

ASPIRİN VE ANTİOKSİDANT β -D-GLUKAN'IN FARELERDE (*Mus musculus*) YAŞLANMA ÜZERİNE ETKİLERİNİN ENZİMATİK DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Yapılan bu çalışmada non-enzimatik antioksidanlar olarak bilinen aspirinin ve β -(1,3)-D-glukanın, önemli bir radikal süpürücü enzim olan, karaciğer mitokondrial Mangan Süperoksit Dismutaz (Mn-SOD) aktivitesi ve dolayısıyla hücrel yaşlanma üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

Bu amaçla Aspirin, β -(1,3)-D-glukan, Aspirin+ β -(1,3)-D-glukan ve kontrol grubu olmak üzere 4 grup hayvan kullanılmıştır. Hayvanlar enjeksiyondan önce 24 saat süre ile aç bırakılmıştır. Aspirin ve β -(1,3)-D-glukanın intraperitoneal yolla enjekte edildiği laboratuvar fareleri (*Mus musculus*) 6., 12., 24. ve 48. saatlerde servikal dislokasyon ile öldürülerek karaciğerleri çıkarılmıştır. Daha sonra bu karaciğerlere sırasıyla homojenizasyon, sonifikasyon ve santrüfigasyon işlemleri uygulanarak mitokondrial enzim fraksiyonu elde edilmiştir. Bu çalışmada protein miktarı Lowry yöntemine göre belirlendikten sonra karaciğer Mn-SOD aktivitesi ölçülmüştür.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre Aspirin ve β -(1,3)-D-glukanın ayrı ayrı verilmesi durumunda: Aspirinin Mn-SOD aktivitesinde başlangıçta bir inhibisyon gerçekleştirdiği buna karşın 48. saatte bu inhibisyonun yerini aktivasyona bıraktığı tespit edilmiştir. β -(1,3)-D-glukan ise maksimum inhibisyonu 24. saatte göstermiştir. Aspirin ve β -(1,3)-D-glukanın birlikte verilmesi durumunda ise maksimum inhibisyon etkisi 12. saatte gözlenmiştir ve bir aktivasyon etkisi tespit edilmemiştir.

Anahtar Kelimeler : Yaşlanma, oksidatif stres, aspirin, β -glukan, karaciğer.

INVESTIGATION OF EFFECTS IN ENZYMATYC LEVEL OF ASPIRİN AND β -D- GLUCAN ON AGING IN MICE (*Mus musculus*)

ABSTRACT

In this study, the effects of nonenzymatic antioxidants aspirin and β -(1,3)-D-glucan, on one of the important radical scavanging enzyme, liver mithochondrial manganosüperoxide dismutase (Mn-SOD) activity, and by this way cellular senesence are investigated.

For this purpose, four groups of animals were used as aspirin, β -(1,3)-D-glucan, aspirin+ β -(1,3)-D-glucan and control groups.

Animals kept hungary for 24 hours before injection. The laboratory mice (*Mus musculus*) that aspirin and β -(1,3)-D-glucan injected intraperitonally killed by servical dislocation at 6 th, 12 th, 24 th, 48 th hours and their liver took out. Then livers were exposed to homogenisation, sonification, and centrifugation respectively and mitochondrial enzyme fraction obtained. And in this study after the determinanion of protein amount by Lowry method, liver Mn-SOD activity mesured.

Accoding to the results obtained in our study; in the case of injection of aspirin and β -(1,3)-D-glucan individually; It was determined that Aspirin inhibate the Mn-SOD activity at the beginning although at the 48 th hour this inhibition turn into activation. β -(1,3)-D-glucan showed maximum inhibition effect at 24 th hour. in the case of injection of aspirin and β -(1,3)-D-glucan together maximum inhibion effect observed at 12 th hour and an activation effect could not detected.

Key words: Aging, oxidative stres, aspirin, β -glukan, liver.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerek planlama gerek labaratuvar aşamalarında her türlü desteğini ortaya koyan değerli hocam, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Zafer EREN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince hiçbir zaman değerli yardımlarını esirgemeyen Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Emine DIRAMAN'a,

Verdiği değerli fikirleri ile her zaman, her konuda bana yol gösteren sevgili hocam Banu EREN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma arkadaşlarım sayın Gülhan AKŞİMŞEK, sayın Ayşe BAŞARDI, sayın Dilek KARADUMAN ve sayın Yeliz YILMAZ'a, bölümümüz araştırma görevlilerinden sayın Sevcan TÜLEK'e yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Destekleri ve ilgilerinden ötürü, Biyoloji Bölümü'nün tüm öğretim elemanları ve görevlilerine teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında beni bir an olsun yalnız bırakmayan ve daima destekleyip motive eden, bölümümüz araştırma görevlilerinden sayın Gönül AKBAL'a ve ailesine sonsuz teşekkürler ederim.

Her zaman olduğu gibi, tez dönemimde de büyük bir fedakarlık ve anlayışla beni destekleyen aileme; sevgili annem ve babam Nurhan ve Tahsin ÇELEBİOĞLU'na ve canım ağabeyim Kerem ÇELEBİOĞLU'na teşekkürler ederim.

Bu önemli dönemde, karşıma çıkan tüm zorlukları en basite çeviren, öncelikle anlayışı ve sonra desteği ile bana güç veren sevgili nişanlım Cem Tolga GÜRKANLI'ya sonsuz teşekkürler ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	
ABSTRACT.....	
TEŞEKKÜR.....	
ŞEKİL LİSTESİ.....	
TABLO LİSTESİ.....	
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Reaktif Türler Olarak Radikaller.....	3
2.2. Serbest Radikallerin Oluşumu.....	4
2.3. Oksijen, Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres.....	4
2.3.1. Oksijen ve Canlılar.....	5
2.3.2. Oksijenin Toksik Etkileri.....	5
2.3.3. Reaktif Oksijen Türleri.....	6
2.3.3.1. Süperoksit Radikali (O_2).....	7
2.3.3.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	7
2.3.3.3. Hidroksil Radikali (HO), Fenton ve Haber-Weiss Reaksiyonları.....	8
2.3.3.4. Singlet Oksijen (1O_2).....	9
2.4. Reaktif Oksijen Türevleri ve Diğer Serbest Radikallere Karşı Antioksidan Savunma Sistemleri.....	10
2.4.1. Doğal Antioksidanlar.....	11
2.4.1.1. Süperoksit Dismutaz.....	12
2.4.1.2. Katalaz.....	15
2.4.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPXs).....	16
2.4.1.4 Metal iyonlarının Etkisizleştirilmesini Sağlayan Antioksidanlar.....	17
2.4.1.5. <i>İn vivo</i> Sentezlenebilen Düşük Moleküler Ağırlıklı Abtioksidanlar.....	18
2.4.1.6. Diyetle Alınan Düşük Moleküler Ağırlıklı Antioksidanlar.....	18

2.4.2. İlaçlar.....	19
2.4.3. Aspirin.....	20
2.4.3.1. Etki Mekanizması.....	21
2.4.3.2. Antioksidan Özelliği.....	23
2.4.5. β -D-Glukan.....	23
2.5. Canlılarda Reaktif Oksijen Metabolitlerinin Kaynakları.....	26
2.5.1. Elektron Transport Zinciri.....	27
2.5.2. Enzimatik Olmayan Tepkimeler.....	28
2.5.3. Enzimatik Tepkimeler.....	28
2.5.4. Dış Etkenler.....	30
2.6. Serbest Radikallerin Hücre Biyomoleküler Üzerine Etkileri.....	31
2.6.1. Serbest Radikallerin Mitokondri Üzerine Etkileri.....	32
2.6.2. Serbest Radikallerin Biyomembranlar Üzerine Etkileri.....	36
2.6.3. Serbest Radikallerin nDNA'ya Etkileri.....	38
2.6.4. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri.....	39
2.6.5. Serbest Radikallerin Replikatif Yaşlanmaya Etkisi.....	41
3. MATERYAL ve METOT.....	43
3.1. Deneyde Kullanılan Farelerin Sağlanması	43
3.2. Farelere Uygulanan Maddeler.....	43
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	43
3.4. Araştırma Gruplarının Oluşturulması.....	44
3.5. Çalışmada Kullanılan Aletler.....	44
3.6. Fare Karaciğerinin Homojenizasyonu ve Sonikasyonu.....	45
3.7. Fare Karaciğerlerinin Santrifügasyonu.....	45
3.8. Mitokondrial Süperoksit Dismutaz (Mn-SOD) Aktivite Tayini.....	46
4. BULGULAR.....	48
4.1. β -Glukan'ın Karaciğer Mitokondrial SOD (Mn-SOD) Aktivitesi Üzeri Etkileri.....	48
4.2. Aspirin'ın Karaciğer Mitokondrial SOD (Mn-SOD) Aktivitesi Üzeri Etkileri.....	49
4.3. β -Glukan+Aspirin'ın Karaciğer Mitokondrial SOD (Mn-SOD) Aktivitesi Üzeri Etkileri.....	50

4.4. β -Glukan, Aspirin ve β -Glukan+Aspirin'in Karaciğerde ki Mn-SOD Aktivitesi Üzerindeki Karşılaştırmalı Etkileri.....	51
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	54
6. KAYNAKLAR.....	57

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No.	Şekil Adı	Sayfa
Şekil 2.1.	Radikal olmayan bir molekülden, tek bir elektron alarak kararlı hale dönüşen radikal molekülü.....	3
Şekil 2.2.	Oksijen molekülünün elektron sayısı ve oluşan oksidan moleküller (Onat ve ark., 2002).....	6
Şekil 2.3.	Reaktif oksijen türlerinin radikal ve radikal olmayan örnekleri (Onat ve ark., ark., 2002).....	6
Şekil 2.4.	Singlet oksijenin moleküler şekli.....	10
Şekil 2.5.	Bir antioksidan tarafından bir serbest radikal molekülünün nötralize edilmesi.....	11
Şekil 2.6.	Hücre içerisindeki enzimatik antioksidanların etki mekanizması.....	12
Şekil 2.7.	Katalazın fonksiyonel döngüleri.....	15
Şekil 2.8.	Düşük H ₂ O ₂ konsantrasyonunda katalaz etkisi.....	16
Şekil 2.9.	Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz aktiviteleri.....	17
Şekil 2.10.	Asetilsalisilik asidin moleküler şekli.....	20
Şekil 2.11.	Prostaglandin biyosentez yolu ve asetilsalisilik asidin etki bölgesi.....	22
Şekil 2.12.	Beta glukanın moleküler yapısı.....	24
Şekil 2.13.	Mitokondrial elektron transport sistemi ile oksijenin suya indirgenmesi.....	27
Şekil 2.14.	Reaktif oksijen metabolitlerinin enzimatik olmayan kaynakları.....	28
Şekil 2.15.	Serbest radikallerin hücreye etkileri.....	32
Şekil 2.16.	Mitokondride üretilen reaktif oksijen türlerinin mitokondri ve hücreye oksidatif hasarı.....	32
Şekil 2.17.	Elektron transport sisteminde reaktif oksijen metabolitlerinin oluşum bölgeleri.....	34
Şekil 2.18.	Oksidatif mDNA hasarı sonucu oluşan GC-TA değişim durumunu.....	35
Şekil 2.19.	Lipit peroksidasyonu.....	37

Şekil 4.1.	Kontrol gruplarında ve β -Glukan verilmiş farelerde Mn-SOD aktivitesinin zamana bağlı değişimi.....	48
Şekil 4.2.	Kontrol gruplarında ve aspirin verilmiş farelerde Mn-SOD aktivitesinin zamana bağlı değişimi.....	49
Şekil 4.3.	Kontrol gruplarında ve β -Glukan+aspirin verilmiş farelerde Mn-SOD aktivitesinin zamana bağlı değişimi.....	50
Şekil 4.4.	Kontrol gruplarında ve ayrı ayrı β -Glukan+aspirin ve β -Glukan verilmiş farelerde Mn-SOD aktivitesinin zamana bağlı değişimi.....	51
Şekil 4.5.	Kontrol gruplarında ve ayrı ayrı β -Glukan+aspirin ve β -Glukan verilmiş farelerde Mn-SOD aktivitesinin zamana bağlı değişimi.....	51
Şekil 4.6.	Kontrol gruplarında ve ayrı ayrı aspirin ve β -Glukan verilmiş farelerde Mn-SOD aktivitesinin zamana bağlı değişimi.....	52
Şekil 4.7.	Kontrol gruplarında ve ayrı ayrı aspirin, β -Glukan ve β -Glukan+Asp verilmiş farelerde Mn-SOD aktivitesinin zamana bağlı değişimi.....	52

TABLO LİSTESİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa
Tablo 2.1.	Metal iyonlarını bağlayan bileşikler.....	17
Tablo 2.2.	<i>İn vivo</i> sentezlenebilen düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlardır.....	18
Tablo 2.3.	Antioksidan özellik gösteren ilaçlar.....	20
Tablo 2.4.	Fagositlerin ürettiği reaktif oksidan ürünler.....	26
Tablo 2.5.	Serbest radikallerin enzimatik kaynakları.....	29
Tablo 2.6.	Serbest radikallerin ekzojen kaynakları.....	30
Tablo 3.1.	Çalışmada kullanılan kıyasal ajanlara ve saatlere bağlı olarak oluşturulan deney grupları.....	44
Tablo 4.1.	Aspirin, β -Glukan ve Aspirin+ β -Glukan verilmiş farelerin karaciğerlerindeki Mn-SOD aktivitelerinin zamana bağlı değişimi.....	53

1. GİRİŞ

Günümüzde, yaşlanma fenomenini açıklamaya yönelik 300'den fazla teori bilinmektedir. Bu teoriler içerisinde, ilk olarak Harman tarafından öne sürülen, serbest radikal teorisi en popüler ve en çok test edilmiş olan teoridir. Bu teori, serbest radikallerin kimyasal doğasına ve her yerde bulunabilmeleri üzerine kuruludur (Ashok ve Ali, 1999).

Yaşlanmanın serbest radikal teorisi, yaşlanmanın doku hücrelerindeki çeşitli biyolojik moleküllerin geri dönüşümsüz oksidatif hasarına yol açan serbest radikallerin birikimi sonucu oluştuğunu belirtir (Lin ve Beal, 2003). Teori daha sonra, mitokondrinin yaşlanmada kilit rol oynadığını ileri süren Miquel tarafından tekrar çalışılmıştır. Bu organeller, oksidanların hem en büyük üreticisi, hem de onların yarattığı oksidatif hasara maruz kalan önemli bir hedeftir (Sastre ve ark., 2003).

Serbest radikaller, dış orbitallarında bir veya daha fazla paylaşılmamış elektron içeren ve diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğilimi taşıyan kimyasal türlerdir (Rozantsev ve Loshadkin, 2001; Mercan, 2004).

Reaktif oksijen türleri (ROT) hücrel hasarlardan sorumlu ana etmenlerdir. Aktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin, lipid peroksidasyonu, protein modifikasyonu, enzim inaktivasyonu, DNA zincir kırıkları ve baz modifikasyonlarını uyardıkları ve oksidatif hasara neden oldukları gösterilmiştir (Camougrand, 2001). Dolayısıyla, bu indirgenmiş oksijen türlerinin hücreden süpürülmesi gerekmektedir (İmlay 2003).

Hücrelerde, oksidanları inaktif hale getirerek, oksidatif hasarı önleyen, yok eden veya kısmen azaltan maddelere antioksidanlar adı verilmektedir (Onat ve ark., 2002).

Fizyolojik şartlarda insan vücudunda oluşan reaktif oksijen ürünleri ile antioksidan defans bir denge halindedir. Yoğun reaktif oksijen türleri (ROT) üretimi, ya da antioksidan defansın azalması biyomoleküllerde yapısal ve fonksiyonel modifikasyonlara yol açarak oksidatif strese neden olur (Köken ve ark., 2003).

Antioksidan enzimlerin, biyolojik makromolekülleri oksidatif hasara karşı koruyan primer defans mekanizması olduğu düşünülmektedir (Leutner ve ark., 2001).

Mitokondrial mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD), mitokondride süperoksit radikallerini uzaklaştırıp hücrel hasarı önleyen, nükleer kodlu, 96 kDa'luk

homotetramer yapıda, primer antioksidan enzimdir (Matés ve Jiménez, 1999; Rojkind ve ark., 2002).

Enzimatik antioksidanlara ek olarak enzimatik olmayan antioksidanlar da mevcuttur (Başaran, 2002).

Aspirin ve β -1,3-D-glukan bilinen önemli antioksidanlardır (Shi ve ark., 1999; Kayalı ve ark., 2005). Aspirinin etki mekanizması genel olarak prostoglandin sentezinin inhibisyonu şeklindedir (Demirsoy ve Türkan, 2002). Beta-1,3-glukan ise bir serbest radikal süpürücü (antioksidan) olarak iş görür ve makrofajları radyasyon, toksinler, ağır metaller ve serbest radikallerin oluşturabileceği hasarlardan korur (Anonymous 2005 a, <http://www.betaglucan.org/history.htm>).

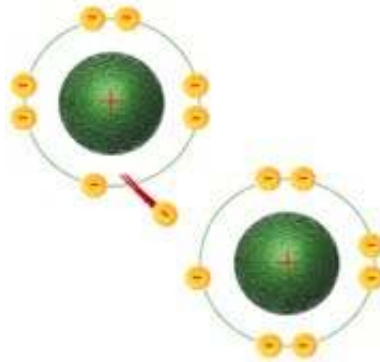
Tüm bu bilgiler ışığında, çalışmalarımızda, memelilerde bazı kimyasalların etkisiyle oluşan oksidatif stres sonucu ortaya çıkan hücresel hasar ve bu hasarın hücresel yaşlanma üzerine etkisini araştırmak ve bu alanda yapılan çalışmalara katkıda bulunmak amacıyla, hemen her hastalığın tedavisinde oldukça sık kullanılan bir ilaç olan aspirin ve beta-1,3-glukan verilmiş farelerde (*Mus musculus*) karaciğer mitokondrial süperoksit dismutaz (Mn-SOD) enzim aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi, ayrı ayrı ve birlikte karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Reaktif Türler Olarak Radikaller

Atom yapısı, bir çekirdek ve çevresinde bulunan değişik sayıda elektronlardan oluşmaktadır. Enerji düzeylerine göre, belirli bir düzende yerleşen elektronlar, orbital adı verilen yörüngelerde hareket etmektedirler. Her orbitalde yaklaşık iki elektron, birbirine zıt yönde kendi eksenini etrafında dönmektedir. Buna uygun olarak, her bir orbitale önceden birer tane aynı yönde dönen elektron yerleşmekte ve atom numarasına göre sayıları artan elektronlar tekrar aynı sıra ile ters yönde dönecek şekilde orbitale yerleşmektedir (Onat ve ark., 2002; Demirsoy ve Türkan, 1999). Dolayısıyla elektronlar bulundukları yörüngede elektron çiftleri halinde, eşleşmiş olarak yer alırlar. Böylece atom veya molekül kararlı bir yapı kazanır (Bay, 2001).

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla paylaşılmamış elektron içeren ve diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğilimi taşıyan kimyasal türlerdir. Çekirdekteki negatif yüklü elektron sayısı, pozitif yüklü proton sayısına eşit olmadığından, kararlı yapıya sahip değildirler ve bu nedenle reaktif özellik taşıyan moleküllerdir. Tek elektronunu bir başka moleküle verebilen bu radikaller, kendileri kararlı hale geçebilmek için, bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilirler (Şekil 2.1.). Böylece, radikal olmayan bir yapının da radikal hale dönüşmesine neden olurlar (Bay, 2001; Başaran, 2002; Mercan, 2004; Akyol, 2004).



Şekil 2.1. Radikal olmayan bir molekülden, tek bir elektron alarak kararlı hale dönüşen radikal molekülü.

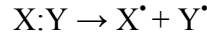
(Anonymous 2005 b, Oxygentimerelease.com/A/ScienceOxygen).

2.2. Serbest Radikallerin Oluşumu

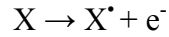
İçinde bulunduğumuz çevrede, çeşitli fiziksel etmenler ve kimyasal olaylar nedeniyle, devamlı bir radikal yapımı vardır. Hücrel koşullarda da ciddi miktarda ve çeşitlilikte radikal üretilmektedir (Kılınç ve ark., 2002).

Radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşur;

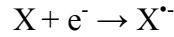
1. **Kovalent bağın homolitik yarılması:** Bir molekülü oluşturan kovalent bağın homolitik yarılması sonucu eşlenmiş elektronlardan her birinin ayrı parçada kalması ile serbest radikaller meydana gelmektedir.



2. **Bir molekülün elektron kaybetmesi:** Molekülün yapısındaki atomlardan birisinden elektron uzaklaştırılması sonucu oluşmaktadır.



3. **Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi:** Bir molekülün yapısına elektron eklenmesi sonucu, reaktif özellik taşıyan yapılar oluşmaktadır (Onat ve ark., 2002).



2.3. Oksijen, Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres

Organizmalarda birçok tipte serbest radikal oluşabilir, ancak bunlar içerisinde serbest oksijen radikalleri en yaygın olanlarıdır (Bay, 2001). Oksijen radikallerinin fazla yapımının neden olduğu etkilerin toplamı ‘oksidan stres’ olarak adlandırılır. Oksidatif hasar ise, süperoksitten kaynaklanan radikaller ile nitrik oksidin reaktif türlerinin neden olduğu hasarların bir toplamıdır (Kılınç, 1985).

