide (GSSG) and reducte (GSH) glutathione amounts in erythrocytes and levels of malondialdehyde (MDA) being a product of lipid peroxidation in the blood serum of same persons were determined with high performance liquid chromatography (HPLC).

Serum MDA level was significantly higher in smokers when compared to that of controls ($p < 0.01$). Moreover it was obtained that the levels GSSG and GSH-Px activity in erythrocyte of smokers were significantly higher than those of control group ($p < 0.05$), while GSH amounts found to be unchanged in the smokers ($p > 0.05$).

Finally, it can explained that the increase seen in the antioxidant activity and in the MDA levels, with oxidative stress formation of cigarette.

Keywords:MDA, GSH-Px, GSSG, GSH, Cigarette

TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanmasında, yürütülmesinde ve çalışmalarım boyunca destek ve anlayışını esirgemeyen bilgi, tecrübe ve hoşgörülerinden yararlandığım sayın hocam Doç. Dr. Fikret KARATAŞ'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. Ayrıca örneklerin temin edilmesini sağlayan Doç. Dr. Tuncer TUĞ hocama da çok teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
TABLoların LİSTESİ	V
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	VI
KISALTMALARIN LİSTESİ	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Malondialdehit (MDA)	2
2.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px).....	2
2.3. Glutasyon	3
2.3.1. Glutasyonun Yapısı ve Önemi	3
2.3.2. Glutasyonun Sentezi ve Döngüsü	5
2.4. Malondialdehit, Glutasyon Peroksidaz ve Glutasyon ile Yapılmış Bazı Çalışmalar.....	7
2.5. Amaç	11
3. MATERYAL VE METOT.....	12
3.1. MDA Tayini.....	12
3.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Tayini	14
3.2.1. Hemolizat Hazırlanması.....	14
3.2.2. Hemoglobin Tayini.....	16
3.3. İndirgenmiş ve Yükseltgenmiş Glutasyon Tayini	17
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	20
4. BULGULAR.....	21
5. TARTIŞMA	25
KAYNAKLAR	28
ÖZGEÇMİŞ	35

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4.1. Kontrol Grubu Kişilerin Kan Serum MDA, Eritrosit GSH-Px Aktiviteleri ile Eritrosit GSH ve GSSG Miktarları.....	21
Tablo 4.2. Sigara Kullanan Kişilerin Kan Serum MDA, Eritrosit GSH-Px Aktiviteleri ile Eritrosit GSH ve GSSG Miktarları.....	22
Tablo 4.3. Kontrol ve Sigara Kullanan Gruplara Ait MDA, GSH-Px, GSH, GSSG Parametrelerinin Karşılaştırılması.....	23
Tablo 4.4. Kontrol ve Sigara Kullanan Kişilerin İlerleyen Yaş Gruplarına ait MDA, GSH-Px, GSH, GSSG Parametrelerinin Karşılaştırılması.....	23



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.3. Glutasyon Sentezi ve Döngüsü.....	6
Şekil 3.1. HPLC’de MDA Standardına ait Kromatogram.....	13
Şekil 3.2. MDA’nın Çalışma Grafiği ve Doğru Denklemi	14
Şekil 3.3. HPLC’de İndirgenmiş ve Yükseltgenmiş Glutasyon Standartlarına ait Kromatogram.....	18
Şekil 3.4. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Çalışma Grafiği ve Doğru Denklemi	19
Şekil 3.5. Yükseltgenmiş Glutasyon (GSSG) Çalışma Grafiği ve Doğru Denklemi	20
Şekil 4.1. Kontrol ve Sigara Kullanan Grubun MDA, GSH-Px, GSH, GSSG, Parametrelerinin Karşılaştırılması.....	24



KISALTMALAR LİSTESİ

GSH	: İndirgenmiş Glutasyon
GSSG	: Yükseltgenmiş Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
MDA	: Malondialdehit
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
DNA	: Deoksiribonüklik Asit
ATP	: Adenintrifosfat
ROS	:Reaktif Oksijen Ürünleri
GSSF	: Glutasyon Disülfit
ADP	:Adenindifosfat
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (indirgenmiş)
H ₂ O ₂	:Hidrojen Peroksit
NADH	:Nikotinamid Adenin Dinükleotit (indirgenmiş)
SOD	:Süperoksit Dismutaz
CAT	:Katalaz
AOE	: Ana Antioksidan Enzimler
TRABS	: Tiobarbütirik Asit Reaktif Maddeleri
GST	:Glutasyon Transferaz
GSH-Red	:Glutasyon Redüktaz
CD	: Konjuge Dien
EDTA	:Etilendiamin Tetra Asetikasit
KCN	:Potasyum Siyanür
KH ₂ PO ₄	:Potasyum Dihidrojen Fosfat
Na ₂ HPO ₄	:Sodyum Monofosfat
HClO ₄	:Perklorik Asit
NaCO ₄	:Sodyum Perklorat
NaN ₃	:Sodyum Azit
H ₃ PO ₄	:Fosforik Asit
HCl	:Hidrojen Klorür
K ₃ Fe(CN) ₆	:Potasyum Ferrosiyanür
NaHCO ₃	Sodyum Karbonat

1. GİRİŞ

Sigara kullanımının, amfizem akciğer kanseri gelişimi, ateroskleroz ve miyokard infarktüsü gibi akciğer ve kardiovasküler sistem üzerine birçok yan etkisi olduğuna dair pek çok epidemiyolojik kanıt vardır [1, 2]. Sigara aldehitler, fenoller, hidrokarbonlar nitrik oksit, kinon ve semikinon radikalleri gibi pek çok kimyasal yapıyı bulundurur. Bu kimyasal yapılar direkt veya indirekt yollarla oksijen kaynaklı serbest radikal oluşumuna yol açarlar [3]. Sigara yüksek konsantrasyonda nitrojen oksitler içerir. Esas olarak nitrik oksitten oluşan bu yapılar daha sonra nitrojen dioksit dönüşür. Nitrojen dioksit bir serbest radikaldir. Sigara yalnızca nitrojen oksitleri değil peroksi radikaller ve gaz fazında mevcut karbon merkezli radikaller ve tar fazında göreceli olarak stabil başka birkaç radikal içerir. Bunlar çeşitli kinon ve hidrokinonlardan kaynaklanan semikinonlardır. Bı radikal yapılar lipid peroksidasyon ve protein sülfhidril oksidasyonuna neden olarak zar yıkımı ve enzim aktiviteleri değişimine neden olabilir [4]. Bu radikaller organizma için önemli birçok moleküle zarar verirler. Serbest radikallere hedef yapılardan biri hücre zarı lipidleridir. Serbest radikallerinin hücre zarı yapısındaki doymamış yağ asitlerine saldırısı sonucu başlayan lipid peroksidasyonu konjuge dienler ve toksik aldehit ürünlerinin oluşumuyla sonuçlanır. Bu ürünlerin en çok bilineni malondialdehittir (MDA) [3, 5]. Sigaranın oksidan potansiyeline sahip olduğu biliniyor. Yüksek katranlı sigara çeşitlerinin oksidasyon dereceleri, düşük katranlı sigara çeşitlerine göre daha yüksektir [6]. Sigara oksidatif stresi arttırmakta ve oksidatif strese bağlı olarak da serbest radikal oluşumu artmaktadır [7-9]. Sigara kullanımı sırasında çok sayıda serbest radikal ve reaktif oksijen örnekleri üretilir. Serbest radikaller hücrede membran lipidleri, proteinler, karbonhidratlar ve DNA üzerinde çok sayıda farklı moleküller yoluyla oksidatif hasara neden olurlar [10]. Serbest radikaller enzimatik (GSH-Px, SOD, katalaz, vs) ve nonenzimatik (antioksidan ve GSH) savunma sistemleri tarafından etkisiz hale getirilmektedir [11].

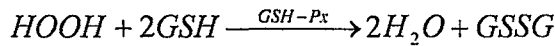
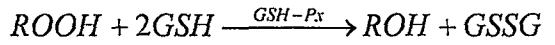
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Malondialdehit (MDA)

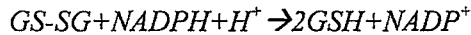
Günümüzde birçok hastalığın ortaya çıkmasında, serbest radikallerin önemli rolü olduğu ileri sürülmektedir [12]. Serbest radikallerinin, membranların reseptörlerine kovalent bağlanması çoklu doymamış yağ asidi/protein oranını değiştirir ve lipid peroksidasyonu başlatır. Lipit peroksidasyonuna bağlı olarak da organellerde fonksiyon bozukluğu oluşur [13]. Bu şekilde oluşan lipid peroksitleri kolaylıkla yıkılarak, en önemlisi MDA olan reaktif karbon bileşiklerini meydana getirirler. Bu nedenle MDA miktarı ölçümü dokulardaki lipid peroksidasyon derecesini yansıtmaktadır [14]. Lipit peroksidasyon yıkım ürünü olan MDA, molekül oksijen azalması yaparak süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit oluşumuna neden olur, bu ürünlerde hücre ve dokulara hasarlayıcı etki yaparlar [15]. İnsanlarda prooksidan-antioksidan dengeyi incelemek için genellikle kan örnekleri kullanılır. Bu amaçla serumda MDA ve dien konjugat düzeyleri (ayrıca protein karbonil grupları, serum toplam antioksidan aktivitesi, vitamin E ve C gibi antioksidan moleküllerin düzeyleri) ölçülmektedir [16, 17].

2.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz hücre içi bir enzim olup aktif merkezinde selenosistein içerir ve vücutta doğal olarak bulunan bir antioksidandır. GSH-Px; iki adet tiyol grubu ihtiva eden glutasyonu, glutasyon disülfite yükseltgerken hidroperoksitleri ve H_2O_2 'yi indirger.



GSH, glutasyon redüktaz (GSH-Red) enzimi tarafından NADPH kullanılarak rejenere edilirler. NADPH ise pentoz fosfat yolundan elde edildiğinden bu yol detoksifikasyon mekanizmasını destekleyici görünümündedir [18-21].



GSH-Px enzimi, karaciğer, böbrek eritrositler, damar endoteli ve gözün lens metabolizmasında büyük önem taşır [22]. GSH-Px peroksitlerin alkollere dönüşümünü katalize ederek; Eritrosit, zar lipidleri, hücre zarı sellüler ve subsellüler membranların oksidatif etkisinden korunmasını sağlar [23]. GSH-Px'in selenyuma bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki şekli mevcuttur [24]. Glutasyonun yükseltgenme ve indirgenmesini sağlayan sistemin bir parçası olan GSH-Px'in her molekülü 4 atom selenyum içermektedir [25].

Selenyum bağımlı enzim hem H_2O_2 'e hem de hidroperoksitlere etki eder. Selenyuma bağımlı olmayan ise H_2O_2 yıkımını katalize etmez, ancak lipid hidroperoksitlerin yıkımında görev alır. GSH-Px karaciğer, böbrek korteksi ve iskelet kasında bulunur. Böbrek medulasında selenyum bağımlı ve bağımsız GSH-Px eşit miktardadır. GSH-Px enziminin katalize ettiği reaksiyon ile membran lipidlerinin ve hemoglobinin peroksitler tarafından oksidasyonu önlenir. Bu reaksiyon hemoglobinin methemoglobine oksidasyon oranını azaltarak eritrositin ömrünü uzatır [26].

