

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

RATLARDA UZUN DÖNEM BİSFENOL A KULLANIMI ÜZERİNE
ALFA TOKOFEROL VE ALFA LİPOİK ASİT'İN ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. AYŞEGÜL BAHADIR

SAMSUN / 2011

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

RATLARDA UZUN DÖNEM BİSFENOL A KULLANIMI ÜZERİNE
ALFA TOKOFEROL VE ALFA LİPOİK ASİT'İN ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. AYŞEGÜL BAHADIR

TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. BAHATTİN AVCI

Bu çalışma (PYO. TIP. 1904-24) Ondokuz Mayıs Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir

SAMSUN / 2011

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Hocamız Prof. Dr. Abdulkerim Bedir'e, tez çalışmalarım sırasındaki destek ve yardımlarından dolayı tez danışmanım sevgili Hocam Yrd. Doç. Dr. Bahattin Avcı'ya ve Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Ramazan Amanvermez'e, Doç. Dr. Nermin Kılıç'a, Yrd. Doç. Dr. Birşen Bilgici'ye, Yrd. Doç. Dr. Özgür Korhan Tunçel'e, Yrd. Doç. Dr. Hasan Alaçam'a, Yrd. Doç. Dr. Ali Okuyucu'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında bana destek olup büyük bir özveriyle yardımcı olan çok değerli arkadaşım Uz. Dr. Murat Günay'a, tez çalışmalarımındaki yardımlarıyla Dr. Şimal Gürler ve Uz. Dr. Rukiye Nar'a, bana desteği olan diğer tüm Uzman ve Araştırma Görevlisi Doktor Arkadaşlarıma,

Halk Sağlığı Uzmanı sevgili arkadaşım Uz. Dr. Nilden Arslan'a ve Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Yrd. Doç. Dr. Leman Tomak'a,

Biyokimya Anabilim Dalı ve Laboratuvarları çalışanlarına, Bölüm Sekreterimiz Osman Ekşioğlu'na, Tıbbi ve Cerrahi Araştırmalar Bölümünde yardımlarından dolayı Mustafa İnce'ye,

...ve bugünlere gelmemde en büyük emeği olan Rahmetli Babama, Canım Anneme, ders çalışırken beni hiç yalnız bırakmayan biricik kızım Ayşenaz'a ve aileme sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Önsöz	I
İçindekiler	II
Kısaltmalar	V
Tablolar	VII
Grafikler	VIII
Şekiller	IX
ÖZET	X
SUMMARY	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. ALKİLFENOLLER	3
2.2. BİSFENOL A	3
2.2.1. Tanımı ve Tarihçe	3
2.2.2. Yapısı	4
2.2.3. Kullanım alanları	6
2.2.4. Metabolizması	8
2.2.4.1. Biyodegradasyon	8
2.2.4.2. Fotodegradasyon	8
2.2.5. Toksisitesi	9
2.3. SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF STRES	11
2.3.1. Reaktif oksijen ürünleri	12
2.3.1.1. Singlet Oksijen	12
2.3.1.2. Superoksit radikali	12
2.3.1.3. Hidrojen Peroksit	12
2.3.1.4. Hidroksil Radikali	13
2.3.2. Reaktif Nitrik Oksit Ürünleri	14
2.3.3. Serbest radikallerin hücredeki biyomoleküllerle etkileşimi	15
2.3.3.1. Lipid Peroksidasyonu	16
2.3.3.2. Protein Oksidasyonu	19
2.3.3.3. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisi	24
2.3.3.4. Serbest radikallerin DNA ve Nükleik asitlere etkisi	24

2.4.ANTİOKSİDANLAR.....	26
2.4.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	27
2.4.1.1. Superoksit dismutaz (SOD).....	27
2.4.1.2. Katalaz.....	28
2.4.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx).....	29
2.4.1.4. Glutasyon Redüktaz.....	29
2.4.1.5. Glutasyon Transferaz.....	30
2.4.1.6. Paraoksonaz (PON1).....	30
2.4.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar.....	31
2.4.2.1. Alfa Tokoferol.....	31
2.4.2.2. Askorbik Asit.....	33
2.4.2.3. Glutasyon.....	33
2.4.2.4. Alfa Lipoik Asit.....	35
2.4.2.5. Geçiş Metal İyonlarını Bağlayıcı Proteinler.....	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
3.1. Kullanılan Cihazlar.....	39
3.2. Kullanılan Kimyasallar.....	39
3.3. Çalışma Popülasyonunun Özellikleri.....	40
3.3.1. Deneyin Yapılışı.....	40
3.4. Biyokimyasal Analizler.....	41
3.4.1. Protein Miktarının Tayini.....	41
3.4.2. Serum ve Doku Lipid Peroksidasyon Düzeyi Tayini.....	43
3.4.2.1. Reaktiflerin Hazırlanışı.....	43
3.4.2.2. Ölçüm.....	44
3.4.3. Serum ve Doku Protein Oksidasyon Düzeyi Tayini.....	44
3.4.3.1. Reaktiflerin Hazırlanışı.....	44
3.4.3.2. Ölçüm.....	45
3.4.4. Serum ve Doku NO Ürünleri (Nitrat ve Nitrit) Düzeyi Tayini.....	45
3.4.4.1. Reaktiflerin Hazırlanışı.....	45
3.4.4.2. Ölçüm.....	45
3.4.5. Plazma ve Doku Glutasyon Peroksidaz Düzeyinin Tayini.....	46
3.4.5.1. Reaktiflerin Hazırlanışı.....	46
3.4.5.2. Ölçüm.....	47

3.4.6. Serum ve Doku Paraoksonaz (PON 1) Düzeyinin Tayini.....	47
3.4.6.1. Reaktiflerin Hazırlanışı.....	48
3.4.6.2. Ölçüm.....	48
3.5. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	49
4. BULGULAR.....	50
4.1. Serumda Malondialdehit Düzeyi (MDA).....	51
4.2. Serumda Protein Oksidasyon Düzeyi (AOPP).....	52
4.3. Serumda NO Ürünleri (Nitrat ve Nitrit) Düzeyleri.....	53
4.4. Serum Paraoksonaz Düzeyi (PON 1).....	54
4.5. Plazma Glutasyon Peroksidaz Düzeyi (GPx).....	55
4.6. Beyin Dokusunda Malondialdehit Düzeyi.....	56
4.7. Beyin Dokusunda Protein Oksidasyon Düzeyi (AOPP).....	57
4.8. Beyin Dokusunda NO Ürünleri (Nitrat ve Nitrit) Düzeyleri.....	58
4.9. Beyin Dokusunda Paraoksonaz Düzeyi (PON 1).....	59
4.10. Beyin Dokusunda Glutasyon Peroksidaz Aktivite Düzeyi (GPx).....	60
5. TARTIŞMA.....	61
6. SONUÇ.....	72
7. KAYNAKLAR.....	73

KISALTMALAR VE SİMGELER

BPA	: Bisfenol A
NP	: Nonilfenol
OP	: Oktilfenol
α -TF	: Alfa Tokoferol
α -LA	: Alfa Lipoik Asit
DHLA	: Dihidro Lipoik Asit
GSH	: Glutasyon
GS-SG	: Okside Glutasyon
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
SOD	: Süperoksid Dismutaz
PON	: Paraoksonaz
PUFA	: Çoklu Doymamış Yağ Asidi
PSH	: Protein sülfidril
LDL	: Düşük Yoğunlukta Lipoprotein
HDL	: Yüksek Yoğunlukta Lipoprotein
Apo B	: Apolipoprotein B
HNE	: 4-hidroksi 2-nonenal
MDA	: Malondialdehit
AOPP	: İleri düzeyde protein oksidasyon ürünleri
AGE	: Glikalizasyon son ürünleri
ALE	: Lipit peroksidasyon son ürünleri
NO	: Nitrik Oksit
NOs	: Nitrik Oksit sentaz
ATP	: Adenozin trifosfat
ETZ	: Elektron Transport Zinciri
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
FMN	: Flavin mono nükleotid
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV	: Ultraviyole
PVC	: Poli Vinil Klorür
AAPH	: 2-amidinopropan hidroklorid

$R^\bullet$	Serbest radikal
$O_2^\bullet$	Süperoksit radikali
$OH^\bullet$	Hidroksil radikali
$ROO^\bullet$	Peroksil radikali
$RO^\bullet$	Alkoksil radikali
$RS^\bullet$	Tiyil radikali
$LOO^\bullet$	Lipid peroksil radikali
$LOOH$	Lipid hidroperoksit
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
$ONOO^-$	Peroksinitrit
$GS^\bullet$	Glutasyon radikali
Fe^{+2}	Demir (ferro)
Cu^{+2}	Bakır (kupri)

TABLolar:

Tablo 3.1. Deney gruplarına Bisfenol A, Alfa Tokoferol ve Alfa Lipoik Asit Uygulanışı

Tablo 3.2. Protein miktarı tayininin çalışma prosedürü

Tablo 3.3. AOPP Standartları

Tablo 4.1. Bulgular

Tablo 4.2. Serum MDA Düzeylerinin BPA grubuna göre ikili karşılaştırması

Tablo 4.4. Serum Nitrat ve Nitrit Düzeylerinin BPA grubuyla ikili karşılaştırması

Tablo 4.4. Serum Nitrat ve Nitrit Düzeylerinin kontrol grubuyla ikili karşılaştırması

Tablo 4.5. Beyin dokusu MDA Düzeylerinin BPA grubuna göre ikili karşılaştırması

Tablo 4.6. Beyin dokusu Nitrat ve Nitrit Düzeylerinin BPA grubuyla ikili karşılaştırması

Tablo 4.7. Beyin dokusu Nitrat ve Nitrit Düzeylerinin ikili karşılaştırması

GRAFİKLER

Grafik 4.1. Serum MDA Düzeyi

Grafik 4.3. Serum AOPP Düzeyi

Grafik 4.3. Serum NO Ürünleri (Nitrat ve Nitrit) Düzeyleri

Grafik 4.4. Serum PON Düzeyi

Grafik 4.5. Plazma GPx Düzeyi

Grafik 4.6. Beyin Dokusu MDA düzeyleri

Grafik 4.7. Beyin Dokusu AOPP Düzeyleri

Grafik 4.8. Beyin Dokusu NO Ürünleri (Nitrat ve Nitrit) Düzeyleri

Grafik 4.9. Beyin Dokusu PON Düzeyleri

Grafik 4.10. Beyin Dokusu GPx Düzeyleri

ŞEKİLLER:

Şekil 1: Bisfenol A

Şekil 2: BPA'nın meydana gelişi

Şekil 3: ETZ'de suyun oluşması

Şekil 4: ETZ'de superoksitlerin oluşması

Şekil 5: Hidrojen peroksitin Fe^{+3} ve Fe^{+2} ile reaksiyonu

Şekil 6: Haber Weiss Reaksiyonu

Şekil 7: İyonizasyon

Şekil 8: Ultraviyole ışınla hidroksil radikalının oluşumu

Şekil 9: Suyun İyonizasyonu

Şekil 10: Peroksinitrit oluşumu

Şekil 11: Çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu

Şekil 12: Peroksitlerin hidroksil ve alkoksil radikallerine dönüşümü

Şekil 13: Karbon merkezli radikaller ve hidroksillenmiş protein ürünleri

Şekil 14: Çapraz bağlı proteinlerin oluşması

Şekil 15: Peroksinitrit oluşumu

Şekil 16: Protein karbonil ürünleri

Şekil 17: Antioksidan Enzimler

Şekil 18: Superoksit Dismutaz Reaksiyonu

Şekil 19: Hidrojen Peroksitin Katalaza Etkisi

Şekil 20: Glutatyon Peroksidazın hidrojen peroksite etkisi

Şekil 21: Glutatyonun GPx ile indirgenmesi

Şekil 22: Glutatyonun indirgenmesi

Şekil 23: Glutatyon Transferaz reaksiyonu

Şekil 24: α -TF'ün yapısı

Şekil 25: Askorbat ve dehidroaskorbat

Şekil 26: Glutatyon sentezi

Şekil 27: Glutatyonun oksidasyonu

Şekil 28: α -LA ve α -TF'ün etkileşimi

ÖZET
BİSFENOL A’NIN OKSİDAN ETKİLERİNE KARŞI
ALFA TOKOFEROL, ALFA LİPOİK ASİT VE KOMBİNE
KULLANIMLARININ KORUYUCU ETKİLERİ

Günlük yaşamımızda geniş bir kullanım alanına sahip olan plastik malzemelerin yapısında yer alan Bisfenol A (BPA), özellikle evsel ürünlerde, yiyecek içecek kaplarının iç kaplamasında, tıbbi ve diş tedavi malzemelerinde kullanılmaktadır. BPA, yüzey gerilimini azaltıcı özellikleri nedeniyle endüstriyel alanda sıkça kullanılan alkilfenollere ait toksik bir bileşiktir. Besin zinciriyle, içme sularıya, inhalasyon yoluyla insan vücuduna alınmaktadır. BPA maruziyetiyle birlikte kandaki düzeyinin yükselmesi yağda çözünür özelliği nedeniyle dokularda birikimine sebep olmaktadır. Dokulardaki BPA birikiminin oksidatif hasara yol açtığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Günümüz yaşamında maruz kaldığımız bir çok toksik maddenin etkilerine karşı antioksidanların önemi giderek artmaktadır.

Yaptığımız çalışmada güçlü antioksidanlar olan alfa tokoferol (α -TF) ve alfa lipoik asitin (α -LA), BPA’ya bağlı ortaya çıkması muhtemel oksidatif hasardan korunmadaki öneminin araştırılması amaçlandı. Her biri on rattan oluşan beş grup oluşturuldu. I.grup kontrol grubu olarak belirlendi. Kontrol grubu dışındaki dört gruba 30 gün süreyle oral gavaj yoluyla 25 mg/kg/gün BPA uygulandı. II. gruptaki ratlara yalnızca BPA uygulanırken, III. gruba BPA ile birlikte 100 mg/kg/gün α -LA, IV.gruba BPA ile birlikte 20 mg/kg/gün α -TF, V. gruba ise BPA ile birlikte 100 mg/kg/gün α -LA ve 20 mg/kg/gün α -TF kombine olarak uygulandı.

Çalışmamızın sonunda, lipid peroksidasyonu ürünü olan Malondialdehit (MDA), Protein Oksidasyon Ürünleri (AOPP) ve Nitrik Oksit düzeyleri ile antioksidan enzimlerden Glutasyon peroksidaz (GPx) ve Paraoksonaz (PON1) düzeyleri ölçülerek istatistiksel olarak değerlendirildi.

Beyin dokusu ve serum örneklerinde BPA uygulanan grup, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında protein oksidasyonu ürünleri (AOPP) ve nitrik oksit (NO) düzeylerinde, antioksidan enzimler glutasyon peroksidaz (GPx) ve paraoksonaz düzeylerinde (PON1) istatistiksel olarak herhangi bir farklılık tespit edilmedi. Lipid peroksidasyon düzeylerinde (MDA) ise beyin dokusu ve serum örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p<0,05$). α -TF ve α -LA uygulanan III, IV. ve V. gruplara ait serum örneklerinde lipid peroksidasyonunun II. gruba göre anlamlı olarak azalması

($p < 0,05$) ancak kontrol grubuna göre bir farklılık göstermemesi ($p > 0,05$), kullandığımız antioksidan maddelerin BPA'nın ortaya çıkardığı oksidatif hasarı geri çevirdiğini düşündürmektedir. Ancak elde ettiğimiz bulgular α -LA ve α -TF'ün ayrı ayrı ya da kombine kullanımlarının birbirlerine herhangi bir üstünlüğünün olmadığını gösterdi.

Sonuç olarak, endüstriyel alanda sıkça kullanılan ve çevresel olarak da maruz kaldığımız toksik bir kimyasal madde olan BPA'nın beyin dokusu ve serum düzeyinde lipid peroksidasyonuna sebep olduğunu tespit ettik. α -LA veya α -TF'ün uyguladığımız dozlarda BPA'nın sebep olduğu hasarın geri çevrilmesinde etkin olduğunu, ancak bu iki antioksidanın birbirlerine bir üstünlüğü olmadığını ve kombine kullanımlarının bir avantaj sağlamadığını belirledik.

Anahtar Kelimeler; Oksidatif stres, Antioksidanlar, Bisfenol A, Alfa Lipoik Asit, Alfa Tokoferol, Malondialdehit.

SUMMARY

EFFECTS OF ALPHA LIPOIC ACID AND ALPHA TOCOPHEROL ON LONG - TERM BISPHENOL A ADMINISTRATION IN RATS

Bisphenol A (BPA) especially used as a building block of plastic materials such as inner lining of food and beverage containers, medical materials, dental sealants and composites and in the other domestical products is a toxic material. BPA is from one of the groups of alkylphenols which are widely used as surfactants in domestic and industrial products. Humans are exposed to BPA primarily through the food cycle, domestic water and inhalation. Exposure to BPA cause to the increase of the serum BPA concentration and bioaccumulation within the tissues by virtue of its lipophilic nature. There are several literatures about the oxidative stress induced by BPA's bioaccumulation within the tissues. Importance of the antioxidants which are used against the toxic effects of several materials in the daily life rise in recently.

The aim of our study was to investigate whether administration of the alpha lipoic acid (α -LA) and alpha tocopherol (α -TF) antioxidants can prevent the probable oxidative stress induced by BPA. The rats were divided into five groups including ten rats in each group. The first group was defined as a control. In the other groups, BPA (25 mg/kg/day) was administrated by intragastric lavage to rats for 30 days. The second group was administrated by only BPA, α -LA (100 mg/kg/day) was administrated along with BPA in the third group, α -TF (20 mg/kg/day) was administrated along with BPA in the fourth group, α -LA and α -TF combination was administrated along with BPA in the fifth group.

At the end of the study, the levels of Malondialdehyd (MDA) as a product of lipid peroxidation, the advanced oxidation protein products (AOPP), nitric oxide (NO) and the antioxidant enzymes Glutathione Peroxidase (GPx) and Paraoxonase (PON1) were determined. Data was evaluated statistically.

No significant difference was observed for the levels of AOPP, NO, GPx and PON1 in rats through by only BPA compared to the control group. The lipid peroxidation levels of only BPA group were significantly higher than the control group of the rat brains and sera ($p < 0.05$). There was a significant decrease compared with only BPA administrated group ($p < 0.05$) with the α -LA and α -TF administrated along with BPA groups but no significant decrease compared with control group in sera ($p > 0.05$). These findings revealed that the coadministration of α -LA and α -TF along with BPA reversed the effects of BPA induced oxidative stress within the sera. In conclusion,

our data suggested that there was no significant difference between the administration of only α -LA/ α -TF and combination along with BPA. These antioxidants didn't have any priority to each other and combined administration had no advantage.

As a result, we revealed that BPA, a toxic chemical material often used in industry and exposed environmentally, induces lipid peroxidation at rat brains and sera. At these dosages, α -LA and α -TF had protective effect against oxidative stress induced by BPA but combined administration had no advantage.

Key Words; Oxidative stress, Antioxidants, Bisphenol A, Alpha Lipoic Acid, Alpha Tocopherol, Malondialdehyd.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alkilfenoller, yüzey gerilimini azaltıcı etkilerinden dolayı endüstride yaygın olarak kullanılan kimyasal maddelerdir. Alkilfenollerin günlük yaşamda geniş kullanım alanı bulunmaktadır. Alkilfenollerden Bisfenol A (BPA), özellikle plastik sanayisinde, plastik mutfak gereçleri, bebek biberonları ve besin saklama kaplarında, diş protez, dolgu ve kaplaması gibi çeşitli diş tedavi malzemelerinde, deterjanlarda, kozmetik ürünlerde, boya, peptisid, herbisid maddeler gibi pek çok üründe kullanılmaktadır (Halden, 2010).

Atıkların içme suyuna karışması sebebiyle gıda ve içme sularıyla, cilt absorpsiyonu ve inhalasyon yoluyla bu maddelerin insan vücuduna alınması mümkün olmaktadır (Staples *et al.*, 1998; Mihaich *et al.*, 2009) (Markey *et al.*, 2001; Yıldız, 2009; Lintelmann *et al.*, 2003). Bu maddelerin alımı sonrasında kanda ve çeşitli dokulardaki konsantrasyonu yükselmekte, yağda çözünen maddeler oldukları için dokularda birikme eğilimi göstermektedirler (Michalowicz and Duda, 2007). Östrojenik potansiyele sahip oldukları ve direk hormon reseptörlerini etkileyerek hormon sentezini bozabildikleri için 'Endokrin Bozucu' olarak tanımlanırlar (Richter *et al.*, 2007; Vandenberg *et al.*, 2007). Endokrin bozucu etkisi dışında, günlük yaşamda maruz kalınan pek çok kimyasal madde gibi BPA'nın da, biriktiği dokularda reaktif oksijen ürünleri (ROÜ) aracılığıyla hücresel protein ve lipid yapıların oksidatif hasarına bağlı olarak hücre düzeyinde hasar oluşturduğu gösterilmiştir (Atkinson and Roy, 1995a; Bindhumol *et al.*, 2003; Chitra *et al.*, 2003; Hasselberg *et al.*, 2004).

Sahip oldukları eşlenmemiş elektrondan dolayı yüksek derecede reaktif moleküler yapılar olan serbest radikallerden ROÜ; protein, lipid, DNA gibi hücresel makromoleküllerde oksidatif modifikasyonlara neden olduğundan inflamatuvar, kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklar, mutasyon, malignite ve yaşa bağlı dejeneratif değişikliklerle ilişkilidir (Young and Woodside, 2001; Fang *et al.*, 2002). Antioksidanlar, elektron yakalayıcı özellikleriyle ROÜ'ni etkisiz hale getirerek hücre ve doku hasarından korunmada etkilidirler. Hücresel makromolekülleri oksidatif hasardan koruyarak serbest radikallerin sebep olduğu hastalıkların başlayış ve ilerleyişini durdurabilmektedirler (Markey *et al.*, 2001) (Suarez *et al.*, 2000; Chitra *et al.*, 2003; Kabuto *et al.*, 2003; Sajiki and Yonekubo, 2003; Hasselberg *et al.*, 2004; Kabuto *et al.*, 2004).

Antioksidanlardan askorbik asit (C vitamini) ve alfa tokoferolün (E vitamini) alkilfenollerin toksisitesine karşı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (Bindhumol *et al.*, 2003; Chitra *et al.*, 2003; Korkmaz *et al.*, 2011).

Alfa Tokoferol (α -TF); ROÜ'nin indüklediği lipit peroksil radikallerinin oluşumunu inhibe ederek membran fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerini peroksidasyondan korur. LDL, hücrel proteinler ve DNA'nın oksidatif hasarına engel olur (Fang *et al.*, 2002). Çalışmalarda; alkilfenollerin oluşturduğu oksidatif hasara karşı kullanılan α -TF'ün hepatik antioksidan savunmayı başlattığı ve oksidatif hasarı ortadan kaldırabildiği gösterilmiştir (Okai *et al.*, 2000; Chitra and Mathur, 2004).