2.3.1. Oksijen ve Canlılar

Moleküler oksijen (O_2), atmosferin yaklaşık %21'ini oluşturur. Bir kısım organizma onsuz yaşayabilse de, bir çoğu yaşamlarının devamlılığı için oksijene gereksinim duyar (Demirsoy ve Türkan, 1999; Kılınç, 1986).

2.3.2. Oksijenin Toksik Etkileri

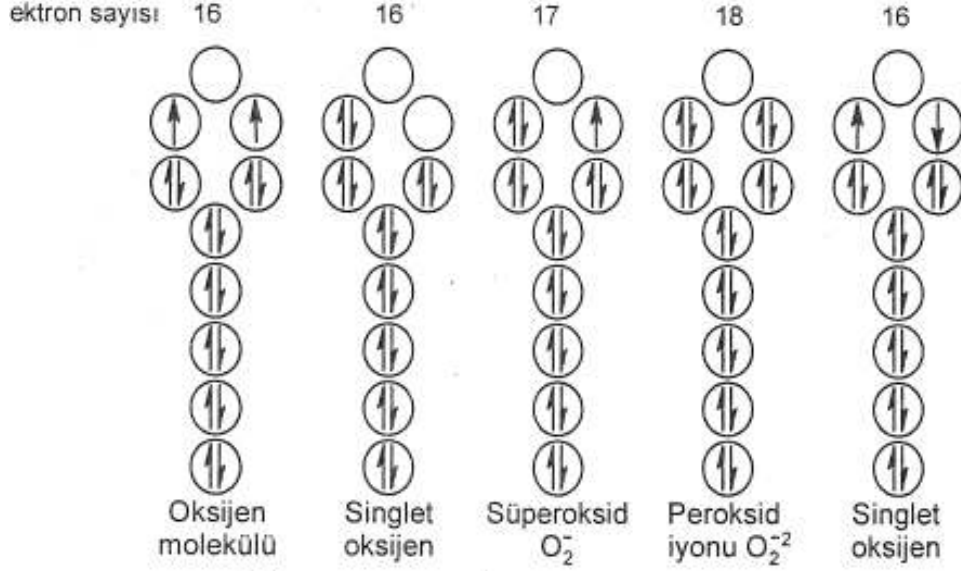
Mikroorganizmalar oksijene karşı sınırlı toleransa sahiptirler (Imlay, 2003). Anaerobik canlılardaki oksijenin toksik etkisinin nedeni, oksijenden kaynaklanan bazı reaktif türlerin biyolojik molekülleri oksitlemeleri ve bu reaktif türlere karşı anaerobik hücrelerde savunma sisteminin bulunmamasıdır (Kılınç ve ark., 2002). Bu özellik en çok, hava ile doyurulmuş ortamlarda (%21'lik atmosferik oksijen) gelişemeyen zorunlu anaeroblar ve mikroaerofillerde belirgindir (Imlay, 2003). Bununla birlikte, oksijen sadece anaerobik türlerde değil yaşamları için mutlaka moleküler oksijene bağımlı olan canlılarda da toksik etki gösterebilir (Kılınç ve ark., 2002). Hiperoksiya'ya karşı korunmasız bırakıldıklarında gelişemeyen veya ölen zorunlu aeroblar bu duruma örnek olarak gösterilebilir (Imlay, 2003).

Aerobik organizmalarda O_2 , hücresel fonksiyonlar için gerekli olan yüksek enerjili fosfatların oluşumuna izin veren bir dizi kompleks olaylar zincirinde, mitokondrial sitokrom oksidaz için en son elektron alıcısıdır. Bu işlem esnasında O_2 , dört elektron ile indirgenerek H_2O molekülüne dönüştürülür (Rojkind ve ark., 2002). Bu dönüşüm esnasında reaktif oksijen türleri olarak bilinen yan ürünler de oluşturulmaktadır (Bay, 2001).

İlk kez 1954 yılında, oksijenin biyolojik sistemlerde görülen toksik etkilerinin, oksijenin bazı reaktif türlerinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Bugün, oksijenin canlılardaki toksik etkisinin “oksijen radikalleri” olarak adlandırılan ve oksijenin vücuttaki metabolizması sırasında oluşan reaktif türlerden kaynaklandığı bilinmektedir (Kılınç ve ark., 2002).

Moleküler oksijen, dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içeren diradikal yapıya sahip bir moleküldür. Bu elektronlar spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken minimum enerji seviyesindedir (Kılınç, 1985; Imlay, 2003). Bu orbitallerden

herhangi birindeki elektron bir orbitalden diğerine geçtiğinde veya farklı orbitallerde farklı yönde döndüğünde singlet oksijen oluşmaktadır. Orbitallerden birine veya ikisine, ters dönüşlü bir veya iki elektron yerleştirilmesi ile radikal elde edilmektedir (Şekil 2.2.) (Onat ve ark., 2002).



Şekil 2.2 Oksijen molekülünün elektron sayısı ve oluşan oksidan moleküller (Onat ve ark., 2002).

2.3.3 Reaktif Oksijen Türleri

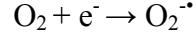
Reaktif oksijen türleri aerobik metabolizmanın kaçınılmaz yan ürünleridir (Squier, 2001). Bunlardan bazıları radikal özellik gösterirken bazıları ise radikal olmayan reaktif türlerdir (Şekil 2.3.) (Onat ve ark 2002).

Radikaller	Radikal olmayanlar
Superoksid anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikal ($OH^{\bullet}$)	Lipid hidroperoksit ($LOOH$)
Peroksil radikal ($ROO^{\bullet}$)	Hipohalöz asid (HOX)
Alkoksil radikal ($RO^{\bullet}$)	N-halojenli aminler ($R-NH-X$)
Semikinon radikal($HQ^{\bullet}$)	Singlet oksijen(1O_2)
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	Ozon (O_3)
Organik radikaller $R^{\bullet}$	Azot dioksit (NO_2)
Organik peroksid radikali $RCOO^{\bullet}$	Hipokloröz asid ($HOCl$)
Nitrik oksid ($NO^{\bullet}$)	Peroksinitrit ($ONOO^{\bullet}$)

Şekil 2.3. Reaktif oksijen türlerinin radikal ve radikal olmayan örnekleri (Onat ve ark., ark., 2002).

2.3.3.1 Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Oksijen ile etkileşimi olan birçok biyolojik sistemde meydana gelen birincil serbest radikal süperoksit radikalidir (Dean ve ark., 1997). Moleküler oksijen, tek bir elektron ile indirgendiğinde süperoksit radikali oluşur (Alberts ve ark., 2002).



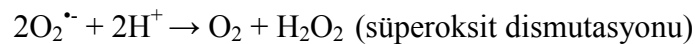
Oksijenin süperoksit radikaline indirgenmesi, demir ve kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle gerçekleşebilir (Mercan, 2004).

Süperoksit radikalının %95'inden fazlası, mitokondri iç zarında yer alan elektron transport sistemi (ETS) tarafından üretilmektedir (Afans'ev, 2004). Mitokondrial ETS hücre tarafından alınan oksijenin %90'ını kullanır (Camougrand ve Rigoulet, 2001). Bunun %1-5'i süperoksit radikaline dönüşür (Mandivalli ve ark., 2002). Buradaki radikal yapımının nedeni NADH dehidrogenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçığının olmasıdır (Kılınç ve ark., 2002).

Süperoksit radikali, diğer radikallerle karşılaştırıldığında, nispeten daha az reaktif olsa da biyolojik sistemler onu peroksil alkoksil ve hidroksil radikali gibi daha reaktif ürünlere dönüştürebilirler (Dean ve ark., 1997).

2.3.3.2 Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, süperoksit radikalının dismutasyonu (süperoksit radikaline bir elektron eklenmesi) ile veya oksijenin enzimatik olarak $2e^-$ ile indirgenmesiyle meydana gelir (Meram ve Aktaran, 2002; Kılınç ve ark., 2002).



Hidrojen peroksit, yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımamakla birlikte, geçiş metalleri varlığında (başlıca Fe^{2+}), yüksek oranda

reaktif olan hidroksil radikalini oluşturduğu için potansiyel oksidant sayılmaktadır (Turner ve ark., 2002; Sen, 2001).

Hidrojen peroksit mitokondrideki oksidatif fosforilasyonun bir yan ürünüdür (Turner ve ark., 2002). ETS’de oluşan süperoksit radikali proton fazlalığında H_2O_2 ’yi oluşturur (Sen, 2001). Hidrojen peroksit ise Fe ve Cu gibi iki değerlikli katyonların varlığında hidroksil radikalini üretir (Dean ve ark., 1997).

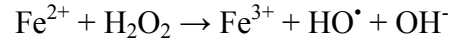
2.3.3.3 Hidroksil Radikali ($HO^\bullet$), Fenton ve Haber-Weiss Reaksiyonları

Oksijen radikalleri içinde en reaktif olanı deoksiriboz ve DNA bazları ile hızlı bir şekilde reaksiyona giren hidroksil radikalidir (Ashok ve Ali, 1999).

In vivo hidroksil yapımına neden olan bazı tepkimeler şunlardır;

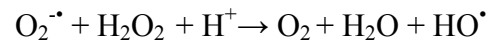
1. Fenton reaksiyonu

Hidrojen peroksit, geçiş elementleri varlığında indirgenerek hidroksil radikalini oluşturur (Turner ve ark, 2002).



2. Haber-Weiss reaksiyonu

Hidrojen peroksit’in süperoksit radikali ile reaksiyona girmesi sonucu hidroksil radikali oluşur (Başaran, 2002).



3. Suyun yüksek enerjili radyasyona maruz kalması (Meram ve Aktaran, 2002).

4. Hidrojen peroksitin fotolizi (Kılınç, 1985).

Hidroksil radikali, DNA’yı da içeren birçok biyomolekülü hasara uğratan son derece reaktif bir moleküldür (Mandivalli ve ark., 2002;). Yarılanma ömrü çok kısa olan bu radikal, oluştuğu yerde oksidatif hasara sebep olduğu gibi yeni radikalleri de oluşturabilir (Meram ve Aktaran, 2002).

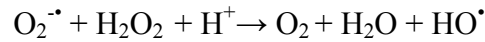
2.3.3.4 Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Atom numarası 8 olan oksijen atomunun 8 elektronu bulunmaktadır. Oksijen molekülünde, aynı yönde dönen 2 elektrona sahip 2p son orbitali önem taşımaktadır. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron bir orbitalden diğerine geçtiğinde veya farklı orbitallerde farklı yönde döndüğünde singlet oksijen oluşmaktadır (Onat ve ark., 2002).

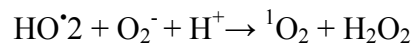
Singlet oksijenin delta ve sigma olarak iki ayrı formu bulunmaktadır. Delta formunda iki elektron aynı orbitalde bulunur ve spinleri birbirine zıttır, diğer orbital boştur. Sigma formunda ise, iki elektron ayrı ayrı orbitallerdedir ve spinleri birbirine zıttır. Sigma formunun enerjisi daha fazladır. Delta formunun yarı ömrünün daha uzun olması sebebiyle, gözlenen kimyasal reaktivitelerden delta formunun sorumlu olduğu kabul edilmektedir. (Kılınç, 1985).

Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu fomunda reaktivite çok yüksektir. Aldığı enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde verip, yeniden oksijene dönebilir. Başlıca şu mekanizmalarla vücutta oluşabilir;

1. Pigmentlerin , örneğin flavin içeren nükleotidler, retinal, bilirubinin, oksijenli ortamda ışığı absorblamasıyla
2. Hidroperoksitlerin metaller varlığındaki yıkım tepkimelerinde

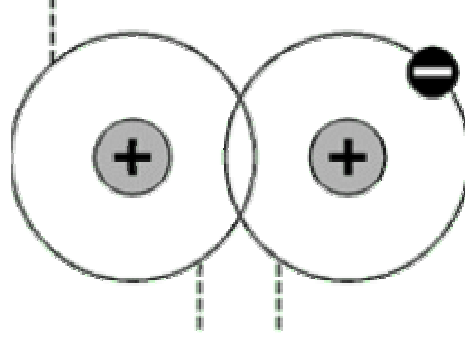


3. Kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında



4. Prostoglandin endoperoksit sentaz, bazı sitokrom p450 tepkimelerinde, miyelo/kloro/laktoperoksidaz enzimlerinin etkileri sırasında oluşmaktadır.

Singlet oksijen, doymamış yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye girerek peroksi radikalini ($\text{ROO}^{\cdot}$) oluşturur ve $\text{HO}^{\cdot}$ kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir (Kılınç ve ark., 2002).



Şekil 2.4. Singlet oksijenin moleküler şekli

(Anonymous 2005 c, www.oxygentimerelease.com/A/ScienceOxygen/p13.htm).

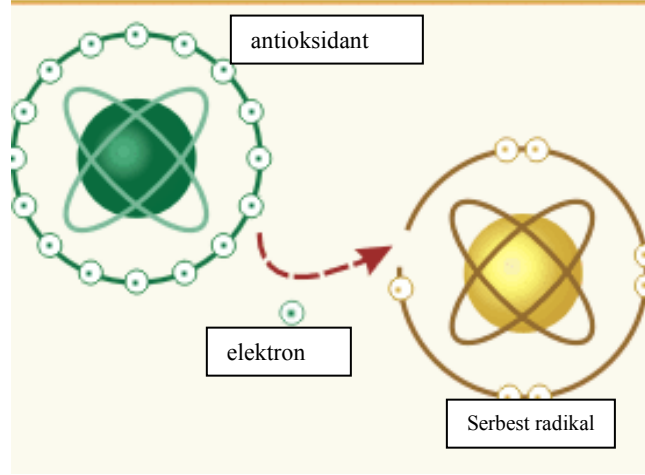
2.4. Reaktif Oksijen Türleri ve Diğer Serbest Radikallere Karşı Antioksidan Savunma Sistemleri

Organizmalar evrimleri süresince serbest radikalleri inaktive etme zorunluluğu ile yüz yüze gelmişlerdir. Bu nedenle kendilerini oksidatif ataklardan korumak için çeşitli yollar geliştirmişlerdir (Leutner ve ark., 2001).

Organizmalarda, serbest radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldıran güçlü savunma sistemleri bulunmaktadır. Serbest radikallerin oluşum hızı, bu savunma sistemlerinin etkisizleştirme hızı ile dengede olduğu sürece organizma oluşan radikallerden etkilenmemektedir. Denge bozulur, zararlı bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa ya da sistemin savunma gücü azalırsa serbest radikaller zararlı olmaya başlarlar. Bunun sonucunda oksidatif hasar ortaya çıkar (Sen, 2001; Meram ve Aktaran, 2002).

Hücrelerde, oksidanları inaktif hale getirerek, oksidatif hasarı önleyen, yok eden veya kısmen azaltan maddelere antioksidanlar adı verilmektedir (Şekil 2.5.). Tüm antioksidanlar etkilerini başlıca dört farklı şekilde gerçekleştirmektedir;

1. Enzimler oksidanları tutarak daha zayıf bir moleküle dönüştürürler.
2. Vitaminler ve flavonoidler gibi bileşikler oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirirler.
3. Oksidanların oluşturduğu hasarı onaran antioksidanlar bulunmaktadır.
4. Ağır metaller, hemoglobin, seruloplazmin, E vitamini oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engellerler (Onat ve ark., 2002).



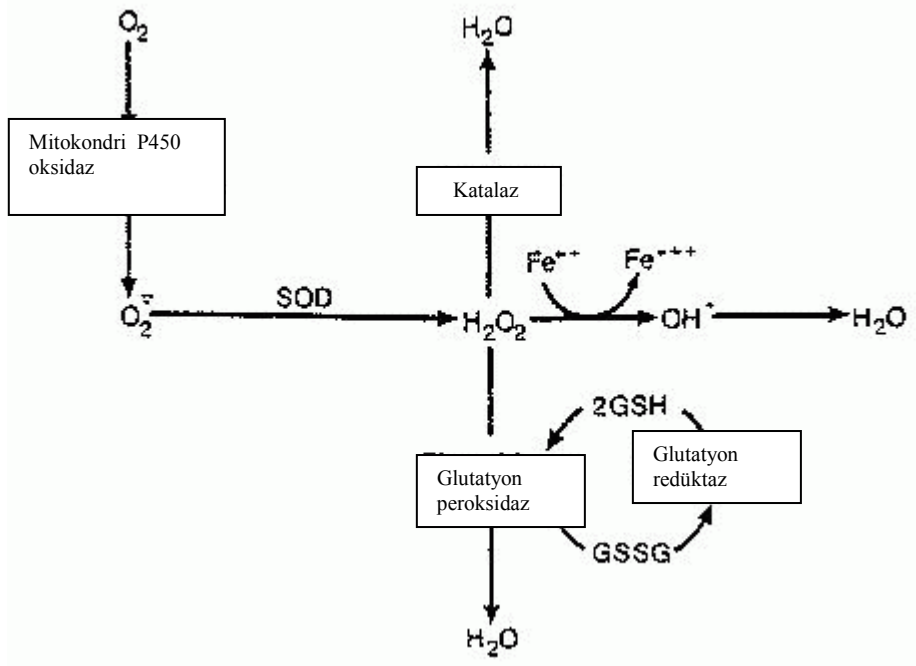
Şekil 2.5. Bir antioksidan tarafından bir serbest radikal molekülünün nötralize edilmesi (Anonymous 2005 d, www.sahealthinfo.org/.../vitamins/vitamin-a.html).

Normal şartlar altında, antioksidan savunma mekanizmaları, reaktif oksijen metabolitlerini zararsız seviyelerde tutar. Ancak, serbest radikallere uzun süre maruz kalınması hücrel hasarı önlemede yetersizlikle sonuçlanır (Camougrand ve Rigoulet, 2001; Matés ve Jiménez, 1999).

Antioksidanlar çeşitli araştırmacılar tarafından işlevlerine ve kullanım alanlarına göre değişik şekillerde sınıflandırılabilir. Örneğin, Ito ve Hirose (1989), yiyecek katkıları olarak kullanılan antioksidanlar ve doğal olarak oluşan antioksidanlar olmak üzere antioksidanları iki ana grup altında değerlendirmiştir. Buna karşın Maxwell (1995) doğal antioksidanlar ve ilaçlar olarak iki gruba ayırmıştır (Akbal, 2002).

2.4.1 Doğal Antioksidanlar

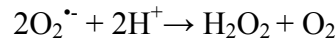
Antioksidan enzimlerin, biyolojik makromolekülleri oksidatif hasardan koruyan primer defans mekanizması olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.6.) (Leutner ve ark., 2001).



Şekil 2.6. Hücre içerisindeki enzimatik antioksidanların etki mekanizması
(Anonymous 2005 e, <http://www.banbest.com/lifeext/aging.html>).

2.4.1.1 Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1), antioksidan kapasite gösteren hücre içi antioksidan bir enzimdir (Bagis ve ark., 2003). Süperoksit radikalının ($O_2^{\cdot-}$), moleküler oksijen (O_2) ve daha az reaktif olan hidrojen peroksit (H_2O_2)'e dönüşümünü katalizlemektedir (Rojkind ve ark., 2002; Rozantsev ve Loshadkin, 2001).



Süperoksit dismutaz, oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunur, vücut tarafından üretilen en güçlü antioksidandır ve antioksidan savunmanın belirteci olarak kullanılır (Bagis ve ark., 2003).

SOD'un diğer bir fonksiyonu da, dehidratazları (dihidroksi akonitaz, 6-fosfoglukonat dehidrataz ve fumaraz A ve B) inaktif süperoksit radikallerine karşı korumaktır (Matés ve Jiménez, 1999).

Ökaryotlarda süperoksit dismutaz enziminin üç adet izoenzimi vardır. Bunlar taşıdıkları prostetik grup olan metallere ve lokalizasyonlarına göre; iki Cu,Zn-SOD ve

bir de Mn-SOD şeklinde sınıflara ayrılırlar. Cu,Zn-SOD'ların biri sitosol ve çekirdekte yer alır (SOD-1), diğeri ise ekstrasellülerdir (EC-SOD veya SOD-3). Mn-SOD ise mitokondri iç membranında lokalize olmuştur (Rojkind ve ark., 2002; Akyol, 2004). Bunların dışında ökaryotlarda bulunmayıp prokaryotlarda bulunan Fe-SOD mevcuttur (Akyol, 2004).

1. Bakır, Çinko Süperoksit Dismutaz (Cu, Zn-SOD veya SOD-1)

Cu, Zn-SOD oksidatif stres defans sisteminin önemli bir bileşenidir (Rojkind ve ark., 2002). Her biri metal grupları içeren, 36 kDa'luk iki farklı subüniteye sahip olan bu enzimler evrim boyunca korunan enzimlerin bir diğeri sınıfıdır. Aktif bölgesi ortak bir ligand (His 61) tarafından bağlanan bakır ve çinko atomundan meydana gelmektedir (Matés ve Jiménez, 1999). Bu enzimin fibroblast peroksizomlarındaki lokalizasyonu Keller ve arkadaşları tarafından belirtilmiştir (Schrader ve Fahimi, 2004).

Enzimin etkinliği için bakır mutlaka gerekli iken çinko, Co^{2+} , Hg^{2+} veya Cd^{2+} ile yer değiştirebilir. Dismutasyon bakır ile $\text{O}_2^{\cdot -}$ arasındaki etkileşimle başılır. Bu enzim mitokondri matriksi dışında ökaryotik hücrenin her organelinde bulunan bir dismutazdır (Kılınç, 1985).