GSH-Px'in substratlara özgü ve farklı doku dağılımlı sitozolik GSH-Px, fosfolipit hidroperoksit GSH-Px, plazma GSH-Px ile mide ve bağırsaklarla ilgili dört farklı izoformu vardır [27].

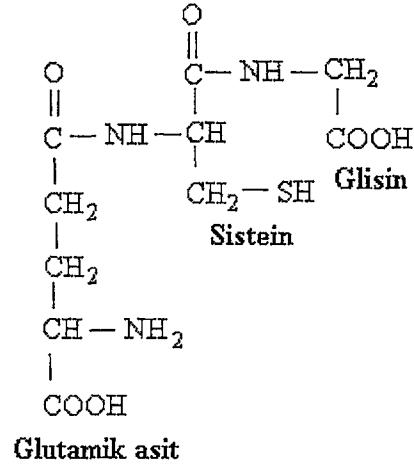
Antioksidanların çoğu radikallerin etkisini önlemek amacıyla hastalıkların tedavisinde kullanılır. Ancak katalaz (CAT) ve GSH-Px enzimleri tedavi amacıyla kullanılmazlar. Bu enzimler protein yapısında oldukları için bağırsak enzimleri tarafından inaktive edilirler. Ancak ağız yoluyla alınan selenyum, GSH-Px ve CAT etkisini in vivo olarak artırıp serbest radikallerin toksisitesini ortadan kaldırmaya çalıştığı belirtilmektedir [12].

2.3. Glutasyon

2.3.1. Glutasyonun Yapısı ve Önemi

Tabiatta çok yaygın bir şekilde bulunan bir sülfürlü bileşik olan glutasyon 1921 yılından HOPKINS tarafından keşfedilmiştir. Önce glutamil-sistein'den ibaret bir dipeptit olduğu zannedilmiştir. Fakat 1929 yılında kristal halde elde edildikten sonra yapısının tripeptit olduğu anlaşılmıştır. 1935 yılında ise HARRINGTON ve MEAD tarafından γ -L-glutamyl-sisteinyl-glisin halinde sentez edilmiştir [28].

Glutasyon (γ -glutamyl sisteinil glisin) organizmada tiyol grubu içeren düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptittir [29, 30]. Yapısını oluşturan 3 aminoasit sırasıyla glutamik asit+sistein+glisin'dir. Bunun isimlendirilmesi serbest amino grubu taşıyan aminoasit artığının isminin sonundaki -in takısı -il olarak değiştirilir. Sondaki aminoasitin yani serbest -COOH taşıyan grubun adı aynen yazılır. Buna göre glutasyonun isimlendirilmesi glutamil-sisteinil-glisin'dir [31].



Glutatyonun Yapısı

Dokularda yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarında önemli rol oynayan glutatyon gliseralehit fosfat dehidrogenaz enziminin prostetik grubudur. Glutatyon dokularda oksijen taşınmasında rol oynayan gliksalaz adındaki koenzimde bulunan bir tripeptittir [32]. Glutatyon kolaylıkla hidrojen verebilen ve alabilen bir yapıya sahiptir. Bu özelliğiyle çeşitli redoks olaylarına katkıda bulunur. Bazı enzim sistemlerinin içinde yer alır, ayrıca eritrositlerde hemoglobinin döñüşümsüz oksidasyonunu engeller ve bağırsaklardan demir emilimini kontrol eder [31].

Glutatyonun DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve hücre dışı transport gibi hücresel fonksiyonları dışında başlıca antioksidan olarak hücre savunmasında önemli rolü vardır [29, 33, 34]. GSH içerdığı tiyol grubu aracılığıyla hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam hazırlayarak hücreyi oksidatif hasara karşı korur. GSH-Px enziminin kofaktörlüğünü yaparak, hidrojen peroksidi metabolize eder [29, 30, 34, 35].

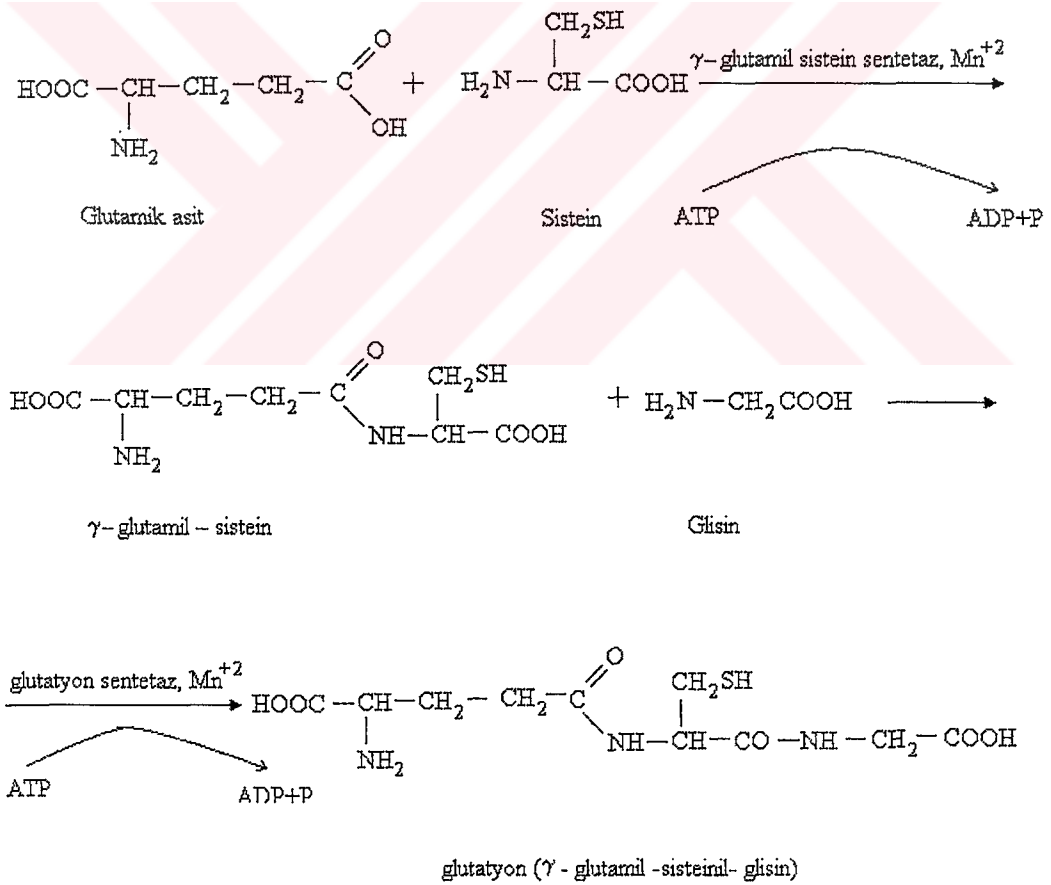
Glutatyon kaslarda, karaciğerde, eritrositlerde, beyin ve böbreklerde bulunur. Kasların ekstratında hidrojen alıcısı olarak görev yapar [32]. Glutatyon, hücresel işlevler için gereklidir. Beyin, kalp, bağışıklık sistemi hücreleri, böbrekler, gözler, karaciğer, akciğer ve deri dokularını oksidatif hasara karşı korur. Yaşlanmayı geciktirici etkisi vardır. Glutatyonun en zengin kaynağı ise soğan ve sarımsaktır [36] Glutatyon maya, bakteri, bitki ve hayvan hücrelerinde çok yaygın olarak bulunur [37]. Glutatyon bitkiler tarafından oksijen alınmasında önemli rol oynamaktadır. Oksijen askorbik asitle birleşir ve dehidroaskorbik asit (DHA) meydana gelir. Sonra bu DHA glutatyon ile indirgenerek askorbik asit meydana gelir [28].

Askorbik asit + $\frac{1}{2} O_2 \rightarrow$ Dehidroaskorbik asit

DHA+2GSH $\rightarrow$ GSSG + Askorbik asit

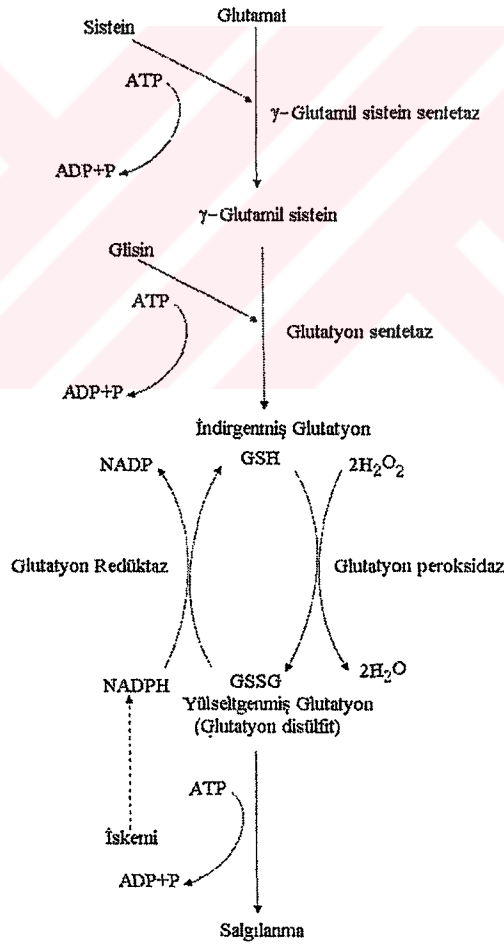
2.3.2. Glutatyonun Sentezi ve Döngüsü

GSH tüm memeli hücrelerinde bol miktarda (0.5-10mM) sentezlenir. Bu sentez iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, γ -glutamil sistein sentetaz isimli enzim GSH'nin öncül aminoasitleri olan glutamat ve sisteinden, γ -glutamil sistein oluşumunu katalizler. İkinci basamakta glutatyon sentetaz, glisin ve γ -glutamil-sisteinden glutatyonu oluşturur. Her iki reaksiyonun da kofaktörü Mn^{+2} dir. GSH negatif geri besleme, glutamil sistein oluşum hızını ve kendi sentezini denetler. Bu sentezde 1 molekül GSH için 2 molekül ATP'nin hidrolizi gerekir.



Her iki reaksiyonda da ATP, aminoasitlerle fosforik asit, karboksilik asit ortak anhidriti oluşturarak aminoasitlerle etkinleştirir. Hem γ -glutamil sistein sentetaz, hem de glutatyon sentetaz kendi substratlarına özgü olduklarından aminoasitlerin birbirine bağlanma şekli yukarıdaki gibi olur [37-39].