Önemli bir enzim kompleksinde kofaktör olan, çeşitli bitkisel ve hayvansal kaynaklarda bulunan α -LA, diyetle alım sonrası farklı dokulara dağılmakta ve organizmada metabolik bir antioksidan olarak etki göstermektedir. Bu etkisini, serbest radikalleri yakalayıp, ROÜ'nin sebep olduğu lipit peroksidasyonu ile protein ve DNA'nın oksidatif hasarını önleyerek ve diğer antioksidanları da yeniden kullanılabilir şekle dönüştürerek göstermektedir (Packer *et al.*, 1995; Packer *et al.*, 1997b). ROÜ'ne bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif hasar, çeşitli kronik hastalıkların patogeneğinde yer almakta, potent antioksidanlardan biri olan α -LA ise lipit, LDL, proteinler ve DNA gibi biyomolekülleri koruyarak oksidatif hasara bağlı olarak ortaya çıkacak etkileri önlemekte, aynı zamanda da alfa lipoik asit/dihidrolipoik asit (DHLA) redoks çiftini oluşturarak pek çok antioksidanın düzenlenmesini özellikle okside glutatyon, dehidroaskorbat ve ubikinonun indirgenmesini sağlamaktadır (Packer *et al.*, 1995; Packer and Tritschler, 1996; Arivazhagan *et al.*, 2001b, a; Arivazhagan *et al.*, 2002; Marangon *et al.*, 1999; Balachandar *et al.*, 2003).

α -LA/DHLA çifti, α -TF'ün radikal okside şekli olan thioredoksini redükte ederek α -TF'ün rejenerasyonunu sağlar (Packer and Tritschler, 1996; Moini *et al.*, 2002). Çalışmamızda α -LA'in biyolojik sistemlerde α -TF'ü rejenere etmesiyle ilgili özelliğinden yola çıkarak; α -LA ve α -TF'ü ayrı ayrı ve kombine uygulayıp BPA'ya bağlı olarak ortaya çıkabilecek muhtemel oksidatif hasara karşı bu antioksidanların ayrı ayrı ve kombine kullanımlarının koruyucu etkilerinin olup olmadığını ve sinerjik bir antioksidan etki oluşturup oluşturmadığını araştırmayı hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ALKİLFENOLLER

Alkilfenollerin etilen oksit ile reaksiyonu sonucu üretilen Alkilfenol Etoksilatları (APEs), evsel ve endüstriyel ürünlerde sürfaktan olarak geniş kullanım alanına sahip bileşiklerdir. Oktilfenol Etoksilatlar (OPEs) ve Nonilfenol Etoksilatlar (NPEs) en sık kullanılan iki sürfaktan grubudur. Atık su arıtma tesislerinden sızan sularda sıklıkla bulunmaktadır. Atık su arıtma tesislerinde veya çevredeki primer degradasyonu, daha kalıcı ve toksik olan kısa zincirli alkilfenol etoksilatların (1, 2, 3 etoksilatlı Nonilfenol Etoksilatlar) ve Nonilfenol (NP), Oktilfenol (OP) gibi alkilfenollerin oluşumu ile sonuçlanır. Fizikokimyasal özelliklerinden dolayı, atık su ıslah ünitelerinden çıktıktan sonra sedimentlerde birikirler. APE metabolitlerinin sudaki konsantrasyonunu belirleyen sıvı çözünürlüğü ile yüksek dağılım katsayısı çeşitli çevresel kompartmanlarda önemli bir şekilde depolanmalarını sağlar. Çalışmalar, APE metabolitlerinin ana bileşiklerden daha toksik olduğunu, östrojen reseptörleriyle etkileşime girerek doğal hormonları taklit edebildiğini ve çevrede bulunma düzeylerinin yaşamı etkileyebildiğini göstermiştir (Markey *et al.*, 2001; Warhurst *et al.*, 1995) (Staples *et al.*, 1998; Ying *et al.*, 2002; Correa-Reyes *et al.*, 2007).

2.2. BISFENOL A

2.2.1. Tanımı ve Tarihçesi

Evsel ürünlerde kullanılan polikarbonat plastiklerin yapı malzemesi, polivinil klorid (PVC) plastiklerin katkı maddesi olan yiyecek içecek kaplarının iç kaplaması ve dış tedavi malzemelerinde bulunan Bisfenol A (BPA)'nın ilk keşfi 1891 yılında olmuştur. 1909 yılında patent alan bakalit; endüstride ve evsel ürünlerde kullanılmak üzere üretilen ilk fenolik plastik olmuş, 1940 ve 1950'li yıllarda plastik endüstrisinde kullanılmaya başlanmıştır. CD, DVD, çeşitli elektronik malzemelerin kaplaması, spor malzemeleri, kağıt kaplamaları ve otomobillerde de ek kullanım alanlarına sahip olan BPA, bugün de en çok kullanılan kimyasallardan biridir (Kang *et al.*, 2007; Calafat *et al.*, 2008; Rubin and Soto, 2009) (Markey *et al.*, 2001).

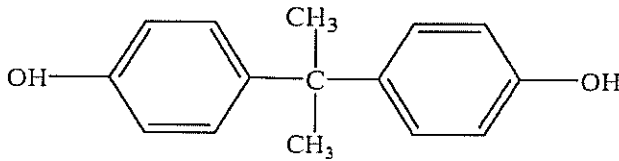
Günlük hayatta sıklıkla kullanılan plastikler, polimerik yapılardır. Polimerler, yapısında karbon, hidrojen, oksijen atomları ve silikon bulunduran monomerlerden oluşurlar. Bu polimerleri oluşturmak için pek çok monomer ısıtılıp birlikte polimerize

edilir. Plastiklerin kimyasal, fiziksel ve biyolojik duyarlılıklarına bağı olarak çok yönlü kullanımları yanında düşük fiyatlı olmaları tek kullanımlık sağlık ürünlerinde tercih edilebilir olmalarını sağlamaktadır. Bu maddelerin çok geniş kullanımları, insan sağlığı ve çevre açısından BPA gibi monomerik yapı taşlarının yanında içerdikleri çok miktardaki katkı maddesinden kaynaklanan riskler taşımaktadır (Halden, 2010).

2.2.2. BPA'nın Yapısı

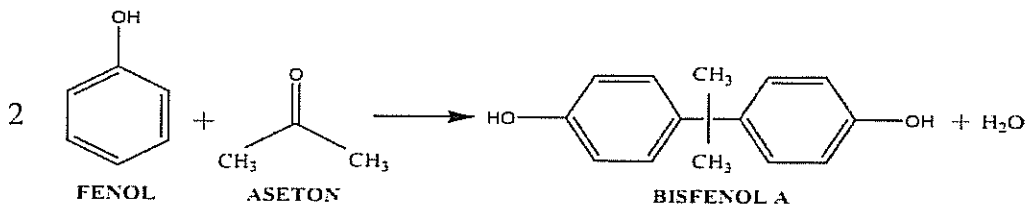
Moleküler formülü; $C_{15}H_{16}O_2$

Görünümü beyazdan açık kahverengiye değişen tanecikler veya pudralar şeklindedir (2,2-(4,4-dihidroksidifenil)).



Şekil 1: Bisfenol A

BPA, parapozisyon durumunda iki hidroksil grubu içeren bir difenil bileşiği şeklinde kimyasal yapıya sahiptir (Kadoma and Fujisawa, 2000). İki mol fenolün bir mol aseton ile düşük pH ve yüksek sıcaklıktaki kondensasyonu ile elde edilen, sonuçta iki fonksiyonel fenol grubu bulunan organik bir çevresel ajandır.



Şekil 2: Bisfenol A'nın meydana gelişi

BPA, hem asit hem de alkaline katalizlenen reaksiyonlar sonucu elde edilebilir, ancak endüstriyel üretimde, oluşan yan ürün miktarını en aza indirebilmek için asitle katalizleme tercih edilmektedir. BPA, yüksek saflıkta polikarbonat imalatında ve daha düşük saflıkta epoksi reçine imalatında kullanılan olmak üzere iki farklı kalitede oluşmaktadır.

Fenol ve ürünleri doğal çevrede çokça bulunur. Bu bileşikler, polimerlerin, ilaçların ve diğer organik maddelerin içeriğinde bulunmaktadırlar. Bazı fenoller doğal süreçler sırasında oluşur. Ekosisteme evsel veya endüstriyel atıkların yüzeyel suya drenajı sonucu giren fenol bileşikleri, çok sayıdaki bileşiğin üretimi, yıkımı ve jenerasyonu ile ilişkilidir. Andropojenik orjinli fenollerin çevrede bulunması petrol veya ilaç endüstrilerindeki kimyasal aktivitelere bağlıdır. Fenoller, klor atomlarıyla reaksiyona girebilen, nitratlanabilen, metillenebilen ve alkillenebilen tehlikeli ekzotoksinlerdir. Fenol ve ürünlerine bağlı olarak akut toksisite, mutajenite ve malignite ortaya çıkabilir. Hematotoksik ve hepatotoksiktirler, histopatolojik değişikliklere sebep olurlar (Michalowicz and Duda, 2007).

Bu bileşiklerin toksik davranışları *hidrofobisite* ve *serbest radikal oluşumu* olmak üzere iki temel süreçle ilgilidir.

Hidrofobisite, hücre içeriğinde fenolün çözünürlüğünü ve buna bağlı olarak bileşiğin hücre ve doku yapılarıyla ilişkisini etkiler. Fenollerin organizmaya girişi hücre membranından difüzyonla olduğu için, bileşiğin hidrofobisitesinde artış hücre membranından etkin bir şekilde geçmesini sağlayarak bu ksenobiyotiklerin toksisitesini başlatır (Michalowicz and Duda, 2007; Markey *et al.*, 2001).

Serbest radikal oluşumu; Fenollerin etkisiyle oluşan fenoksi radikallerinin ve semikinon ve kinon gibi ara ürünlere ait metabolitlerin, hücrelerdeki biyomoleküllerle etkileşimi sonucunda, superoksit radikalleri ve hidrojen peroksit gibi RO₂ oluşur. Fenoller, yüksek reaktiviteleri ile hızlı bir şekilde radikal reaksiyonlarına girerek hücre membranlarında lipid peroksidasyonunu provoke ederler. Daha düşük aktiviteye sahip olanlar ise hücre içi boşluklara girerek hücre içeriğine zarar verirler. Fenollerin veya radikal metabolitlerinin mitokondriyle etkileşimi oksidatif fosforilasyonla elektron transport zinciri arasında ayrılmaya sebep olur (Michalowicz and Duda, 2007).

Fenollerin toksik etkilerinin karşılaştırılmasında önemli faktörler *pKa* ve *logP*' dir. *Ka*, bileşiğin dissosiasyon katsayısı, *logP* ise andissosiye asitlerin oktanol-su partisyon katsayısıdır. Hidrofobisitede ve log P değerinde artış, pKa değerinde azalma ksenobiyotikler tarafından daha etkili membran penetrasyonu ve toksisite oluşumu ile sonuçlanır. Bileşiklerin pKa değerleri birbirine yakın olduğunda toksisite için en önemli faktörü hidrofobisite oluşturur. Fenoller hücreye penetre olduktan sonra aktif dönüşüme uğrarlar. Bu süreç, DNA veya enzimlere bağlanarak zarar veren elektrofilik

metabolitlerin oluşumuyla fenol bileşiklerinin toksisitesini artırır (Michalowicz and Duda, 2007).

Fenolik reçineelerle ilgili pazarlama alanında en geniş kullanım alanına sahip ürün olan BPA, kimyasal yapı olarak sentetik östrojenlere benzer (Markey *et al.*, 2001). Yakın zamanda yapılan pek çok çalışmada, BPA'nın diğer endokrin bozucu fenolik bileşikler gibi zayıf östrojenik aktivitesi olduğu gösterilmiştir (Gaido *et al.*, 1997; Nagel *et al.*, 1997). Çalışmalarda fenolik reçineelerin östrojenik aktivitesi üzerinde durulmuş, otoklavlarda laboratuvar polikarbonat malzemelerinden salınan BPA'nın; Östrojen (ER) reseptörlerine 17 β estradiol'e göre 1:2000 afiniteyle bağlanan, Progesteron (PR)'nun ekspresyonunu düzenleyen ve Östrojene duyarlı meme kanseri hücreleriyle (MCF-7), hücre proliferasyonunu indükleyici özellikte bir madde olduğu gösterilmiştir (Feldman and Krishnan, 1995).

2.2.3. BPA'nın kullanım alanları

BPA monomerleri, özellikle besinlerin paketlenmesi, besin saklama kapları ve sağlıkla ilgili ürünlerde bulunan polikarbonatların ve epoksi reçinelerin üretiminde kullanılırlar (Mihaich *et al.*, 2009) (Yıldız, 2009).

BPA monomerleri içeren polikarbonat plastikler günlük yaşamımızda çok geniş bir kullanım alanına sahiptir;

- besin saklama kapları,
- bebek biberonları ve su kapları,
- diş tedavi malzemeleri,
- kontakt lensler,
- ambalaj endüstrisi,
- sporla ilgili ürünler,
- CD ler, DVD ler, cep telefonları ve çeşitli elektronik malzemeler

Epoksi reçineler; yiyecek içecek kaplarının iç kaplamasında, bazı plastikleştirici maddelerde kimyasal antioksidan olarak, PVC'de ise katkı maddesi olarak kullanılırlar (Rubin and Soto, 2009) (Lintelmann *et al.*, 2003; Markey *et al.*, 2001)

Polikarbonat plastiklerin üretiminde kullanılan BPA moleküllerinin polimerizasyonu sırasında serbest kalan monomerler, yüksek sıcaklık ve asidik/bazik

ortamlarda yiyecek içecek kaplarından (polikarbonat plastik kaplar, epoksi reçine kaplamalar gibi) salınarak, sindirime geçebilen BPA moleküllerini oluştururlar (Vandenberg *et al.*, 2007; Rubin and Soto, 2009; Halden, 2010). Kapların yüksek ısıda ve tekrarlanan yıkanmaları sırasında sıcak sıvıyla teması ya da asidik/bazik saklama koşulları polimer yıkılımına sebep olarak, polikarbonat kaplarla temas eden sıvılara daha fazla BPA'nın salınmasına sebep olur. Ürünlerin üretim sırasındaki tamamlanmamış polimerizasyonu, ısıtılma sırasında artan sıcaklıkla birlikte saklama kaplarından besinlere salınımı artırır (Michalowicz *et al.*, 2007; Halden, 2010).

BPA salınımının en yüksek düzeyine, infant formülleri ve meyve sularında rastlanmaktadır (Markey *et al.*, 2001). Yapılan bir çalışmada plastik bebek biberonları ve kaplarının sterilizasyonu sırasında polikarbonat materyalin gramı başına 7-58 µg BPA salındığı HPLC yöntemiyle tespit edilmiştir (Biles *et al.*, 1997).

Bu şekilde besinlerle alım en önemli kaynak olarak düşünülse de inhalasyon yoluyla çevresel maruziyet de gerçekleşebilir (Halden, 2010).

Diş tedavi malzemeleri ultraviyole ışık veya benzoil peroksit başlatıcıyla polimerize olurken BPA'nın polimerizasyon süreci her zaman tamamlanmamış olabilir ki bu da monomerlerin hasta tükürüğüne salınmasına sebep olur. Enzimatik hidroliz ve diş yüzeyine uygulanan mekanik kuvvet de diş reçineelerinin kalıcı hasarına sebep olur. Dental kaplamalarda bileşiklerin dişlere uygulanması sonrasında bunların enzimatik mekanik kuvvetlerle yıkımıyla ortaya çıkan BPA ve ürünleri gingival epitelden emilip yutulabilmektedir. Dişle ilgili çalışan kişilerde deri yoluyla maruziyet olabildiği gibi imalat çalışmalarında işçiler inhalasyon ve deri yoluyla yüksek doza maruz kalır bu da fotosensitif dermatite neden olur. Lipofilik olmaları nedeniyle, çevresel maruziyet sonrasında hayvanlarda deri ve müköz membranlar yoluyla emilim sonrası et ve süt ürünlerinde birikimleri görülebilir. Yapılan alan çalışmaları ve deneysel laboratuvar çalışmalarında BPA'nın ekolojik problemlere sebep olma potansiyeli olduğu ve insan sağlığını etkilediği gösterilmiştir. Üretimi kapalı sistemlerde gerçekleşen bu kimyasal maddenin çevrede bulunuşu endüstriyel atık sularının sonucudur (Markey *et al.*, 2001).

2.2.4. Metabolizması

BPA için vücuttaki metabolik yol, fenolik hidroksil grubunun karaciğerde glukuronidle konjugasyonu ile başlar. UDP Glukuronil Transferaz (UGT), intrinsik bir membran proteini olup fenol, karboksilik asit, alkol, amin ve ksénobiyotik bu enzimin substratlarıdır. BPA'yı major bileşici olan BPA glukuronide metabolize eder (Kang *et al.*, 2007). Bir miktar BPA ise 5-hidroksibisfenole dönüşür. Sitokrom p450'ye bağı oksidazların fonksiyonuyla, hidroksillenmiş ara ürün olan bisfenol-o-kinon oluşur (Atkinson and Roy, 1995a). BPA metabolizmasıyla ilgili iki önemli oksidatif enzim peroksidaz ve polifenol oksidaz'dır. Bitkiler BPA'yı kökleriyle sudan alarak çeşitli glikozidik bileşiklere metabolize ederler. Glikozilasyon, BPA'nın bitkilerdeki asıl yıkım yolu olup bileşicin östrojenitesini oluşturur (Kang *et al.*, 2007).

BPA'nın kısa yarı ömrü; mikrobiyal popülasyonun bu bileşici hızlı bir şekilde yıkması ve çevrede minerilizasyonla hızlı yıkım başlatan foto oksidasyonun sonucudur (Staples *et al.*, 1998).

2.2.4.1 Biyodegradasyon

BPA yüzeyel sularda, atık su arıtma tesislerinde ve biyolojik atık su sistemlerinde hızlı bir şekilde biyodegradasyona gider (Staples *et al.*, 1998). Çevreye dağılan BPA, biyolojik olarak yıkılıp sedimente adsorbe olur ve muhtemelen yüzeyel sularda ve atmosferde fotokimyasal yıkıma uğrar.

Bakteriyel biyodegradasyonla ilgili çalışmalar, 4-hidroksiasetofenon ve 4-hidroksibenzoik asitin oluşan en önemli metabolitler olduğunu ve her ikisinin de hızlı bir şekilde CO₂ ve H₂O'ya yıkılarak bakteriyel hücreye alındığını göstermiştir. Minör yollarla oluşan 4-hidroksifenil-1-propanol ve 4-hidroksifenil-1,2-propandiol de daha sonra CO₂ oluşturacak şekilde yıkılabilir (Staples *et al.*, 1998) (Markey *et al.*, 2001).

2.2.4.2. Fotodegradasyon

BPA'nın biyolojik olmayan yıkım yoludur. Sıvı çevrede fotoliz veya fotooksidasyon yoluyla gerçekleşir. BPA'nın saf sudaki fotodegradasyonu yavaştır (Chin *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2007). Reaktif fotooksidanlar, ROÜ'ni ve diğer radikalleri biriktirerek BPA'nın yıkımını artırır. Bütün sıvı çevrelerde bulunan demirin, hidrojen peroksit ile reaksiyon sonucu ROÜ'nin oluşmasında rolü vardır. Ayrıca

demirin çözünmüş organik maddelerle veya ROÜ ile oluşturduğu kompleksler, BPA'nın fotodegradasyonunu indükler. BPA'nın fotodegradasyon ürünleri; fenol, 4-izopropilfenol ve semikinondur (Kang *et al.*, 2007).

Polikarbonatlardan deniz suyuna salınan ve çevrede bulunan BPA'nın, suda ROÜ'nin varlığında hızlı bir şekilde yıkılabilir bir bileşik olduğu gösterilmiştir (Sajiki and Yonekubo, 2003, 2004). BPA, BPA kinon oluşumunu katekol ve semikinon oluşumu takip eder. Oluşan yüksek düzeyde redoks aktif moleküller olan kinonlar, ROÜ'nin oluşumuna öncülük eder ve bu şekilde ana bileşiklerin oluşturduğu patolojiyle benzerlik gösteren ürünler oluşur (Bolton *et al.*, 2000). Oluşan ürünlerin DNA'ya kovalent olarak bağlanabilmeleri, BPA'nın DNA nükleotidlerine etkisini ve mutasyon sebebi oluşunu göstermektedir. BPA'nın reaktif bir metaboliti olan 4,5-bisphenol-o-kinon ve majör DNA ürününün rat karaciğer DNA'sında peroksidaz aktivasyonu varlığında okside olduğu gösterilmiştir (Atkinson and Roy, 1995a).

2.2.5.Toksisitesi

BPA, polikarbonat plastiklerde sıklıkla kullanılan çevresel bir kontaminan ajandır. Pek çok çevresel kontaminan maddenin prooksidan ve antioksidan maddelerin oluşturduğu hücre dengesine zarar verdiği ve bundan dolayı da oksidatif stresi indüklediği gösterilmiştir (Bindhumol *et al.*, 2003).

Fenol bileşiklerinin organizmaya penetrasyonu, bileşiğin hücre membranından difüzyonuyla ilişkilidir. Bunu etkileyen faktör hidrofobisitedir. Hidrofobisitedeki artış, hücre membranının fenol bileşiği tarafından etkin bir şekilde penetrasyonuna sebep olarak toksisiteyi başlatır. Fenol toksisitesini asıl oluşturan faktör, bileşiğin hücre biyomolekülleriyle reaktivitesi ve fenol tarafından okside substrattan serbest elektronun alınabilme kolaylığıdır. Hücrelerdeki tek elektron reaksiyonları, karaciğer, akciğer ve diğer organlarda peroksidazlar gibi oksidatif enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlardır. Oluşan etki, fenoksi radikalleri ve semikinon, kinon gibi ara ürünlerin metabolitlerinin hücrelerdeki biyomoleküllerle etkileşimidir. Bu reaksiyonlarda, superoksit radikalleri ve hidrojen peroksit gibi ROÜ oluşur. Fenoller sahip oldukları yüksek reaktivite ile hızlı bir şekilde radikal reaksiyonlarına girer ve hücre membranında lipit peroksidasyonunu provoke ederler. Daha düşük aktiviteye sahip şekilleri hücre içi boşluklara girerek, endoplazmik retikulum, mitokondri ve nükleus membranlarına ve bunların enzim ve nükleik asitler gibi komponentlerine zarar verirler.