2. Mangan Süperoksit Dismutaz (Mn-SOD veya SOD-2)

Birincil olarak mitokondride lokalize olan bu enzimin peroksizomal membrandaki varlığı da bildirilmiştir (Schrader ve Fahimi, 2004).

Mn-SOD, mitokondride süperoksit radikallerini uzaklaştırıp hasarı önleyen, nükleer kodlu, 96 kDa'luk homotetramer yapıda primer antioksidan enzimdir (Matés ve Jiménez, 1999; Rojkind ve ark., 2002).

Mitokondri ve diğeri prokaryotların dismutazlarının pek çok ortak özelliği yanında primer yapıları da birbirine çok benzemektedir. Mitokondrial süperoksit dismutazın bu özelliği, mitokondrinin prokaryotik orijinli olup, ökaryotik hücre içine girerek simbiyotik bir yaşam oluşturduğuna dair bir kanıt olarak kabul edilir. Aynı tepkimeyi katalizlemeleri dışında Mn-SOD ile Cu,Zn-SOD arasında hiçbir ortak yapısal özellik yoktur (Kılınç, 1985).

Diğerleri arasında Mn-SOD'un biyolojik önemi şu şekilde belirtilebilir;

1. Aerobik şartlar altında geliştiğinde, *E. Coli* Mn-SOD genlerinin inaktivasyonu mutasyon sıklığında artışa neden olur.
2. *Saccharomyces cerevisiae*'deki gen (Mn-SOD) eliminasyonu, oksijene duyarlılığı artırır.
3. Transgenik fare genlerindeki insan Mn-SOD ekspresyonu, oksijen indüklü polmonari hastalığı ve adriomycin indüklü kardiyak toksisitesine karşı koruma sağlar. Bu sebeple Mn-SOD ekspresyonu, oksijen radikali aracılı toksisiteye hücresel direncin gelişimi ve aerobik yaşamda hayatta kalabilmek için esastır (Matés ve Jiménez, 1999).

3. Ekstrasellüler Süperoksit Dismutaz (EC-SOD veya SOD-3)

EC-SOD dokuların hem intersitisyel hem de ekstrasellüler sıvıda bulunan tetrameri, bakır, çinko içeren glikoprotein (heparin ve heparansülfat gibi bazı glikoz aminoglukanlara yüksek afiniteli) salgıdır, plazma, lenf ve sinovial sıvıdaki SOD aktivite düzeyini belirtir. EC-SOD substratı veya diğer oksidanlar tarafından uyarılmaz ve memeli dokularında ki regülasyonu tek hücrelerin oksidanlara verdiği yanıttan ziyade primer olarak sitokinler tarafından koordine edilen yolda oluşur (Matés ve Jiménez, 1999).

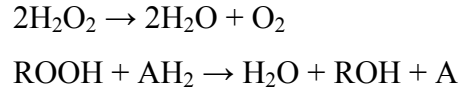
4. Demir Süperoksit Dismutaz (Fe-SOD)

Bazı bakteriler birden fazla SOD içerirler. Bunlardan biri, bütün prokaryotlarda bulunan Mn-SOD olup hücre sitoplazmasında bulunur. Bazı bakteriler, örneğin *E. Coli*, periplazmik bölgelerinde demir içeren süperoksit dismutaz bulundurlar. Bu dismutaz kofaktörü dışında Mn-SOD'a benzer. Bu tip organizmalarda matriks enziminin (Mn-SOD) endojen O_2^- radikaliyle karşı; demir içeren dismutazın ise çevreden gelen radikallere karşı koruyucu fonksiyon gördüğü kabul edilmektedir (Kılınç 1985).

2.4.1.2 Katalaz

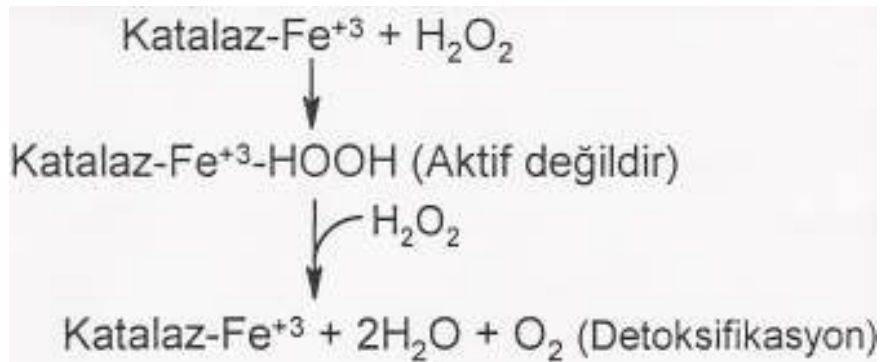
Katalaz (EC 1.11.1.6), 60 kDa özdeş alt üniteleri olan, 240 kDa'luk tetramerik hem grubu içeren bir hemoproteindir (Rojkind ve ark., 2002; Dikmen ve Özgünen, 1998). Hücrenin özellikle peroksizom partikülleri ve mitokondrilerinde, daha az yoğunlukta ise sitoplazma ve endoplazmik retikulumunda bulunur (Akyol, 2004).

Katalaz enzimi hidrojen peroksidi su ve moleküler oksijene dönüştürmektedir (Alberts ve ark., 2002). Bu enzim şartlara bağlı olarak, hem katalitik hem de peroksidatif aktivite göstermektedir ve H_2O_2 'ye ek olarak; etanol, metanol, fenoller ve nitritler gibi bazı çeşitli substratları da metabolize edebilmektedir (Schrader ve Fahimi, 2004).



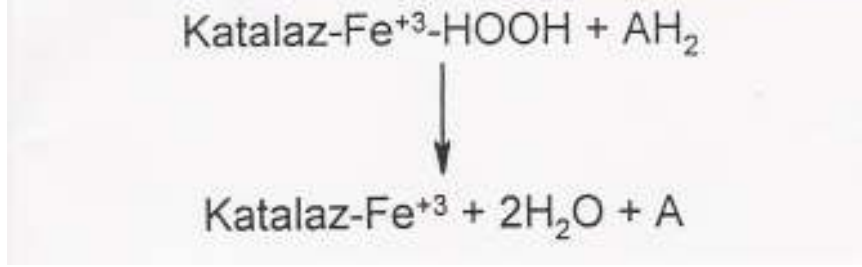
Katalaz her ne kadar normal şartlar altında, bazı hücre tipleri için esasi olmasa da hücrelerin oksidatif strese karşı tolerans kazanmasında önemli bir rol oynar (Matés ve Jiménez, 1999; Rojkind ve ark., 2002). Katalazın inhibisyonunun, oksidatif stres sonrasında, hücrenin hayatta kalıp kalmaması üzerinde önemli etkileri vardır (Schrader ve Fahimi, 2004).

Enzimler arasında en yüksek katalitik dönüşüm hızına sahip olduğu bilinen katalazın aktivitesi için demir gerekmektedir. Aktif kısmı olan Fe^{+3} -protoporfirinin iki fonksiyonel döngüsü bulunmaktadır (Şekil 2.7.) (Onat ve ark., 2002).



Şekil 2.7. Katalazın fonksiyonel döngüleri. (Onat ve ark., 2002).

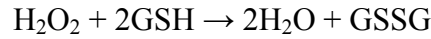
Ortamda H_2O_2 düzeyi çok düşük olduğunda aktif olmayan enzim bileşiği ile elektron alıcısı tepkimeye girmektedir (Şekil 2.8.) (Onat ve ark., 2002).



Şekil 2.8. Düşük H_2O_2 konsantrasyonunda katalaz etkisi (Onat ve ark., 2002).

2.4.1.3 Glutatyon Peroksidaz (GPXs)

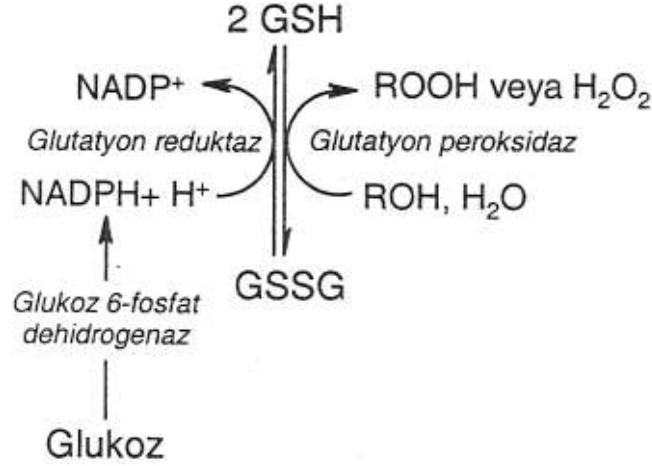
Glutatyon peroksidaz (EC 1.11.1.19), vücutta hidrojen peroksitin detoksifikasyonunda ve ayrıca lipid hidroperoksitlerin detoksifikasyonunda görev alır. Bu nedenle bu enzim hücreleri lipid peroksidasyonuna karşı korumada önemli bir role sahiptir. Koenzim olarak glutatyonu (GSH) kullanır (Rojkind ve ark., 2002; Akyol, 2004).



Glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptid olan glutatyon, indirgenmiş (GSH) ve yükseltgenmiş (GSSG) şekilde bulunmaktadır. Birçok GPXs aktif bölgelerinde selenyuma ihtiyaç duyar, çünkü glutatyon selenyum içeren glutatyon peroksidaz ile yükseltgenmektedir. Glutatyon, hücrenin yükseltgenme-indirgenme dengesini koruyan önemli bir indirgen ve antioksidandır. Hücreleri eksojen ve endojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır. Proteinlerdeki -SH gruplarının korunması ve aminoasitlerin hücre içine taşınmasında rol oynar (Onat ve ark., 2002; Rojkind ve ark., 2002).

Glutatyon peroksidaz, hücre içinde sitoplazma ve mitokondride daha yoğun bulunur. Sitoplazmadaki varlığına ek olarak fare karaciğeri peroksizomlarında da lokalize olmuştur (Akyol, 2002; Schrader ve Fahimi, 2004).

Bu enzimin aktivitesi, indirgenmiş glutatyona bağlıdır. Glutatyonda oluşan disülfid bağının tekrar sülfidril yapısına indirgenmesi, glutasyon redüktaz aktivitesi ile gerçekleşir (Onat ve ark., 2002; Rojkind ve ark., 2002). Şekil 2.6.'da glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz aktiviteleri özetlenmiştir.



Şekil 2.9. Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz aktiviteleri (Onat ve ark., 2002).

2.4.1.4 Metal İyonlarının Etkisizleştirilmesini Sağlayan Antioksidanlar

Seruloplazmin, ferritin, transferin ve laktoferin gibi metaloproteinler, metal homeostazi ve bakır ve demir gibi esasi iz metallerin depo rezervuarındaki kritik rolleri ile bilinmektedirler. Bu proteinlerin oksidatif stres şartları altında uyarıldıklarına dair kanıtlar mevcuttur. Bu proteinler redeoks aktif metaller olan demir ve bakırı bağlayarak onların Fenton reaksiyonu yoluyla ROS üretimini katalizleme kapasitelerini azaltırlar. Böylece ROS'un zararlı etkilerini önlerler (Rojkind ve ark., 2002).

Tablo 2.1. Metal iyonlarını bağlayan bileşikler (Onat ve ark., 2002).

Demir Bağlayan Bileşikler	Transferrin, laktoferrin, Ferritin.
Bakır Bağlayan Bileşikler	Seruloplazmin, albumin
Hem Proteinleri	Hemoglobin, haptoglobulin, hemopeksin
Diğerleri	Metallotioneinler (5-7 adet Zn, Ag, Cu, Cd veya Hg)

2.4.1.5 *İn vivo* Sentezlenebilen Düşük Moleküler Ağırlıklı Antioksidanlar

Diğer bir antioksidan grubu ise *İn vivo* sentezlenebilen düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlardır.

Tablo 2.2. *İn vivo* sentezlenebilen düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar (Onat ve ark., 2002).

Ürik asit	$O_2\bullet$, $OH\bullet$ ve peroksit radikali tutucusu
Ubikinon (koenzin Q)	Serbest radikal tutucusu
Bilirubin	Peroksil radikali ve singlet oksijeni yok etmektedir
α -Keto asitler	Piruvat ve α -ketoglutarat H_2O_2 ile nonenzimatik tepkimeye girmektedir.
Cinsiyet hormonları	Dişi cinsiyet hormonları (östradiol, östron, ve östriol) lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedir.
Melatonin	Antioksidan enzim sentezini uyarmaktadır
Lipoik asit	
Melaninler	Melanin polimerleri yapılarındaki eşlenmemiş elektronlar ile UV radyasyonun absorbe edilmesini sağlamaktadır.
Histidin içeren dipeptitler	Bakır iyonlarını şelatlayan karnozin, homokarnozin ve anserin, lipid peroksidasyonunu önlemektedir.
Tiyol içerenler (Glutatyon, N-asetilsistein, metilyonin kapto pril)	Serbest radikal ve $HOCl$ tutucusu.

2.4.1.6 Diyetle Alınan Düşük Moleküler Ağırlıklı Antioksidanlar

Gıdalardaki antioksidan vitaminler oksidasyona karşı savunmada önemli mikro besin maddeleridir (Dündar ve Aslan, 1999). Bu gruba A, C ve E vitaminleri örnek gösterilebilir.

Karatenoidler, yaklaşık olarak 600 tane yağda çözünen antioksidan grubudur, vitamin A öncülüdürler. Bu bileşikler singlet oksijeni, moleküler oksijenin özellikle indirgenmiş formunu ve yağ asitlerini direk okside edebilen hidroperoksitleri süpürebilen çoklu antioksidan aktiviteye sahiptirler. Karatenoidler lipit peroksidasyonunu engellemede anahtar rol oynarlar (Rojkind ve ark., 2002; Onat ve ark., 2002).

Vitamin C (askorbik asit) suda çözünür ve vitamin E ile birlikte serbest radikalleri ve singlet oksijeni ortadan kaldırabilir. Askorbik asitin, süperoksit, hidroksil radikalleri ve singlet oksijen ile direk olarak reaksiyona girdiği gösterilmiştir. Askorbik asit aynı zamanda E vitaminini rejenere etmektedir (Machlin ve Bendich, 1987).

Vitamin E, bulunduğu biyolojik ortamlardaki serbest radikal türlerini toplayarak, peroksidasyonun erken döneminde zar fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerini korumada, oksidatif strese karşı ilk savunma hattını oluşturur. Bir diğer yol ile de singlet oksijen, süperoksit ve daha çok hidroksil radikallerini indirger. Bu işlevini peroksidasyon reaksiyon zincirini sonlandırarak gerçekleştirir. Uzunca bir süre, vitamin E'nin antioksidan kapasitesinin, sadece bu reaksiyonun zincirini sonlandırarak gerçekleştiği kabul edilmesine karşın, bugün vitamin E'nin radikal giderme, baskılama, onarma ve endojen savunmayı arttırma mekanizmalarının tümünü kullanabildiği, bu nedenle çok hızlı ve geniş bir antioksidan etki kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. E vitamininin antioksidan özelliği yüksek oksijen derişimlerinde etkilidir (Dündar ve Aslan, 1999; Dikmen ve Özgünen, 1998).

2.4.2 İlaçlar

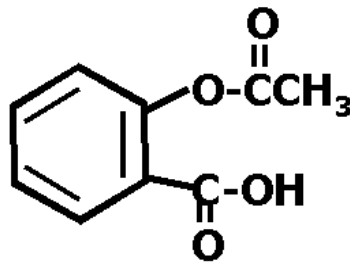
Oksidatif strese karşı yanıtta antioksidan etki gösterebilen ilaçlar da kullanılmaktadır. Bu ilaçlara örnekler Tablo 2.3.'de gösterilmektedir.

Tablo 2.3. Antioksidan özellik gösteren ilaçlar (Onat ve ark., 2002).

Rekombinan h-SOD
21-Aminosteroidler
Sitokinler (TNF ve interlekin-1)
Mannitol
Trimetazidin
Ebselen
Demir şelatörleri (Deferroksamin, dimetil tiyöüre)
Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopurinol, oksipurinol)
Babitüratlar
Indapamid
H2 reseptör blokeri

2.4.3 Aspirin

Asetilsalisilik asit, kimyasal olarak saf ve stabil bir formda ilk olarak 1897’de Bayer Laboratuvarları’nda elde edilmiş ve 1899’da, bu yeni ilaç Berlin’deki Imperial Patent Ofisine “Aspirin” ismi ile kayıt ettirilmiştir. Preparatın bariz analjezik (ağrı giderici), anti-inflamatuvar ve antipiretik (ateş düşürücü) özellikleri aspirinin tüm dünyada hızla yayılmasına yol açmıştır (Nietsch, 1991). Şekil 2.10.’da asetilsalisilik asidin kimyasal yapısı gösterilmektedir.

**Şekil 2.10.** Asetilsalisilik asidin moleküler şekli

(Anonymous 2005 f, <http://www.genchem.rutgers.edu/aspirin.html>).

Aspirin, öncelikle, ateş düşürücü bir ilaç olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Aspirinin insanlarda uzun süreli kullanımı, kolon kanseri, özefagus ve mide kanserini de içeren diğer sistem kanserlerinin gelişimine karşı koruyucu etkisinin olduğunu göstermiştir. Yapılan hayvan çalışmaları, aspirinin kimyasallar ile uyarılan birçok kanser tümörlerini inhibe ettiğini göstermiştir (Shi ve ark., 1999).

2.4.3.1 Etki Mekanizması

1. Analjezik (ağrı kesici) Etki

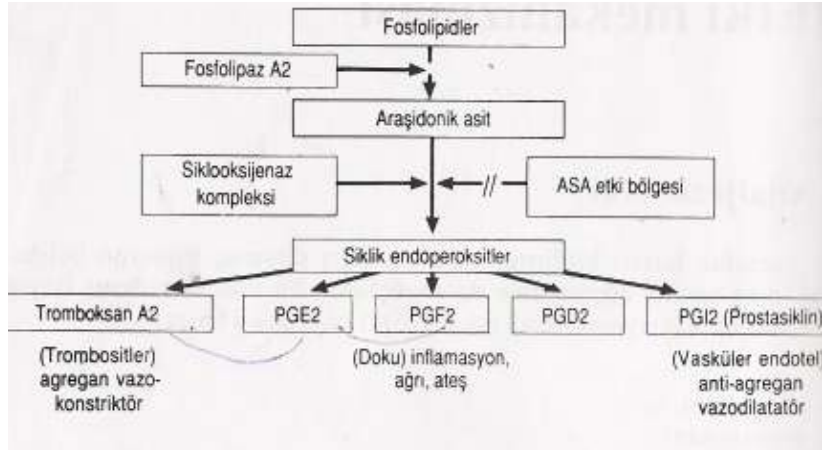
Ağrı, vücudun hasarı bildirme yoludur. Ağrı duyusu iritasyon bölgesinde başlayan ve santral çözümleme ile sonuçlanan bir dizi zincirleme fizyolojik ve psikolojik reaksiyonu ihtiva eder. Lokal doku hasarı;

- histamin
- serotonin
- asetilkolin
- kininler
- prostaglandinler

gibi çeşitli doku hormonlarının salınımını uyarır (Nietsch, 1991).

Prostaglandinler 20-C'lu (eikozanoik) poliansatüre yağ asitlerinin (araşidonik asit) merkezinin bir siklopentan halkası vermek üzere in vivo halka yapması ile üretilir. Önceden sentez edilerek depo edilmeyen eikozanoidler gerektiğinde fosfolipaz A2 aktivasyonu ile membran fosfolipitlerinden salıverilen arşidonik asitten sentezlenmektedir (Şekil 2.11.) (Onat ve ark., 2002; Dikmen ve Özgünen, 1998).

Prostaglandinler, şaşırtıcı ölçüde çok çeşitli etkiler gösterirler. Bu etkiler arasında, yangı cevabının uyarılması ve ağrı algılanmasının arttırılması da yer almaktadır. Aspirinin ağrıya karşı etkisi prostoglandin sentezini inhibe etmesinin bir sonucudur (Demirsoy ve Türkan, 2002).



Şekil 2.11. Prostaglandin biyosentez yolu ve asetilsalisilik asidin etki bölgesi (Nietsch, 1991).

2. Anti-inflamatuar Etki

Kızarıklık, sıcaklık, ağrı, şişlik ve fonksiyon kaybı inflamasyonun klasik semptomlarıdır ve çok kompleks bir sinirsel ve kimyasal mekanizma ile ilgilidir (Nietsch, 1991).

Vane ve arkadaşları prostoglandinlerin sadece inflamasyon bölgesinde üretilmediğini, aynı zamanda bunların tek başlarına veya diğer mediatörlerle birlikte inflamasyonun başlıca belirtilerini ortaya koyduklarını ileri sürmüşlerdir (Weissman, 1991). Burada da temel farmakolojik etki prostoglandin sentezinin inhibisyonudur.

Aşağıdaki farmakolojik etkiler, asetil salisilik asidin anti-inflamatuar etkinliği için öne sürülmüştür;

- kapiler membranın stabilizasyonu
- sayısız mediyatörün inhibisyonu
- trombosit agregasyonunun önlenmesi
- lizozomların sitabilizasyonu
- anti-inflamatuar etkili proteine bağlı peptitlerin salınımı mukopolisakkarit metabolizmasına etki (Nietsch, 1991).