Oksidatif stres sonucu oluşan reaktif oksijen ürünleri (ROS) oluşumunun hücre hasarlarındaki etkileri bilinmektedir. Bu ürünlerin detoksifikasyonu glutatyonun indirgenmiş formunun (GSH), yükseltgenmiş dimer formuna (GSSG) dönüşümüyle sağlanmaktadır. Glutatyon peroksidazın katalizlediği bu reaksiyonda GSH'ın enzim aktivitesi için esas olduğu açıktır. Oksidasyon sonucunda oluşan GSSF (glutatyon disülfid) ise glutatyon redüktaz enzim aracılığıyla geri dönen bir döngü ile GSH'a rejenere olmaktadır [34, 38].(Şekil 2.3)

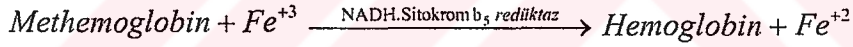


Şekil 2.3. Glutatyon Sentezi ve Döngüsü

Hücre yüksek miktarda oksidana maruz kaldığında GSSG oluşumu metabolik sınırını aşmakta ve oksidatif stres oluşmaktadır. Detoksifiye olmayan oksidanlar zardaki lipidlerin ve hücrelerin çeşitli fonksiyonel ve yapısal proteinlerinin bozulmasına neden olmaktadır [34, 39]. Ayrıca GSSG'in kendisi de proteinlerin sülfhidril gruplarıyla (-SH) reaksiyona girerek kalıcı zararlı etkiler meydana getirmektedir[34, 40]. Hücre içi GSSG birikiminin, ATP'ye bağımlı bir taşıyıcı mekanizmanın varlığı ile bertaraf edildiği de rapor edilmiştir [39].

Glutasyonun indirgenmiş formunun, yükseltgenmiş forma dönüşmesinden sonra bu molekül pentoz fosfat yolundan sentezlenen NADPH-H⁺ ve glutasyon redüktaz ile indirgenmiş hale geçer [28].

$GS-SG + NADPH + H^+ \xrightarrow{\text{Glutasyon redüktaz}} 2GSH + NADP^+$ metabolizmada pentoz fosfat yolu meydana gelmediğinde veya yetersiz olduğunda koenzim (glutasyon) indirgenmesi azalır. Eritrositlerde NADPH'in tek kaynağı pentoz fosfat yoludur. Eritrositler de NADPH'in önemli bir fonksiyonu glutasyonu indirgenmiş halde tutmaktadır. Pentoz fosfat yolunun yeterince meydana gelmemesi NADPH miktarını azaltacağından glutasyon indirgenmez, bunun sonucunda hemoglobindeki demir +2'den +3'e yükseltgenir, methemoglobin birikir ve eritrositlerin ömrü kısalmıştır [42].



Glutasyonun oluşması ve yeniden elde edilmesi, glutasyonun hücrede oluşan H₂O₂'in indirgenmesindeki rolü nedeniyle büyük önem taşır. İndirgenmiş glutasyon H₂O₂ ve süperoksit anyonu (O₂⁻) için tampon, protein yapısındaki yükseltgenmiş sülfhidril grupları için indirgen olarak hareket etmekte ve hemoglobin, zar proteinleri ile enzimlerde meydana gelebilecek hasarı önlemektedir [28].

2.4. Malondialdehit, Glutasyon Peroksidaz ve Glutasyon ile İlgili Bazı Çalışmalar

Oksidatif hasara aktif sigara içiminin neden olup olmadığının incelendiği çalışmada, lipid peroksidasyonun bir göstergesi olan serum MDA düzeyleri ölçülmüştür. Serum MDA konsantrasyonları sigara içenlerde, sigara içmeyenlerden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Böylece bu sonuç sigara içiminin oksidatif hasara neden olduğunu bildiren raporları desteklemiştir [43].

Türklerde lipit peroksidasyonu ve antioksidan enzimlerin aktivitelerine yaş, egzersiz, ve sigara kullanımının etkileri incelenmesi amacıyla lipit peroksidasyon göstergesi olan MDA, ve antioksidan aktivitelerin bir göstergesi olarak ta SOD ve GSH-Px aktiviteleri ölçülmüştür. Yaşı ilerleyenlerde ve sigara içenlerde MDA seviyelerinde artış, SOD aktivitelerinde azalma gözlenmiştir. Şiddetli egzersizde ise MDA seviyeleri sigara içenlere göre daha az yükselme gösterirken SOD ve GSH-Px aktivitelerinde azalma gözlenmiştir. Buna göre yaşın ilerlemesi, sigara içimi ve ağır egzersiz sonucunda antioksidan enzim aktivitelerinde azalma ve lipit peroksidasyonda artma olduğu belirtilmiştir [44].

Sigara kullanan annelerin süt ve serumunda antioksidan potansiyeli ve SOD, GSH-Px aktiviteleri, MDA seviyelerin tayininde anneleri aktif sigara kullanan, pasif sigara kullanan, ve sigara kullanmayan olarak 3 grupta değerlendirmişler. Gruplar arasında serum MDA, SOD, ve antioksidan potansiyelinde önemli farklılıklar yokken GSH-Px seviyelerinde önemli farklılıklar bulunmuştur. Süt örneklerinde ise MDA ve SOD'da önemli farklılıklar varken GSH-Px ve antioksidan potansiyelinde fark bulunamamıştır. Bulunan bu sonuçlara göre, düzenli pasif ve aktif sigara kullanan annelerin sütleri oksidatif stres ve lipit peroksidasyonundan serum örneklerine göre daha fazla etkilendikleri rapor edilmiştir [45].

Bağırsakları iltihaplı hastalarda oksidatif stres ve antioksidan kapasitenin araştırıldığı çalışmada, MDA ve GSH-Px seviyeleri belirlenmiştir. Hasta gruplarında plazma GSH-Px seviyesi, kontrol gruplarından önemli derecede yüksek bulunmuş. Fakat plazma MDA seviyeleri arasında önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir. Buna göre bağırsakları iltihaplı hastalarda oksidatif strese rağmen bir antioksidan kapasitenin varlığının olduğu belirtilmiştir [46].

CAPD (sürekli ayaktan periton diyalizi)'li ve hemodiyalizli hastalarda eritrosit GSH-Px aktivitesi, plazma MDA ve eritrosit glutatyon seviyeleri ölçülmüştür. MDA seviyelerinin prehemodiyaliz, pasthemodiyaliz ve CAPD'lı hastalarda yüksek olduğu, glutatyon seviyelerinin ise, kontrol grubuna göre önemli ölçüde düşük olduğu saptanmıştır. Buna göre antioksidan seviyelerinin düşmüş ve lipit peroksidasyonun artmış olduğu CAPD'lı ve hemodiyalizle şiddetlendirilmiş kronik böbrek hastalıklarının oksidatif stresi gösterdiği rapor edilmiştir [47].

Kronik böbrek hastaları ve kontrol gruplarında glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, GSH-Red, GSH-Px seviyeleri ve glutatyonun oksidatif durumları incelenmiştir. Hastaların eritrositlerinde GSH seviyesi, GSH-Px ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitelerinde azalma gözlenmiştir. GSSG seviyesinde ve GSSG\GSH oranlarında ise artış belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitelerindeki azalmaların düşük GSH ile ilgili olduğu, düşük GSH ve düşük GSH-Px aktivitesinden dolayı peroksitlerin indirgenmesinin azaldığı ileri sürülmüştür. Ayrıca artan GSSG, eritrositlerdeki proteinin sebep olduğu birikimle ve hemoglobinle reaksiyona girerek hemolize sebep olabileceği ve hemodiyalizli hastaların anemisinde hastalık yapmada rol oynayabileceği düşünülmüştür [48].

İnsan kanında SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerine yaş ve sigara kullanımının etkilerinin araştırıldığı çalışmada, tüm ana antioksidan enzim (AOE) aktivitelerinde bireyler arası anlamlı farklılıklar gözlenmiştir ($p<0.001$). Yaşın ilerlemesinin SOD ve GSH-Px aktivitelerini azalttığı fakat CAT aktivitesine etki etmediği belirlenmiştir. Sigara kullanımının ise CAT aktivitesini düşürürken, AOE (SOD, GSH-Px vs) aktivitesinde önemli bir farklılık oluşturmadığı ileri sürülmüştür. Buna göre her bir AOE'lerin çalışma aktiviteleri için karşılaştırma aralığı belirlenmiş ve AOE aktivite ölçümlerinde kişilerin yaş ve sigara kullanımının göz önünde tutulması gerektiği rapor edilmiştir [49].

Tip 2 diyabetli hastalarda C vitamini uygulaması glutatyon miktarının artmasını sağlayarak antioksidan etkiyi artırdığı ve nonenzimatik glikolizlenmeyi azalttığı ve bu nedenle C vitaminin koruyucu etkisi olduğu kanaatine varılmıştır [50].

Tip 2 diyabetli hastalarda glutatyon ve glutatyonla ilgili antioksidan enzimlerin oksidasyona duyarlılığının incelenmesi amacıyla hastaların GSH-Px, GSH-Red, GST aktiviteleri ve GSH ve GSSG seviyeleri ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda insan eritrositindeki glutatyon ve glutatyonla ilgili antioksidan enzimlerin oksidasyona duyarlı olduğu ve özellikle GSH-Px ve GSH-Red'in oksidasyona daha çok duyarlı olduğu bulunmuştur [51].

13-19 yaşları arası kızlarda sigara kullanımının serum mineral konsantrasyonlarına, antioksidan durumlarına ve oksidatif hasara etkilerinin gözden geçirildiği çalışmada, GSH-Px, GSH-Red ve hücre dışı SOD aktiviteleri, serum askorbik asit ve folat konsantrasyonlarının sigara kullananlarda, kullanmayanlara göre daha az olduğu belirtilmiştir. Oysa serum tiobarbütirik asit reaktif maddeleri ise (TBARS) daha yüksek bulunmuştur. Serum bakır, demir ve magnezyum konsantrasyonları iki grupta da benzer

iken, serum çinko konsantrasyonu sigara kullananlarda daha yüksek bulunmuştur. Buna göre 13-19 yaşları arasındaki sigara kullanmış kızlarda oksidatif stresin kanıtı olan serum TBARS'ın yüksek olması oksidan savunma sisteminde bozulmaya neden olabileceği ifade edilmiştir. Uzun süreli sigara kullananlarda ise ikincil kronik hastalıkların görülmesinden dolayı mineral metabolizmasında değişim olabileceği belirtilmiştir [52].

Göğüslerindeki lenf bezlerinde tümör ve lenf bezlerinin şişmiş olduğu hastaların antioksidan durumları ve lipit peroksidasyonları araştırılmış, kontrol grubuna göre hastaların antioksidanlarının (SOD, CAT, GSH, GSH-Px, askorbik asit, vit E) azaldığı ve lipit peroksidasyonunun arttığı belirtilerek ($p<0.05$) bu tür hastalarda redoks durumlarında bir dengesizlik olduğu rapor edilmiştir [53].

Rahim kanserli hastalarda enzimatik ve nonenzimatik antioksidanların ve dolaşımdaki lipit peroksidasyon durumlarını incelendiğinde kontrol grubuna göre hastaların plazma TBARS ve CD (konjuge dienler)'nin seviyesinde önemli yükselme ve vitamin C ve E, SOD, GSH, GSH-Px'de azalma gözlenmiştir. Buna göre tümörlü hücrelerin kişiyi zaptettiği gibi lipit peroksit yiyicilerin kullanımındaki artım nedeniyle rahim kanserli hastaların dolaşımında vitamin C ve E, SOD, GSH, GSH-Px seviyelerinde düşüş arttığı ayrıca düşük sosyoekonomik durumlu kadınların kötü beslenmeleri rahim kanserinin hüküm sürmesinde artışa neden olabileceği belirtilmiştir [54].