Fenollerin veya radikal metabolitlerinin mitokondriyle etkileşimi oksidatif fosforilasyonla elektron transport zinciri arasında ayrılmaya sebep olur. Fenollerin toksik etkisi aynı zamanda reaksiyona giren substratın çeşidiyle, hücre içindeki lokalizasyonu ve hücre proliferasyon fazıyla ilgilidir. Önemli bir faktör de, fenol reaktivitesine maruz kalan doku tipidir. Örneğin fenollerin hepatositlere difüzyonu hücreyi elektrofilik metabolitler açısından koruyan glukuronid ve sülfatlarla konjugasyonuna yol açar (Michalowicz *et al.*, 2007). BPA, karaciğerde glukuronidasyon ve sülfatasyon yollarıyla detoksifiye edilmektedir. Karaciğerden atılan BPA-glukuronid safra yoluyla ulaştığı sindirim kanalında tekrar BPA'ya dönüşmekte ve buradan kana geçmektedir (Pottenger *et al.*, 2000).

Fenolik bileşiklerin toksik davranışı, mitokondriyal enerji üretiminin inhibisyonuyla sitotoksik etkilerin ortaya çıkması şeklindedir (Nakagawa *et al.*, 2000).

Bisfenoller toksisitesini fenil grupları arasındaki hidrokarbon köprünün uzunluğu ve moleküler büyüklüğüne bağlı olarak gösterir. Bu köprüleşmenin başlaması ve uzaması moleküllerin hidrofobisitesinde artış, bisfenollerin biyolojik membranların hidrofobik kısmına doğru geçişini sağlar. Ksenobiyotiklerin, partiyon koefüzyon katsayısıyla yakından ilişkili olan hidrofobisiteyi, biyolojik davranışlarıyla ilgilidir (Atkinson and Roy, 1995a). Hepatositotoksikite ve mitokondriyal disfonksiyon, alkil kenar zincirlerinin moleküler yapısındaki uzama ve buna bağlı oluşan hidrofobisite ile ilgilidir. Hidrokarbon köprünün uzaması moleküllerin hidrofobisitesini arttırarak mitokondriyal disfonksiyona öncülük ederken, fenolik hidroksil grubu ise mitokondriyal solunumun inhibisyonu için gereklidir. Diğer hücrelerde olduğu gibi, hepatositlerde de asıl enerji üretim yeri mitokondrilerdir. Bu bileşikler, oksidatif fosforilasyonda ayrılmaya neden olup, NAD^+ ve FAD 'ye bağlı mitokondriyal solunumu inhibe ederler. BPA gibi çeşitli kimyasallar, nekrozis ve apoptozis gibi durumlarla sonuçlanan mitokondriyal disfonksiyona sebep olur (Kehrer *et al.*, 1990).

BPA' nın indüklediği hücre ölümünün oluşumunda, ATP'nin düşüşü ve buna bağlı olarak hücre iskeletiyle plazma membranı arasındaki etkileşimi de içeren mikrotübül ve mikrofilamentlerin polimerizasyonu da etkilidir (Kadoma and Fujisawa, 2000)

ROÜ'nin oluşturduğu hücresel toksisiteye karşı savunma sağlayan hücredeki antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki düşüş, serbest radikallere karşı hareket eden primer antioksidan sistemdeki azalmayı gösterir. BPA, çeşitli metabolitlere dönüşürken

bu metabolitler de ROÜ ile reaksiyona girerek BPA radikallerine dönüşürler (Bindhumol *et al.*, 2003; Sajiki and Yonekubo, 2003).

Serbest radikaller, antioksidan defans sistemi tarafından temizlenir. Antioksidan enzimlerin aktiviteleri azalırken hidrojen peroksit ve lipid peroksidasyonu artar. Mitokondri, reaktif oksijen ürünlerinin hücrede en çok biriktiği yerdir (Bindhumol *et al.*, 2003). Pek çok hücresel aerobik reaksiyon için gerekli olan oksijen, reaktif membran toksik ara ürünlerinin birikimiyle sonuçlanan elektron transfer reaksiyonlarına girer. Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri membran lipidleri üzerinde oksidatif hasarı başlatarak lipid peroksidasyonuna sebep olur. Oksidatif stres, hücre ölümüne sebep olarak önemli patofizyolojik durumlara yol açarlar. Çeşitli antioksidan mekanizmalar ise hücreleri, serbest oksijen radikallerinin sebep olduğu hasardan korur (Kabuto *et al.*, 2003).

2.3. SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF STRES

Serbest radikaller, eşlenmemiş elektronu bulunan yüksek derecede reaktif moleküler yapılardır ve katıldıkları molekülden yeni bir radikal oluşturarak stabil hale geçerler. İki radikalın reaksiyona girmesiyle ya da eşlenmemiş elektronların bir veya daha fazla moleküle çift oluşturması ile serbest radikal oluşumu sonlandırılabilir (Young and Woodside, 2001).

Serbest radikaller vücutta normal şartlarda da oluşurlar, hücre membranları ve plazma lipoproteinlerindeki nükleik asit, protein ve lipidlerde birikerek hasara yol açarlar. Bu da malignite gelişimi, ateroskleroz, koroner arter hastalığı ve otoimmün hastalıklara sebep olur. Biyolojik sistemlerdeki en zararlı radikaller olan oksijen radikalleri Reaktif Oksijen Ürünleri (ROÜ) olarak isimlendirilir ve bunlar *süperoksit*, *hidroksil* ve *perhidroksil*dir. Vücutta oksijen radikallerinin endojen kaynağını mitokondriyal elektron transport zincirinden (ETZ) kaçan elektronlar oluşturur (Kehrer *et al.*, 1990). Ekzojen kaynaklardan biri olan iyonize radyasyon (x-ray ve UV), OH radikalleri oluşturacak şekilde suyu parçalayabilir. Diğer ekzojen kaynağı oluşturan geçiş metal iyonlarının varlığı ise oksijen veya hidrojen peroksitle enzimatik olmayan yoldan reaksiyona girerek hidroksil radikallerinin oluşumuna öncülük eder (Halliwell, 1995; Murray, 2009; Akkuş, 1995)

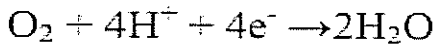
2.3.1. Reaktif oksijen ürünleri

Aerobik organizmaların mutlak gereksinim duyduğu oksijen bir dizi reaksiyonla suya dönüşürken, hücre kendisi için gerekli enerjiyi sağlar (Moini *et al.*, 2002). Oksijen, elektron ilgisi yüksek bir element olup normalde kademeli olarak dört basamakta suya indirgenirken tüm aerobik solunum yapan hücreler tarafından elektron alıcısı olarak kullanılır (Murray, 2009; Akkuş, 1995).

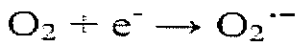
2.3.1.1. Singlet Oksijen; oksijenin elektronlarından birinin dışarıdan enerji alarak kendi spininin ters yönündeki başka bir orbitale yer değiştirmesi ile oluşur. Serbest radikal oluşumuna öncülük etmesi ile önem taşır (Sies, 1999; Akkuş, 1995).

2.3.1.2. Süperoksit radikali; moleküler oksijenin indirgenmesinde ara basamak olup, organizmaya direk zarar vermez. Ancak hidrojen peroksit kaynağıdır ve geçiş metal iyonlarının indirgenmesinde görev alır (Fang *et al.*, 2002).

Mitokondriyal ETZ memelilerde ATP'nin asıl kaynağıdır. Makromoleküllerin yıkılmasıyla açığa çıkan elektronlar, mitokondri iç membranında bulunan elektron taşıyıcılar aracılığıyla moleküler oksijene aktarılıp su oluştururken, mitokondriyal ETZ'den kaçan elektronlar ise moleküler oksijenle direk reaksiyona girerek süperoksit radikalinin oluşumuna sebep olurlar (Kehrer *et al.*, 1990; Valko *et al.*, 2007).



Şekil 3: ETZ'de suyun oluşması



Şekil 4: ETZ'de süperoksitlerin oluşması

İskemi reperfüzyon hasarı ve yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıklar gibi durumlarda mitokondri iç membranında meydana gelen permeabilite artışı mitokondriyal ETZ'den elektron kaçışının en önemli hücresel kaynağıdır (Moini *et al.*, 2002). Hücre mitokondrisinde oluşan süperoksit radikallerinin salınımı iç mitokondri membranından sitozole doğru olur (Kehrer *et al.*, 1990).

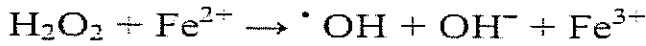
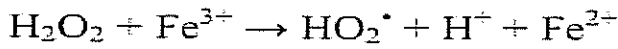
2.3.1.3. Hidrojen Peroksit; membranları kolayca geçerek, sitozole diffüze olan uzun ömürlü bir reaktif oksijen ürünüdür. Süperoksitin ulaşamadığı, membranla korunan bölgelere ulaşırlar ve bu arada süperoksitle reaksiyona girerek hidroksil radikali

oluştururlar. Geçiş metallerinin varlığında da kolayca parçalanarak yine en reaktif ve toksik oksijen bileşiği olan hidroksil radikalini oluştururlar (Young and Woodside, 2001).

Hidrojen Peroksit iki şekilde ortaya çıkar;

1. SOD ile superoksitten,
2. Sitokrom p450 ile oksijen molekülünün iki elektronlu redüksiyonu ile oluşur (Fang *et al.*, 2002).

2.3.1.4. Hidroksil Radikali; Bütün moleküllerle reaksiyona girebilen çok reaktif bir yapıda olup en güçlü oksidandır. Geçiş elementleri varlığında; hidrojen peroksit, hidroksil radikale dönüşür. Stabil lipid hidroperoksitlerinin peroksi ve alkoksi radikallerine dönüşümünü hızlandırır (Halliwell, 1995).



Şekil 5: Hidrojen peroksitin Fe^{+3} ve Fe^{+2} ile reaksiyonu

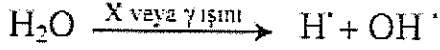
Demir, fenton reaksiyonu yoluyla en güçlü serbest radikal olan hidroksil radikalini oluşmasını sağlar (Halliwell, 1995). Hücre içinde serbest demir yoktur. Oksidatif stres durumunda biriken fazla miktardaki süperoksit nedeniyle, demir içeren moleküllerden serbest demirin salınımı gerçekleşir. Demirin süperoksit etkisiyle salınımı, fenton reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için ortamda gerekli olan demiri sağlayarak reaktifliği oldukça yüksek olan hidroksil radikallerinin oluşmasına aracılık eder (Young and Woodside, 2001; Valko *et al.*, 2007).

Haber-Weiss reaksiyonunda ise hidrojen peroksit, süperoksitle reaksiyona girerek hidroksil radikallerini oluşturur (Liochev and Fridovich, 2002).



Şekil 6: Haber Weiss Reaksiyonu

Geçiş elementlerinin aracılığı dışında hidroksil radikalini oluşumu; suyun yüksek enerjili iyonizan radyasyona ya da hidrojen peroksitin ultraviyole ışığa maruz kalması ile de olabilir (Halliwell, 1995) (Akkuş, 1995).

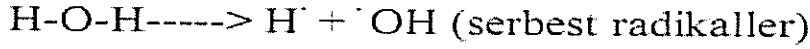
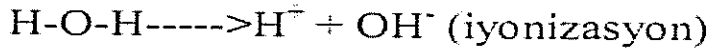


Şekil 7: İyonizan radyasyonla hidroksil radikalının oluşumu



Şekil 8: Ultraviyole ışınla hidroksil radikalının oluşumu

Ekzogen serbest radikal kaynaklarından radyasyonun indirek etkisi, atoma enerji transferi sonucu serbest radikallerin oluşmasına sebep olabilir (Halliwell, 1995) (Akkuş,1995)



Şekil 9: İyonizasyon

Hidroksil radikali, hücrel DNA hasarı oluşumundan ve iyonize radyasyonun membranlarda meydana getirdiği etkiden sorumludur. Çoklu doymamış yağ asidi gibi çeşitli moleküllerden proton kopararak lipid peroksidasyon sürecini başlatır.

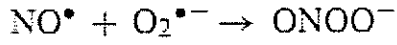
Oksijenden derive olan ek reaktif radikaller peroksil radikalleridir ($\text{ROO}^\bullet$). En basit peroksil radikali $\text{HOO}^\bullet$ olup, süperoksitin protonlanmış şeklidir (de Grey, 2002).

2.3.2. Reaktif Nitrik Oksit Ürünleri

Nitrik Oksit, eşlenmemiş elektronu olan küçük bir moleküldür. Biyolojik sistemlerde spesifik Nitrik Oksit Sentetaz (NOSs) tarafından sentezlenir. NOS, moleküler oksijen, arjinin ve NADPH üzerine etki ederek NO, sitrülün ve NADP üretir. Bu süreç için FMN, FAD, Hem, Kalmodulin ve Tetrahydropteridin gereklidir. Arginin, sitrülüne beş elektronlu oksidatif reaksiyonla nitrik oksit oluşturacak şekilde dönüştürülür.

Nitrik oksit çok reaktif bir radikal olup önemli bir oksidatif biyolojik sinyal molekülü olarak nörotransmisyon, kan basıncı düzenlenmesi, defans mekanizmaları, düz kasların gevşemesi ve immün regülasyon gibi çok çeşitli fizyolojik süreçlerde rol alır. Sıvı ortamda birkaç saniyeden daha kısa bir yarı ömre sahipken düşük oksijen konsantrasyonu olan ortamlarda daha stabildir. Hem sulu hem de yağlı ortamda çözünmediği için sitoplazma ve plazma membranından difüze olabilirler. Nitrik Oksit,

hücre dışı alanda oksijen ve suyla reaksiyona girerek nitrat ve nitrit anyonlarını oluşturur (Valko *et al.*, 2007).



Şekil 10:Peroksinitrit oluşumu

İmmün sistemde oksidatif patlama sırasında hem superoksit anyonu hem de nitrik oksit anyonu önemli miktarda daha oksidatif madde oluşturacak şekilde reaksiyona girebilirler. Yüksek NO düzeyleri peroksinitrit oluşumuna, demir sülfür hasarına, tiyolün nitrözlenmesine ve daha başka reaktif ve toksik ürünlerin oluşmasına sebep olur. Superoksit radikali nitrik oksitle reaksiyona girerek reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitriti oluşturur. Kendisi de bir radikal olan nitrik oksidin etkisi inhibe olurken oluşan peroksinitritlerin proteinler üzerine direk zararlı etkileri vardır. Proteinlerin yapısını bozarak normal fonksiyonlarını inhibe edebilirler. Oluşan peroksinitrit anyonu, DNA kırıklarına ve lipit peroksidasyonuna neden olabilen güçlü bir oksidatif ajandır (Carr *et al.*, 2000).

Reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri, immün sistemde ve çeşitli sinyal iletim yollarında önemlidir. Aynı zamanda sinyal molekülleri olan reaktif oksijen ve nitrojen moleküllerinin yüksek düzeyleri, hücresel makromoleküllere zarar vererek çeşitli kronik hastalıkların patogenezi ve progresyonunda önemlidir (Moini *et al.*, 2002). Metabolik olaylar sırasında oluşabildikleri gibi radyasyon, ilaç ve kimyasal maddeler gibi dış etkenlerle de oluşabilen serbest radikaller, dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron taşımalarına bağlı olarak kararsız yapı gösterirler ve ömürleri çok kısadır. Etraflarındaki moleküllerle etkileşime girerek elektron almaya, böylece bir an önce kararlı hale dönmeye çalışırlar. Serbest radikal oluşumunda artış veya antioksidan sistemdeki yetersizliğe bağlı olarak organizmada oksidatif stres gelişir. Reaktif oksijen radikallerinin oluşturduğu doku hasarı, oksidatif hasar olarak isimlendirilir, oksijen radikal hasarından koruyan maddeler de antioksidanlar olarak bilinir (Young and Woodside, 2001; Akkuş, 1995; Murray, 2009)

2.3.3. Serbest Radikallerin hücredeki biyomoleküllere etkileri

Serbest radikal üretimi ile antioksidan defans arasındaki dengenin bozulmasına bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stres; hücredeki lipit, protein ve nükleik asitler gibi

biyomolekülleri etkileyen geniş bir hasarla ilişkilidir. Lipoprotein partikülleri veya membranla lipit peroksidasyonu sürecine girer. Oluşan kısa zincirli aldehitler (MDA, 4-hidroksi nonenal, alkanlar, alkenler, konjuge dienler, hidroperoksitler), lipit peroksidasyonu göstergesidir (Fang *et al.*, 2002).

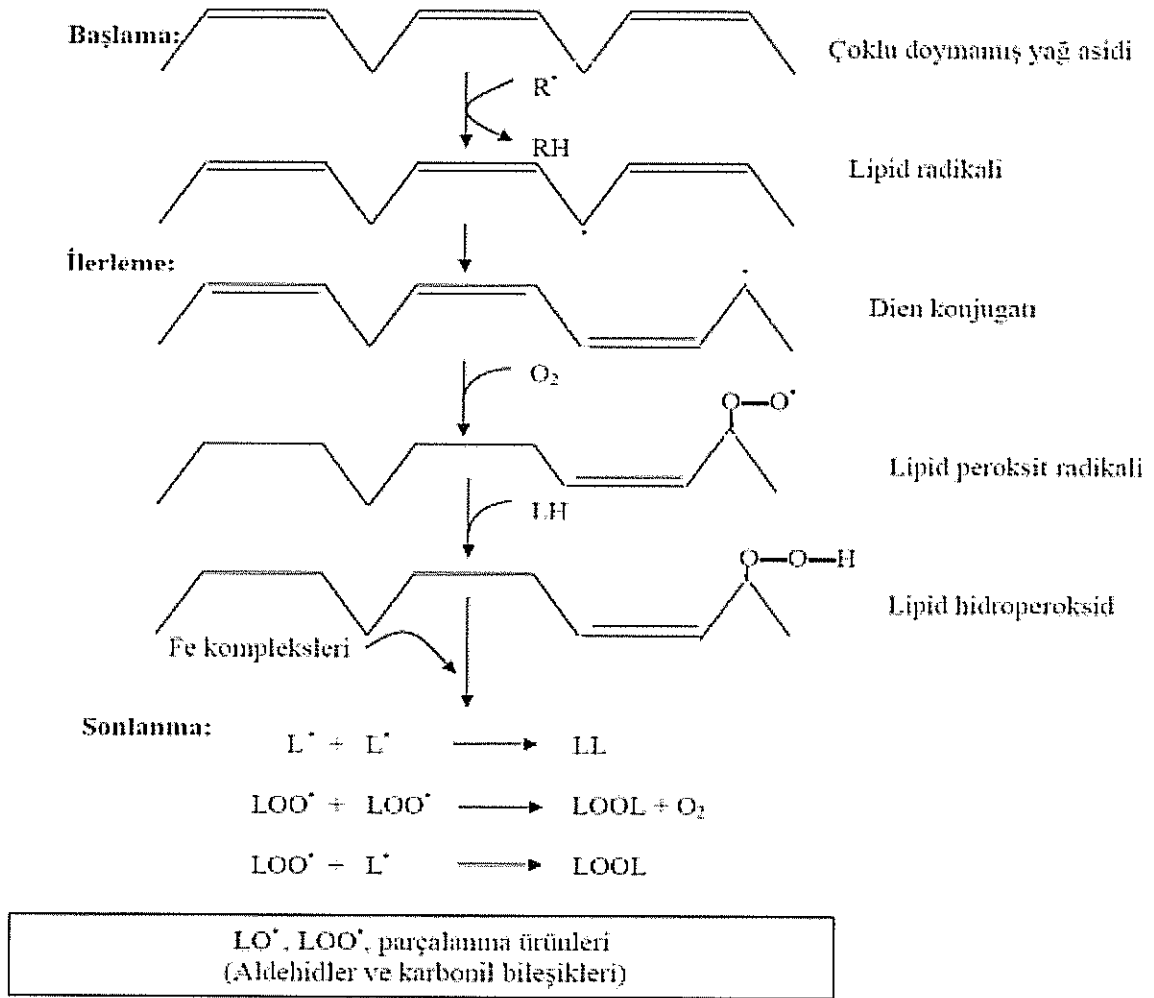
2.3.3.1. Lipit Peroksidasyonu

Oksidatif stres sonucu meydana gelen serbest radikallerin başlattığı lipit peroksidasyonu, hücre membranında yer alan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açan kimyasal bir olaydır. Lipit peroksidasyonunu başlatan başlıca radikaller; superoksit, hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleridir. İlk üretilen serbest radikaller kısa yarı ömürlerinden dolayı lokal etkilere sahiptirler. Sonrasında oluşan lipit peroksitleri, uzamış yarı ömürleri ve serbest radikallere göre oluştukları yerden daha kolay difüze olabilmelerine bağlı olarak oksidatif stres ikinci mesajcıları gibi davranırlar. Aldehitlerden oluşan yıkım ürünleri lipit peroksidasyonunun toksik son ürünlerini oluştururlar. Kimyasal reaktivitelerine bağlı olarak bu yıkım ürünleri nükleik asit, protein ve lipitler gibi makromoleküller üzerinde biyolojik etkilere sahiptir (Akkuş, 1995; Murray, 2009). Lipit peroksidasyonu nedeniyle membran geçirgenlik ve akışkanlığında oluşan bozulma, hücre bütünlüğünün bozulmasına sebep olur (Gueraud *et al.*, 2010).

Lipit peroksidasyonunun en yaygın substratları kolesterol ve fosfolipitlere ait yağ asitleridir. Bu süreci başlatan en önemli etkenler; enzimler, serbest radikaller, metal iyonları, UV radyasyon, ısı, çeşitli kimyasallar ve ilaçlarla ortaya çıkan reaktif oksijen ve nitrojen ürünleridir (Halliwell, 1995).

Lipit peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asidi zincirlerindeki alfa metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaşmasıyla başlar. Hidrojen molekülünün lipit zincirinden çıkarılması sonucu yağ asidi zinciri, lipit radikali özelliği kazanır. Bu lipit radikali dayanıksız bir bileşik olup bir dizi değişikliğe uğrar. İlk önce molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle (rezonans) dien konjugatları oluşur, daha sonra oksijenin eklenmesiyle hızlı bir şekilde lipit peroksil radikaline dönüşür. Bu basamakla oluşan primer bileşikler; daha stabil fakat hala reaktif ve potansiyel olarak toksik sekonder bileşikler olan peroksil ve alkoksil radikallerini ($ROO\cdot$, $RO\cdot$) oluşturur (Gueraud *et al.*, 2010).