3. Antipiretik (ateş düşürücü) Etki

Prostoglandinlerin iki tipinin, serebral ventriküllere veya ön hipotalamusa enjekte edilmelerinin ateş meydana getirdi belirlenmiştir (Weissman, 1991).

Prostoglandinlerden özellikle E1 ve E2 santral ısı regülasyonunda düzenleyicidirler. Bu sebeple, prostoglandin sentezinin inhibisyonu, asetilsalisilik asidin ateş düşürücü etkisinin temel mekanizmasıdır (Nietsch, 1991).

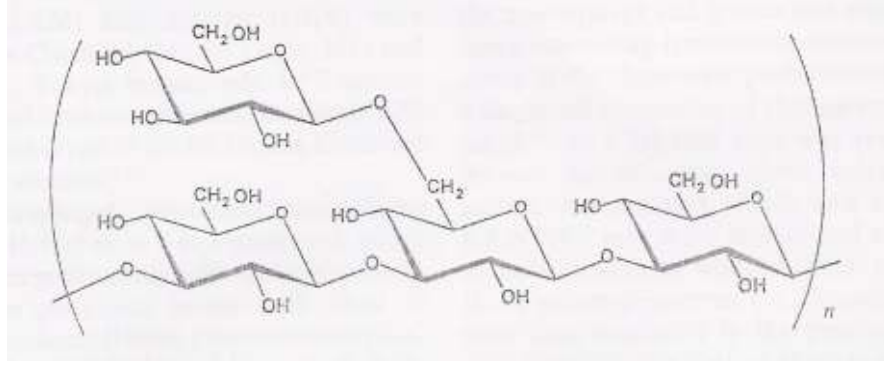
2.4.3.2 Antioksidan Özelliği

Yapılan son çalışmalar, aspirinin kimyasal yapısının salisilik asidin yapısına benzer olmasından ötürü, hidroksil radikalini süpürerek, biyolojik hedefleri bu radikalın neden olduğu hücresel hasardan koruduğunu göstermiştir.

Aspirinin, $O_2^{\cdot-}$, $HO^{\cdot}$ ve H_2O_2 gibi reaktif oksijen türlerine karşı reaksiyonunu araştırmak için, elektron spin rezonans kullanılarak yapılan çalışma sonucunda, aspirinin askorbat, glutatyon ve sistein gibi iyi bilinen antioksidanlardan daha hızlı olan reaksiyon sabitesi ile ($k = 3.6 \times 10^{10} M^{-1} \text{ saniye}^{-1}$) etkili bir hidroksil radikali süpürücüsü olduğunu göstermiştir. Diğer yandan aspirin, süperoksit radikali veya hidrojen peroksit için iyi bir süpürücü değildir. Aspirinin bu antioksidan özelliği, çeşitli fizyolojik ve farmakolojik etkilerini açıklayabilir (Shi ve ark., 1999).

2.4.5 β -D-Glukan

(1,3)- β -D-Glukanlar (glukanlar) mayaların, fungusların ve tahılların hücre duvarlarında yapısal bir element olarak bulunan glikoz polimerinin heterojen bir grubudur (Şekil 2.12.) (Cleary ve ark., 1999).



Şekil 2.12. Beta glukanın moleküler yapısı (Adachi, ve ark., 1994).

Mayalardan elde edilen preparasyonlar çok uzun zamandır kozmetik ve farmakolojik amaçlar için kullanılmaktadır (Züllü ve ark., 1998). 1940'lı yıllardan bu yana glukanın fonksiyonel kullanım alanları üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (Wang ve ark., 2003). Yapılan çalışmalar yaygın olarak β -1,3 Glukanların immünolojik ve farmakolojik etkileri üzerinedir (Vetvicka ve ark., 2004). Son yıllarda glukanın faydalı etkileri immün fonksiyonların modülasyonu, antioksidant etkileri ve diğer nonspesifik etkilerine bağlanmaktadır (Kayali ve ark., 2005). β -Glukanların temel immuno-farmakolojik aktiviteleri, konakçının viral, bakterial, fungal ve parazitik enfeksiyonlara karşı direncini artırması, antitümör etkisi ve karsinogenezden korunma, zararlı ışınların etkilerinden korunma ve immunoadjuvant etki, retikuloendotelial sistemin fagositik ve proliferatif aktivitesinin artırılmasını kapsamaktadır. Bununla birlikte bütün glukalar immün sistemi destekleme anlamında aynı veya kuvvetli değildir. Bu surette yulaftan, arpadan, çeşitli mantarlardan ve alglerden elde edilen glukalar ekmek mayasından izole edilen β -glukan kadar kuvvetli bir immün sistem kuvvetlendirici değildir (Ahmad, 2000).

Beta-Glukanlar, konakçının immün sisteminin sitümilasyonunu ve biyolojik cevap değiştirici (Biological response modifiers) olarak bilinen bir ilaç sınıfı içerisinde gruplandırılırlar (Slamenova, 2003). Ayrıca beta 1,3-glukan genellikle zararsız olarak kabul edilir (FDA ya göre GRAS kategorisinde) ve hiçbir toksik veya yan etkisi yoktur (Carrow, 1997).

Beta-1,3-glukanın kanser tedavisindeki faydalı rolü 1975'de Peter W. Mansell ve arkadaşları tarafından açığa çıkartılmıştır. Dokuz hastada malignant deri kanseri nodüllerine beta-1,3-glukan enjekte edilmiştir. Kanser lezyonlarının ebatları beş gün

gibi kısa bir zaman periyodunda çarpıcı biçimde azalmıştır (Anonymous 2005 a, <http://www.betaglucan.org/history.htm>). Ayrıca kimyasal olarak uyarılmış farelerin karaciğerlerindeki sarkoma ve melanomalarda yapılan klinik gözlemler ve deneyler suda çözünen ve çözünmeyen (1-3)- β -D-glukanların antitümör ve antimetastatik etkilerini açığa çıkarmıştır (Falameeva ve ark., 2001).

β -Glukanların antitümör aktivitesini yükseltmesi kadar çeşitli viral, bakterial, protozoon ve fungal hastalıklara karşı direnci arttırdığı da gösterilmiştir (Davis ve ark., 2004). Glukan, diğer bilinen ajanlara (BCG, *Corynebacterium parvum*, pyrane copolimer v.b.) benzer biçimde bir immün mekanizma modülatörüdür. Glukan varlığı temel olarak humoral immün mekanizmalarının sitümilasyonu ile makrofaj sayısı ve aktivitelerini arttırarak etkisini gösterir (Petruczenko, 1984). Glukanların bu tepkileri oluşturmada temel mekanizmaları, makrofajların muhtemelen makrofaj spesifik (1,3)- β -D-glukan reseptörü veya komplement reseptör CR3 (CD11b/CD18)'e bağlanma yolu ile aktive edilmesidir. Bununla birlikte, son çalışmalar glukanların T ve B hücreleri, NT hücreleri, ezinofiller ve nötrofilleri kapsayan diğer immün hücrelerin aktivitelerini de direk etkileyebileceğini göstermiştir (Cleary ve ark., 1999). Son yıllarda bunların immünomodilasyon ve hematopoetik aktiviteleri fare, rat, gine domuzu gibi çeşitli hayvan modelleri kullanılarak geniş ve dikkatli bir biçimde çalışılmıştır (Slamenova, 2003). Yaşlanma sürecinin temel elemanlarından bir tanesinin immün fonksiyon etkinliğinde azalma olduğu iyi bir şekilde anlaşılmıştır (Carrow, 1997). Bu bağlamda β -glukanların immün faaliyetleri hızlandırması nedeniyle hücresel yaşlanmayı önleme üzerine olumlu etki gösterebileceği söylenebilir.

Beta-1,3-glukanın radyasyon koruyucu etkisi 1985'de Dr. Patchen ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Araştırmacılar deney farelerini öldürücü dozlarda radyasyona maruz bırakmışlardır. Beta-1,3-glukan oral dozda verildiğinde, radyasyon uygulamasından sonra, farelerin %70'inin ışının zararlı etkilerinden tamamen korunduğu görülmüştür. Dr. Patchen beta-1,3-glukanın immün sistemin onarılması ve enfeksiyonlardan korunmanın etkin bir yolu olabileceğini önermişlerdir. Ayrıca araştırmacı ilerleyen araştırmalarında beta-1,3-glukanın bir serbest radikal süpürücü (antioksidan) olarak iş görebileceğini ve hatta makrofajları radyasyon, toksinler, ağır metallerden ve serbest radikallerin oluşturabileceği hasarlardan koruyabileceğini önermiştir (Anonymous 2005 a, <http://www.betaglucan.org/history.htm>).

Deneyisel veriler glukanların etkin bir serbest radikal süpürücü olarak görev yapabileceğini ortaya koymuştur (Kayalı ve ark, 2005). Beta-1,3-glukanın antioksidan etkisinin saptandığı ‘serbest radikal süpürücü etkisi’ deneyleri farklı organizmalarda tekrarlanmıştır (Carrow, 1996). Örneğin, Zülfi ve ark. (1998) tarafından yapılan bir çalışmada CM-glukan’ın insan deri hücrelerini oksidatif strese karşı koruma etkisi incelenmiştir. İmmün sistemin baskılanmasına ek olarak UV-A tarafından tetiklenen oksidatif stres de kansere neden olabilmektedir. Yapılan çalışmada, CM-glukanın keratositleri oksidan moleküllerin azaltıcı etkilerinden korudukları gösterilmiştir. Bu gün serbest radikallerin yaşlanmayı hızlandırması, kansere neden olması ve diğer dejeneratif etkileri ile ilgili olarak sahip oldu potansiyel hakkındaki bilgilerimizin ışığı altında Beta-1,3-glukanın serbest oksijen süpürücü (antioksidan) etkisi özellikle çok büyük önem taşımaktadır (Carrow, 1996).

2.5. Canlılarda Reaktif Oksijen Metabolitlerinin Kaynakları

Reaktif oksijen türevleri (ROT), mitokondri, lizozom, peroksizomu içeren çeşitli organellerde ve çekirdek, endoplazmik retikulum, plazma membranlarında endojen kaynaklı üretilmelerinin yanı sıra ekzojen kaynaklardan da oluşabilirler (Machlin ve Bendich, 1987; Turner ve ark., 2002).

Hücre organellerinin her biri farklı miktarda radikal oluşumuna sebep olurlar. Bunların yanı sıra radyasyon, stres ve ksenobiyotikler aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini artırırlar. Aktive fagositler intrasellüler radikal oluşumuna neden olurlar (Tablo 2.1.). Sitokrom P450, sitokrom b5, ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, lipooksijenaz, prostoglandin sentetaz, hemoglobin, flavoproteinler, lipid peroksidasyonu, oksidatif stres yapan iskemi, mitokondrial elektron transport sistemi, moleküler otooksidasyon yapan tiol, hidrokinon, katekolamin, flavin ve antibiyotik gibi moleküllerin hepsi hücrel serbest radikalleri oluştururlar (Meram ve Aktaran, 2002).

Tablo 2.4. Fagositlerin ürettiği reaktif oksidan ürünler (Meram ve Aktaran, 2002).

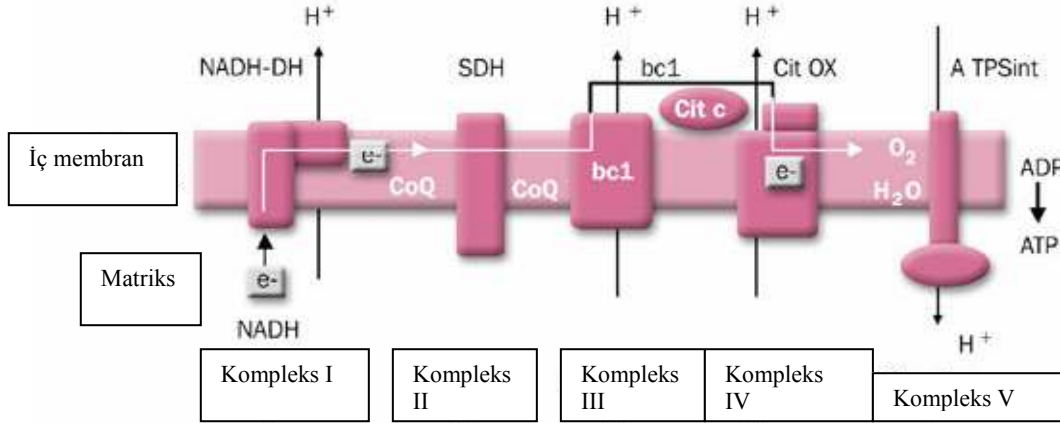
Trombositler	H_2O_2 , O_2^- , OH
Nötrofiller	H_2O_2 , O_2^- , OH, HOCl
Eozinofiller	H_2O_2 , O_2^- , OH, HOCl, 1O_2
Makrofajlar	H_2O_2 , O_2^- , OH, HOCl, NO

Reaktif oksijen metabolitlerinin kaynaklarını şu şekilde özetleyebiliriz.

2.5.1. Elektron Transport Zinciri

Süperoksit radikali gibi oksijen radikalleri ve H_2O_2 , $HO_2^\bullet$ veya $HO^\bullet$ gibi diğer ürünler bir çok hücresel kısımda üretilebilir ancak reaktif oksijen türlerinin (ROT) sağlıklı post-mitotik dokulardaki esas üreticisinin mitokondri olduğu düşünülmektedir (Barja, 2002 a). Normal metabolizma sırasında oluşan süperoksit radikallerinin % 95'inden fazlası mitokondri iç membranında üretilmektedir (Bohr ve ark., 2002).

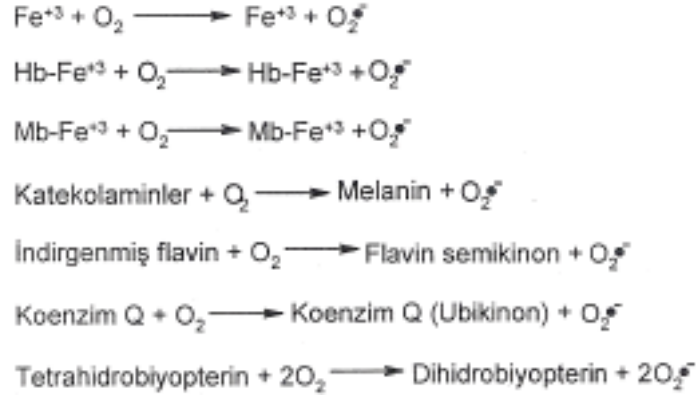
Mitokondri H_2O_2 'yi sitosole bırakır, oksidatif stresin hücre içindeki genel düzeyi ise H_2O_2 üretimi ve onun hücresel antioksidanlar tarafından eliminasyonu arasındaki dengeye bağlı olacaktır. Normal koşullarda mitokondri, sitokrom oksidaz sistemi ile oksijeni suya indirgeyerek detoksifiye etmektedir (Şekil 2.13.). Elektron transport zincirinde yer alan pek çok bileşik, örneğin NAD, FAD, KoenzimQ gibi, oksijen ile tepkimeye girerek $O_2^\bullet$ salınmasına neden olmaktadır. Bu, tek değerlikli oksijen kaçağı olarak tanımlanmaktadır. ROT üretiminin iki ana bölgesi, elektron transport zincirinin kompleks I ve III kısımlarıdır (Camaugrand ve Rigoulet, 2001; Onat ve ark., 2002).



Şekil 2.13. Mitokondrial elektron transport sistemi ile oksijenin suya indirgenmesi (Anonymous 2005 g, www.antioxidantes.com.ar/12/Art097.htm).

2.5.2 Enzimatik Olmayan Tepkimeler

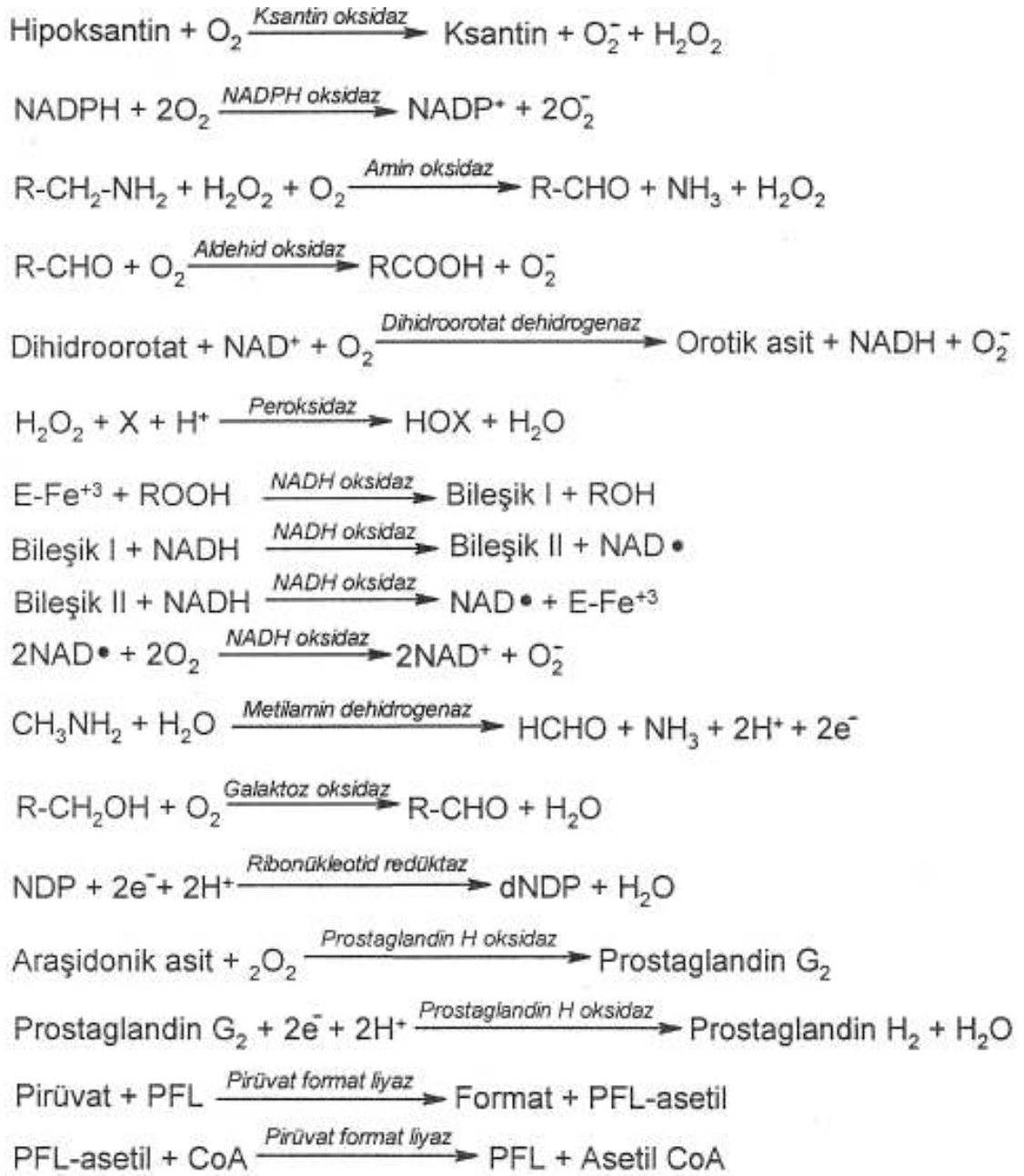
Hücre içi serbest radikaller, otooksidasyon tepkimeleri sonucu indirgenmiş flavinler ve tioller gibi küçük moleküllerin inaktivasyonu ile enzimatik olmayan tepkimerde üretilirler. Şekil 2.14.'de hücre içi serbest radikallerin oluşumuyla sonuçlanan, enzimatik olmayan tepkimelere örnekler gösterilmektedir (Machlin ve Benedich, 1987; Onat ve ark., 2002).



Şekil 2.14. Reaktif oksijen metabolitlerinin enzimatik olmayan kaynakları (Onat ve ark., 2002).

2.5.3 Enzimatik Tepkimeler

Oksijen içeren tepkimeleri katalizleyen enzimler oksidazlar veya oksijenazlar olarak sınıflandırılırlar. Elektronları oksijene aktaran oksidazlar oksijenin suya veya hidrojen peroksite indirgenmesini sağlar. Oksijenazlar, oksijenin bir substratın yapısına katılmasını gerçekleştirmektedirler. Bu gruptaki enzimlerin katalizlediği tepkimelerde serbest radikaller oluşabilmektedir. Tablo 2.5'de de serbest radikal oluşumuna neden olan enzimatik tepkimelere örnekler verilmiştir (Onat ve ark., 2002).

Tablo 2.5. Serbest radikallerin enzimatik kaynakları (Onat ve ark., 2002).

2.5.4 Dış Etkenler

Serbest radikallerin ekzojen kaynakları, sigara, bazı kirletici maddeler ve organik çözücüler, anestezipler, hiperoksik ortamlar ve pestisitlerdir. Bu bileşikler bazıları, hedef dokularda oksidatif hasara neden oldukları gösterilen serbest radikal ara ürünlerine metabolize edilirler. Ayrıca dokuların radyasyona maruz bırakılmaları, serbest radikal oluşumu ile sonuçlanmıştır (Machlin ve Benedich, 1987). Tablo 2.6.'da serbest radikallerin ekzojen kaynakları gösterilmektedir.

Tablo 2.6. Serbest radikallerin ekzojen kaynakları (Onat ve ark., 2002).