Ratların böbreklerinde GSH ve MDA seviyelerine sigara kullanımının ve kronik etanole maruz kalınmasının etkilerinin araştırıldığı çalışmada, hayvanlar ; kontrol grubu (C), etanol grubu (E), sigara kullanan grup (CS) ve sigara kullanan + etanol grubu (CS + E) olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Her grupta MDA ve GSH seviyeleri ölçülmüştür. GSH seviyeleri E, CS ve CS + E gruplarında C grubuna göre daha düşük bulunmuştur. MDA seviyeleri E; CS ve CS + E gruplarında C grubuna göre önemli derecede yüksek bulunmuştur. Bu verilere göre reaktif oksijen örneklerinin oluşumundaki artışla rat böbreklerinde bir oksidatif hasara sigara kullanımı ve kronik etanole maruz kalınmasının neden olabileceği bildirilmiştir [55].

HIV enfeksiyonlu kişilerde eksilmiş GSH'ı tamamlamak için N-asetilsisteinin ağız yoluyla verilmesinin önerildiği çalışmada, HIV bulaşmış kişilere N-asetilsistein belirli bir süre verilmiş ve sonunda bağışıklık sistem fonksiyonlarında gelişme, oksidatif strese karşı korunmada artma ayrıca asetoaminofen ve diğer ilaçların detoksifikasyonunda artış gözlenmiştir. Buna bağlı olarak Parkinson hastalığı, hepatit, karaciğer sirozu ve diyabet gibi

patolojik hastalıklarda etkili olan oksidatif stres veya GSH eksikliğini gidermede N-asetilsisteinin kullanılabileceği rapor edilmiştir [56].

Friedreich's bozukluklu hastalardaki glutatyon metabolizmasının araştırıldığı çalışmada serbest radikal sitotoksitesiyle ilgili olduğu önerilen Friedreich's bozukluklarında glutatyon metabolizmasının bozulduğu kanıtlanmıştır [57].

2.5. Amaç

Bu araştırmada sigara kullanmayan ve sigara kullanan gruplarda; enzimatik savunma sistemlerinden biri olan GSH-Px enzim aktivitesi ile GSH, GSSG ve MDA miktarının belirlenmesi ve belirlenen bu parametreler arasındaki ilişkilerin araştırılması amaçlanmıştır.



3. MATERYAL VE METOT

Materyal: Araştırma materyali olarak 20-50 yaşları arasında 30'u kontrol grubu, 26'sı sigara kullanan (günde en az bir paket) hiçbir ilaç kullanmayan, ruhen ve bedenen de hiçbir sağlık problemi olmayan kişilerden oluşturuldu.

Kan örneklerinin alınması: GSH ile yapılan işlemler esnasında GSH'nin oksidasyonunu ve bozulmasını önlemek için kan alımında, kan hemolizini en aza indiren bir kelebek iğnesiyle toplanmalı ve hemen koruyucu bir çözelti içine konmalıdır. Bu koruyucu çözeltiler pıhtılaşmayı önleyici EDTA, gama-glutamil transpeptidazla GSH'nin bozulmasını önleyici serin borat [58], GSH oksidasyonunu önleyici beta-fenontiolin disülfat ve alkali GSH'lı iyodoasetik asit içermelidir [59]. Yukarıda belirtilen durumlar göz önünde bulundurularak; kontrol grubu ve sigara kullananlarda yaklaşık 4 ml kan alındı. Alınan kan örneklerden her birinde GSH-Px enzim aktivitesi çalışmak üzere 1 ml kan EDTA'lı bir tüpe alındı. Ayrıca aynı kan örneğinden GSH ve GSSH miktarlarının belirlenmesi içinde 1 ml kan başka bir EDTA'lı tüpe alındı. Aynı örnekten geriye kalan yaklaşık 2 ml kan ise plastik tüplere alınıp 4500 devirde 3 dk santrifüjlenerek serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar örneklerinde MDA miktarlarını belirlemek üzere en geç 3 gün içerisinde MDA çalışmak üzere -20°C de bekletildi.

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup sigma (Darmstadt, Germany) markadır.

3.1. MDA Tayini

Ayrılan serum örneklerinden 0.30 ml alınıp üzerine 0.5 M HClO₄'den 0.30 ml ilave edilerek vortekslendi. Daha sonra saf su ile toplam hacmi 1.5 ml'ye tamamlanarak 4500 devirde 5 dk santrifüjlenerek proteinleri çöktürüldü. Santrifüjlenen süzütünün üst kısmından dikkatlice 20 µl alınarak HPLC'ye enjekte edildi. H PLC'de Supelcosil LC-18-DB kolonunda, 30 mmol KH₂PO₄ ve metanol karışımı (%65-%35), pH: 4' e H₃PO₄ ile ayarlanmış mobil faz kullanıldı. Mobil fazın akış hızı 1.5 ml/dk'ya ayarlanarak 254 nm' de MDA miktarları belirlendi [60].

10 ml'lik balon jöjeye 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP)'dan 10 µl alınarak 0.1 M HCl toplam hacmi 10 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan bu çözelti ağzı kapaklı bir plastik tüpe alınarak su banyosunda 100°C'de 5 dk. bekletildi. Bu sürenin sonunda soğuk suya

daldırılarak hızla oda sıcaklığına soğutuldu. Soğutulan çözeltiden de 100 ml balon jojeye, 1 ml alınarak saf su ile toplam hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Bu şekilde 40.6 nmol/ml derişimde stok MDA çözeltisi hazırlandı [61]. Bu stok çözeltiden uygun seyreltmeler yapılarak 4, 8, 16, 24, 32 ve 40.6 nmol/ml konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerin HPLC'de pik yükseklikleri belirlendi (Şekil 3.1). Çalışma grafiğı çizildi (Şekil 3.2). Örneklerdeki MDA miktarları çalışma grafiğinin doğru denklemi yardımıyla belirlendi. Alınan 0.3 ml'lik serum örnekleri 1.5 ml toplam hacme seyreltildiğı için 5 kat seyreltilmiş oldu. Bu nedenle bulunan sonuçlar seyrelme faktörü olan 5 katsayısı ile çarpıldı.

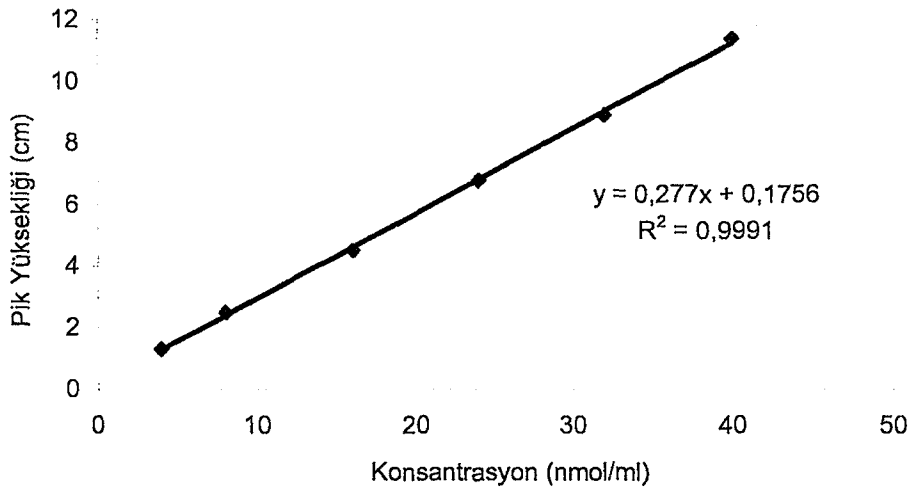


Şekil 3.1. HPLC'de MDA Standardına ait Kromatogram

Geri Kazanım: Geri kazanım için normal serum örneğinin HPLC'de kromatogramı alınarak pik yüksekliğı belirlendi. Daha sonra MDA tayini kısmında hazırlanmış olan 32 nmol/ml konsantrasyonunda stok çözeltinin kromatogramı alınarak pik yüksekliğı ölçüldü. Serum örneğine 1:1 oranında 32 nmol/ml standart stok MDA çözeltisinden katılarak bu karışımın kromatogramından pik yüksekliğı belirlendi. Standart'a ait pik yüksekliklerinden, seruma standart ilave edilmiş örneklerin pik yükseklikleri çıkarıldı ve standart ilave edilmemiş serumun pik yüksekliğine bölünerek geri kazanımlar aşağıdaki gibi hesaplandı. Geri kazanımın amacı, metodun güvenliğini test etmek ve ortamda tayini istenen maddenin ne kadarının belirlendiğı ölçmektir. Bu çalışmada MDA'nın geri kazanımı %96.8 olarak belirlenmiştir.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{S \text{ tan dart} - s \text{ tan dart ilaveli serum}}{\text{Normal serum}} \times 100$$

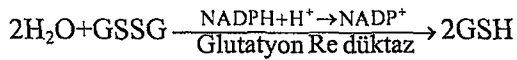
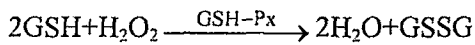
$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{10 - 7}{3.1} \times 100 = 96.8$$



Şekil 3.2. MDA'nın Çalışma Grafiği ve Doğru Denklemi

3.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Tayini

Prensip: GSH-Px, hidrojen peroksit (H-O-O-H) varlığında indirgenmiş glutatyonun (GSH) yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) yükseltgenmesini kataliz eder. H₂O₂'in bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutatyon redüktaz (GSH-Red) ve NADPH yardımıyla GSH'a indirgenir.



GSH-Px aktivitesi, NADPH'in NADP⁺ 'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkının 340 nm'de okunmasıyla ölçülür.

3.2.1. Hemolizat Hazırlanması

EDTA'lı tüplere alınan 1 ml'lik kan örnekleri 3 defa soğuk % 0.9'luk NaCl ile yıkandı. Oluşan hücre süspansiyonundan 0.2 ml alınıp üzerine 0.8 ml soğuk saf su ilavesiyle lizat elde edildi ve 15 dakika derin dondurucuda eritrositlerin tamamen parçalanması için bekletildi. Bu lizat diğer peroksidazların pozitif inhibisyonunu önlemek için eşit miktarda çift güçlü drabkin çözeltisi ile karıştırıldı. Bu karışımın 0.1 ml' sine içerisinde 0.005 M

EDTA bulunan pH : 7'de 0.05 M fosfat tamponundan 2.58 ml eklendi ve böylece enzim kaynağı hazırlanmış oldu [62].

Deneyde Kullanılan Reaktifler

GSH (150 mM)	= 50 mg GSH 1 ml tamponda çözüldü
NaN ₃ (1 M)	= 65 mg sodyum azid 1 ml tamponda çözüldü.
NADPH (3 mM)	= 10 mg NADPH 2 ml tamponda çözüldü.
GSH - Redüktaz	= Ticari preparatdan (U/mL, spesifik aktivite) direkt olarak seyreltme yapılmaksızın kullanıldı.
H ₂ O ₂ (50 mM)	= 15 µl H ₂ O ₂ alınıp hacim 5 ml'ye tamponla tamamlandı.
Tampon (pH : 7.5), 50 mM fosfat tamponu	= 600 ml A + 400 ml B + 2.08 gr NaEDTA ile hazırlandı.
A : Na ₂ HPO ₄ , 50 mM, 7.1 gr/L B : KH ₂ PO ₄ , 50 mM, 6.8 gr/L	

Deneyin Yapılışı

	Numune	Kör
Fosfat Tamponu (ml)	2.66	2.68
Redükte GSH (ml)	0.10	0.10
NADPH (ml)	0.10	0.10
GSH - Redüktaz (ml)	0.01	0.01
NaN ₃ (ml)	0.01	0.01
Numune (eritrosit) (ml)	0.02	-

Tüpler iyice karıştırılarak oda sıcaklığında (25°C) 30 dk. inkübe edildi. Sürenin sonunda her tüpe 0.1 ml H₂O₂ ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Dalga boyu 340 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede 5 dakika süre ile takip edildi. İlk absorbands - son absorbands değeri alınarak 5'e bölündü (ΔA / dakika).

Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

$$E = 6.22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} = \text{NADH ve NADPH için molar absorplama katsayısı}$$

V_T = Toplam Hacim (ml)

V_n = Toplam hacimdeki numune hacmi

l = Küvet çapı (1 cm)

$\Delta A/t$ = Dakikadaki absorbans

10^6 = Molü mikromole dönüştürme sabiti

$$U(\mu mol / dakika) = \frac{(\Delta A/t) \times V_T \times 10^6}{ExV_n \times l} = \frac{(\Delta A/5) \text{dak} \times 3 \times 10^6}{6.22 \times 10^3 \times 0.02 \times 1} = \frac{(\Delta A/5) \times 3 \times 10^6}{124.44}$$

He $\lambda_{ios} \propto$ UV-Visilol marka spektrofotometre ile okumalar yapıldı. Hemoglobin, Drabkin ile ölçülerek GSH-Px enzim aktivitesi U / gr Hb olarak belirlendi [63].

3.2.2. Hemoglobin Tayini

Hemoglobin miktarı Drabkin yöntemiyle ölçüldü. Bu yöntemde ferrisiyanür hemoglobindeki demiri oksitleyerek iki değerlikli demiri üç değerlikli demire çevirerek methemoglobine dönüşmesini sağlar. Bunu takiben potasyum siyanür ile kararlı bir pigment olan siyanmethemoglobin meydana gelir. Siyanmethemoglobinin absorbansı spektrofotometrik olarak 546 nm'de okundu [64].

Ayırıcılar:

1. Drabkin Çözeltisi: 50 mg KCN + 200 mg $K_3 Fe(CN)_6$ + 1 g $NaHCO_3$ alınarak distile su ile 1 litreye tamamlanan çözelti renkli şişede ve oda ısısında 1 yıl süreyle saklanabilir.

2. Hemoglobin Satandartı: 18g/dl

İşlem:

	Kör	Standart	Örnek
Drabkin Çözeltisi(ml)	5.0	5.0	5.0
Hb standartı (ml)	-	0.02	-
Hemolizat (ml)	-	-	0.02
Distile su (ml)	0.02	-	-

Tüpler iyice karıştırıldı ve oda ısısında 20 dk bekletildikten sonra 546 nm'de köre karşı absorbansları okundu.[65]

Hesaplama:

18gr/dl Hb=0.49 absorbans değerini verir.

$$\text{Hemoglobin (g/dl)} = \frac{\text{Örnek absorbens}}{\text{Standart absorbens}} \times \text{Standart Konsantrasyonu eşitliğinden}$$

Standart konsantrasyonu = 18g/dl

Standart absorbens = 0.49

$$\text{Buradan; Faktör} = \frac{\text{Standart konsantrasyonu}}{\text{Standart absorbens}} = \frac{18}{0.49} = 36.73$$

$$\text{Hemoglobin (g/dl)} = \text{Örnek absorbens} \times 36.73$$

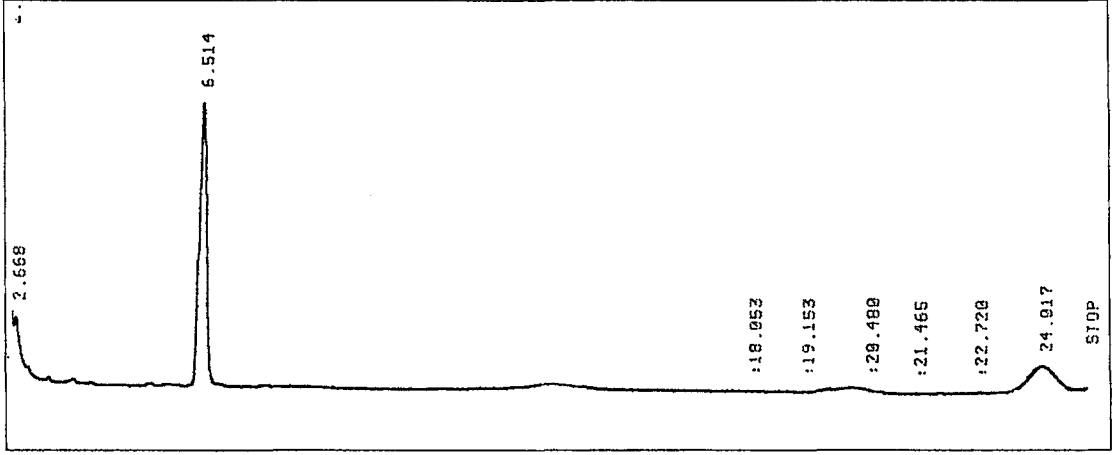
3.3. İndirgenmiş ve Yükseltgenmiş Glutatyonun Tayini

GSH ve GSSH miktarlarının belirlenmesi için EDTA'lı tüplere alınarak derin dondurucudan bekletilen (yaklaşık 2 gün) 1 ml kan örnekleri soğutucudan çıkarılarak oda sıcaklığına kadar ısınması için bekletildi. Bu kan örneklerinden 0.5 ml alınıp her birinin üzerine 0.75 ml 0.5 M HClO₄ ilave edilerek vortekslendi. Vortekslenen bu örneklerle 2.75 ml saf su ilave edilerek 4500 devirde 10 dk. santrifüjlenip proteinler çöktürüldü. Santrifüjlenen süzütünün üst kısmından dikkatlice 20 µl alınarak HPLC'ye enjekte edildi. HPLC'de SGE Walkosil 11 5C18 RS kolonu ve mobil faz olarak da çözücü olarak 0.1% H₃PO₄ kullanılarak hazırlanmış olan 50 mM NaClO₄ çözeltisi kullanıldı. Mobil fazın akış hızı: 1.3 ml/dk ayarlanarak 215 nm'de 5.3 dk'da indirgenmiş ve 22.0 dk'da ise yükseltgenmiş glutatyon tayin edildi. [66].

Standart indirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyon çözeltilerinin hazırlanması: 5 ml'lik balon jojeye 10 mg indirgenmiş glutatyon ve üzerine de 1ml 0.5 M HClO₄ ilave edilerek iyice çözüldü. Daha sonra saf su ile toplam hacmi 5 ml'ye tamamlanarak, 2000 µg/ml'lik indirgenmiş glutatyon çözeltisi hazırlandı. Bu 2000 µg/ml'lik stok çözeltiden uygun seyreltmeler yapılarak 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 µg/ml'lik indirgenmiş glutatyon çözeltileri hazırlandı. Standart stok yükseltgenmiş glutatyon çözeltileri de indirgenmiş glutatyon çözeltilerinin hazırlandığı şekilde hazırlandı. Daha sonra bu çözeltilerin HPLC'de pik yükseklikleri belirlendi (Şekil.3.3) ve bu pik yüksekliklerine karşı konsantrasyonlar grafiğe alınarak, çalışma grafikleri çizilip, doğru denklemleri oluşturuldu (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5).

Her çalışmada yeni bir çalışma grafiği çizilerek o çalışmanın indirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyon verileri o günkü çalışma grafiğinin doğru denkleminde hesaplandı.

Doğru denkleminde y yerine örneğin pik yüksekliği yazılarak x bulundu ve yapılan seyreltme göz önünde bulundurularak seyreltme faktörüyle çarpıldı



Şekil 3.3. HPLC’de İndirgenmiş ve Yükseltgenmiş Glutasyon Standartlarına ait Kromatogram

Geri Kazanımlar

15 mg indirgenmiş glutasyon 5 ml’lik bir balon jofeye alındı ve üzerine 1ml 0.5 M HClO_4 ilave edilerek iyice çözünürleştirildi. Daha sonra toplam hacmi saf su ile 5 ml ye tamamlandı. Bu şekilde 3000 $\mu\text{g/ml}$ ’lik stok indirgenmiş glutasyon hazırlanmış oldu. Daha sonra bu çözeltiden 25 μl alınarak saf suyla hacmi 5 ml’ye tamamlanarak 15 $\mu\text{g/ml}$ ’lik standart indirgenmiş glutasyon çözeltisi hazırlanmış oldu. Hazırlanan bu stok çözeltiden 20 μl alınarak HPLC’ye enjekte edildi. Analize hazır hale getirilmiş serum örneği ve serum örneğine 1:1 oranında 15 $\mu\text{g/ml}$ ’lik standart indirgenmiş glutasyon katılmış çözeltilerden 20’er μl alınarak HPLC’ye enjekte edildi. Standart, standart katılmış serum ve serum örneğinin pik yükseklikleri MDA geri kazanımı kısmında verilen formülde yerine yazılarak indirgenmiş glutasyon için geri kazanım % 65 olarak hesaplandı.

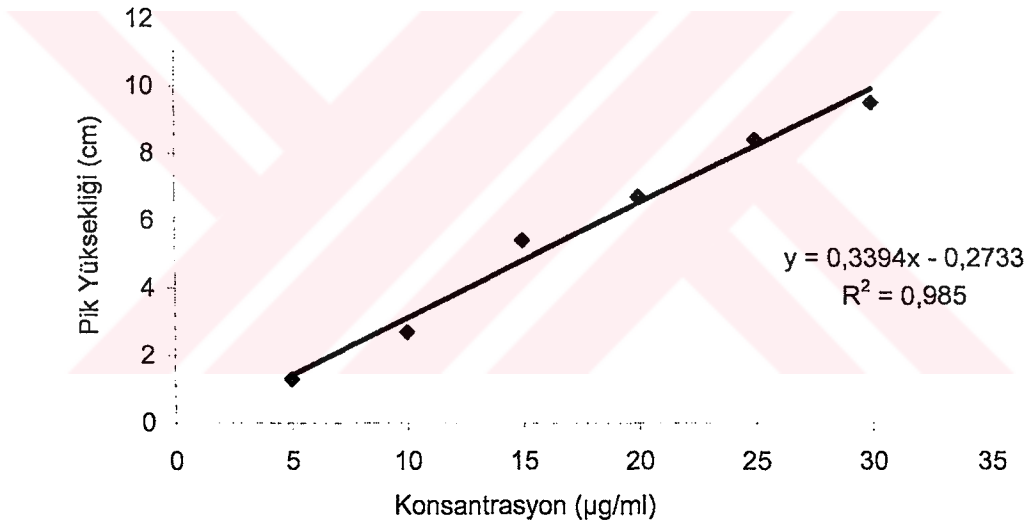
Yükseltgenmiş formdaki glutatyondan 4 mg tartılıp 5 ml’lik bir balon jofeye alındı ve üzerine 1ml 0.5 M HClO_4 ilave edilerek iyice çözüldü. Saf su ile toplam hacmi 5 ml’ye tamamlandı. Bu şekilde 800 $\mu\text{g/ml}$ ’lik stok yükseltgenmiş glutasyon çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiden 25 μl alınarak saf suyla hacmi 5 ml’ye tamamlanarak 4 $\mu\text{g/ml}$ ’lik standart yükseltgenmiş glutasyon çözeltisi hazırlanmış oldu. Hazırlanan bu stok çözeltiden 20 μl alınarak HPLC’ye enjekte edildi. Ön işleme tabii tutulmuş serum ve bu seruma 1:1

oranında 4 µg/ml'lik yükseltgenmiş glutatyon katılmış çözeltilerin her birinden sıra 20'er µl alınarak HPLC'ye enjekte edildi. İndirgenmiş glutatyonun hesaplanmasındaki işlemler burada da aynen uygulandı. Yükseltgenmiş glutatyon içinde % 50 geri kazanım değeri hesaplandı.