Lipit peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer doymamış yağ asidi moleküllerinden hidrojen atomlarını çıkartarak yeni reaksiyonlar başlatırken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine dönüşür. Lipit hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile lipit peroksidasyon reaksiyonları sona erer (Akkuş, 1995).



Şekil 11: Çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu

Biyomembran, hücrenin çevreyle arasındaki bariyeridir. Çevresel stresle hücre arasındaki ilk ilişkiyi ve defans mekanizmasını oluşturur. Sıvı mozaik modeline göre membran, lipitler ve hidrofobik integral componentleri olan akışkan bir yapıdır. İçinde protein yapıların gömülü olduğu lipit çift tabakadan oluşur. Membran, hücre içeriğini çevreden ayıran temel yapıdır ve hücredeki organelleri çevreleyerek fonksiyonlarını tanımlar. Yapı, içerik ve akışkanlığın bozulması anormalliklere sebep olur. Akışkanlık,

lipit tabakanın her iki tarafındaki fosfolipit moleküllerdeki çoklu doymamış yağ asitlerinin varlığıyla tanımlanır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyon ürünleri ilk olarak membran molekülleri, fosfolipitler ve membran proteinlerini etkiler. Membran lipit ve proteinlerinin modifikasyonu, membran fonksiyonu ve akışkanlığında bozulmaya neden olur (Gueraud *et al.*, 2010). Hücre membranında meydana gelen lipit peroksidasyonu sonucu membran transport sistemleri etkilenir ve böylece hücre içi ve dışı iyon dengeleri bozulur. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artışıyla proteazlar aktive olur (Chirico *et al.*, 1993; Halliwell, 1995).

Peroksit radikalleri bir kez oluştuktan sonra öncelikle endoperoksitlere ve daha sonra da peroksidasyon sürecinin final ürünü olan Malondialdehite (MDA) dönüşür (Marnett, 1999). Hücre membranı ve plazma lipoproteinlerindeki doymamış yağ asitlerinin radikal hasarına uğraması sonucu oluşan lipit peroksitleri kimyasal olarak protein ve nükleik asit bazlarını da modifiye edebilen yüksek derecede reaktif dialdehitlerin oluşumuna öncülük eder (Murray, 2009). Bunlardan en önemlisi olan MDA'nın DNA üzerine etkisi, baz çifti yerdeğiştirmelerine bağlı olarak mutajenite oluşturmaktadır (Gueraud *et al.*, 2010). Lipit peroksidasyonunun Malondialdehit dışında en önemli ürünü ise 4-hidroksi 2-nonenal (HNE) dir. Oluşan aldehitlerden en iyi bilinenleri MDA ve HNE'dir. Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan aldehitler de sitotoksik etkilere sahiptir. Diffüze olarak hasarı hücrenin diğer bölgelerine yayarlar. MDA ölçümü ile lipit peroksidasyonu değerlendirilir (Chirico *et al.*, 1993; Halliwell, 1995; Chisolm and Steinberg, 2000; Fang *et al.*, 2002). Vücudun radikallere maruziyeti, lipit peroksidasyon ürünlerinin ölçülmesiyle hesaplanır. Lipit peroksitlerinden oluşan ürünler olan dialdehitler, tiobarbitürik asitle reaksiyon sonrasında kırmızı floresan veren ürünler oluşturmalarıyla ölçülebilir (Murray, 2009).

Lipit peroksidasyonu son ürünlerinin en iyi bilinen etkilerinden biri LDL modifikasyonundaki rolüdür (Chisolm and Steinberg, 2000). LDL'ye ait protein veya lipitlerin kimyasal modifikasyonunda anormal LDL'ler oluşur, bunlar karaciğerdeki LDL reseptörleri tarafından tanınmayıp karaciğer tarafından temizlenemezler. Modifiye LDL'lerin, temizleyici makrofaj reseptörleriyle alınmasıyla meydana gelen lipit yüklü makrofajlar (köpük hücreleri) kan damarı endoteline infiltre olurlar. Köpük hücrelerinin birikimi erken aterosklerotik lezyonların karakterini oluşturan yağlı çizgilere neden olur. Buradaki endotele bir miktar hasar verirken biriktirdikleri esterleşmemiş

kolesterolün yüksek yoğunluğu neticesinde ölürlür. Bu durum kan damarını tıkayabilen bir aterosklerotik plağın gelişimi sırasında görülebilir (Ross, 1993).

LDL oksidasyonu, LDL'lerin vasküler hücreler tarafından oluşturulan reaktif oksijen ürünleri ve lipit peroksidasyon ürünlerinden etkilenmesi neticesinde subintimal boşlukta ortaya çıkan yavaş bir oksidasyon sürecidir. Bu süreç, lipit peroksidasyon ürünlerinin çokluğuyla ilgilidir. Aldehitler, apo B'lerin lizin rezidüleri ile reaksiyona girerler. Makrofajlar dışındaki bütün hücre tiplerinde eksprese olan reseptörler, LDL'nin geri alınması için gereklidir (Steinbrecher, 1999). LDL'nin modifikasyonu ise bu reseptörler tarafından alınımı etkileyerek, LDL'yi makrofajlar tarafından metabolize edilmeye yönlendirirler. 4 HNE ve MDA gibi aldehitler, LDL'leri direk olarak modifiye ederek makrofajlarla metabolize edilmelerini sağlar (Chisolm and Steinberg, 2000)

2.3.3.2. Protein Oksidasyonu

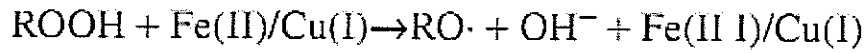
Protein oksidasyonu, proteinlerin direk olarak ROÜ veya oksidatif strese bağlı oluşan sekonder ürünlerle reaksiyonu sonucu meydana gelen kovalen modifikasyonudur (Dalle-Donne *et al.*, 2005).

Peptid bağları, prolin ve lizin gibi aminoasitler serbest radikallerden etkilenir. Histidin, tirozin, fenilalanin gibi aminoasitler karbonil gruplarının oluşumu şeklinde etki gösterirler. Proteinlerin özellikle sistein ve metiyonin aminoasit rezidülerini bulunduran yan zincirleri reaktif oksijen ve nitrojen ürünleriyle oksidasyona duyarlıdır. Lipit peroksidasyonunun aldehit yapıdaki ürünleri, sisteinin sülfidril grupları ile veya lizin ve histidinler ile kovalent bağlar oluşturarak proteinlerde fragmentasyon ve çapraz bağlanmalar yapar (Stadtman, 2004). Yapıları bozulan proteinler, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Reseptör proteinleri, sinyal ileti mekanizmaları, yapısal proteinler, transport proteinleri ve enzimler bu durumdan etkilenir. ROÜ'ye bağlı olarak meydana gelen protein oksidasyonu özellikle lizin, arjinin ve prolin aminoasit rezidülerinin karbonil ürünlerine dönüşmesine sebep olur. (Stadtman and Levine, 2003; Stadtman, 2004). Çeşitli mekanizmalarla meydana gelen karbonil gruplarının konsantrasyonu, ROÜ aracılı protein oksidasyonunun iyi bir göstergesidir. Protein karbonil gruplarının ölçümü için yüksek duyarlılıkta metodlar geliştirilmiştir (Dalle-Donne *et al.*, 2005).

Protein zincirinin oksidasyonu, aminoasit rezidüsündeki alfa hidrojen atomunun, hidroksil radikali tarafından koparılması ile başlar. Bu reaksiyon için gerekli olan

hidroksil radikali, suyun radyolizis ile parçalanmasıyla ya da hidrojen peroksitin metal ile katalizlenen reaksiyonu ile ortaya çıkmaktadır (Berlett and Stadtman, 1997).

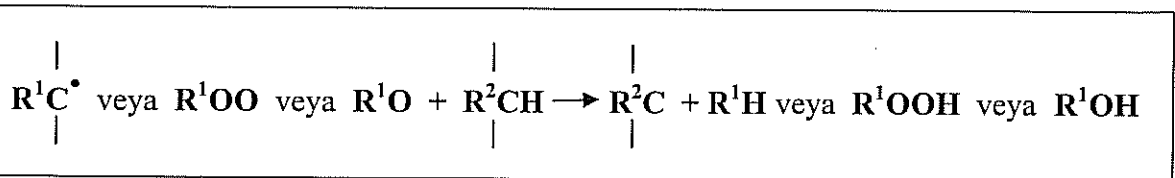
Metalle katalizlenen oksidasyon sistemleri, oksidatif hasarın en önemli kaynağını oluşturur. Peroksitler, reaktif olmayan bileşikler olduğu halde, geçiş elementlerinin varlığında reaktivliği yüksek olan hidroksil veya alkoksil radikallerine dönüşürler ve bütün organik bileşiklerle reaksiyona girebilirler.



Şekil 12: Peroksitlerin hidroksil ve alkoksil radikallerine dönüşümü

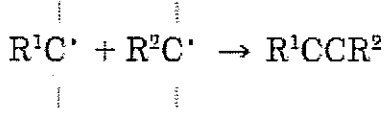
Demir veya bakır iyonlarının, proteinler üzerindeki metal bağlayıcı gruplara bağlanması hızlı bir şekilde reaktif ürünlerin oluşumunu başlatır. Geçiş iyonlarının ve hidrojen peroksitin düşük konsantrasyonda olduğu her tür fizyolojik durumda metal bağlayıcı gruplarda oluşturulan aminoasit rezidülerinin modifikasyonu ile bağlanmaları engellenerek protein hasarı sınırlandırılır (Stadtman and Levine, 2003).

Hidroksil radikalının başlattığı reaksiyon sonucunda oluşan karbon merkezli radikal, oksijen ile hızlı bir şekilde reaksiyona girerek ara ürün olan ‘alkilperoksil’ radikalini oluşturur. Daha sonra alkil peroksit oluşumu, alkoksil radikalının meydana gelmesi ile devam eder ve böylece hidroksillenmiş protein ürünleri oluşur. Bu yoldaki basamakların çoğu demir veya bakır iyonlarıyla katalizlenir. Oluşan alkil, alkilperoksil ve alkoksil ara ürünleri, aynı ya da farklı protein yapılarıdaki diğer aminoasit rezidüleri ile reaksiyona girerek yeni karbon merkezli radikaller oluşturabilir.



Şekil 13: Karbon merkezli radikaller ve hidroksillenmiş protein ürünleri

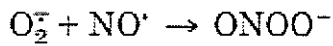
Ortamda oksijenin bulunmadığı durumlarda oluşan karbon merkezli radikal başka bir karbon merkezli radikalle reaksiyona girerek çapraz bağlı protein ürünleri oluşturabilir.



Şekil 14: Çapraz bağlı proteinlerin oluşması

Alkoksil radikallerinin oluşumu ve birikimi, peptid bağlarının diamid ya da alfa amidasyon yollarıyla kırılmasını başlatır. Sistein ve metionin rezidüleri gibi sülfür içeren aminoasitler, her çeşit RO $\cdot$ tarafından oluşturulacak oksidasyona duyarlıdır. Sistein rezidülerinin disülfidlere, metionin rezidülerinin ise metionin sülfoksit rezidülerine dönüşümü, tamir edilebilen tek protein modifikasyonudur. Bütün biyolojik sistemler, okside sistein ve metionin rezidülerini tekrar eski haline çevirebilecek redüktazlara sahiptir. Metionin rezidülerinin bu oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları, RO $\cdot$ 'ni aktif olmayan ürünlere çevirip ortadan kaldırarak antioksidan bir sistem kurar (Berlett and Stadtman, 1997). Aromatik aminoasit rezidüleri olan tirozin, triptofan, fenilalanin de RO $\cdot$ 'nin hedefidir (Stadtman and Levine, 2003).

Arginin metabolizmasının ürünü olan nitrik oksitin, süperoksit anyonuyla reaksiyona girmesiyle oluşan peroksinitrit, proteinlerdeki triptofan, tirozin, sistein, metionin rezidülerini etkileyerek, çeşitli hastalıkların gelişiminde rolü olan peroksinitrit aracılı hasarın oluşmasına neden olur (Murray, 2009).



Şekil 15: Peroksinitrit oluşumu

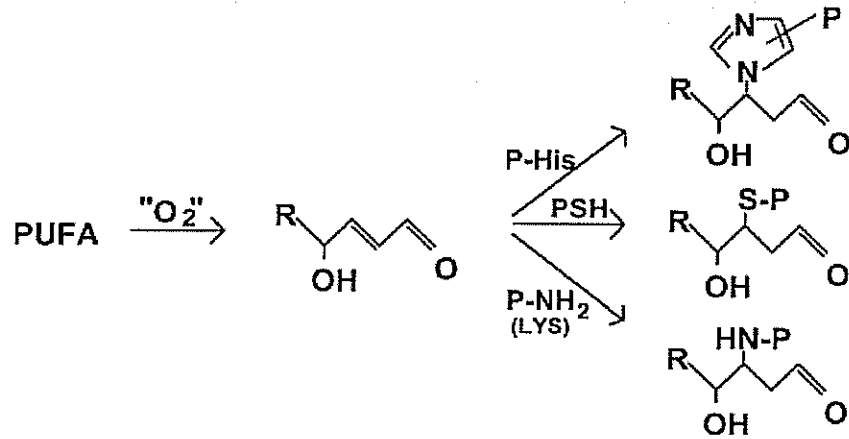
Düzenleyici proteinlerdeki tirozin rezidülerinin peroksinitrit aracılığıyla nitratlanması, hücrel düzenlenmedeki en önemli mekanizmalardan birini oluşturmaktadır. Tirozin rezidülerinin fosforillenmiş ve fosforillenmemiş şekilleri arasındaki dönüşüm özellikle sinyal iletim yollarında önemlidir. Bu yüzden tirozin rezidülerinin nitratlanması, protein tirozin kinazların oluşturacağı fosforilasyona engel olarak enzimi inaktif konfigürasyonda kilitleyen dönüşümsüz bir süreçtir (Berlett and Stadtman, 1997; Stadtman and Levine, 2003).

Lipit peroksidasyon ürünleri olan reaktif aldehitler membranlardan kolayca difüze olabildikleri için reaktif aldehitlerin hücredeki modifiye proteinlere kovalent olarak bağlanmalarıyla protein modifikasyonu meydana gelir (Gueraud *et al.*, 2010). Metabolik ve yapısal proteinlerin oksidatif modifikasyonu, protein disfonksiyonunda önemli rol oynar.

Proteinlerdeki karbonil içeriği, oksidatif hasarın en yaygın belirleyicisidir. Yaşlanma ve kronik hastalık sürecinde biriken lipit peroksidasyonu sırasında ve karbonhidratların glikozidasyonu sırasında endojen olarak meydana gelen reaktif karbonil bileşikleri, dokusal proteinler üzerinde çapraz bağlar oluşturarak bütün dokularda progresif protein disfonksiyonunu indükler (Petersen and Doorn, 2004; Dalle-Donne *et al.*, 2005).

Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan reaktif derivate aldehitlerin en önemli toksik etkileri, protein ve peptidlere çapraz bağlanmaları sonucu oluşur. MDA, lipit peroksidasyonu sırasında en çok oluşan aldehit olup schiff bazı oluşturmak için lizin rezidüleriyle reaksiyona girer. Aldehit ürünlerin proteinlerde birikimi, yaşlanma sırasında biriken lipofuskin isimli floresan pigmentlerin oluşumuna sebep olur. Proteinlerde oluşan etki sadece rezidülerin selektivitesi ile ilgili olmayıp hedef aminoasitlerin proteinin fonksiyonu ve yapısındaki önemiyle ilgilidir. Alfa beta doymamış karbonil yapısı konjuge bir sistem olup hareketli π elektronlarına sahiptir. Karbonil oksijen atomu elektronegatifdir ve bölgesel elektron hasarına neden olabilir. Elektron polarizabilite temeline göre elektrofilik özellikteki acrolein ve HNE, sisteinin nükleofilik sülfidril tiyolat grupları ile 1,4 Michael tipi ürünler oluşturmaktadır. Bu anyonik rezidüler, hücresel metabolizmada anahtar görevi olan çeşitli proteinlerin katalitik kenarındaki nükleofilik içeriğin merkezini oluşturur. Bundan dolayı da acrolein veya HNE tarafından bu düzenleyici tiyolat gruplarının eklenmesi protein fonksiyonunun redoks kontrolüne zarar verecek ve sitotoksiste oluşacaktır.

Lizin ve histidin rezidüleri nitrojen gruplarının ve aynı zamanda tip 2 alkenlerin hedefidir (Gueraud *et al.*, 2010).



Şekil 16: Protein karbonil ürünleri

Protein karbonil ürünlerinin üretimi peptid bağının alfa amidasyon yoluyla oksidatif yıkımı neticesinde ve glutamil rezidülerine bağlı yıkımında ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, proteinlere karbonil grupları lipit peroksidasyonu sırasında oluşan aldehitlerle (HNE, MDA) reaksiyon sonucu ve redükte şekerler veya bunların oksidasyon ürünlerine sekonder olarak da oluşabilir. Lipit peroksidasyon ürünlerinden en önemli iki aldehitten biri olan MDA, proteinlerdeki lizinin alfa amino grubuyla schiff baz oluşturarak karbonil fonksiyonu ortaya çıkarır. Bu mekanizmalardan herhangi biriyle ortaya çıkan proteinlerin karbonil grupları, aynı ya da farklı proteinin lizin rezidülerinin alfa amino gruplarıyla daha ileri reaksiyona girerek molekül içi veya moleküller arası protein çapraz bağları oluşturur.

ROÜ aracılı oksidasyon reaksiyonlarının en önemli ürünleri olan protein karbonil gruplarının ölçümüne dayanan metodlar geliştirilmiş ve oksidatif stres, yaşlanma ve hastalık durumlarında karbonil gruplarının tespiti oksidatif hasarın göstergesi olmuştur (Stadtman and Levine, 2003). Aldehitler hücresel ve dokusal proteinler ile reaksiyona girerek protein disfonksiyonunu indükleyen ve hücresel cevabı başlatan ürünler oluşturur (Petersen and Doorn, 2004). Yaşlanma, proteolitik kapasitenin azalmasıyla ilgilidir. Çok sayıda enzimin katalitik olarak daha aktif ve ısıya daha duyarlı formları oluşur. Protein konformasyonunda ısı denatürasyonuna daha duyarlı ve daha az aktif formların olduğu spontan değişikliklere proteinlerin okside şekillerini yıkabilecek olan proteozomların inhibe edilmesi, bu okside protein şekillerinin yıkılamayıp birikmesi, yaşlanma ile ilişkili hastalıkların da sebebi olabilir.

Nörodejeneratif hastalıklarda beyinde tesbit edilen aldehit ürünleri beyin hasarı sırasındaki oksidatif stresin varlığını güçlü bir şekilde kanıtlar (Matson and Chan, 2003; Lenner et al., 2003)

Protein Oksidasyonu, proteinlerin reaktif oksijen ürünleriyle indüklendiğini gösteren son ürünler, protein karbonilleri, proteinlerdeki serbest tiyol gruplarının kaybı ve proteinlere bağlı tirozin rezidülerinin nitratlanmasıdır. Protein nitrotirozinleri, reaktif nitrojen merkezli oksidanların üretimini gösterebilmek açısından geniş olarak kullanılır (Fang *et al.*, 2002; Stadtman and Levine, 2003).

İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (AOPP)'nin plazma seviyeleri okside proteinlerin önemli işareti olan ditirozin düzeyleriyle orantılıdır. Pentazidin ise oksidatif stresle ilişkili protein glikozilasyon belirtecidir. AOPP'ler, glikozilasyon son ürünlerine (AGE) yapısal benzerlik gösterdikleri için benzer biyolojik aktivite gösterirler ancak AGE'ler daha çok kronik stresi gösterir (Demirbilek ve ark.,2007).

AOPP ilk kez 1996'da tanımlanmış ve üremiyle ilgili hastalıklardaki serbest radikal aktivitesinin ölçümünde ve çeşitli bileşiklerin antioksidan karakterinin ölçümünde kullanılmıştır. AOPP düzeylerinin, protein oksidasyonunun göstergesi olan plazma ditirozin ve ileri glikozilasyon son ürünü (AGE) olan pentozidin düzeyleri ile orantı gösterdiği fakat lipid peroksidasyon belirteci olan tiyobarbütirik asit ile reaksiyona giren maddelerle korelasyon göstermediği bildirilmiştir. Tirozin gibi aminoasit rezidülerinin oksidasyonu neticesinde ditirozin oluşumu, protein agregasyonu, çapraz bağlanma ve yıkılıma yol açar. Ditirozin içeren proteinlerin çapraz bağlanma ürünleri izole edildiğinde ileri glikozilasyon son ürünlerine referans olarak ileri protein oksidasyon ürünleri tanımlanmıştır (Witko-Sarsat *et al.*, 2003).

2.3.3.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlar üzerine etkisi

İnflamatuvar eklem hastalıklarında sinovyal sıvıda artan hidrojen peroksit ve süperoksit ile hyalüronik asitin parçalandığı gösterilmiştir. İleri glikozilasyon son ürünleri (AGEs); karbonhidratlarla proteinlerin serbest amino grupları arasındaki reaksiyonlar sonucu oluşan kompleks ürünler grubunu oluşturur (Dalle-Donne *et al.*, 2005). Geçiş elementlerinin varlığında glukoz, reaktif ketoaldehitlere ve süperoksite dönüşür. Oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi gerçekleşirken solunum zincirinde bu reaksiyon zinciri ile süperoksit ve hidrojen peroksit üzerinden hidroksil radikali oluşur.

Hücre içi glukoz oksidasyonunun artması ile NADH oluşumunda artış gerçekleşirken solunum zincirindeki süperoksit radikali üretimi artar.

AGE'lerin oluşumu, diabetes ve hiperglisemide proteinlerle lipid peroksidasyon son ürünlerinin oluşturduğu diğer bir etkileşimdir. Alfa oksoaldehitler olarak isimlendirilen diğer bir ALE sınıfı, asıl olarak Schiff bazı oluşumuyla sonuçlanan Maillard reaksiyonundan oluşturulur. Bu reaksiyonu enzimatik olmayan bir glikozilasyon reaksiyonu takip eder; lipid peroksidasyonundan üretilen oksoaldehitlerin, lizin ve arginin rezidüleriyle AGEs oluşturmaları için Amadori ürünlerinin oluşumuyla takip edilir (Gueraud *et al.*, 2010).