Radyasyon	
Toksik kimyasallar	CCl ₄ , halojenlenmiş hidrokarbonlar, difenoller, kinonlar
Hava kirliliği	Azot dioksit, ozon, sulfur dioksit
Sitoatetikler	
Pestisitler	Bipridil herbisit ajanlar
Metaller	Titanyum, aliminyum, kurşun, molibden, nikel, krom, kobalt, civa, kadmiyum, arsenik
Antibiyotikler	Tetrasiklinler, kinon antibiyotikleri, aminoglikozidler
Sigara ve diğer yollarla toksik tütün alımı	
Alkol	

2.6. Serbest Radikallerin Hücre ve Biyomoleküller Üzerine Etkileri

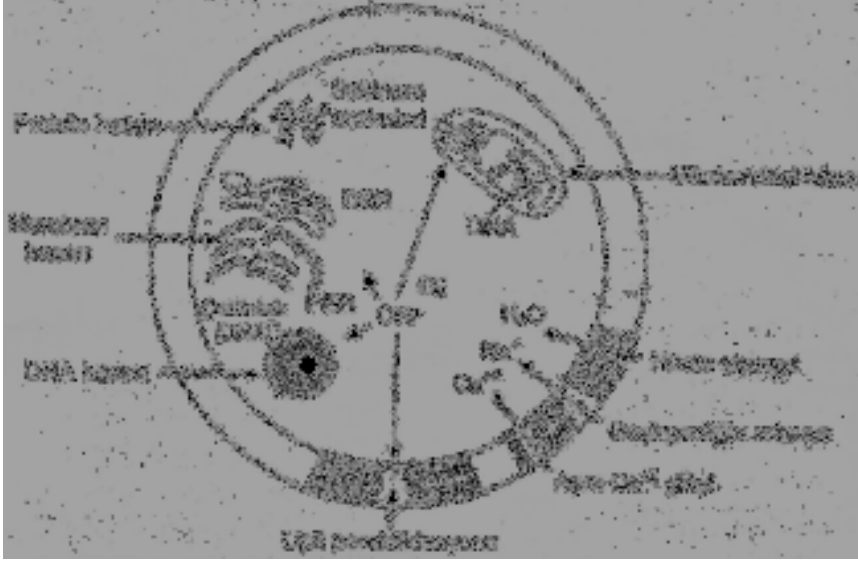
Fizyolojik şartlarda insan vücudunda oluşan reaktif oksijen ürünleri ile antioksidan defans bir denge halindedir. Yoğun ROS (Reaktif Oksijen Türevleri) üretimi ya da antioksidan defansın azalması biyomoleküllerde yapısal ve fonksiyonel modifikasyonlara yol açarak oksidatif strese neden olur (Köken, T., 2004).

Örneğin canlıların yaşlanması radikallerin neden olduğu kalıcı hasarların bir birikimi olarak değerlendirilmektedir. Oksidatif stresin yaşlanma üzerine etkisini açıklayan teori, fizyolojik fonksiyonlardaki yaşa bağlı azalmanın makro moleküllerdeki oksidatif hasarın birikimi nedeniyle olduğunu ileri sürer (Lin ve ark., 2003). Bu teori ilk olarak 1956'da Danham HARMAN tarafından öne sürülmüştür (Sastre ve ark., 2003).

Daha önce çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipitlerde hasara yol açtığı bildirilmiştir. Diğer taraftan oksidatif strese bağlı olarak oluşan *in vivo* DNA ve protein hasarının, lipitlerdeki hasardan daha önemli olduğu öne sürülmektedir. Proteinlerde *in vivo* olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler, proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücresel fonksiyonları etkiler. Reseptörlerin, sinyal ileti mekanizmalarının, yapısal proteinlerin, transport sistemlerinin ve enzimlerin rol oynadığı hücresel olaylar oksidatif protein hasarından etkilenir (Çakatay ve Terzi, 2000).

Serbest radikallerin, karbonhidratların bozulmasında da etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve oksoaldehitler meydana gelir. Oksoaldehitler; DNA, RNA, proteinlere bağlanarak çapraz bağlar oluştururlar. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarını stimüle etmiş olurlar (Başaran, 2002).

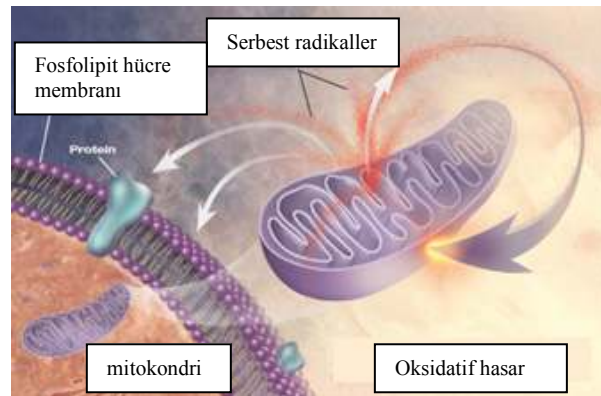
Reaktif oksijen türleri (ROT) hücresel hasarlardan sorumlu ana etmendir. Aktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin lipid peroksidasyonu, protein modifikasyonu, enzim inaktivasyonu, DNA zincir kırıkları ve baz modifikasyonlarını uyardıkları ve oksidatif hasara neden oldukları gösterilmiştir. Bu hasarlar hücreyi bozar, yaşlandırır ve apoptoza götürür. Şekil 2.15.'de serbest radikallerin hücrenin çeşitli kısımlarına olan etkileri görülmektedir (Camougrand ve Rigoulet, 2001; Başaran, 2002).



Şekil 2.15. Serbest radikallerin hücreye etkileri (Onat ve ark., 2002).

2.6.1 Serbest Radikallerin Mitokondri Üzerine Etkileri

Mitokondrial elektron transport sistemi (ETS) aerobik organizmalarda, enerji üretiminde önemli bir rol oynar ve aynı zamanda hücre içerisindeki DNA, RNA ve proteinlere hasar veren reaktif oksijen türevlerinin hem en önemli kaynağı hem de onların ana hedeflerinden biridir (Sastre ve ark., 2003). Şekil 2.16. mitokondrinin, reaktif oksijen türlerinin hem ana üreticisi hem de hücredeki ilk hedefi olduğunu göstermektedir.



Şekil 2.16. Mitokondride üretilen reaktif oksijen türlerinin mitokondri ve hücreye oksidatif hasarı (Anonymous 2005 h, www.alzheimers.org/pr01-02/07.html).

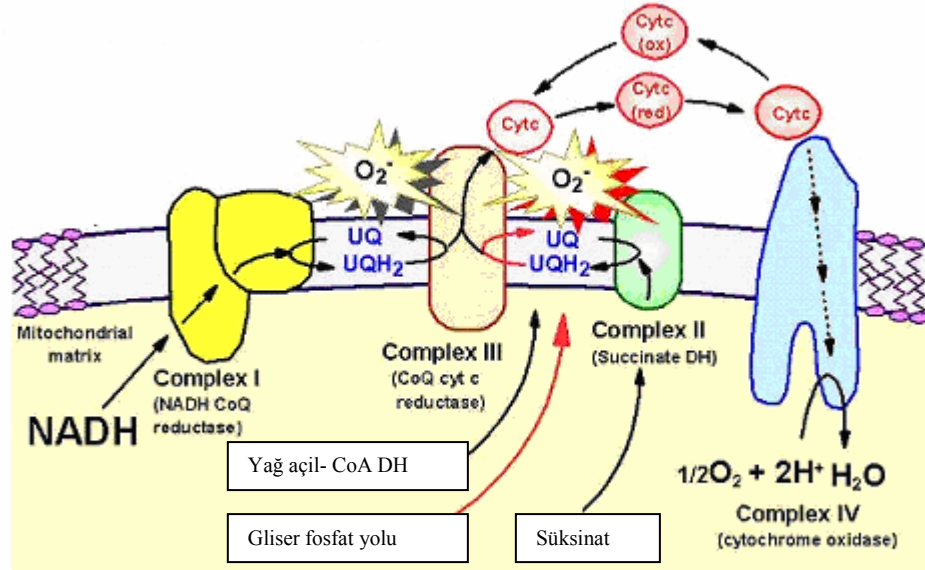
Mitokondrinin ROS'un ana üreticisi olduğunun belirlenmesi, yaşlanmanın mitokondrial teorisine yol açmıştır (Mandavilli ve ark., 2002). Bu teoriye göre, serbest radikaller yaşam boyu devamlı olarak üretilirler ve endojen kaynaklıdır (Barja, 2002).

Serbest radikallerin mitokondrial hasar ve ardı sıra yaşlanmadaki rolü ilk olarak Harman tarafından 1972 yılında ileri sürülmüştür. Harman, mitokondrial DNA'nın ROT atağı için muhtemel bir hedef olduğunu ileri sürmüştür. Daha sonra Miquel ve arkadaşları bu konuda çalışmalar yapmışlar ve yaşlanmaya mitokondrial genomlarında meydana gelen oksidatif hasar nedeniyle, fonksiyonel mitokondri sayısı azalmış mitoz sonrası hücrelerdeki azalan enerji üretimi ve hücre ölümünün sebep olduğunun kabul etmişlerdir. Daha da ileri çalışmalar, kanser gibi birçok nörodejeneratif hastalığı mt DNA oksidatif hasarına bağlamıştır (Mandavilli ve ark., 2002).

Mitokondrial ETS, aerobik organizmalarda enerji üretiminde önemli bir rol oynar. Sitrik asit döngüsü boyunca oluşturulan nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) ve flavin adenin dinükleotid (FADH₂)'in elektronları ETS'de akar ve ATP üretiminde kullanılan Proton gradientinin oluşumuna birleşir. En son elektron alıcısı moleküler oksijendir ve 4 elektron ile indirgenerek suya dönüştürülür. Elektron transport zinciri mitokondrilerin iç membranında lokalize olmuştur ve 5 komplekse sahiptir. Bunlar; NADH dehidrogenaz (kompleks I), süksinat dehidrogenaz (kompleks II), sitokrom bc₁ kompleks (kompleks III), sitokrom c oksidaz (kompleks IV) ve ATP sentetaz (kompleks V)'tir. Kompleks I, III, IV mitokondri iç membranı boyunca protonları sitoplasmaya pompalayarak burada bir proton gradienti oluşturur, bu gradient kompleks V tarafından ATP üretiminde kullanılır. Komplekslerin alt ünitelerinin çoğu nükleer genom tarafından kodlanır (Mandavilli ve ark., 2002).

ETS, hücre tarafından alınan oksijenin %90'ından fazlasını tüketir (Camougrand ve Rigoulet, 2001), bunun %1-5'i süperoksit radikale dönüştürülür. Zincirde yer alan pek çok bileşik (NAD, FAD, KoenzimQ) oksijen ile tepkimeye girerek süperoksit salınmasına neden olur. Kompleks I ve III süperoksit üretimi için ana bölgelerdir (Şekil 2.17.). Bu radikal daha sonra SOD (süperoksit dismutaz) ile hidrojen peroksit'e dönüştürülür. Hidrojen peroksit sıra ile glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksinler ile suya yıkılır. Eğer bu sağlanamazsa hidrojen peroksit, Fe ve Cu gibi iki değerlikli katyonların varlığında, Fenton reaksiyonuna girer ve DNA'yı da içeren birçok

biyomolekölü hasara uğratan hidroksil radikalini üretir (Mandavilli ve ark., 2002). Burada oksidatif stresin genel düzeyi H_2O_2 üretimi ve H_2O_2 'nin hücresel antioksidanlar tarafından eleminasyonu arasındaki dengeye bağlı olacaktır (Barja, 2002).



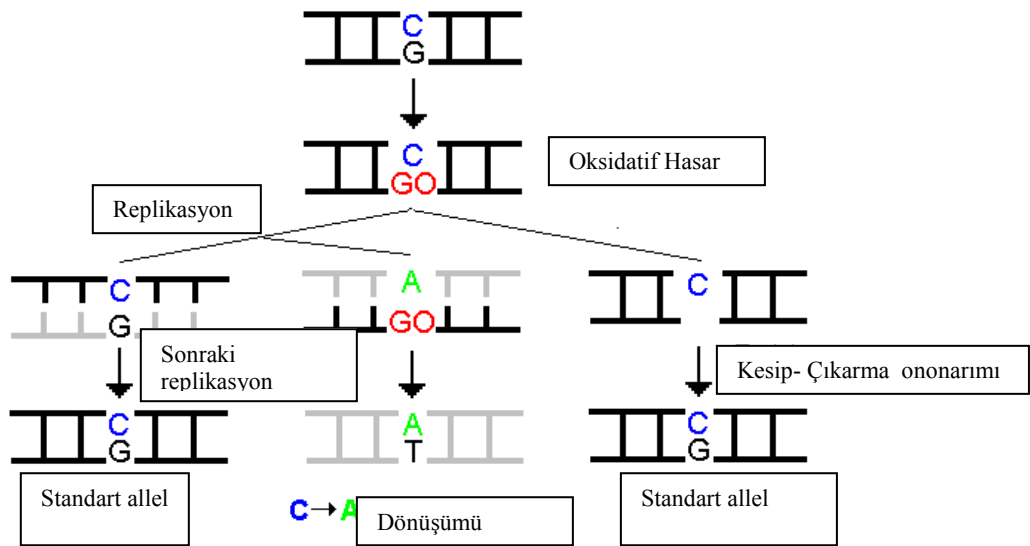
Şekil 2.17. Elektron transport sisteminde reaktif oksijen metabolitlerinin oluşum bölgeleri (Anonymous 2005 1, www.essex.ac.uk/.../oxidative-Stress).

Mitokondrial DNA bu radikallerin üretildiği ETS'ye yakın olduğu için, sınırlı tamir mekanizmasına sahip olduğu için, koruyucu histonları olmadığı için, kodlanmayan dizisi az olduğu için oksidatif hasara karşı özellikle hassastır (Lin ve Beal, 2003). Ames ve arkadaşları mitokondride üretilen oksidanların, yaşlanma ile biriken oksidatif lezyonların en büyük kaynağı olduğunu ve oksidatif hasarın, yaşlanma boyunca mitokondrial disfonksiyonun oluşmasında en büyük rolü oynadığını göstermiştir (Sastre ve ark., 2003).

Oksidatif stresin mitokondrial disfonksiyona etkisini şu şekilde açıklayabiliriz; insan mt DNA'sı sadece 13 polipeptid kodlamakla kalmaz, bunun yanında 2 rRNA ve 22 tRNA kodlamaktadır. Bu nedenle tamir edilemeyen oksidatif mt DNA hasarı, elektron transport zincirinde kırılmalara, ATP sentezi için esasi olan bir veya birkaç proteinin kaybına ve daha fazla ROT oluşumuna neden olur. Bu bozuk ROT üretim halkası ve mtDNA hasarı, hücrede enerji azalması, yaşlanma ve apoptozisle sonuçlanır

(Mandavilli ve ark., 2002). Şöyle ki; mt DNA’da oluşan mutasyonlar elektron taşıma zincirinde görev yapan NAD, NADH oranında azalmaya neden olur. Bunun sonucu olarak oksidatif fosforilasyon ve dolayısıyla ATP sentezi azalır. Ayrıca elektron taşıma zincirinde oluşacak hatalı elektron transferi, mitokondride serbest radikallerin artışına bu da daha fazla mt DNA mutasyonuna neden olur (Zhang ve arkadaşları, 2002; Başaran, A., 2002). Örneğin Lezza ve arkadaşları solunum zincirinin kompleks IV’ünde meydana gelen oksidatif hasarların, mitokondrideki 4977 baz delesyonlarının sonucundan çok sebebi olduğunu belirtmiştir (Sastre ve ark., 2003).

Oksidatif mitokondrial DNA hasarının artışı, deoksiguanozinin serbest radikal atakları sonucu oluşan okside formu 8-hidroksi 2-deoksiguanozinin ölçümleri ile belirtilir. 8-oxodG en çok çalışılan oksidatif lezyondur. Bunun belirlenmesinde çok hassas metotlar kullanılır. Yüksek oranda mutajeniktir ve Adenin rezidüleri ile yanlış eşleşme gerçekleştirir. Böylece şekilde görüldüğü gibi GC-TA değişim durumunu artırır (Şekil 2.18.) . HPLC kullanılarak yapılan çalışmalarda baz modifikasyonu 8-oxodG’nin mtDNA’da, nDNA’ya oranla 16 kat fazla bulunduğu gösterilmiştir. Bu durum mtDNA’daki yüksek oranlı oksidatif hasarı belirtir (Mandavilli ve ark., 2002).



Şekil 2.18. Oksidatif mDNA hasarı sonucu oluşan GC-TA değişim durumunu
(Anonymous 2005 j, www.mun.ca/biology/scarr/oxidative-damage.html).

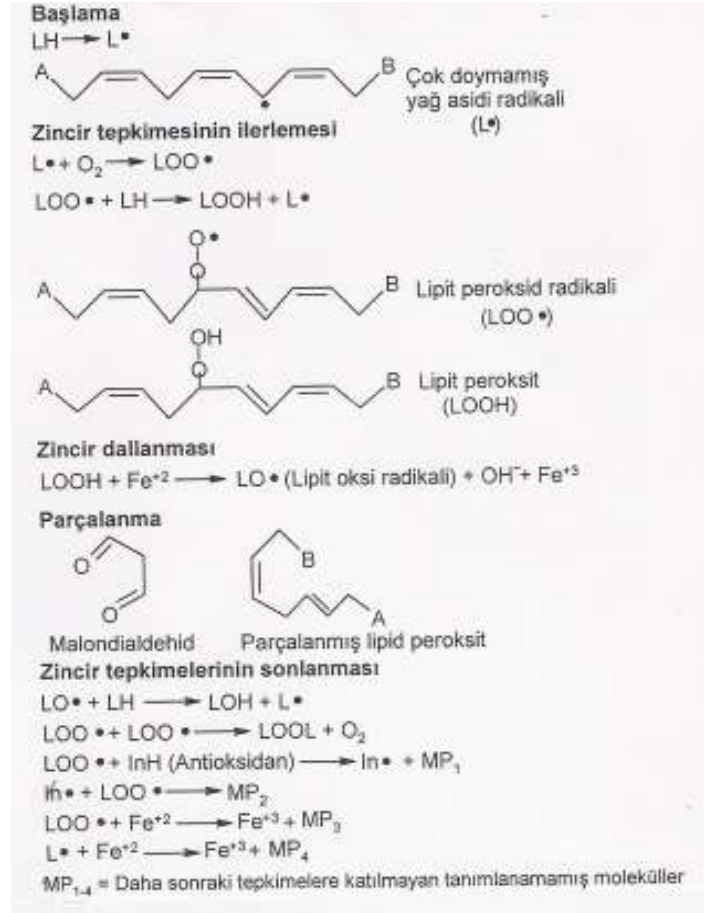
2.6.2 Serbest Radikallerin Biyomembranlar Üzerine Etkisi

Memeli hücre membranları peroksidatif hasara karşı çok duyarlı olan, büyük miktarda çok doymamış yağ asidi (PUFA) içermektedir. Bu yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. PUFA'nın yıkımı bir lipid peroksidasyonudur ve hücresel hasarın en önemli nedenlerinden biridir. Çünkü PUFA peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir şeklinde ilerler (Başaran, 2002).

Doymamış yağ asitlerindeki bir hidrojen atomunun çıkması peroksidasyonun başlamasına neden olur, böylece yağ asidi zinciri lipid radikali niteliği kazanır. Radikal dayanıksız olup, çift bağların yerini değiştirir ve oksijenle reaksiyonu sonucu lipid peroksil radikaline dönüşür. Lipit peroksil radikalleri diğer doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni radikalleri oluşturur, bir yandan da hidrojen atomları alarak hidroperoksitlere dönüşürler. Hidroperoksitlerin parçalanmasıyla lipid alkoksi radikalleri açığa çıkar. Lipit peroksidasyonu antioksidan reaksiyonlarla sonlandırılır ya da devam ederek daha ileriye gider.

Lipit peroksidasyon ürünleri olarak açığa çıkan lipit peroksitleri, hidroperoksitleri ve aldehitleri membran yapısına direkt olarak, diğer hücre bileşenlerine ise aldehit üreterek indirek olarak zarar verirler. Bu da pek çok hastalığın ve doku hasarının oluşmasına neden olur. Membranın yapısının bozulması sonucu malondialdehit (MDA) oluşur. Lipit peroksidasyonu Fe ve Cu gibi redoks yapan metaller varlığında artar (Meram, 2002).

PUFA'da oluşan peroksidasyon sonucu, hücre zarı geçirgenliği ve kırılganlığı artar. Buna bağlı olarak hem bu hücrenin hem de buna komşu olan hücrelerin zar yapısı bozulur ve hücre zarı enzim aktivitesi azalarak hücre iyon geçişi dengesi kaybolur. Örneğin hücre dışı sıvıdan hücreye Ca^{++} girişi artar. Sitozoldeki Ca^{++} artışı, fosfolipaz aktivitesi ile fosfolipit kaybına, hücre zarı geçirgenliğinde değişiklik yaparak toksik maddelerin hücreye girişine ve dolayısıyla toksik etkinin çoğalmasına, proteaz aktivasyonu ile proteolitik etkinin şiddetlenmesine, katabolik enzim aktivitesinin artarak DNA kırılmalarının artması gibi hücreyi yaşlanmaya götüren pek çok hasar yapıcı olayın başlamasına neden olur. Bunun yanında hücre için gerekli olan K^+ iyonları da gereğinden fazla hücre dışına atılır (Başaran, 2002).