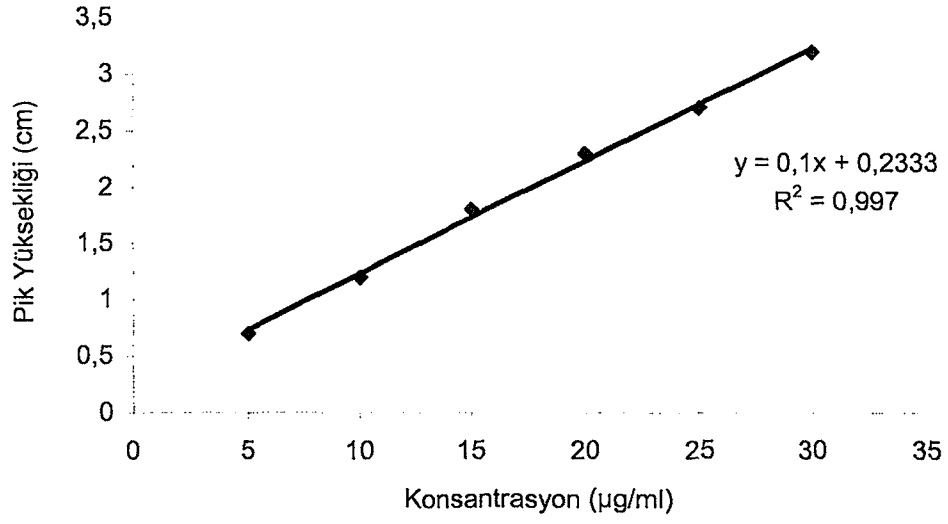
$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{S_{\text{standart}} - S_{\text{standart ilaveli serum}}}{\text{Normal serum}} \times 100$$

$$\text{GSH için \% Geri Kazanım} = \frac{10.2 - 7.0}{4.9} \times 100 = 65$$

$$\text{GSSG için \% Geri Kazanım} = \frac{2.6 - 2.1}{1.0} \times 100 = 50$$



Şekil 3.4. İndirgenmiş Glutatyonun Çalışma Grafiği ve Doğru Denklemi



Şekil 3.5. Yükseltgenmiş Glutasyonun Çalışma Grafiği ve Doğru Denklemi

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmadaki tüm istatistiksel değerlendirmeler SPSS 10.0 bilgisayar programı ile yapıldı. Veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi ve gruplar arası karşılaştırmalarda Student *t* testi, yaş gruplarına göre karşılaştırmada ise One–Way Anova testi kullanıldı. $P < 0.05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Uygulama sonunda elde edilen sonuçlardan kontrol grubu ve sigara kullananların MDA, GSH-Px aktivite ile GSH ve GSSG miktarları Tablo 4.1, Tablo 4.2 ve Tablo 4.3 verilmiştir.

Tablo 4. 1 Kontrol Grubu Kişilerin Serum MDA, Eritrosit GSH-Px Aktiviteleri ile Eritrosit GSH, GSSG Miktarları

Örnek No	Yaş (Yıl)	MDA (nmol/ml)	GSH-Px (U/gr Hb)	GSH (µg/ml)	GSSG (µg/ml)
1	20.00	7.70	146.55	69.25	59.26
2	31.00	9.97	159.16	90.75	39.63
3	45.00	6.76	89.28	144.48	75.19
4	25.00	12.50	136.91	130.15	81.48
5	40.00	7.60	118.35	77.61	64.07
6	22.00	6.53	120.55	87.16	74.07
7	37.00	8.17	120.81	75.64	77.78
8	46.00	6.88	107.15	93.13	67.78
9	48.00	11.80	54.80	75.22	66.67
10	23.00	9.10	131.07	103.88	115.60
11	21.00	5.77	115.76	114.63	66.67
12	50.00	12.19	136.98	101.49	82.59
13	34.00	6.38	151.54	105.07	96.30
14	33.00	7.81	148.84	112.24	59.26
15	25.00	5.85	73.10	90.75	56.67
16	22.00	4.92	130.60	70.93	63.39
17	30.00	6.85	101.00	92.10	35.71
18	43.00	5.94	98.65	140.85	79.36
19	24.00	9.00	110.78	127.30	85.27
20	39.00	6.32	105.20	80.12	75.89
21	44.00	5.47	126.40	85.87	78.32
22	46.00	7.50	107.35	77.54	69.63
23	25.00	8.73	109.26	99.80	106.45
24	24.00	5.35	113.80	116.55	70.67
25	47.00	9.10	117.82	95.41	90.78
26	35.00	7.30	121.90	100.27	108.55
27	34.00	8.90	102.39	107.56	67.29
28	27.00	10.60	93.21	93.35	65.42
29	36.00	4.40	87.90	101.70	49.10
30	40.00	6.90	104.26	89.62	39.63

33.87±9. 249

7.74±.11

114.71±23.05

99.35±19.63

72.62±19.33

Tablo 4. 2. Sigara Kullanan Kişilerin Serum MDA, Eritrosit GSH-Px Aktiviteleri ile Eritrosit GSH, GSSG Miktarları

Örnek No	Yaş (Yıl)	MDA (nmol/ml)	GSH-Px (U/gr Hb)	GSH (µg/ml)	GSSG (µg/ml)
1	43,00	5,83	190,95	74,03	111,11
2	44,00	6,01	79,26	71,64	51,85
3	30,00	11,87	93,05	151,19	81,48
4	22,00	7,49	153,41	78,80	44,44
5	40,00	17,99	150,29	124,18	107,41
6	40,00	6,89	141,81	112,99	85,19
7	30,00	13,34	115,06	96,30	101,48
8	27,00	14,17	113,10	119,40	81,48
9	40,00	6,20	147,93	80,75	81,48
10	40,00	5,79	106,24	85,97	111,11
11	50,00	8,10	121,71	71,64	96,30
12	22,00	10,76	85,08	78,81	51,85
13	41,00	13,88	118,35	99,10	85,19
14	41,00	11,40	178,20	72,45	102,28
15	45,00	12,70	145,63	70,88	52,10
16	33,00	7,24	137,40	138,73	82,68
17	24,00	10,87	126,68	87,40	46,47
18	38,00	11,85	141,00	123,82	106,84
19	31,00	7,48	159,85	105,21	86,57
20	27,00	13,20	150,96	98,64	114,80
21	40,00	7,35	127,25	92,17	80,11
22	37,00	8,84	109,67	74,10	109,49
23	49,00	9,50	161,45	80,63	95,63
24	35,00	6,96	110,61	103,14	50,14
25	25,00	8,70	118,94	109,28	80,60
26	37,00	10,43	127,00	91,16	87,38

35.81±8.05

9.80±3.18

131.19±27.058

95.86±22.10

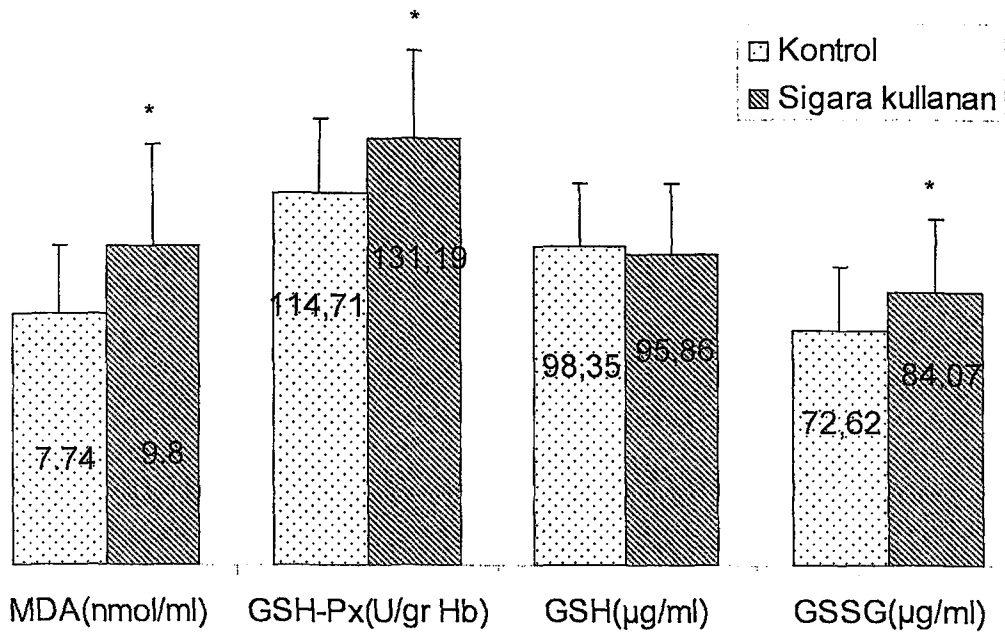
84.07±22.21

Tablo 4.3. Kontrol ve Sigara Kullanan Gruplara Ait MDA, GSH-Px, GSH, GSSG Parametrelerinin Karşılaştırılması

	Kontrol (n: 30)	Sigara kullanan (n: 26)	P değeri
MDA (nmol/ml)	7.74 ± 2.11	9.80 ± 3.18	p<0.01
GSH-Px (U/g Hb)	114.71 ± 23.05	131.19 ± 27.08	P<0.05
GSH (µg/ml)	98.35 ± 19.63	95.86 ± 22.10	P>0.05
GSSG (µg/ml)	72.62 ± 19.33	84.07 ± 22.21	P<0.05

Tablo 4.4. Kontrol ve Sigara Kullanan kişilerin ilerleyen yaş gruplarına ait MDA, GSH-Px, GSH, GSSG Parametrelerinin Karşılaştırılması

	MDA (nmol/ml)	GSH-Px (U/g Hb)	GSH (µg/ml)	GSS (µg/ml) G
20-29 yaş Kont (n= 11)	7.82 ± 2.40	116.51 ± 20.65	100.34 ± 20.59	76.81 ± 19.10
30-39 yaş Kont (n= 9)	7.34 ± 1.62	122.08 ± 25.61	96.16 ± 12.45	67.72 ± 24.71
40-50 yaş Kont (n= 10)	8.01 ± 2.31	106.10 ± 22.68	98.12 ± 24.97	72.40 ± 14.51
20-29 yaş Sigara (n= 6)	10.87 ± 2.55*	124.70 ± 25.52	95.39 ± 16.70	69.94 ± 27.52
30-39 yaş Sigara (n= 8)	9.75 ± 2.46	124.21 ± 21.33	110.46 ± 25.67*	88.26 ± 18.92*
40-50 yaş Sigara (n= 12)	9.30 ± 3.91	139.09 ± 30.90*	86.37 ± 17.63	88.31 ± 20.21



Şekil.4.1. Kontrol ile Sigara Kullanan Gruplara Ait MDA,GSH-Px,GSH,GSSG Parametrelerinin Karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Serbest radikaller son yıllarda üzerinde en çok durulan ve araştırmaların yoğunlaştığı bir konudur. Serbest radikallerin hücrel kaynakları, rol oynadıkları reaksiyonlar ve serbest radikallere karşı hücrel savunma mekanizmalarının açıklığa kavuşması ile bu moleküllerin kanser, şeker, kalp hastalıkları gibi birçok hastalıkla ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır [67].