2.3.3.4. Serbest radikallerin DNA ve Nükleik asitler üzerine etkisi

DNA bazlarıyla etkileşim, tamir edilmediği durumda kalıtımla aktarılabilen kimyasal değişikliklere sebep olabilir. Hidroksil radikali, DNA molekülünün bütün komponentleriyle, pürin ve pirimidin bazlarına ve deoksiriboz yapıya zarar vererek etkileşir (Halliwell, 1995). Hidroksil radikalının DNA moleküllerinde ve yakınlarında bulunup etkili olabilmesiyle ilgili olası mekanizma, membranı kolayca geçebilen hidrojen peroksitin nükleusta demir veya bakır iyonlarıyla reaksiyonudur (Haber Weiss ve Fenton Reaksiyonları). Çok sayıda negatif yüklü fosfat grubu içeren DNA, çeşitli kanyonları bağlayabilme yeteneğine sahip büyük bir anyondur. Aktif geçiş metal iyonlarının bağlanması, DNA molekülünü hidrojen peroksitin hedefi haline getirir. Oksidatif stres altındaki hücrede, reaksiyonların sonucunda meydana gelen hidroksil radikalleri hücre içindeki demir ve bakır içeren proteinlerden serbestleşirler (Halliwell, 1987). DNA Baz Oksidasyonunun ölçümü, DNA baz oksidasyonuna bağlı olarak oluşan spesifik ürünlerin ölçümüne dayanmaktadır. Bunlardan en önemlileri; 8-hidroksi deoksiguanozin, 5-OH sitozin, 8-OH Guanin ve Timin Glikol'dür. Serbest Radikallerin direk ölçümü ise; elektron spin rezonansı ile olur. Biyolojik dokularda yüksek su içeriğinden dolayı çok anlamlı değildir. DNA lezyonuyla ilgili en geniş çalışma 8-OH-Guanozin oluşumuyla ilgili yapılmıştır. Oksidatif hasar sonucu oluşan bu kalıcı genetik modifikasyon ise mutagenез, karsinogenез ve yaşlanmanın ilk basamağını oluşturmaktadır (Fang *et al.*, 2002).

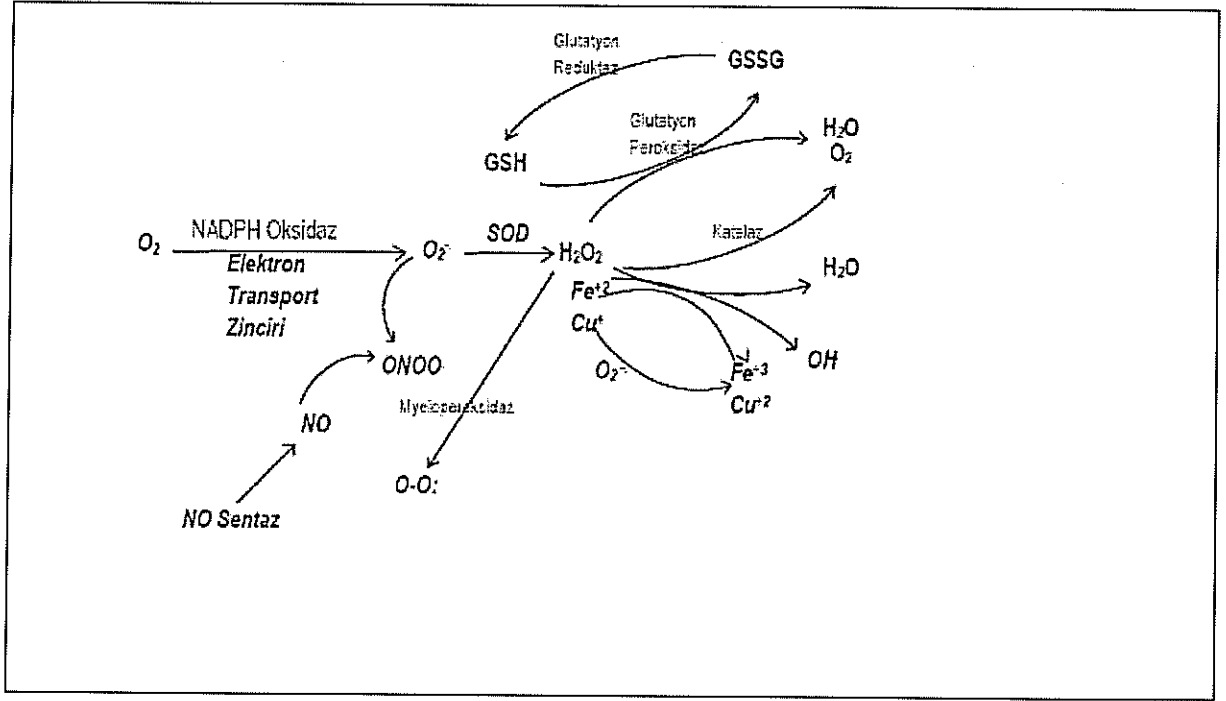
2.4. ANTİOKSİDANLAR

Antioksidanların fizyolojik rolü, hücresel komponentleri serbest radikallerin neden olduğu kimyasal reaksiyonların sonuçlarından korumaktır. Yüksek reaktiviteye sahip serbest radikaller diğer moleküllere elektron verebilir ya da onlardan elektron alabilirler. Yüksek reaktiviteleri sonucu bütün radikaller kısa yarı ömre sahiptir. Endojen ya da çevresel faktörlerle çeşitli mekanizmalar sonucu ortaya çıkan serbest radikallerin birikerek iç mitokondriyal membrandaki elektron transport zincirinin çeşitli komponentlerine bağlanması çeşitli elektronların mitokondriyal matrikste birikmesine ve süperoksit oluşumuna sebep olur. Karaciğerde çeşitli enzimlerin aktivitesi ve respiratuvar patlama sırasında fagositik hücreler superoksit oluşumuna sebep olur. Hidrojen peroksit varlığında myeloperoksidaz, bakterilerin makrofajlar tarafından fagositozunda önemli olan hipoklöröz asit ve singlet oksijeni oluşturur. Superoksit üreten herhangi bir biyolojik sistem, spontan dismutasyon reaksiyonunun sonucu olarak üretilen zayıf bir radikal olan hidrojen peroksiti proteinlere ve reaktif tiyol grubu içeren enzimlere direk zarar verebilen hidroksil radikaline dönüştürür. Hidroksil radikali, doku hasarına neden olan bütün ROÜ'nin patolojik etkilerini göstermelerine aracı olan son ürünüdür. Hidroksil radikallerinin oluşumu için en önemli yol, periyodik tablonun 'd' bloğundaki elementler olan 'geçiş metalleri' ile ilgili olanıdır. Demir ve bakır bunların en önemlileridir. Bir veya daha fazla eşlenmemiş elektronu bulunan geçiş metallerinin serbest radikal biyolojisindeki anahtar rolü tek bir elektronun transferiyle ilgili reaksiyonlara girebilmesine dayanır. Proteinlere bağlı demir dışında küçük bir demir havuzu, demire bağlı fenton reaksiyonlarının katalizlenmesini ve hidroksil radikalının oluşumunu başlatır. Endojen reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan serbest radikallerin yanı sıra ekzojen çevresel faktörlerin de radikal oluşturucu etkileri vardır. Antioksidanlar, oksidanları inaktif hale getiren maddeler olup normal şartlarda oksidan ve antioksidan maddeler denge halindedirler. Dört farklı mekanizma ile oksidan maddeleri etkisiz hale getirirler.

1. Scavenging (süpürme) Etkisi: Enzimler tarafından yürütülen, oksidanları zayıf moleküllere çevirmeye dayalı etkidir.
2. Quencher (baskılama) Etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirilmesine dayanan bu etki vitamin ve flavonoidler aracılığıyla oluşturulur.
3. Repairing (onarıcı) Etkisi; Radikallerin oluşturduğu hasarın onarılmasıdır.

4. Zincir Koparıcı Etki: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarının engellenmesi şeklindeki bu etki hemoglobin, serüloplazmin ve E vitamini tarafından oluşturulur(Young and Woodside, 2001).

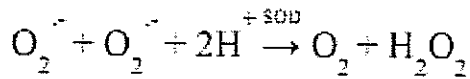
2.4.1. Enzimatik antioksidanlar



Şekil 17: Antioksidan Enzimler

2.4.1.1. Superoksit dismutaz (SOD)

Metalloprotein ailesinden olan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, bir süperoksit molekülünü oksijen molekülüne oksitlerken, diğer süperoksit molekülünü hidrojen peroksit molekülüne indirger.



Şekil 18: Superoksit Dismutaz Reaksiyonu

1968’de keşfedilmiş olan üç tür SOD enzimi vardır (Liochev and Fridovich, 2002);

1. Mn-SOD
2. Cu-Zn SOD
3. Cu-SOD

Mn-SOD; mitokondride lokalize, 40 bin kDa ağırlığında bir enzimdir.

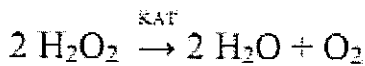
Cu-Zn SOD; sitozolde lokalize, 32 bin kDa ağırlığında, her biri katalitik olarak aktif bakır ve çinko atomuna sahip iki protein subüniti olan enzimdir.

Cu-SOD; vasküler endotele bağlı olup plazmadaki SOD radikallerini metabolize eden hücre dışı süperoksit dismutaz türüdür. Sadece birkaç hücre tipi tarafından sentezlenebilir. Fibroblastlara, endotelyal hücrelere, hücre yüzeyine sunulacak heparan sülfatlara bağlanırlar. Ekstraselüler sıvılardaki en önemli süperoksit türüdür ve heparin enjeksiyonunu takiben vasküler endotelden salınır. Endotelyal ürün olan nitrik oksit, plazmada süperoksitle nötralize edildiği için vasküler düzenlenmede önemlidir (Young and Woodside, 2001).

Kısa ömürlü bir serbest radikal olan süperoksit, SOD aracılığıyla daha stabil ve invaziv olan hidrojen peroksit dönüşmektedir. Bu da süperoksit dismutaza prooksidan özellik kazandırır, çünkü hidrojen peroksit etkin bir şekilde temizlenmezse çok agresif bir radikal olan ve hücre içeriğindeki biyomoleküllere saldıran hidroksil radikale dönüşecektir. Hidrojen peroksitin etkin bir şekilde ortadan kaldırılması, katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimlerinin hidrojen peroksiti zararsız bir ürün olan suya çevirmesiyle mümkün olmaktadır. Katalaz, substrat olarak sadece hidrojen peroksiti kullanırken; GPx hidrojen peroksitten başka peroksitleri de kullanabilen bir enzimdir (Drevet, 2006).

2.4.1.2. Katalaz

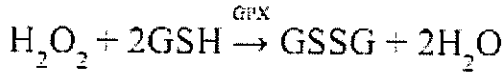
Peroksidazlarda lokalize olan bu enzim, yapısında Fe^{+3} bulunduran, dört hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir. Eritrosit, karaciğer ve böbreklerde aktivitesi yüksektir. Peroksidazlarla beraber SOD'nin oluşturduğu hidrojen peroksiti oksijen ve suya çevirir. Düşük konsantrasyonlardaki hidrojen peroksiti glutatyon peroksidaz parçalarken, yüksek hidrojen peroksit konsantrasyonlarında katalaz aktivite kazanır (Young and Woodside, 2001).



Şekil 19: Katalazın Hidrojen Peroksit Etkisi

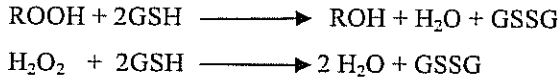
2.4.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GPx)

Redükte glutatyonu oksitlerken, hidrojen peroksiti de suya çevirerek hücreyi oksidatif strese karşı koruyan bu enzim, her birinde selenosistein içeren dört alt birimden oluşmuştur. GPx'in aktif kenarı polipeptid zincirine gömülü selenosistein rezidüsü şeklindedir (Chaudiere and Ferrari-Iliou, 1999). GPx, sitozolde bulunur ve lipitleri peroksidasyondan koruyan en önemli hücre içi enzim olarak hücre yapı ve fonksiyonunu korur (Van Haaften *et al.*, 2001; van Haaften *et al.*, 2003).



Şekil 20: Glutatyon Peroksidaz'ın hidrojen peroksiti etkisi

Glutatyon varlığında hidroperoksitlerin indirgenmesini katalizleyen bu enzim, hidrojen peroksiti suya, organik peroksitleri ise alkollere indirger.

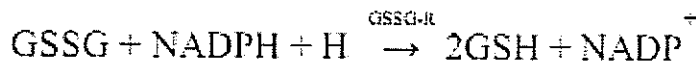


Şekil 21: Glutatyonun GPx ile indirgenmesi

Glutatyon Peroksidaz ve Redüktaz, bütün dokulara dağılmış olmasına rağmen en yüksek konsantrasyonu karaciğerdedir. Lipit hidroperoksitlerini de içeren peroksitlerin GPx için substrat olabilmesi, lipit peroksidasyonundan kaynaklanan hasarın tamirinde rol oynar (Young and Woodside, 2001).

2.4.1.4. Glutatyon Redüktaz

İki alt birimden oluşan her bir alt birimi NADPH, FAD bağlayan alanlarla bu alanlar arasındaki ara yüzden oluşan üç yapısal alan bulunduran bir enzimdir. Glutatyon redüktaz aracılığıyla elektronlar NADPH'tan FAD'ye transfer edilirken subünitlerdeki iki sistein arasında bulunan disülfid köprüsüne transfer edilerek okside glutatyonla aktarılmış olur ve böylece glutatyon indirgenir (Sies, 1999).



Şekil 22: Glutatyonun indirgenmesi.

Glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyonda gerekli olan NADPH, pentoz fosfat yoluyla sağlanır. NADPH' ın tükendiği yollar redükte glutasyon eksikliğine sebep olarak GPx'in aktivitesini etkiler. Glutasyon Redüktaz flavin nükleotidine bağlı bir enzimdir ve vücuttaki dağılımı GPx'in dağılımına benzer (Young and Woodside, 2001).

2.4.1.5. Glutasyon Transferaz

Glutasyon Transferaz, toksik metabolitlerin glutasyon ile konjugasyonunu sağlayarak detoksifikasyonlarında önem taşıyan bir enzimdir. Membran lipit peroksidasyonunu inhibe eder, lipit peroksitlerine karşı selenyumdan bağımsız GPx gibi aktivite gösterir (Van Haaften *et al.*, 2001; van Haaften *et al.*, 2003). Glutasyon-s-transferaz'ın katalizlediği reaksiyonlarda glutasyon, çeşitli ksenobiotik elektrofilik bileşiklerle reaksiyona girer (Fang *et al.*, 2002).



Şekil 23: Glutasyon Transferaz reaksiyonu

2.4.1.6. Paraoksonaz (PON1)

Hem arilesteraz hem de paraoksonaz aktivitesine sahip bir ester hidrolaz olan Paraoksonazın in vivo ksenobiyotik metabolizması ile ilgili yapılan toksikolojik çalışmalar; HDL'nin yapısında bulunduğunu göstermiştir. PON1; Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, organofosfatlara karşı korunma, bakteriyel endotoksinlerden kaynaklanan toksisiteye karşı korunma ile LDL ve HDL oksidasyonunun engellenmesinde görev alır (Aviram *et al.*, 1998).

PON1'in; hem LDL hem de HDL'yi oksidasyondan koruduğu, HDL vasıtasıyla metal iyon şelasyonu ve peroksidaz benzeri etkilerle antioksidan etkiye katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Baskol *et al.*, 2006b). Ayrıca HDL'deki PON1, uzun zincirli fosfolipitleri hidroliz edebilme yeteneğine sahiptir (Watson *et al.*, 1995). HDL'nin LDL oksidasyonu üzerine koruyucu etkisi de PON'dan kaynaklanmaktadır. PON1'in, bakır'ın (Cu^{+2}) indüklediği lipoprotein oksidasyonunu inhibe ettiği düşünülür. Klinik önemi; LDL oksidasyonunun sebep olduğu aterom plağının önlenmesiyle ilgilidir. Sadece lipoproteinlerle ilgili peroksitlere değil, aynı zamanda ateroskleroz oluşumu sırasında arteriyel duvar hücrelerinde üretilen hidrojen peroksit üzerine de etkilidir. Aktivite tayininde en çok kullanılan substrat olup organofosfat bileşiklerinden

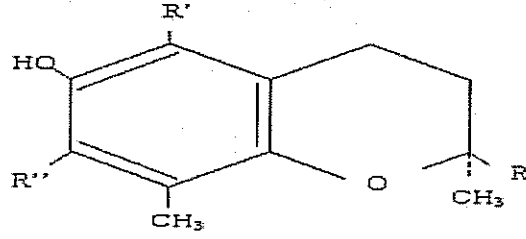
paratyonun aktif katabolik metabolizması sonucu oluşur. PON1 aktivitesi, p-nitrofenol veya fenolün konsantrasyonu üzerinden spektrofotometrik olarak tayin edilebilir (Aviram *et al.*, 1998; Baskol *et al.*, 2006a).

2.4.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

Bir serbest radikalın başka bir molekülle reaksiyonu sekonder radikallerin oluşumuna sebep olabilir. Zincir reaksiyonunun klasik bir örneği olan lipit peroksidasyonu, iki radikal birleşip stabil bir ürün oluşturuncaya kadar ya da zincir kıran bir antioksidan ile radikaller nötralize edilene kadar devam eder. Bu antioksidanlar, stabil ürünler oluşuncaya kadar bir radikalden elektron koparan ya da radikale elektron ekleyen moleküllerdir. Genellikle eşlenmemiş elektronların varlığıyla ilgili yük, süpürücü antioksidan ile disosiye olarak diğer moleküllerden elektron alıp veremeyecek ürünlerin oluşmasını sağlayarak zincir reaksiyonunun ilerlemesini durdurur (Young and Woodside, 2001). Hidrofobik serbest radikal süpürücüler, lipoprotein ve membranlarda bulunur. Lipit peroksidasyon basamaklarını, peroksil radikallerini ortadan kaldırarak veya singlet oksijen moleküllerinden hidrojen peroksit moleküllerinin oluşumunu engelleyerek ortadan kaldırırlar (Halliwell and Chirico, 1993; Chaudiere and Ferrari-Iliou, 1999). Vitaminler, ROÜ'ni direk olarak temizleyebilir ve aynı zamanda da antioksidan enzimlerin aktivitelerini düzenler (Fang *et al.*, 2002).

2.4.2.1. Alfa Tokoferol (E Vitamini)

Alfa Tokoferol (α -TF), fosfolipit tabakadaki peroksil radikallerinin en etkin temizleyicisi olup en önemli lipit faz antioksidanıdır. ROÜ'nin indüklediği lipit peroksil radikalleri oluşumu ile membran fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu engelleyerek, LDL'yi, hücresel proteinleri ve DNA'yı oksidatif hasardan korur (Fang *et al.*, 2002). Hücre membranı ve lipoproteinlerdeki asıl rolü peroksil radikallerini yakalamak olan α -TF, peroksil radikalleriyle reaksiyonda çoklu doymamış yağ asitlerine göre daha hızlı davranıp lipit peroksidasyon zincirini kırar. Lipitten zengin bir çevrede karbon merkezli radikallerin oluşmasına engel olamaz ama sekonder radikallerin oluşumunu azaltır.



Şekil 24: α -TF'nün yapısı

Kromonal halkadaki metil gruplarının sayı ve pozisyonuna göre alfa-theta şeklinde sekiz farklı şekli bulunup biyolojik aktivite derecesine göre farklılık gösterirler. Alfa tokoferol en güçlü tokoferoldür, peroksil radikalleriyle çok hızlı bir şekilde reaksiyona girerek kromonal halkanın üzerindeki ekstra elektronla stabil tokoferoksil radikalini oluşturur. Bu rezonans stabil radikal, çeşitli yollardan biriyle reaksiyona girer; sıvı ara yüzeyde askorbatla veya redükte glutatyon ve ürat gibi diğer bir sıvı faz zincir kırıcı antioksidan ile yenilenebilir. Sıvı membran yüzeyinde ise askorbatla yenilenmesi, serbest radikal translokasyonu olarak isimlendirilir. İki alfa tokoferoksil radikali stabil bir dimer oluşturmak üzere birleşebilir ya da alfa tokoferoksil radikali tokoferol kinon oluşturmak üzere tam olarak okside olabilir (Young and Woodside, 2001). Memeli hücre membranlarında α -TF'nün kromonal ailenin diğer üyelerine göre üstünlüğü, spesifik taşıyıcı proteinlerle güçlenmesidir (Chaudiere and Ferrari-Iliou, 1999).

α -TF lipit peroksil radikallerini hidrojen atomu transferi yaparak temizler;

$\alpha\text{TOH} + \text{LOO}^\bullet \longrightarrow \alpha\text{TO}^\bullet + \text{LOOH}$ (kromanoksil radikali oluşur) tekrar αTOH 'a dönüşü, askorbik asit veya diğer redükleyici ajanlarla olur.

Reaksiyonda üretilen LOOH ve hidroperoksit dengesi için ise glutatyon varlığında hidroperoksitlerin indirgenmesini katalizleyen GPx enzimi gereklidir. Membranlardaki α -TF'nün rejenerasyonu, glutatyonun hidrofilik ortamdaki oksidasyonu ile sağlanabilir. Fenoksil radikalleri ($\alpha\text{TO}^\bullet$), αTOH 'ün lipit peroksil radikalleri ile reaksiyonu sonucu oluşur (Chaudiere and Ferrari-Iliou, 1999).

α -TF'nün diyetel eksikliği, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz'ın aktivitesini azaltıp, lipit peroksidasyonunu katalizleyerek nörolojik ve kardiyovasküler hasara sebep olur. Bütün bu etkiler diyetel α -TF desteğiyle geri

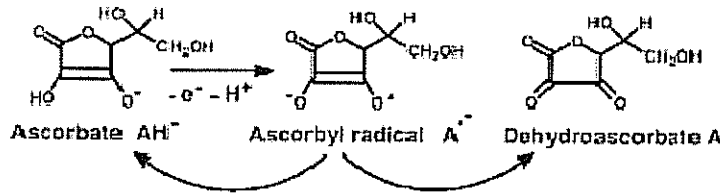
döndürülebilirken, α -TF transfer protein eksikliği beyin lipid peroksidasyonu ve nörodejenerasyon sebebidir.

Antioksidan özelliğine ek olarak α -TF (E vitamini), membranı stabilize edici özelliğe de sahiptir. E vitamini eksikliği hemolize ve abetalipoproteinemide görülen periferik nöropatiye yol açabilir.

Hücrenin sitozolik, mitokondriyal ve nükleer kompartmanlarında bulunan hidrofilik temizleyiciler olan Askorbik Asit ve Glutasyon tek elektron veya hidrojen atomu transferi ile sıvı ortamdaki serbest radikalleri temizlerler (Chaudiere and Ferrari-Iliou, 1999).

2.4.2.2. Askorbik asit (C vitamini)

Sıvı fazdaki radikalleri direk olarak temizleyen antioksidanlar içinde en önemlisi olan Askorbat, hidroksilasyon reaksiyonlarını katalizleyen çeşitli enzimler için kofaktördür. Tam bir enzimatik aktivite oluşturmak ve enzimlerdeki prostetik metal iyonlarını redükte formda tutabilmek için enzimlere elektron sağlar.