Şekil 2.19. Lipit peroksidasyonu (Onat ve ark., 2002).

Bu da yine hücre için zararlıdır. Örneğin lizozomlarda lipit peroksidasyonu sonucu oluşan değişimler üç yolla hücreyi yaşlanmaya götürür;

1. Lizozom enzimlerinin sitosole salınması;

Lizozom zarının geçirgenliğinde meydana gelen bozulmalar, lizozom enzimlerinin sitosole salınıp hücrenin kendi kendini sindirmesine neden olur.

2. Lizozom enzimlerinin hücreden dışarıya salınması;

Bu durum komşu hücrelerin veya hücre dışı yapıların bozulmasına neden olur.

3. Lizozomların sindirilmeyen maddelerle dolup, fonksiyonlarının bozulması;

Hücredeki bu sindirilmeyen maddelerin birikimi melanine benzeyen kahverengi yağ pigmentleri, lipofuksin ve seroid oluşumuna dolayısıyla hücrenin yaşlanmasına neden olur. Lipofuksin ve seroid lipit peroksitlerinin parçalanma ürünleridir ve

yaşlanma pigmentleri veya kromolipitler grubuna girerler. Yaşlanma pigmentleri lipit peroksidasyon ürünlerinin amino asit, protein fosfolipit ve DNA'daki primer amino grupları ile girdiği reaksiyonlar sonucu meydana gelir. Yapılan çalışmalarda, lizozomlarda lipidlerin metaller tarafından katalizlenen peroksidasyon reaksiyonları sonucunda lipofussin olduğu gösterilmiştir. Hücrede lipofussin gibi yaşlılık pigment birikimi, hücre yaşlanmasını indükler (Başaran, 2002).

2.6.3 Serbest Radikallerin nDNA'ya Etkileri

Diğer hücresel bileşenler gibi, nükleik asitler de oksidatif stres boyunca, hasara karşı hassastırlar (Stadtman, 2002). Herhangi bir nedenle oluşan serbest radikaller, hücre çekirdeğinde başlıca DNA ile tepkimeye girerler (Onat, 2002). Dolayısıyla DNA'da oksidatif hasarın bir sonucu olarak meydana gelen çok sayıda mutasyon belirlenmiştir (Goyns, 2002).

Oksijen radikalleri DNA'yı şeker-fosfat iskeletinde veya bazlarda direkt etkileyebilirler, bu durum tek ve çift iplik kırıkları ve oksidatif olarak modifiye olmuş bir çok farklı pürin ve pirimidinler oluşturur (Barja, 2002 b). Örneğin, tüm serbest oksijen radikalleri arasında en reaktif olan, deoksiriboz ve DNA bazlarıyla hızlı bir şekilde reaksiyona giren hidroksil radikali hasarının iki ürünü timin glikol ve 8-oxo-G, DNA'daki hasarın biyolojik belirteçleridir (Ashok ve Ali., 1999).

Oksidatif olarak modifiye olmuş bazlar normal bazal şartlar altında post- mitotik dokularda bulunurlar ve DNA replikasyonu veya tamiri sırasında DNA mutasyonlarına sebep olurlar (Barja, 2002). Memeli hücreleri ise çeşitli DNA tamir sistemleri kullanırlar. Bunlar içinde en önemli olanlar; nükleotid excision tamiri (NER) ve baz excision tamiri (BER) dir (Bohr, 2001). Oksidatif DNA hasarları bu tamir sistemleri tarafından tam olarak düzeltilmezse, zamanla, genomda hasar birikimi oluşur. Düzeltilmeyen DNA hasarı veya tam olmayan DNA tamiri hücrelerin ve dokuların iç dengesini bozulmasına neden olur (Zglinicki ve ark., 2001).

DNA hasar oranını arttıran oksidatif metabolitler ve zamanla azalan DNA tamiri yaşlanma oranını arttırabilir, bu nedenle ömür uzunluğunu azaltır. Metabolitlerin hasar ürünleri inhibe edilerek veya DNA tamir verimliliği artırılarak hasar oranı belirgin şekilde azaltılabilir (Ashok ve Ali, 1999).

2.6.4 Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Proteinlerin reaktif oksijen türevleri tarafından oksidasyonunu yönlendiren ana ilkeler Swallow, Garrison, Scheussler ve Schilling'in öncü çalışmaları ile tanımlanmıştır (Berlett ve Stadtman, 1997).

Makromoleküler oksidatif hasar tipleri arasında, hücre içi proteinlerin oksidatif modifikasyonlarının, fizyolojik fonksiyon kayıplarının oluşmasında anahtar rol oynadığı belirtilmiştir. Bunun sebebi ise, okside edilmiş proteinlerin genellikle katalitik fonksiyonlarını kaybetmeleri ve seçici olarak indirgenmeleridir (Sohal, 2002).

Proteinlerde meydana gelen radikal nedenli hasar, elektron kaçağı, metal iyonu bağımlı reaksiyonlar ve lipid veya şekerlerin otooksidasyonu ile başlatılabilir (Dean ve ark., 1997).

Reaktif oksijen metabolitlerinin etkisi ile meydana gelen protein modifikasyonlarının birkaç tipi belirlenmiştir. Bunlar; karbonil oluşumu, sülfidril grup kaybı, protein çapraz bağlanması ve nitrotirozin oluşumu şeklindedir (Sohal, 2002).

Protein oksidasyonunun en yaygın çalışılan belirteci protein karbonilleridir. Proteinlerde karbonil gruplarının bulunması, reaktif oksijen türevi aracılı protein oksidasyonunun belirteci olarak kullanılır (Berlett ve Stadtman, 1997; Sohal, 2002). Protein karbonillerinin genellikle, amino asit rezidülerinin direk oksidasyonu ile oluşturulduğu bilinir (Goto ve arkadaşları, 1999). Protein karbonilleri ayrıca yan zincirlerin, lipid peroksidasyon ürünlerinin modifikasyonu ile veya şekerlerin indirgemesiyle de oluşmaktadır.

Protein karbonil gruplarının başlıca oluşum şekilleri şunlardır;

1. Arjinin, lizin, prolin veya treonin rezidülerinin oksidasyonu yolu ile,
2. Polipeptid zincirinin α amidasyon yoluyla oksidatif olarak kırılması yoluyla; bu durumda peptitteki N terminal amino asit bir α -ketoasit grubu ile tutulur.
3. Glutamil rezidüsünün oksidasyonu yoluyla; bu durumda N terminal amino asit bir α -ketoasit grubu ile tutulur. (Stadtman, ve ark., 1998).
4. Lipit peroksidasyonu sırasında üretilen 4-hidroksi nonenal'in Micheal ekleme reaksiyonları ile proteinlere eklenmesi yolu ile (Goto ve ark, 1999).

Protein –SH grup kaybı da, reaktif oksijen türevlerinin oluşturduğu oksidatif modifikasyon tiplerinden biridir ve oksidatif stres artışına karşı gösterilen ilk yanıtlardan biridir (Sohal, 2002). Sistein ve metionin rezidüleri reaktif oksijen türevlerinin her formu ile oksidasyona karşı özellikle hassastırlar. Ilımlı koşullar altında bile sistein rezidüleri disüfitlere ve metionin rezidüleri de metionin sülfoksit rezidülerine dönüştürülür. Birçok biyolojik sistem, sistein ve metioninin okside formlarını modifiye olmadan önceki hallerine dönüştüren, disüfit redüktazlar ve metionin sülfoksit redüktazlar içerir. Dolayısıyla bunlar tamir edilebilen tek protein oksidatif modifikasyonlarıdır (Berlett ve ark., 1997). Düzelden kalan protein –SH grup kaybının proteinlerdeki bazı fonksiyonel sonuçları şunlardır;

1. Hatalı katlanma
2. Katalitik inaktivasyon
3. Azalmış antioksidatif kapasite
4. Ağır metalleri ve sülfür içeren amino asitleri albümin vasıtasıyla bağlama fonksiyonunda kayıp (Sohal, 2002).

Protein oksidasyonunun diğer bir belirteci 3-nitrotirozin'dir. 3-nitrotirozin peroksinitrit tarafından meydana getirilen oksidatif hasarın biyolojik belirtecidir (Lin ve ark, 2003).

Patolojik şartlar altında süperoksit radikali direk olarak nitrik oksit radikali ile reaksiyona girip peroksinitriti (ONOO^-) oluşturabilir. Bu bileşik herne kadar tam manasıyla bir serbest radikal olmasa da hidroksil radikali gibi rol oynayarak lipid ve protein oksidasyonunu arttırma kapasitesine sahiptir (Beal, 2002). Tirozin ve triptofan rezidüleri peroksinitrit bağımlı nitrasyon için seçici hedeflerdir. Tirozin rezidülerinin nitrasyonu sonderece önemli olabilir, çünkü nitrasyon tirozin rezidülerinin, fosforile ve defosforile formları arasında gidip gelmesini engeller (Berlett, 1997).

Protein oksidatif hasarının daha az kullanılan diğer bir belirteci çapraz bağlı proteinlerdir (Beal, 2002). Polipeptit iskeletinin oksidatif hasarı, amino asit rezidüsünün α -hidrojen atomunun $\cdot\text{OH}$ radikaliyle bağı olarak ayrılması ile başlar. Böylece karbon merkezli bir radikal oluşur. Bu karbon merkezli radikal, alkil peroksil radikal ara ürünü oluşturmak üzere O_2 ile hızlıca tepkimeye girer. Alkil peroksil ise alkil peroksiti arttırır ve bunu alkoksil radikalının oluşumu takip eder. Alkoksil radikali, hidroksil protein

türevine dönüştürülebilir. Bu metabolik yoldaki alkil, alkil peroksil ve alkoksil radikal ara ürünleri, yeni bir karbon merkezli radikal oluşturmak için aynı veya farklı protein molekülündeki aminoasit rezidüleri ile yan reaksiyonlara girerler oksijen yokluğunda alkil peroksil radikal oluşumu önlenirse karbon merkezli radikal, protein-protein çapraz bağlı ara ürünler oluşturmak üzere diğer bir karbon merkezli radikalle radikalle reaksiyona girer (Berlett, 1997). Ditirozin çapraz bağlarının oluşumu buna örnek gösterilebilir. Bunlar iki tirozil radikali arasındaki reaksiyondan sonra ortaya çıkarlar (Sohal, 2002).

Proteinlerdeki bu oksidatif modifikasyonlar enzim aktivitesinde azalma veya inaktivasyonla sonuçlanır (Ashok ve Ali, 1999). Örneğin, akonitaz ve adenin nükleotid translokaz karbonilasyonun ardı sıra fonksiyonel aktivite kaybı göstermiştir. Akonitaz aktivitesinin düşmesi TCA döngüsünü yavaşlatabilir ki bu da elektronların oksijene aktarımını azaltır ve oksidatif fosforilasyonda durgunluğa yol açar. Akonitaz aktivite kaybının diğer bir sonucu da sitrat birikimidir. Sitrat Fe^{+2} bağlar, bu durum hidrojen peroksidin parçalanmasına ve yüksek düzeyde hidroksil radikali oluşmasına neden olur (Sohal, 2001). Kreatin kinaz diğer bir anahtar hücre içi enzimdir, enerji metabolizmasını düzenler. Peroksinitrit tarafından nitratlandığında inaktif hale gelir (Lin ve ark, 2003).

Membran transport proteinlerindeki oksidatif hasar ise hücrel metabolizmayı etkileyen hücre içi kalsiyum ve potasyum seviyelerinin değişmesine yol açar. Hücredeki sinyal transferi de, reseptör proteinleri ve gap junction proteinlerindeki oksidatif hasar nedeniyle değişime uğrar (Ashok ve Ali, 1999).

Sonuç olarak oksidatif stres özel proteinleri inaktive etmede seçicidir. Bu durum enzimatik aktivitenin ve kinaz sinyal yollarının inaktivasyonuna ve yapısal bozukluklara neden olur (Beal, 2002).

2.6.5 Serbest Radikallerin Replikatif Yaşlanmaya Etkisi

Replikatif kapasitenin geri dönüşümsüz kaybı yaşlanmaya yol açar . Şöyle ki; hücre bölünmesinin belli bir sayıdan sonra son bulması veya kesintisiz devam etmesi telomer boy uzunluğu ve telomeraz enzim aktivitesi ile ilişkilidir. Genç ve bölünmekte olan normal soma hücrelerinde telomeraz enzimi inaktif olduğu halde hücre bölünmesi belli bir süre devam eder. Çünkü bunlarda telomer boyu hücre bölünmesine yetecek

uzunluktadır (~15 kbp). Fakat her bölünme sonucu telomer boyu giderek kısalır ve hücre bölünmesini sağlayamayacak duruma gelir (~5-7 kbp). Hücre böylece yaşlılık dönemine girer (Başaran, 2002).

Yapılan son çalışmalar ile, düşük oranda hidrojen peroksit uygulaması altında, telomer kısalmasının hızlanması sonucu, replikatif ömür uzunluğunun azaldığı ve kontrol şartlarında düşük olan telomer kısalma oranının, artan oksidatif stresle arttığı bulunmuştur (Zglinicki, 2002).

İnsan fibroblastlarında telomer kısalmasının en düşük oranı, popülasyon çiftlenmesi başına 10-20 bp kadardır. Daha yüksek peroksit oranlarına sahip olan hücrelerdeki daha hızlı telomer kısalma oranı, yetersiz antioksidan savunma olduğunu işaret eder. Burada belirtilmek istenen; birçok durumda oksidatif hasarın telomer kaybına katkısının, uç replikasyon probleminin tek başına neden olduğundan daha fazla olduğudur. Buna uygun olarak, yüksek oranlı oksidatif stres, DNA replikasyonu olmaksızın, telomerik çift iplik kırıklarını yüksek frekansta uyararak, telomer kısalmasına sebep olabilir (Zglinicki, 2002).

Sonuç olarak; telomer kısalması ve hücresel yaşlanma oranları oksidatif stres ve antioksidatif defans arasındaki dengeye bağlıdır. Bu durum kuvvetli bir şekilde belirtir ki; hafif ve düşük stres şartları altında yaşlanmanın ana mekanizması telomer kısalmasıdır ve bu kısalma oksidatif strese de bağımlıdır. Telomere bağlı yaşlanma, birçok durumda oksidatif hasara karşı tam olmayan korunma nedeniyle çok sonra oluşur ve hızlanmış telomer kaybıyla sonuçlanır (Zglinicki, 2002).

3. MATERYAL VE METHOD

3.1. Deneylerde Kullanılan Farelerin Sağlanması

Çalışmalarda, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda üretilip yetiştirilen Swiss albino tipi laboratuvar fareleri (*Mus musculus*) kullanıldı.

Kullanılan farelerin aynı jenerasyondan olmalarına dikkat edildi. Ortalama 20-30 gr ağırlıkta olan fareler, enjeksiyondan önceki son 24 saat aç bırakıldı.

Kullanılan Fareler Samsun Yem Fabrikası tarafından üretilen standart fare yemi ile beslendi. Su serbest olarak verildi.

3.2. Farelere Uygulanan Maddeler

Çalışmada, Bayer Leverkusen lisansı ile imal edilen Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti. İst. İmal yeri Birleşik Alman İlaç Fab. T.A.Ş. İstanbul firmasınca üretilen 'Aspirin' kullanıldı. Aspirinin fareler için %0.9'luk NaCl çözeltisindeki 200mg/kg'lık dozu kullanıldı (Karım ve ark., 2001).

Beta-D-glukan Sigma-Aldrich Germany firmasından sağlandı. Beta-D- glukanın fareler için %0.9'luk NaCl çözeltisindeki 50mg/kg'lık dozu kullanıldı (Tsiapali ve ark., 2000).

β -glukan ve Aspirin farelere intraperitoneal enjeksiyon yoluyla verildi. Enjeksiyon 1ml'lik plastik enjektörlerle yapıldı. Enjeksiyon işleminde kullanılan tüm araçlar otoklavda 175°C'de 60 dakika steril edildikten sonra kullanıldı.

3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarda kullanılan Xanthine, Xanthine Oxidase, Sitokrom c, BSA (Bovine Serum Albumin), Folin ayracı (Folin Phenol Reagent) ve analitik saflıktaki bileşikler Sigma London England firmasından; NaOH Riedel-de Haen firmasından; K_2HPO_4 , Na-K Tartarat Montrlet-Esteban SA Barcelona Madrid firmasından; EDTA, KH_2PO_4 , $CUSO_4$, NaCN, Merck W. Germany firmasından sağlanmıştır.

3.4. Araştırma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada, hiçbir işlem görmemiş kontrol grubu, β -D-Glukan, Aspirin, β -D-Glukan ve Aspirin birlikte, verilmek üzere 4 grup oluşturulmuş, her grupta 3 fare kullanılmıştır.

Enjeksiyon işlemi farelere öğlen saat 12-12:30 arasında gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon işlemini izleyen 6., 12., 24., 48. saatlerde fareler servikal dislokasyon ile öldürülerek gerekli deneysel işlemlere geçilmiştir.

Her çalışma en az 2 kez tekrar edilmiş ve bu çalışmalarda elde edilen değerlerin ortalaması, deney sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kıyasal ajanlara ve saatlere bağlı olarak oluşturulan deney grupları.

Gruplar				
Saatler	Kontrol (K)	B-D-Glukan	Aspirin (ASA)	B -(1,3)D-Glukan+ Aspirin (ASA)
6.	3	3	3	3
12.	3	3	3	3
24.	3	3	3	3
48.	3	3	3	3

3.5. Çalışmada Kullanılan Aletler

Çalışma esnasında; Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan;

- SANYO MS60 (MSE) Ultrasantrifüj
- SANYO Soniprep 150 (MSE) Sonikatör
- Ultra-Turrax T-25 Homojenizatör
- Jenway 6105 UV/VİS. Spektrofotometre
- Jenway 3010 pH metre
- Finans Whirlimixer (karıştırıcı)

- Chiltren Holplate Magnetic Stirrer HS31
- Sanyo Ultra Low derin dondurucu kullanılmıştır.

3.6. Fare Karaciğerinin Homojenizasyonu ve Sonikasyonu

Fareler servikal dislokasyon yöntemi ile öldürüldükten sonra, karın ve göğüs kısımları açılıp karaciğerlere arterden girildi ve %0.9'luk NaCl ile perfüze edilerek karaciğerler çıkarıldı. Karaciğerlerin fazla suyu kurutma kağıdı ile alınarak hassas terazide tartıldı.

Elde edilen karaciğer örnekleri işlemlere geçmeden önce iki katı kadar 0.25 M'lık süktroz çözeltisinde, -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

Derin dondurucudan çıkarılan karaciğer örnekleri oda sıcaklığında erimeye bırakılarak, buz içerisine yerleştirilen bir beherde makaslama ile ince ince doğrandı. Buzun içine yeleştirilmiş beher içindeki karaciğer örnekleri Ultra-Turrax T.25 tipi homojenizatörün 8000 rpm hız durumunda 20 sn süre ile homojenize edildi.

Homojenizasyondan sonra örneklere kendi ağırlıkları kadar süktroz ilave edildi ve sonikasyona geçildi. Örnekler sonikatörde 0°C'de, 15-20 µ'da, 1.5 dakika, 30 sn süreyle sonifiye edildi. Tüm enzimatik çalışmalar 0-4°C'de gerçekleştirildi.

3.7. Fare Karaciğerlerinin Santrifügasyonu

Sonifikasyonu yapılan karaciğer örnekleri santrifüj tüplerine boşaltıldı. 15000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant temiz numune şişelerine alındı ve pellete 3ml 0.25 M'lık süktroz çözeltisi ilave edildi. Pellet 15-20 µ'da 1.5 dakika, 30 sn süreyle sonifiye edildikten sonra tekrar 15000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant alındı ve enzimatik aktivite ve protein değerleri bu süpernatantta ölçüldü.

Çalışmada protein tayini, Lowry (1951) yöntemine göre yapıldı.

3.8. Mitokondrial Süperoksit Dismutaz (Mn-SOD) Aktivite Tayini

Mn-SOD aktivitesi, McCard ve Fridovich (1969)'in spektrofotometrik metodu ve Larry W. Oberley (1984)'in metodu modifiye edilerek belirlenmiştir.

A Çözeltisi

0.76 mg (5 μ mol) Ksantin'in 10 ml 0.001 N, NaOH içindeki çözeltisi ve 24.8mg (2 μ mol) sitokrom C'nin 100 ml 50 mM pH 7.8 ve 0.1 mM EDTA içeren fosfat tamponundaki çözeltisi 1:10 karıştırıldı (bu çözelti + 4°C'de 3 gün kararlıdır).

B Çözeltisi

Taze hazırlanan Ksantin oksidaz'ın 0.1 mM EDTA'daki çözeltisi 0.2 U/ml.

- NaCN'nin distile su içindeki 5 mM'lık çözeltisi hazırlandı.