Çeşitli patolojik durumlar sırasında birçok hücre tipinde oksijenin redüksiyonundan oluşan türlerin olağan dışı ve şiddetli üretimiyle karakterize oksidatif stresin meydana geldiği günümüzde iyi bilinmemektedir. Bu oksidatif stresin genel bir sonucu, hücre organizasyonunun az ya da çok parçalanması ile sonuçlanan hücre lipidlerinin peroksidasyonudur [68].

Sigara kullanımının oksidatif etkilerinin incelendiği çalışmada da MDA düzeyleri arasında farklılıklar olduğu ($p=0.029$) belirtilmektedir [69]. Ayrıca çeşitli kanser vakalarının serum MDA düzeylerinin incelenmesinde serum MDA düzeyinin ölçümü in vivo serbest oksijen radikallerinin yapmış olduğu hasarın göstergesi olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır [70]. Bu çalışmada kontrol grubu ve sigara kullanan bireylerin serum MDA miktarları, eritrosit GSH-Px enzim aktiviteleri ile GSH ve GSSG miktarları belirlendi (Tablo 4.1 ve 4.2). Elde ettiğimiz bulgulara göre sigara kullananların MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu ($p<0.01$) belirlendi (Tablo 4.3 ve Şekil 4.1). Verilen literatürlerle bulgularımız uyumlu olup, sigara kullanımının lipid peroksidasyon göstergesi olan MDA'yı arttırmasının nedeni, sigaranın oksidatif strese neden olması ile açıklanabilir.

Sigara kullanımı sonucu oluşan oksidatif stresin plazma antioksidan savunmada bazı değişiklikler yapması beklenebilir [71]. Sigara kullanımının insanların kan ve göz lensindeki mineraller ve antioksidan enzimlerine etkilerinin incelendiği çalışmada kontrol grubuna göre sigara kullananların göz merceği ve kanında GSH-Px ve SOD aktivitelerinin azaldığı belirtilmiştir [75]. Strese bağlı mide mukozası hasarlı hastaların GSH-Px aktivitelerinde kontrol grubuna göre anlamlı azalmalar saptanmıştır ($p<0.001$) [73].

Oysa bizim bulgularımızda GSH-Px enzim aktiviteleri sigara kullananlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p<0.05$) yüksek bulundu (Tablo 4.3 ve Şekil 4.1). GSH-Px enzim aktivitesindeki bu artış sigara kullanımının oluşturduğu oksidatif hasara bir cevap şeklinde olabileceğini düşündürmektedir.

Sigara kullanımının oksidatif etkilerinin incelendiği çalışmada ayrıca antioksidan savunmanın bir göstergesi olarak toplam sülfhidril gruplarının plazma konsantrasyonları da (özellikle GSH miktarı) incelenmiş ve kontrol grubu ve sigara kullananların değerlerinde farklılıklar anlamlı bulunmamıştır [69]. Serbest oksijen radikallerin zararlı etkilerinin neden olduğu yaşlanmayla, fizyolojik performanstaki bozulmanın birleşmesiyle serbest radikallerin yaşlanmaya neden olduğunu düşündürmüş ve çeşitli çalışmalarda yaşlı hayvanların hücrelerindeki GSH miktarlarında azalma olduğu, fakat GSSG miktarlarında ise hafif artma olduğu rapor edilmiştir [74]. Oksidatif strese cevapta GSH miktarlarında azalma ve GSSG miktarında artma olabilir. GSH ve GSSG konsantrasyonlarındaki karşılıklı değişim oksidatif stresin işaretlerinden biri olarak düşünülen GSSG/GSH oranıyla ifade edilir [75].

Strese bağlı mide mukozası hasarında endojen glutatyon tükenişinin enerji metabolizmasıyla ilişkisi incelendiğinde stres grubu sıçanlarda mide mukozası GSH ve ATP düzeylerinde kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı azalmalar kaydedilmiştir ($p<0.001$) [73].

Radyasyonun sebep olduğu biyolojik hastalıklarda eritrositlerdeki GSH/GSSG oranının hızlı bir indikatör olabileceği önerilmiştir [76].

Sigara kullanımının akciğerde GSH miktarını azalttığı ve MDA'nın gösterdiği peroksidasyonun artmış olması diğer sitozolik aldehitlerle birlikte sigaranın zarar verici etkisinden sorumlu olabileceği bildirilmiştir [77]. Buna rağmen sigaranın eritrosit GSH miktarını arttırdığı [78] ve değişmediği [79, 80] şeklinde çalışmalarda vardır.

Bizim çalışmamızda ise kontrol grubu ve sigara kullananlarda GSH miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). GSSG miktarlarında ise sigara kullananlarda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu ($p<0.05$) belirlendi. (Tablo 4.3 ve Şekil 4.1).

Hem kontrol hem de sigara kullanan kişiler yaşlarına göre 3 gruba ayrıldı (20-29; 30-39 ve 40-50). Bu grupların MDA değerleri karşılaştırıldığında sigara kullanan (20-29) yaş grubuna ait MDA değerlerinin anlamlı farklılık gösterdiği, aynı şekilde GSH-Px değerleri karşılaştırıldığında ise 40-50 yaş grubuna ait sigara kullanan grubun anlamlı farklılık gösterdiği görülmüştür. GSH ve GSSG değerlerinde ise sigara kullanan 30-39 yaş grubunda anlamlı farklılıkların olduğu görülmektedir (Tablo 4.4)

Tüm bu verilerden sigara kullanımının MDA ve GSSG miktarlarını ve GSH-Px enzim aktivitesini artırdığı, GSH miktarı üzerine etkisinin olmadığı görülmektedir. Sonuç olarak sigaranın oksidatif strese neden olduğu söylenebilir.



KAYNAKLAR

- [1] Duthie, GG., Arthur, JR., Beattie, JAG., Brown, KM., Marrice, PC., Robertson, JD., Short, CT., Walker, KA., James, WPT., "Cigarette smoking, antioxidants, lipid peroxidation and coroner heart disease", *Ann Ny Acad Sci*, 1993, 686:120-129.
- [2] Petro, R., "Smoking and death: the past 40 years and the next 40", *Br Med. J.*, 1994, 309:937-939.
- [3] Church, DF., Prior, WA., "Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications", *Environ Health Perspective*, 1985, 64:111-126.
- [4] Ryfeldt. A., Bannenberg. G., Moldeus. P., "Free radical and lung disease", *British Med. Bull*, 1993, 49(3): 588-603.
- [5] Frei, B., Forta, TM., Ames, BM., Cross, CE., "Gas phase oxidant of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma", *Biochemistry J.*, 1991, 277:133-138.
- [6] Durak. I., Elgün. S., Kemal Bingöl. N., Burak Çimen. MY., Kaçmaz. M., Büyükoçak. S., Serdar Öztürk. H., "Effects of cigarette smoking with different tar content an erythrocyte oxidant/antioxidant status", *J: Basic Clin. Physiol Pharmacol.*, 2002, 13(1): 69-72.
- [7] Ozbay, B., Dulgur, H., "Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in Turkish population: relation to age, gender, exercise, and smoking", *Tohoko J.Exp Med.*, 2002, 197(2):119-124.
- [8] Altuntaş, I., Dane, S., Gümüştekin, K., "Effects of cigarette smoking on lipid peroxidation", *J Basic clin. Physiol Paharmacol*, 2002, 13(11):69-72.
- [9] Zhaob, Yk., Yu, Rs., "Effect of smoking on the lipid peroxides antioxidant and alpha 1- antitryp sin", *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 1998, 21(4):218-220.
- [10] Park, EM., Park, YM., Guval, YS., "Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoker", *Free Radicel Biol. Med*, 1998, 25:79-86.
- [11] Halliwell, B., "Free radical antioxidants in human disease. Curiosity, cause or consequence", *Lancet*, 1994, 344:721-724.

- [12] Halliwell, B., Gutteridge, WMC., "Free Radicals in Biology and Medicine", Oxford Medicine Press, 1999, 246-351.
- [13] Akgül, E., İlhan, M., Halifeoğlu, İ., "Tip 2 diabetes melitusta lipid peroksidasyonu ve eritrosit antioksidan enzim aktiviteleri", *Biyokimya Dergisi*, 1999, 24(3):28-33.
- [14] Draper, Hh., and Hadly, N., "Methods in Enzymology", 1990, 186:421.
- [15] Fısun, Ü., Tahan, V., Akaya, A. Ve ark. Primer., "Akciğer kanserinde lipid peroksidasyonu ve eritrosit antioksidan enzim aktivitesi", *Tüberkuloz ve Toraks Dergisi*, 1999, 47:31-35.
- [16] Gutteridge, JMC., "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage", *Clinical Chemistry*, 1995, 41:1819.
- [17] Stocker, R., Frei, B., "Endogenous antioxidant defences in human blood plasma oxidative stress: Oxidants and Antioxidants", Editör: Sieslt, Academic Press, London, 1991, syf:213
- [18] Açıkan, N.L., Tezcan, E.F., "Glutathion Redüktaz" *Biyokimya Dergisi*, 1992, 17(2):67-83.
- [19] Gutteridge, JMC., and Halliwell, B., "The Deoxyribose Assay: An assay both for free radical and for site-specific Hydroxyl Radical Production.", *Biochem*, 1988, 253-953.
- [20] Yöntem, M., Akkuş, İ., Şekeroğlu, M.R., Vural, H., Öztok, İ., Kolak, S., ve Koçyiğit, A., "Erkeklerde orta derecede alkol alımının eritrosit glutathion peroksidaz aktivitesi üzerine olan etkisi", *S.Ü. Tıp Fak. Derg.*, 1993, sy: 9,3,339-344.
- [21] Candell, A.R., and Tappel, A.L., "Evidence for suitability of GSH-Px as a protective enzyme: studies of oxidative damage, renaturation. and proteolysis", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1983, 223:2,407-416.
- [22] Underwood, E.J., "Trace elements in human and animal nutrition.", Academic Press New York, 1997, pp:302-346.
- [23] Oldfield, S.E., "The two faces of Selenium", *J. Nutrition*, 1987, 117:2002-2008

- [24] Kutsky, R.J., "Hand book of vitamins, mineral and hormones", 2th Ed. VMR, 1981, 157-207, New York.
- [25] Özer, M., "Temel Biyokimya", Editörler (Onat. T., Emerk K.), Sonay Medikal Yayıncılık, İzmir, 1996, 786-820
- [26] Halliwell, B., "Free radical antioxidants in human disease. Curiosity, cause or consequence", Lancet, 1994, 344:721-724.
- [27] Brigelius-Flohe, R., "Tissue-specific functions individual glutathione perexidoses", Free Radical Biology and Medicine, 1999, 27:951-965.
- [28] Gözükar, E., "Biyokimya", cilt 1, 2001, syf : 709-712.
- [29] Meister, A., Anderson, ME., "Glutathione", Ann Rev. Biochem, 1983, 52:711-760.
- [30] Meister, A., "Glutathione, ascorbate and celluler pretection", Cancer Res. Suppl., 1994, 954:1969-1975.
- [31] Ası, T., "Tablolarda Biyokimya", 1996, cilt I, syf: 222.
- [32] Emerk, K., Onat, T., *Temel Biyokimya*, 2.Baskı, Saray Medikal Yayıncılık ve Tic. Ltd. Şti, 1997, İzmir- Türkiye.
- [33] Deneke, SM., Fanburg, BL., "Regulation of cellular glutathione", Am J., Physiol., 1989, 257: L163-L173.
- [34] Ambrosia, G., Santora, G., Tritto., I., et al., "Effects of is chemia and reperfusion on cardiac tolerance to oxidative stress", Am J., Physiol, 1992, 262:H23-H30.
- [35] Meister, A., "Selective modification of glutathione metabolism", Science, 1983, 220:427-477.
- [36] Aksoy, M., "Beslenme Biyokimyası" Hatiboğlu basım ve yayım San. Tic. Ltd. Şti. 2000, Ankara
- [37] Champe, P.C., Harvey, R.A. *Biyokimya*. Lippincotts Illustrated Reviews Serisinden. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti. 1997, Çapa-İstanbul.