Şekil 25: Askorbat ve dehidroaskorbat

Plazmadaki diğer zincir kırıcı antioksidanlar proteinlere bağlı tiyol gruplarıdır. Plazma proteinleri üzerindeki sülfidril grupları, serbest radikalleri nötralize edebilmek için elektron vererek zincir kırıcı antioksidan olarak fonksiyon gösterirler. Sonuçta bir protein-thiyl radikali oluşur. Protein thiyl radikalleri reaktif oksidanların potansiyel kaynağı olarak hareket ederler. *Thiyl radikali*, çoklu doymamış yağ asidinden bir elektron çıkararak lipid peroksidasyon sürecini başlatır (Young and Woodside, 2001).

2.4.2.3. Glutasyon

Glutasyon (GSH); tiyol grubu içeren, düşük molekül ağırlıklı önemli bir antioksidandır. Glutamik asit, sistein ve glisin içeren tripeptid bir yapıya sahip olup, aktif bir sülfidril grubuna sahiptir. L-glutamat ve L-sisteinin gama glutamil sentetaz ile katalizlenen reaksiyonuyla oluşan gama glutamil sistein, L-glisin ile glutasyon sentetaz

enziminin katalizörlüğünde glutatyona dönüşür (Fang *et al.*, 2002). Sistein, glutasyon sentezinde temel rol oynar. Sülfür içeren aminoasitler sisteinin yönünü sistein katabolizması ile glutasyon sentezi arasında belirlemede önemli rol oynar. Sistein, glutasyon sentezi için hız belirleyici bir enzim olan gama glutamat sistein ligaz enzimini onarır, dolayısıyla glutasyon sentezi için hız belirleyici bir aminoasit olarak kabul edilir (Parcell, 2002).



Şekil 26: Glutasyon sentezi

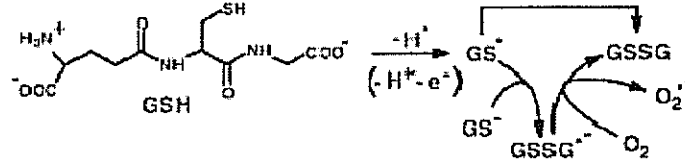
Glutasyonun okside formu glutasyon disülfittir (Fang *et al.*, 2002; Masella *et al.*, 2005). Bu da NADPH bağımlı glutasyon redüktazla glutatyona indirgenir. İndirgenmiş glutasyon(GSH) sahip olduğu tiyol grubunun aracılığıyla hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak hücreyi oksidatif hasardan korur.

Nukleusta DNA tamir ve ekspresyonu için gerekli kritik sülfidril proteinlerinin redoks durumuna gelmesini sağlar. Tiyol proteinleriyle etkileşimi hücrel redoks dengesinde önemlidir (Fang *et al.*, 2002).

Glutasyon, hücrelerde bulunan en önemli çözünür antioksidan ve en çok bulunan protein dışı tiyoldür. Serbest sülfidril grubu aracılığıyla hidrojen peroksit, süperoksit, hidroksil ve alkoksil radikalleriyle etkileşime girerek hücreyi oksidanlardan korumada önemli rol oynar (Sies, 1999).

Glutasyon, hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin GPx ile indirgenmesi ve ksenobiotiklerin detoksifikasyonunda rol alır. GPx, redükte glutasyonun –SH grubundan hidrojen molekülünü çıkartıp hidroksil radikali ya da hidrojen peroksitle birleştirerek hidrojen peroksiti metabolize eder. GPx'in katalizlediği bu reaksiyonda enzim aktivitesi için GSH gereklidir. Ekzojen olarak diyetle alınan ve endojen sentezlenebilen glutasyonun oksidasyonu ile oluşan GS[•] prooksidan bir radikaldir, başka bir GS[•] Radikaliyle reaksiyona girerek GS-SG (okside glutasyon) oluşturur. Oksidatif strese ortaya çıkan ROÜ'nin detoksifikasyonu, glutasyonun indirgenmiş şeklinden(GSH) oksitlenmiş dimer şekline(GSSG) dönüşümü ile gerçekleşmektedir. Hücreler serbest radikal ataklarına maruz kaldığında meydana gelen GSSG metabolik sınırı aşarak

oksidatif stres oluşturmaktadır. Proteinlerin sülfidril gruplarıyla(-SH) tepkimeye girerek kalıcı hasar oluşturan GSSG (Glutasyon disülfid) glutasyon redüktaz ile GSH'a rejenere olmaktadır.



Şekil 27: Glutasyonun oksidasyonu

Glutasyon, ROÜ'ni direk veya enzimatik yollarla indirek olarak etkin bir şekilde temizler (Fang *et al.*, 2002);

1. Çeşitli detoksifiye edici enzimlerin kofaktörüdür (glutasyon peroksidaz, glutasyon transferaz gibi); Superoksidaz enziminin ürünü olan hidrojen peroksit, glutasyon peroksidaz ve katalazla suya çevrilmektedir. GPx'in başka bir tipi de membran yapısındaki fosfolipit peroksitlerini etkiler (Fang *et al.*, 2002).
2. Hidroksil radikali ve singlet oksijeni direk olarak yakalar, hidrojen peroksit ve lipit peroksitlerini, glutasyon peroksidazın katalitik etkisi ile detoksifiye eder,
3. En önemli antioksidanlar olan C vitamini ve E vitamininin yenilenip tekrar eski şekillerine dönebilmeleri için gereklidir (Masella *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2007).
4. Nitrik oksitle konjuge olarak S-nitrozoglutasyon ürünlerini oluşturur bu da thiorredoksin sistemi tarafından glutasyon ve nitrik oksit oluşturmak üzere kırılır.
5. Plazma membranında aminoasit transportunda görev alır,

Glutasyon hızlı bir şekilde GS-SG'ye serbest radikaller ve diğer reaktif ürünler tarafından okside edildiği için hücre içi (GS-SG):(GSH) oranı oksidatif stresin göstergesidir (Fang *et al.*, 2002).

2.4.2.4. ALFA LİPOİK ASİT

Alfa lipoik asit (α -LA), oksidatif hasarı azaltan ve diğer antioksidanların redükte düzeyini arttıran bir biyolojik tiyol antioksidanıdır (Moini *et al.*, 2002). Antioksidan özellikleri yakın zamanda ön plana çıkmış, enerji metabolizmasının temel bir kofaktörüdür (Packer *et al.*, 1995; Packer *et al.*, 1997a; Marangon *et al.*, 1999).

α -LA, hem hücrelerde doğal olarak bulunan hem de diyetle alınıp hücrelere taşınarak dihidrolipoik asite (DHHA) indirgenen etkili bir serbest radikal temizleyici olmasının yanı sıra α -LA / DHHA oksidasyon/ redüksiyon çifti, alfa tokoferol, L-askorbik asit, ubikinon ve glutatyonun redükte şekillerinin yenilenmesinde önemlidir; endojen redükte durumu koruyarak oksidatif strese karşı düzenlenme sağlar. (Packer and Tritschler, 1996; Packer et al., 1997a).

Bir multienzim kompleksi olan lipoamidin yapısında yer alarak, pirüvat gibi alfa ketoasitlerin oksidatif dekarboksilasyonunu katalizleyen bir kofaktördür. α -LA'nın R-enantiomeri alfa keto asit dehidrogenaz kompleksinin ve glisin temizleyici sistemin önemli bir kofaktörü olup amid bağıyla lizin rezidüsünün epsilon amino grubuna bağlanarak lipoamid olarak sunulur (Matsugo et al., 1997; Moini et al., 2002).

Ekzojen olarak da alınabilen α -LA, mitokondriyal disfonksiyona karşı antioksidan olarak hareket eder. α -LA mitokondriyal kalsiyum transportunu da inhibe ederek hücre içi kalsiyum düzeyinde önemli etkilere sahiptir. α -LA, serbest radikalleri temizlediği gibi geçiş metallerini şelatlama ve hücre içi glutatyon düzeyini artırma özelliklerine de sahiptir (Packer and Tritschler, 1996).

Sebzelerde ve hayvansal dokularda düşük dozlara sahiptir. Sebzelerden sadece ıspanak, brokoli ve domateste, hayvansal dokulardan da böbrek, kalp ve karaciğerde bulunur (Matsugo et al., 1997; Moini et al., 2002). Diyetle alınıp hücrelere taşınarak DHHA'ya indirgenen α -LA, Diabetes Mellitus'ta proteinlerin glikozillenmesi, glukozun harcanması, polinöropati, katarakt tedavisinde ve aterogenezin erken basamaklarında anahtar role sahip olan LDL oksidasyonunun önlenmesinde kullanılır. Sentetik rasemik LA 1:1 R ve S enantiomerler karışımı diabetik nöropatide tedavi amaçlı kullanılabilmektedir (Packer et al., 2001).

Pek çok fizyolojik sistemde faydalı rolü olan alfa lipoik asidin sıvı ve lipid fazlar arasında, pH ve asit protonlanma derecesine bağlı olarak partiyon kapasitesiyle antioksidanlar arasında tek olma özelliği göstermektedir (Pershad Singh, 2007). Hidrofilik ve lipofilik çevrelerde antioksidan davranış gösterebilme özelliğiyle kan beyin bariyerini geçebilen metabolik bir antioksidandır (Packer et al., 1995; Packer et al., 1997b).

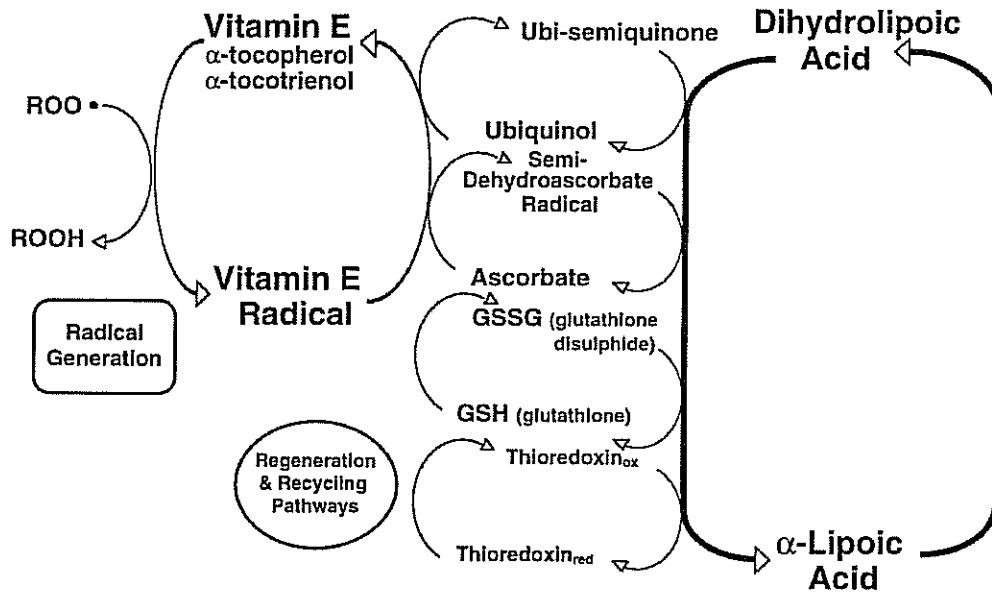
Oksidatif hasara bağlı ortaya çıkan serbest radikaller mitokondriyal DNA'ya zarar verir. Hasarlı mDNA'nın kodladığı hatalı proteinler mitokondride toplanarak ETZ

komponentleri ile daha fazla serbest radikal oluştururlar. Oksidatif süreçler sonucu glutasyon gibi hücresel antioksidanların azalması ve mitokondrideki hasar nörodejeneratif hastalıklara sebep olabilir. Beyin ve diğەر dokularda merkezi rol oynayan en önemli tiyol antioksidanı olan glutasyon direk olarak alınamazken, diyetle alınabilen α -LA, ditiyol bir antioksidan olarak beyin ve sinir sisteminde antioksidan savunmanın merkezini oluşturmasıyla çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda önem taşır (Packer and Tritschler, 1996).

α -LA, okside formunda intramoleküler disülfid bağı içeren oktanoik asitin disülfid ürünüdür. İki sülfür atomunun 1,2 ditiyolen halkasındaki özel pozisyonlardan ortaya çıkan yüksek elektron yoğunluğu α -LA'e çevresel şartlara göre diğەر redoks duyarlı moleküllerin redüksiyonu için yüksek bir gerginlik verir. Monotiyollerden daha kolay okside olan -SH/ S-S zincirler arası reaksiyonlara yol aarak, -0,32 mV gibi düşük redoks potansiyeli ile kuvvetli redüktan olan α -LA /DHLLA redoks çiftini oluşturur (Packer and Tritschler, 1996). α -LA ve redükte şekli olan dihidrolipoik asit (DHLLA), biyolojik tiyol antioksidanları olarak önem taşıyan (Packer et al, 1995, 97, 98), direk serbest radikal temizleyici özelliğe sahip bir redoks çiftidir (Moini *et al.*, 2002). RO'e karşı yüksek reaktifliğe sahiptirler. 0.005-1 mM konsantrasyonda hidroksil, hipokloröz asit ve singlet oksijeni yakalarlar. Aynı zamanda Mn^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} ve Fe^{+2} 'yi şelatlar (Packer and Tritschler, 1996). Reaktif nitrojen ürünleriyle ilgili olarak da, 0.01-0.5 mM konsantrasyonda peroksinitritin indüklediği α_1 -antiproteinaz inaktivasyonuna karşı etkin bir şekilde korur ve L-tirozin nitrasyonunu inhibe eder (Moini *et al.*, 2002). α -LA ve DHLLA peroksinitritle reaksiyona girerek etkisini ortadan kaldırır.

Ekzojen alınan α -LA emilir, dokulara taşınır ve DHLLA'e redükte edilir. α -LA'i DHLLA'e indirgeyen iki enzim sistemi bulunmaktadır. Mitokondriyal dihidrolipoamid dehidrogenaz; NADH ya da NADPH varlığında α -LA'i DHLLA'e çevirir. Bu enzim α -LA'in R enantiyomeridir. Sitozolik glutasyon redüktaz da; NADPH varlığında, α -LA'in daha yavaş bir reaksiyonunu katalizler. Redükleyici g NADH ve NADPH'tan gelir, böylece α -LA, NADH/NAD⁺ ve NADPH/NADP oranlarını düzenler. α -LA'i DHLLA'e dönüştüren en önemli enzim alfa ketoasit dehidrogenaz kompleksidir. Bundan dolayı DHLLA oksidan birikiminin olduğu tarafta olacaktır. (Haramaki *et al.*, 1997; Moini *et al.*, 2002).

Hücre içi α -LA redüksiyonunu takiben DHLA hızlı bir şekilde hücre dışı boşluğa salınırken redükte sistinin sisteine dönüşmesi, sistinin de nötral aminoasit taşıyıcıları tarafından alınıp glutatyon sentezinde kullanılmasıyla, okside glutatyon redükte glutatyona çevrilir. Böylece α -LA, hücre içi glutatyon düzeyini artırır. Sistinin hücre içi yetersizliğinde α -LA'in indüklediği glutatyon düzeyi yükselir (Han *et al.*, 1997; Moini *et al.*, 2002). DHLA, Hücrel glutatyon düzeyindeki artışa ek olarak, dehidroaskorbat ve semidehidroaskorbil radikalini redükte eder. α -LA /DHLA çifti tarafında okside glutatyon, dehidroaskorbat veya ubikinonun indirger, Thioredoksini redükte ederek radikal okside şeklinden α -TF'ün rejenerasyonunu sağlar (Packer and Tritschler, 1996; Packer *et al.*, 1997a; Moini *et al.*, 2002).



Şekil 28: α -LA ve α -TF'ün etkileşimi

2.4.2.5. Geçiş metal iyonlarını bağlayıcı proteinler

Geçiş metallerini bağlayıcı proteinler olan ferritin, transferin, laktoferritin ve seruloplazmin demir ve bakırı muhafaza ederek antioksidan defans sisteminin çok önemli komponentlerini oluşturur, böylece hidroksil radikallerinin oluşumu önlenir. Seruloplazmin; asıl olarak bakır bağlayıcı olan bu protein divalen demirin oksidasyonunu katalizleyen bir antioksidan enzim olarak fonksiyon görür.

Fe^{+2} ; Fenton reaksiyonunda yer alan demir şeklidir ve Fe^{+2} 'nin Fe^{+3} 'e dönüşümü antioksidan bir etkidir. Diyetel protein eksikliği veya demir yüklenmesine bağlı olarak hücre içi ve dışı demir konsantrasyonunda meydana gelen artış, reaktif oksijen ürünlerinin üretimi, lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresi artırır (Fang *et al.*, 2002).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

Otomatik pipet

Hassas terazi (CHYO JL-180)

Manyetik karıştırıcı (IKAMAG RH Janke ve Kunkel)

pH metre (METTLER TOLEDO MP 220)

Vorteks (VM3)

Santrifüj (MSE CENTAUR 2)

Santrifüj (Sigma 3K30)

Derin dondurucu (-40°C, BOSH Automatic)

Sıvı azot tankı (International Cryogenics, Inc.IC 20D Storage Dewor)

Spektrofotometre (SHIMADZU, UV- 160 A)

Benmari (Kotterman)

Karıştırıcı (NÜVE, SL 350)

Ultrasonik sonikatör (Siemens, MBTU)

Etüv (Heraeus, B 5042)

Mikroplate Yıkayıcı (Siemens, Multiwash)

Eliza Okuyucu Cihazı (TECAN)

Eliza Okuyucu Cihazı (Synergy-4 microplate reader)

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Tris baz	($C_4H_{11}NO_3$, MA:121,14 g/mol, Art:8387, Merck)
Tiyobarbütirik asid	($C_4H_4N_2O_2S$, MA:144,1 g/mol, Art:8180, Merck)
Glasial asetik asid	(CH_3COOH , %100, MA:60,05 g/mol, 1lt:1.05 kg, Merck)
Sodyum hidroksid	($NaOH$, MA: 40 g/mol, B639062 016, Merck)
Potasyumdihidrojenfosfat	(KH_2PO_4 , MA:136,09 g/mol, Art:4871, Merck)
Dipotasyumhidrojenfosfat	(K_2HPO_4 , MA:174,18 g/mol, Art:5101, Merck)
Hidroklorik asid	(HCl , %37, MA:36,46 g/mol, 1lt:1,19 kg, Art:314, Merck)
Sodyum karbonat	(Na_2CO_3 , MA:84,01 g/mol, Art:6223, Merck)
Bakırsülfat.5.hidrat	($CuSO_4.5H_2O$, MA:249,68 g/mol, Art:2787, Merck)
Potasyum sodyum tartarat	($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$, MA:282,23 g/mol, Art:8085, Merck)
Folin reagent	(2 Normal, F-9252, Lot:013K3692, Sigma)
Bovin albumin	(% 99'luk, A9647, Sigma)

α -tocopherol (Sigma Cat. No:T3634-10 (% 95, C₂₉H₅₀O₂, MA: 430,71, T3251)
 α - lipoic acid (Sigma Cat. No: T5625-25 G)
Bisphenol A (Sigma Cat. No: 239658)

3.3. Çalışma Popülasyonunun Özellikleri

Çalışmamız, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi ve Cerrahi Araştırmalar Merkezi Laboratuvarında yaşları 2-3 ay arasında değişen, 180-240 gram ağırlığındaki 50 adet Wistar cinsi dişi rat üzerinde yapıldı. Ratlar standart kafeslerde, odun talaşı zemininde ve standart rat yemi ve su sistemi ile ad libitum beslenecek şekilde deney ortamına yerleştirildi. 2 günlük adaptasyon süreci sonrasında çalışmaya dahil edildi. Ratlara 12 saat gündüz 12 saat gece ortamını sağlayacak şekilde aydınlatma sağlandı ve ortam ısısı 22±1°C'ye sabitlendi.

Çalışmada kullanılan ratlar her grupta 10 adet olmak üzere beş gruba ayrıldı; Gruplar; kontrol, yalnız Bisphenol A uygulanan grup, Bisphenol A ve Alfa Lipoik asit uygulanan grup, Bisphenol A ve Alfa Tokoferol uygulanan grup, Bisphenol A ile birlikte Alfa Tokoferol ve Alfa Lipoik Asit uygulanan grup olarak belirlendi. Zeytinyağı içinde çözülerek hazırlanan kimyasal maddeler oral gavaj ile intragastrik olarak verildi. Kontrol grubundaki ratlara da günlük diğer çalışma gruplarındaki etken maddeleri çözmek için kullandığımız zeytinyağı 0,5 ml olarak oral gavaj yolu ile intragastrik olarak uygulandı. Çalışma 30 gün sürdü.

Tablo 3.1. Deney gruplarına Bisfenol A, Alfa Tokoferol ve Alfa Lipoik Asit Uygulanışı

Grup	n	Uygulama
1. Kontrol grubu	10	0,5 ml zeytinyağı
2. BPA	10	25 mg/kg/gün BPA
3. BPA + α - LA	10	25 mg/kg/gün BPA ve 100 mg/kg/gün alfa lipoik asit
4. BPA + α - ATF	10	25 mg/kg/gün BPA ve 20 mg/kg/gün alfa tokoferol
5. BPA+ α - LA+ α - ATF	10	25mg/kg/gün BPA ve 20 mg/kg/gün alfa tokoferol ve 100 mg/kg/gün alfa lipoik asit

Çalışma sonunda, ratların plazma, serum ve beyin dokularında; Malondialdehit(MDA), AOPP, Glutasyon Peroksidaz (GPx), Paraoksonaz (PON1) ve Nitrik Oksit (NO) düzeyleri ölçülüp, sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.3.1. Deneyin Yapılışı

- Ratlar 30 gün boyunca takip edildi ve 30. günün sonunda çalışma sonlandırıldı.

- İntraperitoneal 5 cc ketamin ile anestezi uygulandı.
- Ratların göğüs kafesi açılarak intrakardiyak 6-8 ml kan alındı ve kanlar EDTA'lı tüplere ve antikoagulan içermeyen düz biyokimya tüplerine aktarıldı.
- Alınan kanlar 3000xg'de 10 dk santrifüj edilerek serum ve plazmaları ayrıldı. Çalışma gününe kadar -40°C ye kaldırıldı.
- Serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) ile reperfüzyon uygulaması sonrasında beyin dokuları alındı.
- Alınan beyin dokusu sıvı nitrojen ile dondurularak manuel olarak ezildikten sonra, eppendorf tüpü içerisindeki 1 ml PBS tamponu (pH 7.4, 10 mM) içine konularak 10 dk sonikasyon yapıldı.
- Doku örnekleri çalışma gününe kadar -40°C ye kaldırıldı.
- Çalışma gününde -40°C'de saklanan numuneler, oda ısısında çözülene kadar bekletildi. Doku örnekleri 10000xg'de 5 dk santrifüj edildi ve yeterli miktarda süpernatant eppendorflara ayrıldı. Süpernatant ve serumlarda MDA, AOPP, NO, PON1 düzeyleri, süpernatant ve plazmalarda GPx düzeyleri ölçüldü.
- Doku örneklerinin protein miktarı Lowry metodu ile tespit edildi. Sonuçlar mg protein başına verildi.