Yöntem

1. Spektrofotometre tüpüne 3ml distile su konuldu ve kör tüp olarak kullanıldı. Spektrofotometre kör tüpe karşı sıfırlandı.
2. 3 ml'lik küvete 2.9 ml A çözeltisi koyuldu.
3. 25 μ l örnek ilave edildi.
4. Üzerine 10 μ l 5 mM NaCN çözeltisi ilave edildi. Bu solüsyon 2 saatten fazla olmamak koşuluyla oda sıcaklığında en az 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Siyanidin bu konsantrasyonu, süperoksit dismutazın diğer formlarını inhibe ederken Mn-SOD'u inhibe etmez.
5. İnkübasyondan sonra 50 μ l B çözeltisinin ilavesiyle reaksiyon başlatıldı.
6. 550 nm'de 2 dakika boyunca, 30 sn aralıklarla absorbans değişimi okundu.
7. Kontrol tüpü için örnek yerine 25 μ l distile su eklendi ve 550 nm'de 2dakika boyunca, 30 sn aralıklarla absorbans değişimi okundu.
8. Örnekleri değerlendirme işlemi kontrol tüpüne göre yapıldı.
9. Kalibrasyon grafiği çizmek için belli konsantrasyonlardaki (5×10^{-7} M) SOD çözeltisinin 5 μ l, 10 μ l, 15 μ l'deki bilinen değerlerine karşılık gelen % inhibisyon

değerleri grafiğe geçirildi. Bu işlem için siyanid ile inkübasyona bırakılmış olan saf SOD enzimi kullanıldı.

İnhibisyon değerleri,

$$\% \text{inhibisyon} = 100 \times \frac{\Delta \text{OD Örnek}}{\Delta \text{OD Blank}}$$

formülü ile hesaplandı.

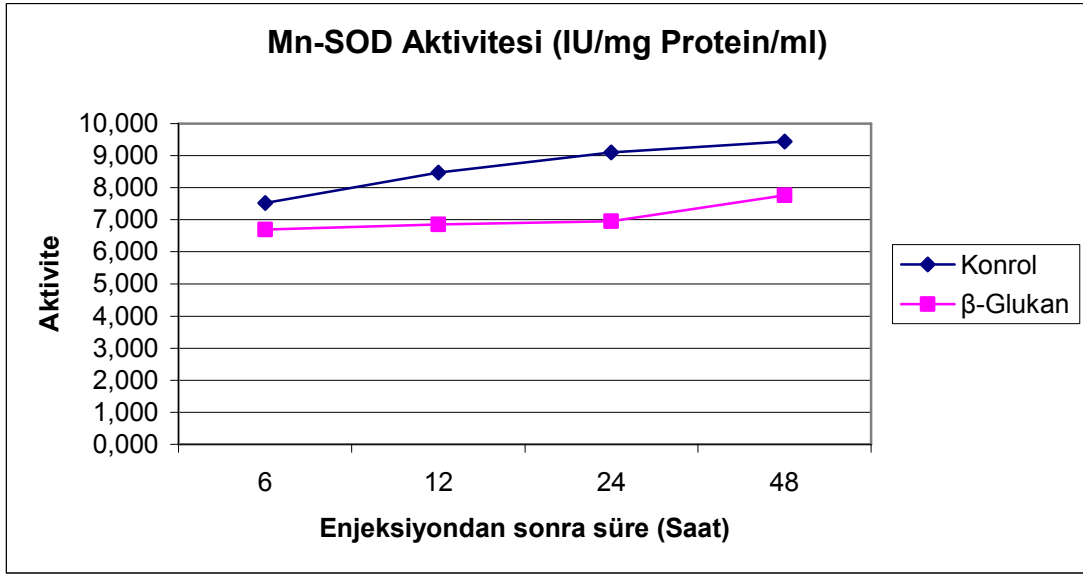
ΔOD = Optik Dansite Farkı

Mn-SOD'un bir ünitesi ksantin/ksantin oksidaz sistemi tarafından meydana getirilen süperoksit anyonu ile sitokrom C'nin redüksiyonunun % 50'si için gerekli enzim miktarı olarak belirlenir ve 550 nm'de spektrofotometrik olarak ifade edilir.

4. BULGULAR

4.1. β -Glukan'ın Karaciğer Mitokondrial SOD (Mn-SOD) Aktivitesi Üzerine Etkileri

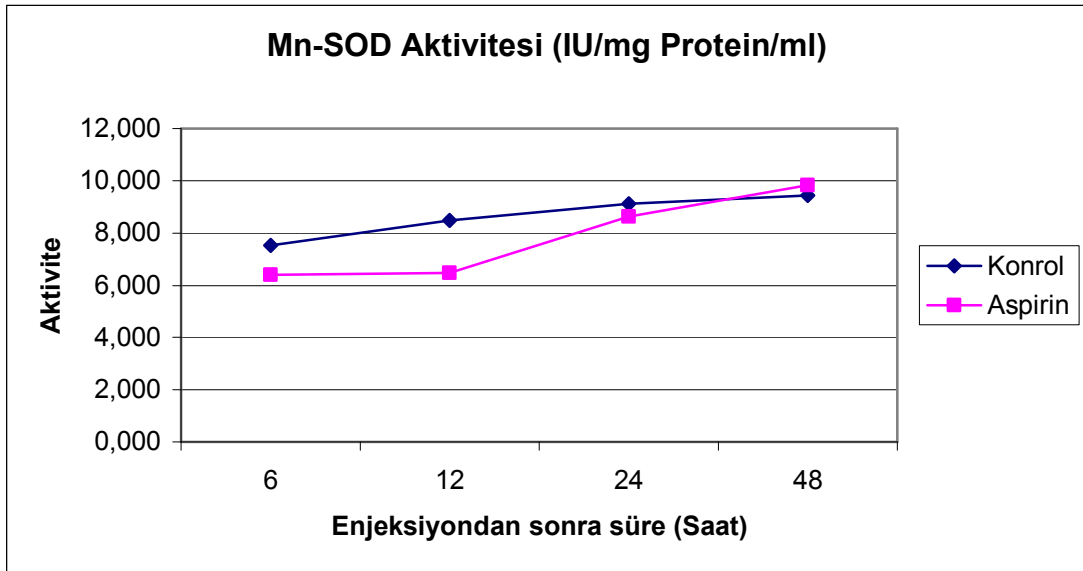
Yaptığımız çalışmanın ilk aşamasında, bir antioksidan olan β -glukanın karaciğer Mn-SOD aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Şekil 4.1.'de görülebileceği gibi, β -glukanın karaciğer Mn-SOD aktivitesi üzerine etkisi kontrol grubuna oranla; 6. saatte % 11.03 oranında inhibisyonla başlamış, bu inhibisyon oranı 12. saatte %19.17'ye çıkmıştır. Mn-SOD'un inhibisyon oranı 24. saatte %23.66'lık oran ile maksimum seviyesine ulaşmış, 48. saatte ise bu oran %17.84'e düşmüştür.



Sekil 4.1. Kontrol gruplarında ve β -glukan verilmiş farelerde Mn-SOD aktivitesinin zamana bağlı değişimi.

4.2. Aspirinin Karaciğer Mitokondrial SOD (Mn-SOD) Aktivitesi Üzerine Etkileri

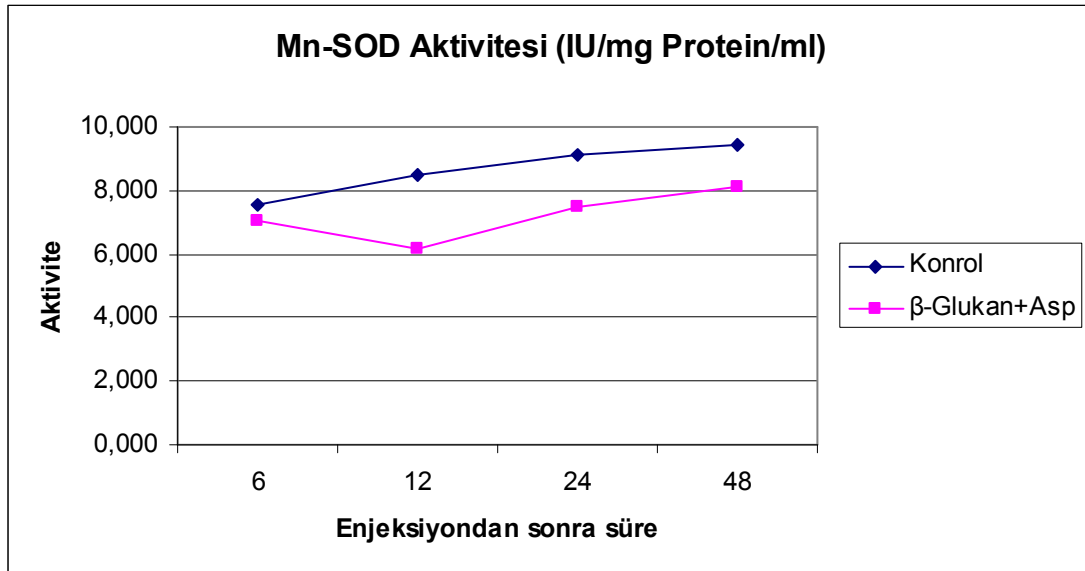
Aynı çalışmada antioksidan etkisi bilinen diğer bir madde olan aspirinin de karaciğer Mn-SOD aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Şekil 4.2.'de görülebileceği gibi, Aspirinin karaciğer Mn-SOD aktivitesi üzerine etkisi, kontrol grubuna oranla; 6. saatte % 14.86 oranında inhibisyonla başlamış, bu inhibisyon oranı 12. saatte %23.53 'e çıkmıştır. Mn-SOD'un inhibisyon oranı 24. saatte % 5'lik oran ile minimum seviyeye ulaşmış. 48. saatte aspirinin Mn-SOD aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi son bulmuş, %3.97'lik aktivasyon gözlenmiştir.



Sekil 4.2. Kontrol gruplarında ve aspirin verilmiş farelerde Mn-SOD aktivitesinin zamana bağlı değişimi.

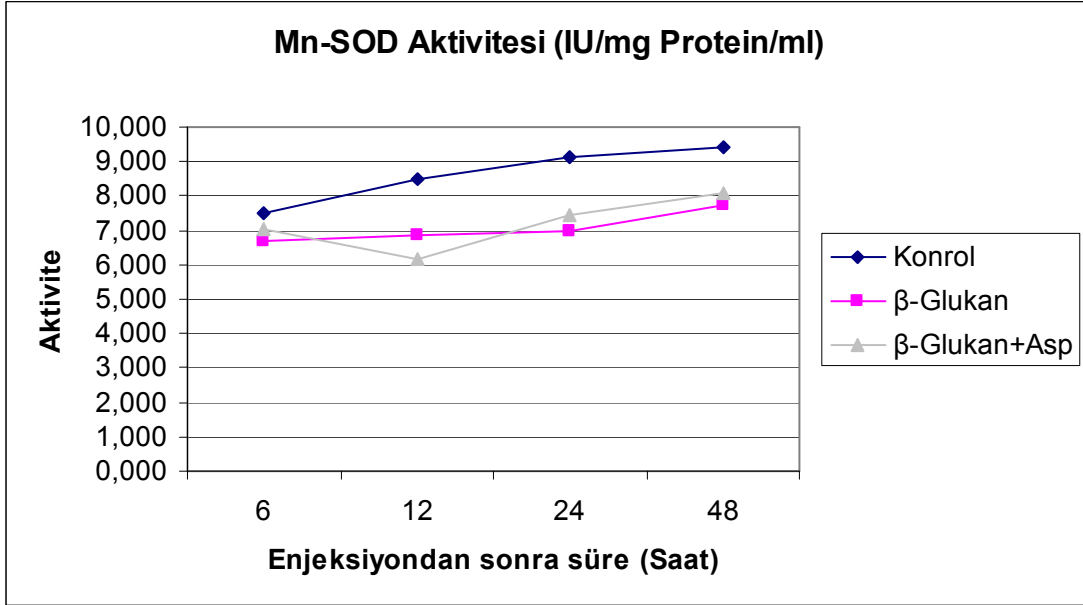
4.3. Aspirinin+ β -Glukan'ın Karaciğer Mitokondrial SOD (Mn-SOD) Aktivitesi Üzerine Etkileri

Bu çalışmada ayrıca, deney hayvanlarına bir arada verilen β -glukan ve aspirinin karaciğer Mn-SOD aktivitesi üzerine ortak etkileri de incelenmiştir. Şekil 4.3.'de görülebileceği gibi, β -glukan+aspirinin karaciğer Mn-SOD aktivitesi üzerine etkisi kontrol grubuna oranla; 6. saatte % 6.3'lük düşük birinhibisyon oranı ile başlamış, inhibisyon oranı 12. saatte % 26.96'luk oranla maksimum değerine ulaşmıştır. Buna karşın Mn-SOD'un inhibisyon oranı enjeksiyondan itibaren 24. saatte %18.06'luk bir orana gerilemiş ve 48. saatte ise % 14.24'e düşmüştür.

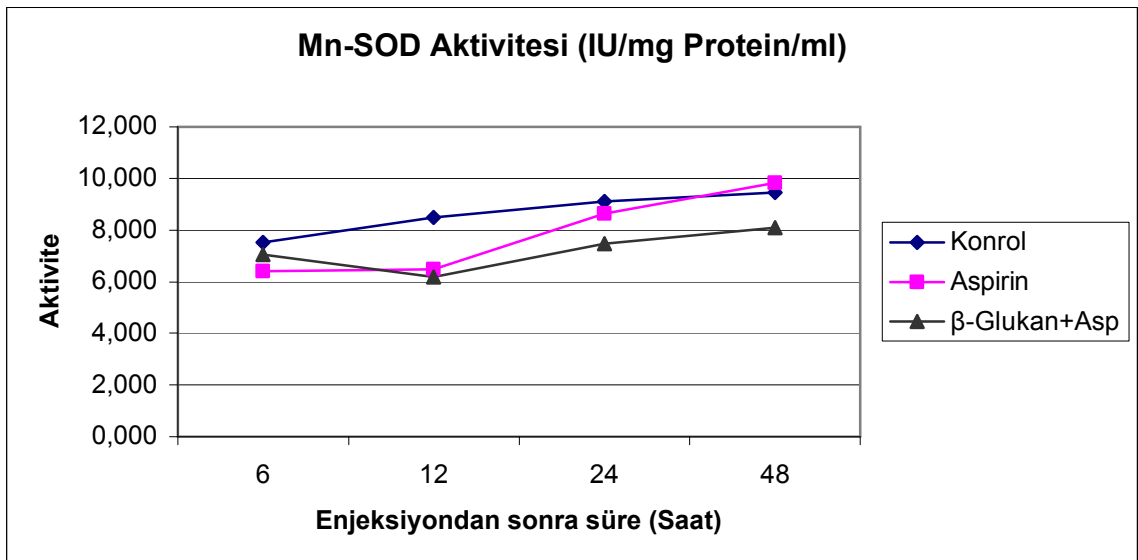


Sekil 4.3. Kontrol gruplarında ve β -glukan+aspirin verilmiş farelerde Mn-SOD aktivitesinin zamana bağlı değişimi.

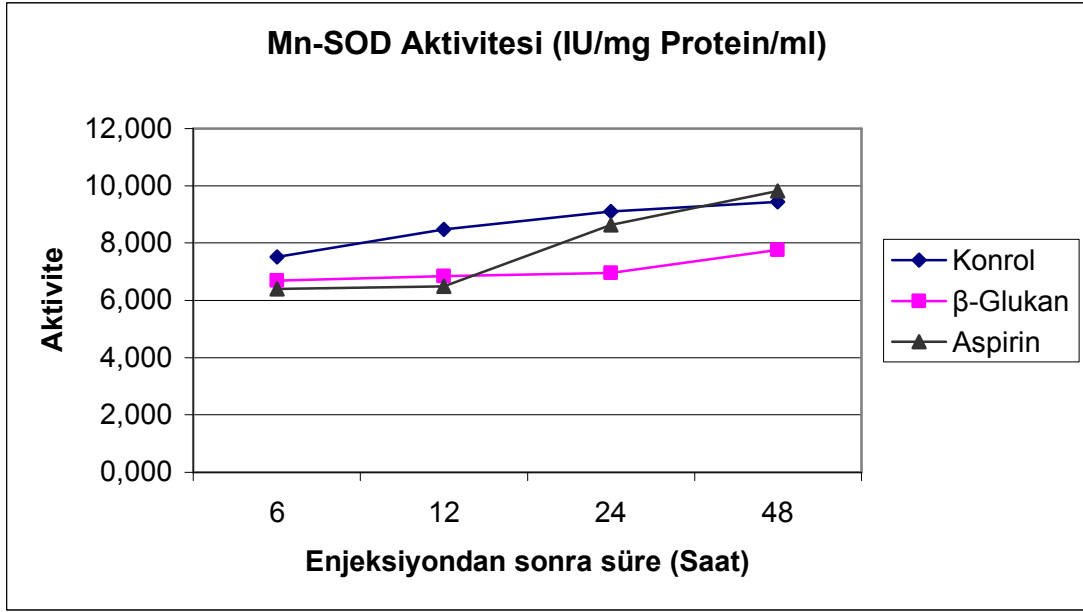
4.4. Aspirin, β -Glukan ve Aspirin+ β -Glukan'ın karaciğerde ki Mn-SOD aktivitesi üzerindeki karşılaştırmalı etkileri



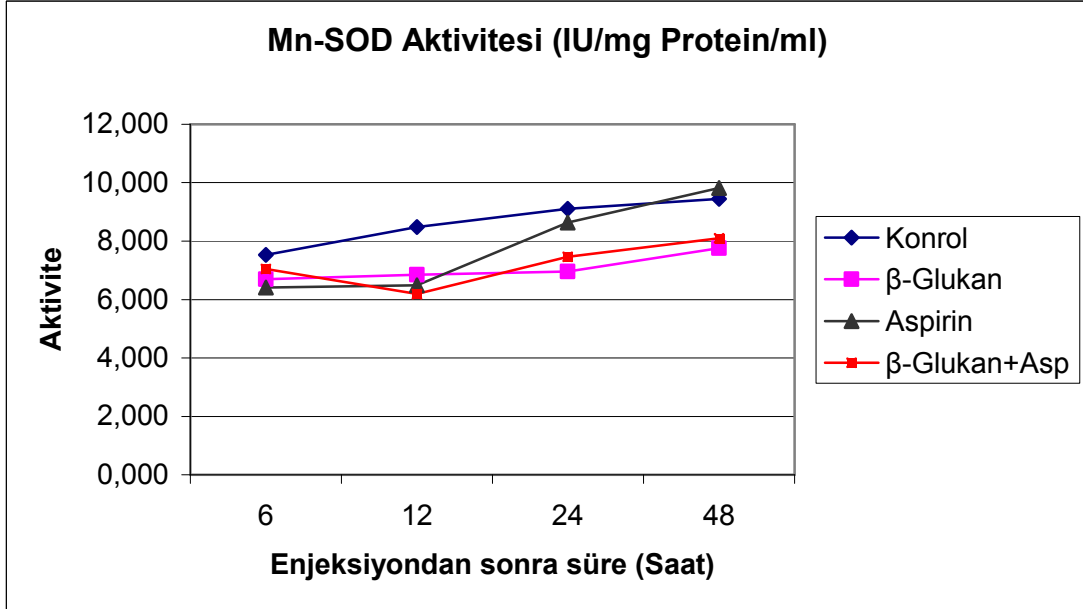
Sekil 4.4. Kontrol gruplarında ve ayrı ayrı β -glukan+aspirin ve β -glukan verilmiş farelerde Mn-SOD aktivitesinin zamana bağlı değişimi.



Sekil 4.5. Kontrol gruplarında ve ayrı ayrı β -glukan+aspirin ve aspirin verilmiş farelerde Mn-SOD aktivitesinin zamana bağlı değişimi



Sekil 4.6. Kontrol gruplarında ve ayrı ayrı aspirin ve β -glukan verilmiş farelerde Mn-SOD aktivitesinin zamana bağlı değişimi



Sekil 4.7. Kontrol gruplarında ve ayrı ayrı aspirin, β -glukan ve β -glukan+asp verilmiş farelerde Mn-SOD aktivitesinin zamana bağlı değişimi.

Bu çalışmada kullanılan aspirinin, β -glukanın ve aspirin+ β -glukanın karaciğerdeki Mn-SOD aktivitesi üzerindeki etkileri Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6. ve Şekil 4.7. de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.

β -glukanın ve β -glukan+aspirinin karaciğerdeki Mn-SOD aktivitesi üzerine etkileri karşılaştırıldığında Şekil 4.4.'de görülebileceği gibi 6. saate β -glukan, β -glukan+aspirine oranla daha yüksek bir inhibisyon oranı göstermiştir. Buna karşın 12. saate bu etki tersine dönmüş ve β -glukan+aspirin, β -glukana oranla daha yüksek bir inhibisyon göstermiştir. 24. ve 48. saatlerde, 6. saate benzer şekilde β -glukan, β -glukan+aspirine oranla daha yüksek bir inhibisyon oranı göstermiştir.

Aspirin ve β -glukan+aspirinin karaciğerdeki Mn-SOD aktivitesi üzerine etkileri karşılaştırıldığında Şekil 4.5.'de görülebileceği gibi 6. saate aspirin β -glukan+aspirine oranla daha yüksek bir inhibisyon oranı göstermiştir. Buna karşın 12. saate β -glukan+aspirine oranla daha yüksek bir inhibisyon oranı göstermiştir ve bu oran 24. ve 48. saatlerde artarak devam etmiştir.

Aspirin ve β -glukanın karaciğerdeki Mn-SOD aktivitesi üzerine etkileri karşılaştırıldığında, Şekil 4.6.'da görülebileceği gibi 6. ve 12. saatler de aspirin β -glukana oranla daha yüksek bir inhibisyon etkisi göstermiştir. 24. ve 48. saatlerde inhibisyon etkisi tersine dönmüş ve β -glukan aspirine oranla daha fazla inhibisyon göstermiştir.