- [38] Mutah, H., Hiraishi, H., Ota.s., et al., "Protective role of intracellular glutathione against ethanol-induced damage in cultured rat gastric mucosal cells", *Gastroenterology*, 1990, 98:1452-1459.
- [39] Cochrane, CG., "Cellular injury by oxidants." *Am J.Med.*, 1991, 3C23S-3C3OS.
- [40] Scherer, NM., Deamer, DW., "Oxidative stres impairs the function of the sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulphhydryl groups in the Ca^{++} -ATPase", *Arch Biochem. Biophys.*, 1986, 246:589-601.
- [41] Ishikawa, T., Zimmer, M.,Sies, H., "Energy-linked cardiac transport system for glutathione disulfide", *FEBS Let*, 1986, 200: 128-132.
- [42] Pamuk, F., "Biyokimya", 2000, syf:203-204.
- [43] Altuntaş. I., Dane. S., Gümüştekin. K., "Effects of cigarette smoking on lipid peroxidation", *Tohoku J. Exp Med.*, 2002, 197(2): 119-124.
- [44] Ozbay. B., Dulger. H., "Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in Turkish population: relation to age, gender, exercise and smoking", *Br. J. Nutr.*, 2003, 90(1): 137-150.
- [45] Ermiş. B., Yıldırım. A., Ors. R., Taştekin. A., Özkan. B., Akçay. F., "Influence of smoking on serum and milk malondialdehyde, superoxide dismutase, glutathione peroxiase, and antioxidant potential levels in mothers at the pospartum seventh day", *Andrologia*, 2005, 37(4): 119-124.
- [46] Tüzün, A., Erdil, A., İnal, V., Aydın, A., Bağcı, S., Yeşilova, Z., Soyal, A., Karaeren, N., Dagalp, K., "Oxidative stres and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease", *Chinical Biochemistry*, 2002, 35:569-572.
- [47] Özden, M., Maral, H., Akaydın, D., Çetinalp, P., Kalender, B., "Erythrocyte glutathione peroxidase activity, plasma malondialdehyde and erythrocyte glutathione levels in hemodialysis and CAPD patients", *Chinical Biochemistry*, 2002, 35:269-273.
- [48] Paşaoğlu, H., Muhtaroglu, S., Güneş, M., Utaş, C., "The role of oxidative state of glutathione and glutathione-related enzymes in anemia of hemodialysis patients", *Chinical Bio. Chemistry*, 1996, 29(6):567-572.

- [49] Bozlan, AD., Bianchi, MS., Bianchi, NO., "Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: Influence of sex, age and cigarette smoking", *Chinical Biochemistry*, 1997, 30(6):449-454.
- [50] Cengiz, .M., Cengiz, S., "The effects of vitamine C administration on erythrocyte glutathione and HbA1c levels of type 2 diabetic patients", *Cerrahpaşa J. Med.*, 2000, 31(4):211-215.
- [51] Dinçer, Y., Alademir, Z., İlkova, H., Akçay, T., "Susceptibility of glutathione peroxide in patients with type 2 diabetes effect of glycemic control", *Clinical Bio.*, 2002, 35:297-301.
- [52] Kim, SH., Kim, JS., Shin, Ho.S., Keen, C.L., "Influence of smoking on markers of oxidative stres and serum mineral concentrations in Teenage Girls in Korea", *Nutrition*, 2003, 19:240-243.
- [53] Kumaraguruparan, R., Subapriya, R., Kabalimoorthy, J., Nagini, S., "Antioxidant profili in the circulation of patients with fibroadenoma and adenocarcinoma of the breast", *Chinical Biochemistry*, 2002, 35:275-279.
- [54] Nanju, V., Sailaja, K.J., Nalini, N., "Circulating lipid peroxidation and antioksidant status in cervical cancer patients: acase-control study", *Chinical Biochemistry*, 2002, 35:621-625.
- [55] Cigremis. Y., Türköz. Y., Akgöz. M., Sözmen. M., "The effects of choronic exposure to ethanol and cigarette smoke on the level of reuced glutathione and malondialdehyde in rat kidney", *Ann. Chin. Lab. Sci.*, 2004, 34(4): 405-409.
- [56] Rosa, SC., Zaretsky, MD., Dubs, JG., Roederen, M., Anderson, A., Mitra, D., Watanobe, M., Nakamura, H., Tjioe, I., Deresinski, SC., More, WA., Ela, SW., Parks, D., Herzenberg, LA., and Herzenberg, LA., "N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection", *Europen Journal of Clinical Investigation*, 2000, 80:915-929.
- [57] Piemonte, F., Pastore, G., Tagliacozzi, D., Santorelli, FM., Carrozzo, R., Casali, C., Damiano, M., Federici, G., and Bertini, E., "Glutathione in blood of patients with Friedreich's otaxia", *European Journal of Clinical Investigation*, 2001, 31:1007-1011.

- [58] Smith, CV., Hansen, TN., Martin, ME., McMicken, HW., Eliot, JJ., "Oxidant stress responses in premature infants during exposure to hyperoxia", *Pediatr Res.*, 1993, 34: 360-365.
- [59] Martin, J., White, NH., "Fluorimetric determination of oxidized and reduced glutathione in cell and tissues by high-performance liquid chromatography following derivatization with dansylchloride", *J. Chromatogr.*, 1991, 568:219-225.
- [60] Karataş, F., Karatepe, M., and Baysar, A., "Determination of free malondialdehyde in human serum by high performance liquid chromatography", *Analytical Biochemistry*, 2002, 311:76-79.
- [61] Tsaknis, J., Stavros, L., Michael, H., Gillian, S., and Vassiliki, T., "Rapid high performance liquid chromatographic method of determining malondialdehyde for evaluation of rancidity in edible oils", *Analyst.*, 1998, 123, 325- 327.
- [62] İlhan, N., "Deneysel olarak karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan kobaylarda oksidan ve antioksidan sistemin incelenmesi", F.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 1998, Elazığ.
- [63] Paglia, DE., and. Valentine, WN., "Studies on the quantitative and qualitative of erythrocyte glutathione peroxidase", *J.Lab. Klin. Med.*, 1967, 70(1):158-168.
- [64] Tietz, N.W., "Textbook of Clinical Chemistry", W.B. Saunders Company, 1986, 1532-1534.
- [65] Fairbank, VK., and Farias, RN., "Biochemistry Aspects of Hematology". Ed. NW. Tietz, 1986, In:Textbook of clinical chemistry., WB P, 1506-1507. Saunders Company.
- [66] Dawes, P., Dawes, E., SGE Chromatography Products Catalog, 2000, pg: 182.
- [67] Sudha, K., Ashalatha, V.R., Anjali, R., "Oxidative stress and antioxidants in epilepsy", *Clinica Chimica Acta*, 2001, 303:19-24.
- [68] Nordberg, J., Arner, E.S.J., "Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system", *Free Rad. Biol. And Med.*, 2001, 31 (11):1287-1317.
- [69] Demir, S., Özkurt, S., Köseoğlu, M., Enli,Y., Aslan, D., Gümüştü, N., "Sigara içenlerde plazma lipid peroksidasyonu", Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fak., Biyokimya Anabilim Dalı, Denizli, Solunum, 2001, 3:57-59.

- [70] Torun, M., Yardım, S., Gönenç, A., Sargın, H., "Çeşitli kanser vakalarında serum MDA düzeyleri", *Biyokimya Dergisi*, 1990, 186:421-431.
- [71] Ryfeldt, A., Bannenberg, G., Moldeus, P., "Free Radical and lung disease", *British Med. Bull.*, 1993, 49(3):588-603.
- [72] Sulochana, K.N., Punitham, R., Ramakrishnan, S., "Effect of cigarette smoking on cataract: Antioxidant enzymes and constituent minerals in the lens and blood of humans", *Indian Journal of Pharmacology*, 2002, 34:428-431.
- [73] Zengin, Ulakoğlu, E., Gümüştas, MK., Belce, A., Altug, T., Kökoğlu, E., "The relation ship between endogeneous glutathione depletion and energy metabolism in stres-induced gastric mucosal injury", *Cerrahpaşa J. Med.*, 1998, 29(3):127-131.
- [74] Sastre J, Pallardo FV, Vina J., "Glutathione, oxidative stress and aging" *Age*, 1996, Vol:19, 1ss 4, pp:129-139.
- [75] Morel, Y., Barauki, R., *Biochem. J.*, 1999, 342: 481.
- [76] Navarro, J., Obrador, E., Pellicer, J.A., Asensi, M., Vina, J., ve Estrela, JM., "Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stres in mice and humans", *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, 22(7):1203-1209.
- [77] Cotgreave, IA., Johanson, U., Moldeus, P., Bratsand, R., "The effect of acute cigarette smoke inhalation on pulmonary and systemic cysteine and glutathione redox states in the rats", *Toxicology*, 1987, 45:203-212.
- [78] Duthie, GG., Arthur, Jr., James. WPT., Vint, HM., "Antioxidant status of smokers and nonsmokers. Effect of vitamin E supplementation", *Ann NY Acad Sci.*, 1989, 570: 435-438.
- [79] Duthie, GG., Arthur, JR., James, WPT., "Effects of smoking and vit E on blood antioxidant status", *Am J Clin Nutr*, 1991, 53(4 suppl):1061-1063.
- [80] Jendryczko, A., Szyrko, G., Gruszczynski, J., Korowich, M., "Cigarette smoke exposure of school children effect of passive smoking and vitamin E supplementation on blood antioxidant status", *Neoplasma*, 1993, 40(3):199-203.

ÖZGEÇMİŞ

13.06.1980 yılında Elazığ Merkezde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Elazığ Merkezde tamamladıktan sonra 1998 yılında Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde Yüksek Öğrenimime başladım. 2002 yılında bu bölümden mezun oldum. 2003 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında (Biyokimya) yüksek lisansa başladım, halen yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.