3.4. Biyokimyasal Analizler

3.4.1. Protein Miktarının Tayini

Çalışmamızda protein miktarının tayini Lowry ve arkadaşlarının metodu kullanılarak yapıldı. Tüm protein miktarı tayin metodları, proteini oluşturan aminoasitler arasındaki peptid bağlarının parçalanması esasına dayanır. Aminoasitler arasındaki peptid bağlarının ayrılmasında kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri metodlar arasındaki farklılıkları oluşturmaktadır. Lowry ve arkadaşları protein miktarı ölçümünü biüret metoduna dayandırmıştır. Deneyin prensibi alkali ortamda proteinlerin peptid bağlarının ve tirozin kalıntılarının bakır ile kompleks oluşturması esasına dayanır. Peptid bağı nitrojenlerinin bakır iyonları ile reaksiyonu, daha sonra aromatik aminoasitlerin bakır katalizli oksidasyonu aracılığıyla, ortama konulan folin reaktifinin heteropolimolibden mavisine indirgenmesi esasına dayanmaktadır (Lowry *et al.*, 1951).

Reaktifler

1. Solüsyon A: Na₂CO₃, %2 (w/v)

2 gram Na_2CO_3 tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra balon jojede 100 ml'ye tamamlandı.

2. *Solüsyon B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, %1 (w/v)*

0,1 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra balon jojede 10 ml'ye tamamlandı.

3. *Solüsyon C: Na-K tartarat, %2 (w/v)*

Na-K tartarat.4 H_2O 'dan 0,26 gram tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra balon jojede 10 ml'ye tamamlandı.

4. *Complex Forming Reagent*

Çalışma yapılmadan hemen önce hazırladığımız solüsyon A, B, C'den sırası ile 100:1:1 oranında, karıştırıldı.

5. *NaOH, 2 N*

4 gram NaOH tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra balon jojede 50 ml'ye tamamlandı.

6. *Folin Reagent, 1 N*

2 N Folin reagent ana stoğundan 50 ml alındı ve distile su ile 100ml' ye tamamlandı.

7. *Albumin standartı: 2 mg/ml*

0,002 gram albumin tartıp 1ml'ye tamamlayarak çözüldü. Bundan seri dilüsyonla standartlar hazırlandı.

Tablo 3.2. Protein miktarı tayini

	Numune	Standart	Kör
Süpernatant	100µl	-	-
Standart	-	100µl	-
Deiyonize su	-	-	100µl
NaOH	100µl	100µl	100µl

Örnekler 100 °C su banyosunda 10 dakika bekletildi ve oda ısısına gelene kadar dışarıda tutuldu.

Complex- Forming Reagent	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Folin Reagent	100 µl	100 µl	100 µl

Daha sonra tüpler karıştırıldı ve oda ısısında 30-60 dakika bekletildikten sonra numuneler 550 nm.de okundu.

3.4.2. Serum ve Doku Malondialdehit Düzeyi Tayini

Poliansatüre yağ asitlerinden derive olan lipit peroksitleri stabil olmayıp çoğunluğunu Malondialdehitin oluşturduğu reaktif karbonil bileşikleri oluşturmaya yatkındırlar. Bundan dolayı da MDA, lipit peroksidasyonunun gösterilmesinde geniş bir kullanıma sahiptir.

TBARS metodu biyolojik örneklerde MDA ölçülmesinde kullanılan yaygın bir yöntemdir ama reaksiyon göreceli olarak non spesifik olduğundan hem serbest hem de proteinlere bağlı MDA reaksiyona girebilir.

MDA 586 metodu ise serbest MDA'nın ölçülmesi için kullanılan bir metoddur. Bir hidroliz basamağından sonra total MDA ölçülür. Ölçüm şartları 4 hidroksi alkaneller gibi diğer lipit peroksidasyon ürünleriyle interferansı minimize etmek için korunur. Yöntem, N-metil-2-fenilindol (NMPI) isimli bir kromojenik maddenin reaksiyonu üzerine kuruludur; NMPI Malondialdehit ile 586 nm. de maksimum absorbens veren karbosiyanini oluşturur. MDA 586 metodu, MDA için spesifiktir, çünkü 4 hidroksialkaneller 586 nm. deki ölçüm şartlarında belirgin renk oluşturmaz. Hidroklorik asit ve probukolün eklenmesiyle de 4 hidroksialkaneller minimize edilir. Bu şartlar altında 586 nm. de HNE'den dolayı çok küçük bir absorbens vardır.

MDA 586 ölçümünde, hazırlanan MDA standartı kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulur; MDA bilinmeyen olup bilinmeyeninin 586 nm.deki absorbensından ve standart eğrisinden hesaplanır. Renkli örnekler için örnek blank i oluşturulur. 586 nm.deki absorbens, örneğin absorbensından çıkarılarak karbosiyanine bağlı gerçek absorbens bulunur.

Reaktifler

R1; asetonitril içinde NMPI

R2; konsantre hidroklorik asit

MDA standartı

BHT (butile hidroksitoluen)

Probukol, Metanol

3.4.2.1. Reaktiflerin Hazırlanışı

R1 çözeltisinin kullanım için dilüsyonu;

1 volum (6 ml) 100% methanol, 3 volum (18 ml) R1'e eklenir.

MDA Standartı; MDA stabil olmadığından standart TMOP'tan elde edilmiştir. TMOP, 45°C'deki asit inkübasyon basamağı ile hidrolize olur. 10 mM lık TMOP solüsyonundan kullanımdan hemen önce 1/500 oranında dilüsyon ile 20 µL stok solüsyonu ve bu stok solüsyondan seri dilüsyonla kör ve 2.5;5;10;15;20 µM/l standartlar hazırlandı.

3.4.2.2. Ölçüm

Bütün endorf tüplerine 10 µL probukol konuldu, numune ve standartlardan 200 µL tüplere eklendi. Her tüpe 640 µL dilüe R1 (NMPI) konuldu ve bütün tüpler vortekslendi. 150 µL R2 (HCl) eklenerek bütün tüpler tekrar vortekslendi. 45°C'de 60 dakika inkübasyon sonrasında 10000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar ayrıldı. Daha sonra 586 nm. de absorbansları ölçüldü.

3.4.3. Serum ve Doku Protein Oksidasyon Düzeyi (AOPP) Tayini

Protein oksidasyonunun derecesini belirlemede duyarlı bir marker olan AOPP, ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Diğer taraftan AOPP'nin yapısal olarak ileri glikasyon son ürünlerine (AGEs) yapısal ve biyolojik benzerlik gösterdiği bildirilmektedir. Kontrol plazmasında AOPP'lerin oluşumu; kloramin veya hipokloröz asit gibi klorlanmış oksidanlar ile tetiklenir. (Demirbilek ve ark., 2007)

AOPP ölçüm kiti, biyolojik örneklerdeki AOPP ürünlerinin direk kantitatif ölçümü için gerekli bir ölçüm şeklidir. AOPP içeriği bilinmeyen örnekler veya kloramin standartları, öncelikle renk gelişim sürecini başlatan reaksiyon başlatıcı ile karıştırılır, kısa bir inkübasyondan sonra stop solüsyonu eklenerek, örnek ve standartların absorbansı standart bir spektrofotometre ile ölçülür. AOPP-HSA konsantrasyonu kloramin denge standartından hazırlanır, bilinmeyen AOPP içeriği kloramin standart eğrisiyle kıyaslanarak hesaplanır.

3.4.3.1 Reaktiflerin Hazırlanışı

1X Assay Dilüent; deiyonize su ile 1:10 oranında sulandırıldı.

20 ml Assay Dilüent + 180 ml deiyonize su

Kloramin Reaksiyon Başlatıcı 5 ml deiyonize su ile çözüldü.

AOPP-HSA Pozitif Kontrol; 100 μ M çözelti elde edebilmek için 1:20 oranında assay dilüent ile sulandırılır.

Kloramin Standartı 1:1000 oranında Assay Dilüent ile sulandırılarak 100 μ M çözelti elde edildi.

20 μ l Kloramin Standartı + 19980 μ l Assay Dilüenti

Tablo 3.3. AOPP standartları

Standartlar	Kloramin Standartı (μ l)	Assay Dilüent (μ l)	Kloramin Standartı (μ M)
1	500	0	100
2	400	100	80
3	300	200	60
4	200	300	40
5	100	400	20
6	50	450	10
7	25	475	5
8	0	500	0

3.4.3.2. Ölçüm

Numune ve standartlar, uygun kuyucuklara 200 μ l pipetlendi. Bütün kuyucuklara 10 μ l Kloramin Reaksiyon Başlatıcı ilave edildi. Çalkalayıcıda 5 dakika inkübe edildikten sonra her bir kuyucuğa 20 μ l Stop Solüsyonu eklendi. Absorbanslar 340 nm. de okutuldu.

3.4.4. Serum ve Doku NO Ürünleri (Nitrat ve Nitrit) Düzeyi Tayini

Yarı ömrünün çok kısa olması sebebiyle Nitrik Oksit, oksidasyona uğrayarak stabil metabolitleri olan nitrat ve nitrite dönüşür ki bu metabolitlerin düzeyi ölçülerek NO seviyesi ölçülebilir.

3.4.4.1 Ölçüm

Total nitrat/nitrit konsantrasyonunun iki basamakla ölçümünü kapsayan doğru ve güvenilir bir metoddur.

1. Basamakta nitrat redüktaz kullanılarak nitratın nitrite dönüşümü,

2. Basamakta Griess Reagent 1 (sulfonilamide) ekleyerek nitritin koyu mor renkli azo bileşimine çevrilmesi ve bu azo kromoforuna ait fotometrik ölçüm nitrit konsantrasyonunu gösterir.

Nitrat ve nitritin toplam konsantrasyonunun hesaplanabilmesi için nitrat standart eğrisi oluşturuldu. Bir test tüpüne 0,9 ml Assay Buffer ve 0,1 ml nitrat standardı eklendi ve vortekslendi. Oluşturulan 200 μ M stok solusyonu kullanılarak nitrat konsantrasyonları 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 μ M olan standartlar hazırlandı.

3.4.4.2. Ölçüm

1. Kör kuyucuklarına 200 μ L distile su eklendi,
2. 40 μ L numune, 40 μ L Assay Buffer (1:2 dilüsyon) ile dilue edilerek final hacmi 80 μ L olacak şekilde numune kuyucuklarına eklendi.
3. Bütün kuyucuklara 10 μ L Enzim kofaktör karışımı eklendi,
4. Bütün kuyucuklara 10 μ L nitrat redüktaz karışımı eklendi,
5. Plate kaplanır ve oda ısısında 2-3 saat inkübe edildi,
6. İnkübasyon sonrasında her bir kuyucuğa 50 μ L Griess Reagent R1 ve hızlı bir şekilde Griess Reagent R2 eklendi.
7. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. İnkübasyon sonrasında 540 nm.de absorbanslar ölçüldü.

3.4.5. Plazma ve Doku Glutasyon Peroksidaz Düzeyinin Tayini

Glutasyon Peroksidaz, redükte glutasyonu kullanarak, hücreyi oksidatif hasardan korumak amacıyla hidroperoksitlerin indirgenmesini katalizleyen enzimdir. Bu ölçümde glutasyon peroksidaz düzeyi, glutasyon redüktaz ile oluşturulmuş bir reaksiyon çiftini ölçmeye dayalıdır. Hidrojen Peroksitin, glutasyon peroksidaz ile indirgenmesinden okside glutasyon elde edilir ki bu da glutasyon redüktaz ve NADPH ile redükte şekline dönüştürülür. NADPH'ın NADP'ye oksidasyonu 340 nm. deki absorbans düşüşüyle karakterizedir. Glutasyon Peroksidaz aktivitesinin sınırlı olduğu durumlarda 340 nm. de absorbanstaki düşüş oranı örnekteki glutasyon peroksidaz aktivitesiyle direk olarak orantılıdır.

3.4.5.1. Reaktiflerin Hazırlanışı

GPx Assay Buffer (10X); 3 ml Assay buffer, 27 ml deiyonize su ile dilüe edildi.

GPx Sample Buffer(10X); 2 ml sample buffer, 18 ml deiyonize su ile dilüe edildi.

GPx Kontrol; 10 μ l Bovin eritrosit GPx, 490 μ l sample buffer ile dilüe edildi.

GPx kosubstrat karışımı; Liyofilize NADPH, glutatyon ve glutatyon redüktazın bulunduğu her bir viyale 2 ml deiyonize su katılıp vortekslendi.

GPx Cumene Hydroperoxide(2,5 ml); Kullanıma hazır reaktif.

3.4.5.2. Ölçüm

1. Kör kuyucuklarına 120 µl assay buffer ve 50 µl kosubstrat karışımı eklendi.
2. Pozitif kontrol kuyucuklarına 100 µl Assay Buffer, 50 µl kosubstrat ve 20 µl dilüe GPx kontrolü pipetlendi.
3. Numune kuyucuklarına 100 µl Assay Buffer, 50 µl kosubstrat ve 20 µl numune eklendi,
4. Bütün kuyucuklara 20 µl Cumene Hydroperoxide eklenerek reaksiyon başlatıldı.
5. Birkaç dakika dikkatlice çalkalandı.
6. 340 nm.de spektrofotometrik olarak 1 dakika arayla 3 kez absorbanslar okunarak $\Delta A_{340}/\text{min}$ değerleri belirlendi. Daha sonra formül yardımıyla GPx aktivitesi hesaplandı.

$\Delta A_{340}/\text{min}$	0,19 ml
Gpx aktivitesi = -----	x ----- x Sample dilution = nmol/min/ml
0,00373 μM^{-1}	0,02 ml

3.4.6. Serum ve Doku Paraoksonaz (PON 1) Düzeyinin Tayini

Paraoksonaz (PON 1), hem arilesteraz hem de paraoksonaz aktivitesine sahip bir ester hidrolaz olan Paraoksonazın in vivo ksenobiyotik metabolizması ile ilgili yapılan toksikolojik çalışmalar; HDL'nin yapısında bulunduğunu göstermiştir. Aktivite tayininde en çok kullanılan substrat olup organofosfat bileşiklerinden paratyonun aktif katabolik metabolizması sonucu oluşur. PON1 aktivitesi, p-nitrofenol veya fenolün konsantrasyonu üzerinden spektrofotometrik olarak tayin edilebilir.

Çalışmamızda kullandığımız Plate, PON 1'e spesifik monoklonal antikorlarla kaplanmıştır. Standart ve örnekler bu kuyucuklara PON 1 için özel olan biyotin konjuge poliklonal antikorlarla birlikte eklenir, daha sonra da avidinle konjuge olmuş HRP her kuyucuğa eklenir ve inkübe edilir. Sadece PON 1 biyotin konjuge antikor ve enzim konjuge avidin içeren kuyucuklarda renk değişimi olur. Enzim ve substrat reaksiyonu sülfirik asit çözeltisi eklenerek sonlandırılır. Renk değişimi 450 nm.de Eliza okuyucuda ölçülür. Örneklerdeki PON 1 konsantrasyonu, örneklerin okunduğu değerin standart eğriyle karşılaştırılmasıyla hesaplanır.

3.4.6.1. Reaktiflerin Hazırlanışı

Kit içeriği ve numuneler kullanımdan önce oda sıcaklığına getirildi.

Standart stok solüsyonu (400 ng/ml) 1 ml standart dilüenti ile hazırlandı, 10 dakika oda ısısında bekletildi ve köpürtmeden çalkalandı. Stok standarttan seri dilüsyonla 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ve 0 ng/ ml'lik standartlar hazırlandı.

Assay Diluent A ve Assay Diluent B, 6 ml deiyonize su eklenerek hazırlandı.

Detection Reagent A (PON 1 için spesifik biyotinle konjuge poliklonal antikor) ve *Detection Reagent B* (avidinle konjuge Horseradish Peroxidase) kullanmadan önce karıştırıldı ve 1:100 oranında Assay Diluent A ve B ile dilue edildi.

Yıkama Solusyonu; 20 ml Wash Solusyonu, 580 ml distile su ile sulandırıldı.

TMB substratı; kullanıma hazır reaktif.

3.4.6.2. Ölçüm

1. Numune ve standartlar 100 µl olarak belirlenen kuyucuklara pipetlendi,
2. 37°C'de iki saat inkübe edildi,
3. Yıkayıcı yardımıyla kuyucuklardaki sıvı boşaltıldı,
4. Bütün kuyucuklara 100 µl Detection Reagent A eklendi,
5. Plate kaplanarak 37°C'de bir saat inkübe edildi,
6. Solüsyon aspire edildi ve 350 µl yıkama solusyonu ile üç kez yıkandı,
7. Bütün kuyucuklara 100 µl Detection Reagent B solüsyonu eklendi,
8. Plate kaplandıktan sonra 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı,
9. Solüsyon aspire edildi ve 350 µl yıkama solusyonu ile üç kez yıkandı,
10. Her kuyucuğa 90 µl substrat solüsyonu eklendi.
11. Plate kaplandı 37°C'de 10-15 dakika inkübe edildi ve ışıktan korundu.
12. 50 µl stop solüsyonu eklendi,
13. Eliza okuyucuda 450 nm. de absorbanlar okutuldu.

3.5. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi;

Araştırmadan elde edilen veriler SPSS 15.0 paket programında analiz edildi. Verilerin tanımlayıcı özellikleri ortalama $\pm$ standart sapma ve medyan (minimum-maksimum) olarak ifade edildi.

Gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis testi, anlamlı çıkan değerlerin ikili karşılaştırılmasında ise Bonferonni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi Kruskal Wallis testi için $p < 0.05$, Mann-Whitney U testi için $p < 0.01$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda oluşturduğumuz Kontrol, Bisfenol A (BPA), Bisfenol A + Alfa Lipoik Asit (BPA+ α -LA), Bisfenol A + Alfa Tokoferol (BPA+ α -TF) ve Bisfenol A + Alfa Lipoik Asit + Alfa Tokoferol (BPA+ α -LA+ α -TF) gruplarından 30 günlük deney süresi sonunda alınan beyin dokuları, serum ve plazma örneklerinde BPA toksisitesine bağlı oksidatif hasarı belirleyebilmek için oksidatif hasar göstergesi olan ürünlerden Malondialdehit (MDA), İleri Düzeyde Protein Oksidasyon Ürünleri (AOPP) ve Nitrik Oksit (NO) Ürünlerinin (Nitrat ve Nitrit) Düzeyleri, antioksidan enzimlerden Glutasyon peroksidaz (GPx) ve Paraoksonaz (PON1) düzeyleri ölçülüp istatistiksel olarak değerlendirildi. MDA, AOPP, NO, GPx ve PON1 düzeylerine ait bulgular ve istatistiksel değerlendirmeleri Tablo 4.1’de sunuldu.

Tablo 4.1. Bulgular (*Aritmetik Ortalama $\pm$ Standart Sapma*)

	Kontrol	BPA	BPA+ α -LA	BPA+ α -TF	BPA+ α -LA+ α -TF
BMDA $\mu\text{mol/mg.prot}$	3,25 $\pm$ 0,881	8,873 $\pm$ 3,780	4,974 $\pm$ 1,677	5,445 $\pm$ 1,933	5,446 $\pm$ 2,166
BAOPP $\mu\text{mol/mg.prot}$	0,644 $\pm$ 0,226	0,635 $\pm$ 0,156	0,621 $\pm$ 0,173	0,765 $\pm$ 0,187	0,775 $\pm$ 0,237
BNO $\mu\text{mol/mg.prot}$	1,275 $\pm$ 0,498	1,619 $\pm$ 0,537	1,429 $\pm$ 0,376	0,304 $\pm$ 0,385	0,576 $\pm$ 0,217
BPON ng/mg.prot	12,190 $\pm$ 6,143	15,759 $\pm$ 4,001	11,405 $\pm$ 2,840	12,652 $\pm$ 4,747	15,382 $\pm$ 2,954
BGPx nmol/min/mg.prot	69,629 $\pm$ 76,05	58,640 $\pm$ 45,775	47,411 $\pm$ 26,073	48,679 $\pm$ 23,369	47,207 $\pm$ 25,033
SerMDA $\mu\text{mol/l}$	2,704 $\pm$ 1,383	5,902 $\pm$ 1,054	2,353 $\pm$ 0,605	2,720 $\pm$ 0,529	2,370 $\pm$ 0,733
SerAOPP $\mu\text{mol/l}$	2,976 $\pm$ 0,293	3,175 $\pm$ 0,242	2,947 $\pm$ 0,249	3,102 $\pm$ 0,484	3,067 $\pm$ 0,286
SerNO $\mu\text{mol/l}$	4,084 $\pm$ 1,849	3,131 $\pm$ 1,914	2,118 $\pm$ 0,762	2,260 $\pm$ 1,175	1,401 $\pm$ 0,982
SerPON ng/ml	18,823 $\pm$ 20,168	65,091 $\pm$ 57,890	49,042 $\pm$ 38,197	88,000 $\pm$ 69,353	68,8878 $\pm$ 69,461
PGPx nmol/min/ml	195,348 $\pm$ 49,358	194,839 $\pm$ 67,952	197,895 $\pm$ 66,643	235,335 $\pm$ 86,421	159,417 $\pm$ 103,464

BMDA ; Beyin Dokusu Malondialdehit Düzeyi

BAOPP ; Beyin Dokusu Protein Oksidasyon Düzeyi

BNO ; Beyin Dokusu Nitrik Oksit Ürünleri Düzeyi

BPON ; Beyin Dokusu Paraoksanaz Düzeyi

BGPx ; Beyin Dokusu Glutasyon Peroksidaz Düzeyi

SerMDA ; Serum Malondialdehit Düzeyi

SerAOPP ; Serum Protein Oksidasyonu Düzeyi

SerNO ; Serum Nitrik Oksit Ürünleri Düzeyi

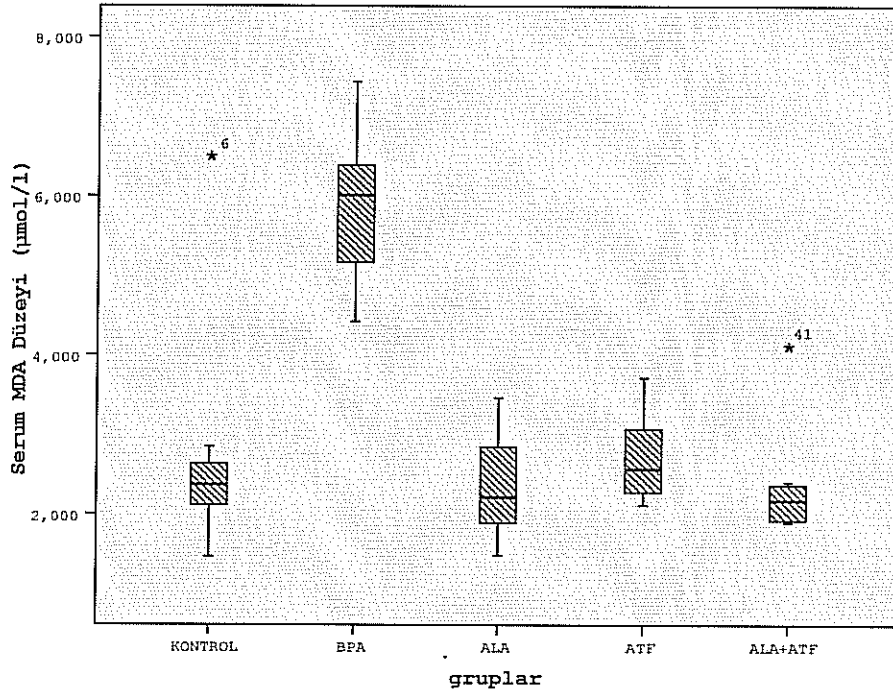
SerPON ; Serum Paraoksanaz Düzeyi

PGPx ; Plazma Glutasyon Peroksidaz Düzeyi

4.1. Serum Malondialdehit (MDA) Düzeyi

MDA düzeyi kontrol grubunda $2,704 \pm 1,383$ $\mu\text{mol/l}$, BPA grubunda $5,902 \pm 1,054$ $\mu\text{mol/l}$, BPA+ α -LA grubunda $2,353 \pm 0,605$ $\mu\text{mol/l}$, BPA+ α -TF grubunda $2,720 \pm 0,529$ $\mu\text{mol/l}$, BPA+ α -LA+ α -TF grubunda $2,370 \pm 0,733$ $\mu\text{mol/l}$ olarak ölçüldü.