Tablo 4.1. de aspirin, β -glukan ve aspirin+ β -glukan verilmiş farelerin karaciğerlerindeki mitokondrial Mn-SOD aktivitelerinin zamana bağlı değişimi toplu olarak gösterilmektedir.

Tablo 4.1. Aspirin, β -Glukan ve Aspirin+ β -Glukan verilmiş farelerin karaciğerlerindeki Mn-SOD aktivitelerinin zamana bağlı değişimi.

Saat	Kontrol	Aspirin	B-Glukan	Asp+ B-Glukan
6	7,52 ¹ $\pm$ 2,78 ²	6,402 $\pm$ 2,97	6,69 $\pm$ 2,5	7,045 $\pm$ 2,78
12	8,48 $\pm$ 3,7	6,48 $\pm$ 2,61	5,11 $\pm$ 1,54	6,2 $\pm$ 1,99
24	9,1 $\pm$ 1,05	8,63 $\pm$ 0,245	6,95 $\pm$ 0,8	7,46 $\pm$ 2,56
48	9,44 $\pm$ 1,5	9,82 $\pm$ 0,11	7,76 $\pm$ 2,56	8,1 $\pm$ 1,5

¹ Mn-SOD Aktivitesi (IU/mg protein/ml)

² Standart sapma

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Serbest radikaller dış orbitallerinde (atomik veya moleküler) eşleşmemiş elektronlar bulunduran kimyasal türlerdir (Rozantsev ve ark., 2001). İnsan vücudunda bulunan bütün hücrelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan giren ve en çok kullanılma özelliğine sahip olan moleküler oksijen (O_2) yapısı itibarı ile radikal olmaya çok uygun olduğundan serbest radikal denilince aslında serbest oksijen radikalleri, daha genel bir tabir ile reaktif oksijen türleri akla gelmektedir (Akyol, 2004).

Reaktif oksijen türleri (ROS) hücrel hasarlardan sorumlu ana etmendir. Aktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin lipid peroksidasyonu, protein modifikasyonu, enzim inaktivasyonu, DNA zincir kırıkları ve baz modifikasyonlarını uyardıkları ve oksidatif hasara neden oldukları gösterilmiştir (Camougrand, 2001). Organizmalar evrimleri süresince bu serbest radikalleri in aktive etme zorunluluğu ile yüz yüze gelmişlerdir. Bu nedenle kendilerini oksidatif ataklardan korumak için çeşitli yollar geliştirmişlerdir. Bu defans mekanizmaları süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi çeşitli antioksidan enzimleri içerir (Leutner ve ark., 2001).

Mitokondriler reaktif oksijen türleri için (ROS) temel üretim yerleridir. Bununla birlikte oksijenazlar, peroksidazlar ve oksidazlar gibi sitosolde bulunan bir dizi enzim az miktarda ROS üretirler. Normal metabolik faaliyetler esnasında üretilen süperoksit anyonlarının %95'inden fazlasının mitokondri zarı içerisindeki elektron transport zincirinde üretildiği tahmin edilmektedir (Bohr ve ark., 2002). Bu nedenle çalışmamızda antioksidan aktivitenin gözlenmesi için özellikle mitokondrilerde bulunan Mn-SOD enzim aktivitesine bakılmıştır.

Hücrelerde, oksidanları inaktif hale getirerek, oksidatif hasarı önleyen, yok eden veya kısmen azaltan maddelere antioksidanlar adı verilmektedir. Aspirin ve β -1,3-glukan bilinen önemli antioksidanlardır. Bu çalışmada aspirin ve β -1,3-glukan'ın içsel oksidatif stres üzerine antioksidan etkileri, mitokondrial Mn-SOD aktivitesi biomarker olarak kullanılarak, gözlenmiştir.

Bugüne kadar aspirinin antioksidan aktivitesine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır:

Eren (1997) ve Dıraman (1994)'ın yapmış oldukları çalışmalarda aspirinin Benzo-a Pyrene Hidroksilaz aktivitesini inhibe ettiğini belirlemişlerdir.

Bu sonuca benzer biçimde; Cai ve ark. (1995) fareler üzerinde hepatik oksidatif stres ve savunmada aspirin etkisini araştırmışlar ve aspirinin süperoksit dismutaz aktivitesini inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.

Shi ve ark., (1999) ESR (Elektron Spin Rezonans) ile yaptıkları çalışmada aspirinin hidroksil radikali süpürücü etkisi ile antioksidan özellik gösterdiğini belirtmiştir. Ayrıca bu etkisinin askorbat, glutatyon ve sistein gibi bir çok iyi bilinen antioksidandan daha iyi olduğunu ortaya koymuşlardır.

Çakır (1997), yaptığı çalışmada aspirin etkisi ile süperoksit dismutaz aktivitesinin karaciğerde inhibe edildiği ve bu inhibisyonun özellikle enjeksiyonu izleyen 24. saatte maksimum düzeye ulaştığını belirtmiştir.

Akbal (2002), yaptığı çalışmada aspirinin Mn-SOD aktivitesini 2. saatte düşük düzeyde aktive ettiğini gözlemlemiş, 4. saatten itibaren inhibisyona neden olduğunu belirlemiştir. Ayrıca maksimum inhibisyonu 12. saatte gözlemlediğini ifade etmiştir.

Yaptığımız çalışmada Şekil 4.2'den görülebileceği gibi, aspirinin Mn-SOD üzerindeki inhibisyon etkisi 6. saatten itibaren düşük bir seviyede başlatmıştır, 12. saatte inhibisyon etkisi maksimum seviyesine ulaşmıştır. Bu saatten sonra inhibisyon etkisi azalmış ve 48. saatte inhibisyon durmuş aktivasyon başlamıştır.

Buradan da görülebileceği gibi bu çalışma neticesinde elde edilen sonuçlar belirtilen literatür ile uygunluk göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada Şekil 4.1'den görülebileceği gibi, β -D-glukanın Mn-SOD üzerindeki inhibisyon etkisi 6. saatte düşük bir oranla başlamış, bu oran 24. saatte maksimum seviyesine ulaşmıştır. Bu saatten sonra β -D-glukanın inhibisyon etkisinde azalma gözlenmiştir.

Bu çalışmada ayrıca antioksidan özellikleri bilinen aspirin ve β -D-glukanın birlikte Mn-SOD aktivitesi üzerinde gerçekleştirdikleri etkiyede bakılmıştır. Şekil 4.3.den görülebileceği gibi aspirin+ β -D-glukanın Mn-SOD aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi 6. saatte düşük bir seviyede başlamıştır. İnhibisyon etkisi 12. saatte maksimum seviyesine ulaşmıştır, bu saatten sonra bu etki azalmıştır ve 48. saatte minimum seviyeye ulaşmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar aspirinin ve β -D-glukanın daha önce yapılmış çalışmalarda da belirtildiği gibi kuvvetli birer antioksidan olduğunu ortaya koymuştur. Yaşlanmaya mitokondri iç zarında meydana gelen serbest radikaller

vasıtasıyla oluşan lipid peroksidasyonu ve mitokondrial DNA hasarı gibi bir çok hücrel hasarın sebep olduğu düşünülmektedir (Ashok ve ark., 1999). Dolayısıyla yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar antioksidan özelliklerini gözlemlediğimiz β -D-Glukan ve aspirinin yaşlanma sürecini geciktirebileceğini ortaya koymaktadır.

Bu bilgiler ışığında, gerek aspirin, gerek β -glukan ile ilgili olarak, yeni yapılması planlanan moleküler düzeydeki çalışmalarla, etki mekanizmalarının tam olarak ortaya çıkarılabileceğine inanıyoruz.

6. LİTERATÜRLER

- Anonymous, a.** <http://www.betaglucan.org/history.htm>
- Anonymous, b.** Oxygentimerelease.com/A/ScienceOxygen/p13.html
- Anonymous, c.** www.oxygentimerelease.com/A/ScienceOxygen/p13.html
- Anonymous, d.** www.sahealthinfo.org/.../vitamins/vitamin-a.html
- Anonymous, e.** <http://www.banbest.com/lifeext/aging.html>.
- Anonymous, f.** <http://www.genchem.rutgers.edu/aspirin.html>.
- Anonymous, g.** www.antioxidantes.com.ar/12/Art097.htm
- Anonymous, h.** www.alzheimers.org/pr01-02/07.html
- Anonymous, i.** www.essex.ac.uk/.../oxidative-Stress
- Anonymous, j.** www.mun.ca/biology/scarr/oxidative-damage.html
- Adachi, Y., Okazaki, M., Ohno, N., Yadomae, T., 1994.** Enhancement of Cytokine Production by Macrophages Stimulated with(1→3)-β-D-Glukan, Grifolan (GRN), Isolated from *Grifola frondosa*. Biol. Pharm. Bull. 17(12), 1554-1560.
- Afanas'ev I., 2004.** Interplay between superoxide and nitric oxide in aging and disease. biogerontology 5: 267-270.
- Ahmed, A.J., 2000. B-Glukan: The Next Generation.** Total Health; 22, 4; Health&Medical Complete sf.34.
- Akbal, G., 2002.** Selenyum Vitamin E ve Aspirin Verilmiş Farelerde (*Mus musculus*) Karaciğer Mitokondrial Süperoksitdismutaz (Mn-SOD) Aktivitelerinin Zamana Bağlı Değişimi, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 49s.
- Akyol, Ö., 2004.** Şizofrenide Oksidatif Stres. Kocatepe Tıp Dergisi 5, Ek sayı 15-25.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002.** Molecular Biology of The Cell.Garland Science Taylor& Francis Group New York, p1462.
- Ashok B.T., Ali, R., 1999.** The aging paradox: free radical theory of aging. Experimental Gerontology 34, 293-303.
- Bagis, S., Tamer, N., Şahin, G., Bilgin, R., Güler, H., Ercan, B., Erdoğan, C., 2003.** Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia:an oxidative stress disorder?. Rheumatol Int. 25: 188-190.

- Barja G., 2002 (a).** Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction. *Ageing research Reviews*, 1, 397-411.
- Barja, G., 2002 (b).** Rate of Generation of Oxidative stress-related damage and animal longevity. *Free Radikal Biology & Medicine*, 33, 9, 1167-1172.
- Başaran, A., 2002.** Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı. Güneş&Nobel Tıp Kitapevleri, 541 sf.
- Bay, C., 2001.** Anti-Aging Advances. *Global Cosmetic Industry* 168, 3, 44-52.
- Beal, M.F., 2002.** Oxidatively Modified Proteins in Aging and Disease. *Free Radikal Biology & Medicine*, 32, 9, 797-803.
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 1997.** Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 33, 20313-20316.
- Bohr, V., Anson, R.M., Mazur, S., Dianov, G., 1998.** Oxidative DNA damage processing and changes with aging. *Toxicology Letters* 102-103, 47-52.
- Bohr, V.A., Stevnsner, T., de Souza-Pinto, N.C., 2002.** Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene*, 286, 127-134.
- Cai, Y., Appelkvist, E.L., DePierre, J.W., 1995.** *J. Biochem. Toxicol*, Apr; 10(2): 87-94.
- Camougrand N., Rigoulet, M., 2001.** Aging and oxidative stress: studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stres. *Respiration Physiology*, 128, 393-401.
- Carrow, D.J., 1997.** Beta-1,3-glucan as a primary immune activator. *Total Health*, 19,2; *Health&Medical Complete* sf. 32.
- Ceballos-Picot, I., Triver, J., Nicole, A., Sinet, P., Thevenin, M., 1992.** Age-Related Modifications of Copper-Zinc Superoxide Dismutase and Glutathione-Related Enzyme Activities in Human Erythrocytes. *CLIN. CHEM.* 38/1, 66-70.
- Cleary, J.A., Kelly, G.E., Husband, A.,J.** The effect of molecular weight and β -1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)- β -D-glukan. *Immunology and Biology* 77, 395-403.
- Çakatay, U., Telci, A., 2000.** Oksidatif Protein Hasarı ve Saptanmasında Kullanılan Marker'lar. *İst. Tıp Fak. Mecmuası* 63, 3.
- Çakır, M., 1997.** Aspirin ve Vitamin E (α -Tocopherol)'nin Farelerde (*Mus musculus*) Karaciğer Total Süperoksit Dismutaz ve Katalaz Aktivitelerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuzmayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 51 s.

- Davis, J.M., Murphy, E.A., Brown, A.S., Carmichael, M.D., Ghaffar, A., Mayer, E.P., 2004.** Medicine&Science in Sports&Exercise, 3608,1321-1327
- Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M.J., 1997.** Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochem. J., 324, 1-18.
- Demirsoy. A., 1998.** The Evolutionary Tale of Aging and Death. Turkish Journal of Geriatrics 1, 1, 1-12.
- Dıraman, E., 1994.** Aspirin ve Antioksidantların (Butylated Hydroxyanısile ve Askorbik Asit) Farelerde (*Mus musculus*) Benzo(a)pyrene Hidrosilaz Aktivitesi Üzerine Etkileri, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 53.
- Dündar, Y., Aslan, R., 1999.** Bir antioksidan olarak vitamin E. Genel Tıp Derg., 9(3): 109-16.
- Eren, Z., 1997.** The effects of Aspirin and Antioxidant Butylated Hydroxy Anisole on the liver Microsomal Benzo (A) Pyrene Hydroxylase Activity in mice (*Mus musculus*). Biochemical Archives, Vol. 13, 43-52.
- Falameeva, O.V., Poteryaeva, O.N., Zhanaeva, S.Ya., Levina, O.A., Filatova, T.G., Korolenko, T.A., Kaledin, V.I., Sandula, I., Kogan, G., 2001.** Macrophage Stimulator β -(1,3)-D-Carboxymethylglucan Improves the Efficiency of Chemotherapy of Lewis Lung Carcinoma. Bulletin of experimental Biology and Medicine, 2, 787-790.
- Finkel, T., 2003.** Oxidant signals and oxidative stres. Current Opinion in Cell Biology, 15: 247-254.
- Gonys, M.H., 2002.** Genes, telomeres and mammalian ageing. Mechanisms of Ageing and Development, 123, 791-799.
- Goto, S., Nakamura, A., Radak, Z., Nakamoto, H., Takahashi, R., Yasuda, K., Imlay, J.A., 2003.** Pathways of Oxidative Damage. Annu. Rev. Microbiol. 57: 395-418.
- Ito, N., Hirose, M., 1989.** Antioxidants-Carcinogenic and Chemopreventive Properties Advances in Cancer Research, 53; 247.
- Karım, S., Bhandarı U., Kumar, H., Salam, A., Siddiqui, M.A.A. and Pillai, K.K., 2001.** Journal of Pharmacology, 33,203-207.
- Kayali, H., Ozdag, M.F., Kahraman, S., Aydin, A., Gonul, E., Sayal, A., Odabasi, Z., Timurkaynak, E., 2005.** Original Article.

- Keeton, W.T., Gould, J.L., Genel Biyoloji, Palme Yayıncılık, 1194sf.**
- Kılınç, K., 1985.** Oksijen Radikalleri: Üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. *Biyokimya Der.*, 10, 2.
- Kılınç, K., 1986.** Kanserde Oksijen Radikalleri ve Süperoksit Dismutaz. *Biyokimya Dergisi*, 11,3 59-76.
- Kılınç, K., Kılınç, A., 2002.** Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 33(2): 110-118.
- Köken, T., Kahraman, A., Serteser, M., Gökçe, Ç., 2004.** Hemodialysis and Oxidative Stress. *KocatepeTıp Dergisi* 5 Ek sayı 9-13.
- Law., A., Gauthier, S., Quirion, R., 2003.** Alteration of nitric oxide synthase activity in young and aged apolipoprotein E-deficient mice. *Neurobiology of aging*, 24, 187-190.
- Leutner, S., Ecker, A., Müller, W.E., 2001.** ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *J. Neural Transm*, 108: 955-967.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E., 1994.** Carbonyl Assays for Determination of Oxidatively Modified Proteins. *Methods in Enzymology*, 233, 346-355.
- Lin, M.T., Beal, M.F., 2003.** The oxidative damage theory of aging. *Clinical Neuroscience Research*, 2, 305-315.
- Lowry, O.H., Rosebrough, Farr, A.L., Randal, R.J., 1951.** Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *T. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Machlin, L.J., Benedich, A., 1987.** Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients.
- Mandavilli, B.S., Santos, J.H., Van Houten, B., 2002.** Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutation Research* 509, 127-151.
- Matés, J.M., Jiménez, F.S., 1999.** Antioxidant Enzymes and their Implications in Pathophysiologic Processes. *Frontiers in Bioscience* 4, d339-345.
- Maxwell, R.J.S., 1995.** Prospects For The Use of Antioxidant Therapies *Drugs*, 49,3; 345-361.
- Meram, İ., Aktaran, Ş., 2002.** Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri. *Arşiv*, 11, 299.

- Mercan, U., 2004.** Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. YYU Vet. Fak. Derg. 15 (1-2): 91-96.
- Dikmen, N., Özgünen, T., 1998.** Harper'in Biyokimyası. Barış Kitapevi, 937 sf.
- Nietsch, P., 1991.** Aspirinin Terapötik uygulamaları. Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti./İstanbul.
- Oberley, L.W., 1984.** Methods in Enzymology, 105, 457-464.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., 2002.** İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara, 711 sf.
- Petruczenko, A., 1984.** Glucan effect on the survival of mice after radiation exposure. ACTA PHYSIOL. POL., 35, 231-236
- Rosantsev, E.G., Loshadkin, D.V., 2001.** The history and modern problems of free radical chemistry. 100 years of free radical chemistry. Designed Monomers and Polymers, 4, 4; 281-300.
- Rojkind, M., Domínguez-Rosales, J.A., 2002.** Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences, 59; 1872-1891.
- Sakurai, Y., Ishii, N., 1999.** Carbonylated proteins in aging and exercise: immunoblot approaches. Mechanisms of Ageing and Development 107, 245-253.
- Sastre, J., Pallardo, F.V., Vina, J., 2003.** The role of mitochondrial oxidative stress in aging. Free Radical Biology & Medicine, 35, 1, 1-8.
- Schrader, M., Fahimi, H.D., 2004.** Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. Histochem Cell Biol. 122: 383-393.
- Sen, C.K., 2001.** Symposium: Antioxidant and Redox Regulation of Cellular Signaling.
- Shi, X., Ding, M., Dong, Z., Chen, F., Ye, J., Wang, S., Leonard, S.S., Castranova, V., and Vallayathan, V., 1999.** Antioxidant properties of aspirin: Characterization of the ability of aspirin to inhibit silica-induced lipid peroxidation, DNA damage, NF- κ B activation, and TNF- α production. Molecular and Cellular Biochemistry, 199; 93-102.
- Slamenova, D., Labaj, J., Krizkova, L., Kogan, Grigorij, Sandula, J., Bresgen, N., Eckl, P., 2003.** Protective effects of fungal (13)- β -D-glukan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. Cancer Letters 198, 153-160.

- Sohal, R., S., 2002.** Role of Oxidative Stress and Protein Oxidation in the Aging Process. *Free Radikal Biology & Medicine*, 33, 1, 37-44.
- Sohal, R.S., Mockett, R.J., Orr, W.C., 2002.** Mechanism of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radikal Biology & Medicine*, 33, 5, 575-586.
- Squier, 2001.** Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Experimental Gerontology*, 36, 1539-1550.
- Stadtman, E.R., 2002.** Importance of Individuality in Oxidative stress and Aging. *Free Radikal Biology & Medicine*, 33, 5, 597-604.
- Stadtman, E.R., Berlett, B.S., 1998.** Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metabolism Reviews*, 30(2), 225-243.
- Tsiapali, E., Whaley, S., Kalbfleisch, J., Ensley, H.E., Browder, I.W., Williams, D.L., 2001.** Glucans Exhibit Weak Antioxidant Activity, But Stimulate Macrophage Free Radical Activity. *Free Radical Biology & Medicine*, 30, 4, 393-402.
- Turner, D.R., Dreimanis, M., Holt, D., Firgaria, F.A., Morley, A.A., 2003.** Mitotic recombination is an important mutational event following oxidative damage. *Mutation Research* 522, 21-26.
- Vetvicka, V., Yvin, J., 2004.** Effects of marine β -1,3 glucan on immune reactions. *International Immunopharmacology*, 4, 721-730.
- Zglinicki, T., Bürkle, A., Kirkwood, T.B.L., 2001.** Stress, DNA damage and ageing- an integrative approach. *Experimental Gerontology* 36, 1049-1062.
- Zglinicki, T., 2002.** Oxidative stress shortens telomeres. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 27, 7, 339-344.
- Wang, Y., Yao, S., Wu, T., 2003.** Combination of induced autolysis and sodium hypochlorite oxidation for the production of *Saccharomyces cerevisiae* (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19, 947-952.
- Weissmann, G., 1991.** Aspirin. *Scientific American*, p 84.
- Zhang, Y., Herman, B., 2002.** Ageing and apoptosis. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123, 245-260.
- Züllig, F., Suter, F., Biltz, H., Nissen, 1998.** Improving skin function with CM-glucan, a biological response modifier from yeast. *International Journal of Cosmetic Science*, 20, 79-86.

ÖZGEÇMİŞ

18.08.1979 tarihinde Samsun’da doğdum. İlk öğrenimimi Ondokuz Mayıs İlkokulu’nda, orta ve lise öğrenimimi Samsun Anadolu Lisesi’nde tamamladım. 1998 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım. 2002 yılında eğitimimi tamamladım, aynı yıl Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladım. Halen yüksek lisansa devam etmekteyim

İrem ÇELEBİOĞLU