Grafik 4.1. Serum MDA Düzeyi



Normal dağılıma uymadığı için Kruskal-Wallis Testiyle değerlendirilen ve buna göre gruplar arasında anlamlı farklılık ($p < 0,05$) gösteren serum MDA düzeyleri, Mann Whitney U testine göre gruplar ikili olarak karşılaştırıldı.

Tablo 4.2. Serum MDA düzeylerinin BPA grubuna göre ikili karşılaştırması

	(I.grup) Kontrol	(II.grup) BPA	(III.grup) BPA+ α -LA	(IV.grup) BPA+ α -TF	(V.grup) BPA+ α -LA+ α -TF
MDA(ort)	2,704 ^a	5,902	2,353 ^b	2,720 ^b	2,370 ^b

I, III, IV ve V. grup, II. gruba karşılaştırıldığında; a: $p=0,001$ b: $p=0,0001$

(Mann Whitney U testine göre $p < 0,01$ anlamlı kabul edildi)

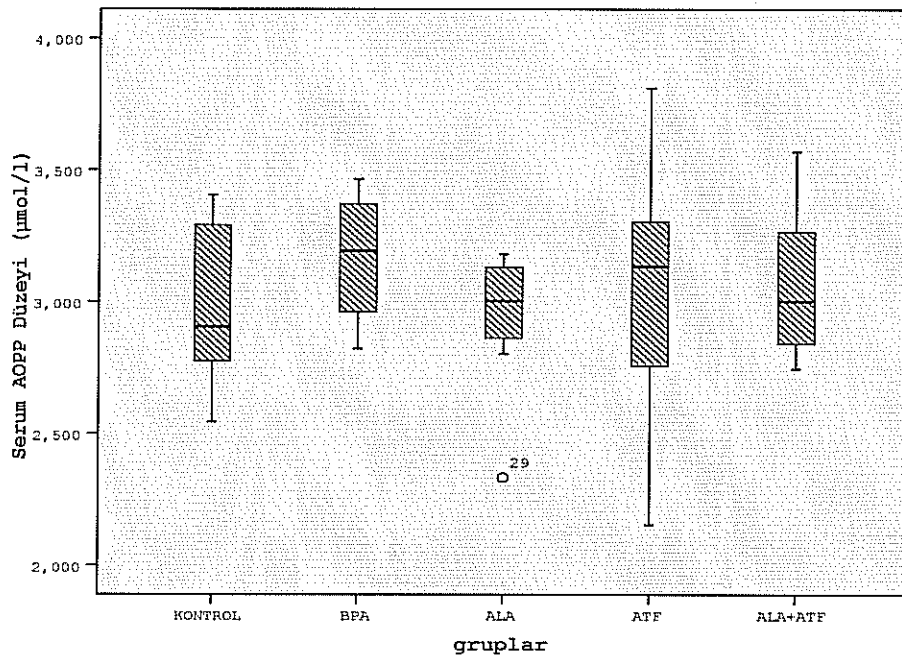
BPA grubu, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MDA düzeylerinin anlamlı olarak arttığı ($p < 0,01$) ; BPA ile birlikte α -LA, α -TF, kombine α -LA ve α -TF uygulanan

gruplarla karşılaştırıldığında ise MDA düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı görüldü ($p<0,01$). Diğer ikili karşılaştırmalarda anlamlı farklılık bulunamadı ($p>0,01$).

4.2. Serum AOPP Düzeyi

AOPP Düzeyi kontrol grubunda $2,976\pm0,293$ $\mu\text{mol/l}$, BPA grubunda $3,175\pm0,242$ $\mu\text{mol/l}$, BPA+ α -LA grubunda $2,947\pm0,249$ $\mu\text{mol/l}$, BPA+ α -TF grubunda $3,102\pm0,484$ $\mu\text{mol/l}$, BPA+ α -LA+ α -TF grubunda $3,067\pm0,286$ $\mu\text{mol/l}$ olarak ölçüldü.

Grafik 4.2. Serum AOPP Düzeyi

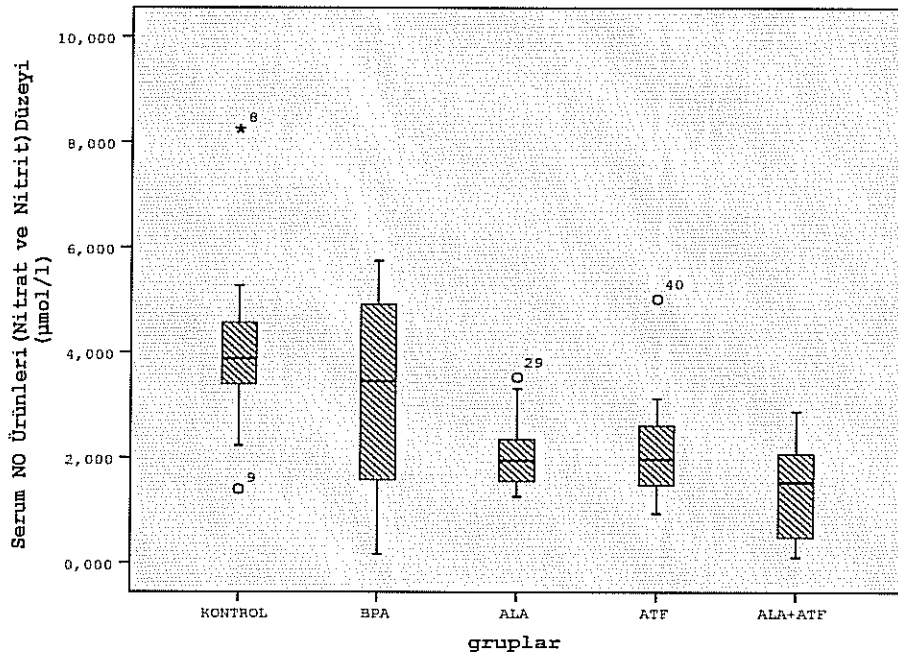


Normal dağılıma uymadığı için Kruskal-Wallis Testiyle değerlendirilen serum AOPP düzeylerinde anlamlı farklılık bulunamadı ($p>0,05$).

4.3. Serum Nitrik Oksit Ürünlerinin (Nitrat ve Nitrit) Düzeyi

NO Düzeyi kontrol grubunda $4,084 \pm 1,849$ $\mu\text{mol/l}$, BPA grubunda $3,131 \pm 1,914$ $\mu\text{mol/l}$, BPA+ α -LA grubunda $2,118 \pm 0,762$ $\mu\text{mol/l}$, BPA+ α -TF grubunda $2,260 \pm 1,175$ $\mu\text{mol/l}$, BPA+ α -LA+ α -TF grubunda $1,401 \pm 0,982$ $\mu\text{mol/l}$ olarak ölçüldü.

Grafik 4.3. Serum NO Ürünlerinin (Nitrat ve Nitrit) Düzeyi



Normal dağılıma uymadığı için Kruskal-Wallis Testiyle değerlendirilen ve buna göre anlamlı farklılık gösteren serum NO düzeyleri ($p < 0,05$), Mann Whitney U testine göre gruplar ikili olarak karşılaştırıldığında, BPA uygulanan gruba diğer gruplar arasında anlamlı farklılık bulunamadı ($p > 0,01$).

Tablo 4.3. Serum Nitrat ve Nitrit Düzeylerinin BPA grubuyla ikili karşılaştırması

	(I.grup) Kontrol	(II.grup) BPA	(III.grup) BPA+ α -LA	(IV.grup) BPA+ α -TF	(V.grup) BPA+ α -LA+ α -TF
NO(ortalama)	4,084 ^a	3,131	2,118 ^a	2,260 ^a	1,401 ^a

I, III, IV ve V. grup, II. gruba karşılaştırıldığında a: $p > 0,01$

(Mann Whitney U testine göre $p < 0,01$ anlamlı kabul edildi)

Ancak, BPA'yla birlikte α -LA ve kombine α -LA ile α -TF uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı azalma olduğu görüldü ($p < 0,01$).

Tablo 4.4. Serum Nitrat ve Nitrit Düzeylerinin kontrol grubuyla ikili karşılaştırması

	(I.grup) Kontrol	(II.grup) BPA	(III.grup) BPA+ α -LA	(IV.grup) BPA+ α -TF	(V.grup) BPA+ α -LA+ α -TF
NO(ort)	4,084	3,131	2,118 ^a	2,260	1,401 ^b

III. grup I. grupla karşılaştırıldığında a: p=0,006

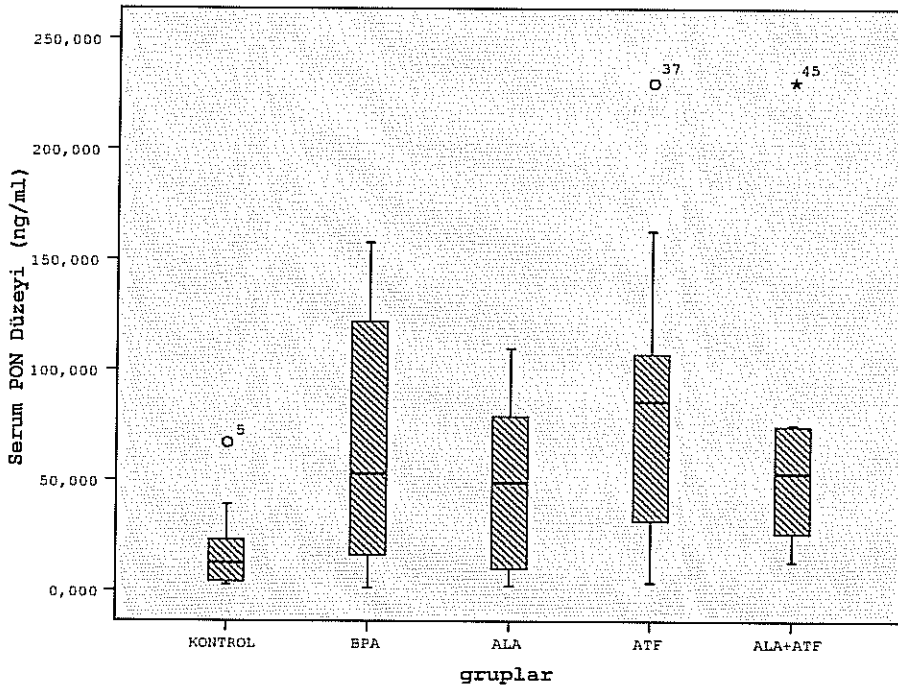
V. grup I. grupla karşılaştırıldığında b: p=0,003

(Mann Whitney U testine göre p<0,01 anlamlı kabul edildi)

4.4. Serum Paraoksonaz Düzeyi (PON1)

PON1 düzeyi, kontrol grubunda 18,823±20,168 ng/ml, BPA grubunda 65,091±57,890 ng/ml, BPA+ α -LA grubunda 49,042±38,197 ng/ml, BPA+ α -TF grubunda 88,000±69,353 ng/ml, BPA+ α -LA+ α -TF grubunda 68,878±69,461 ng/ml olarak ölçüldü.

Grafik 4.4. Serum PON1 Düzeyi

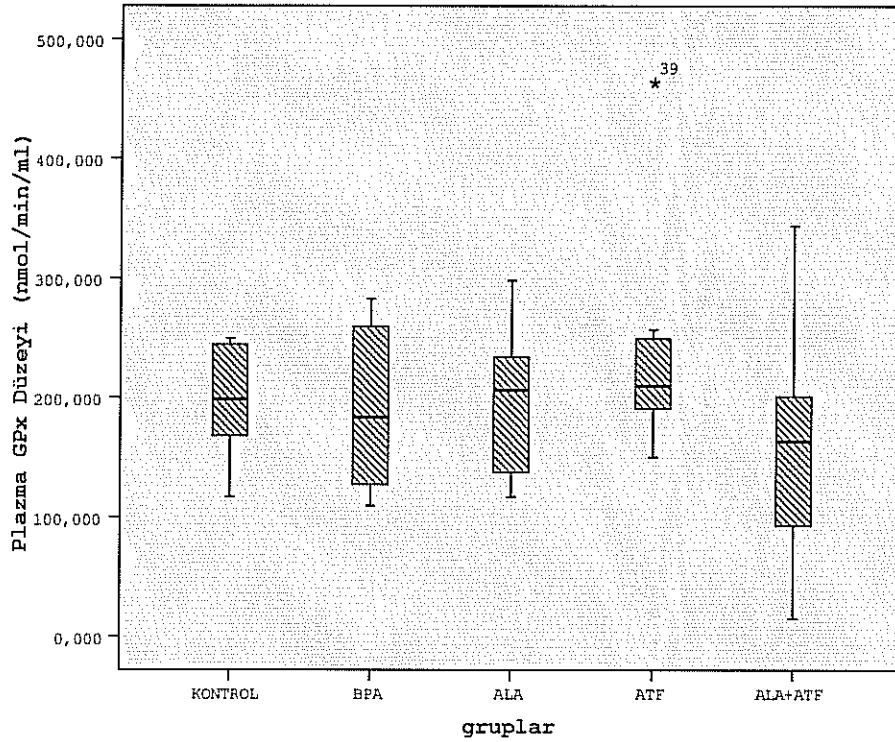


Normal dağılıma uymadığı için Kruskal-Wallis Testiyle değerlendirilen serum PON1 düzeylerinde anlamlı farklılık bulunamadı (p>0,05).

4.5. Plazma Glutasyon Peroksidaz (GPx) Düzeyi

GPx Düzeyi kontrol grubunda $195,348 \pm 49,358$ nmol/min/ml, BPA grubunda $194,839 \pm 67,952$ nmol/min/ml, BPA+ α -LA grubunda $197,895 \pm 66,643$ nmol/min/ml, BPA+ α -TF grubunda $235,335 \pm 86,421$ nmol/min/ml, BPA+ α -LA+ α -TF grubunda $159,417 \pm 103,464$ nmol/min/ml olarak ölçüldü.

Grafik 4.5. Plazma GPx Düzeyi

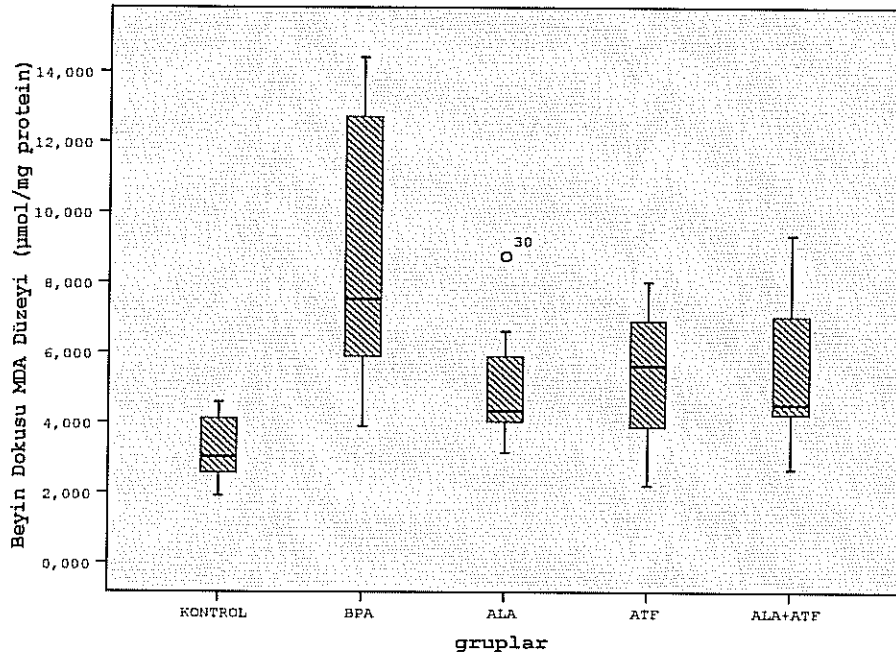


Normal dağılıma uymadığı için Kruskal-Wallis Testiyle değerlendirilen Plazma Glutasyon Peroksidaz düzeylerinde anlamlı farklılık bulunamadı ($p > 0,05$).

4.6. Beyin Dokusu Malondialdehit Düzeyi

Beyin dokusu MDA düzeyleri; kontrol grubunda $3,25 \pm 0,881$ $\mu\text{mol/mg}$ protein, BPA grubunda $8,873 \pm 3,870$ $\mu\text{mol/mg}$ protein, BPA+ α -LA grubunda $4,974 \pm 1,677$ $\mu\text{mol/mg}$ protein, BPA+ α -TF $5,445 \pm 1,933$ $\mu\text{mol/mg}$ protein, BPA+ α -LA+ α -TF grubunda $5,446 \pm 2,166$ $\mu\text{mol/mg}$ protein olarak ölçüldü.

Grafik 4.6. Beyin Dokusu MDA düzeyleri



Normal dağılıma uymadığı için Kruskal-Wallis Testiyle değerlendirilen ve buna göre gruplar arasında anlamlı farklılık ($p < 0,05$) gösteren beyin MDA düzeyleri, Mann Whitney U testine göre gruplar ikili olarak karşılaştırıldı.

Tablo 4.5. Beyin dokusu MDA düzeylerinin BPA grubuyla ikili karşılaştırması

	(I.grup) Kontrol	(II.grup) BPA	(III.grup) BPA+ α -LA	(IV.grup) BPA+ α -TF	(V.grup) BPA+ α -LA+ α -TF
MDA	3,25 ^a	8,873	4,974 ^b	5,445 ^b	5,446 ^b

I, III, IV ve V. grup, II. grupla karşılaştırıldığında a: $p=0,0001$ b: $p>0,01$

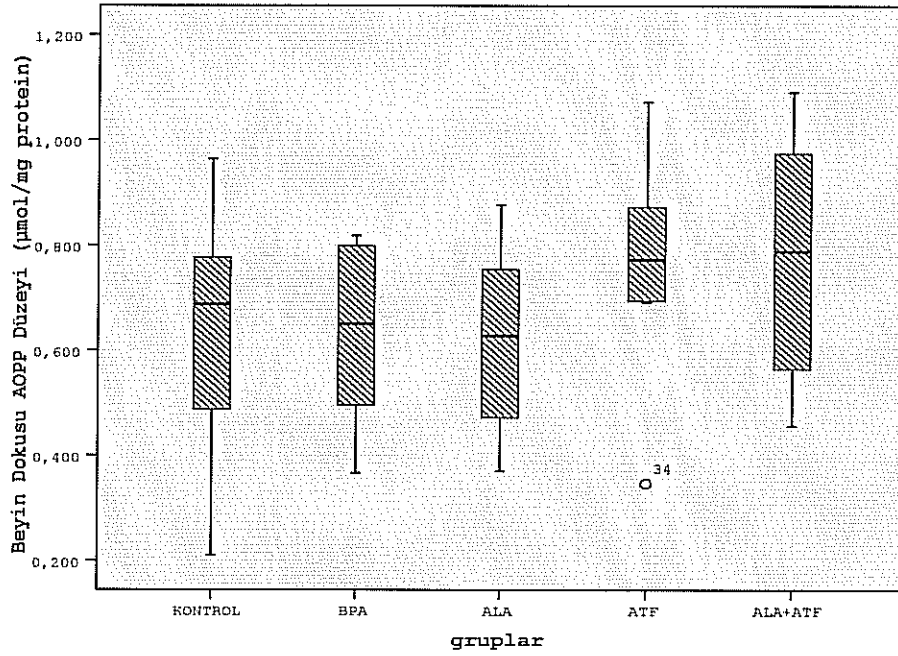
(Mann Whitney U testine göre $p < 0,01$ anlamlı kabul edildi)

BPA uygulanan grupta, kontrol grubuna göre MDA düzeylerinin anlamlı olarak arttığı görüldü ($p < 0,01$). BPA ile birlikte ayrı ayrı ve kombine α -LA ile α -TF verilen gruplarda ise BPA uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p > 0,01$).

4.7. Beyin Dokusu AOPP Düzeyi

AOPP düzeyleri kontrol grubunda $0,644 \pm 0,226$ $\mu\text{mol/mg}$ protein, BPA grubunda $0,635 \pm 0,156$ $\mu\text{mol/mg}$ protein, BPA+ α -LA grubunda $0,621 \pm 0,173$ $\mu\text{mol/mg}$ protein, BPA+ α -TF $0,765 \pm 0,187$ $\mu\text{mol/mg}$ protein, BPA+ α -LA+ α -TF grubunda $0,775 \pm 0,237$ $\mu\text{mol/mg}$ protein olarak ölçüldü.

Grafik 4.7. Beyin Dokusu AOPP Düzeyleri

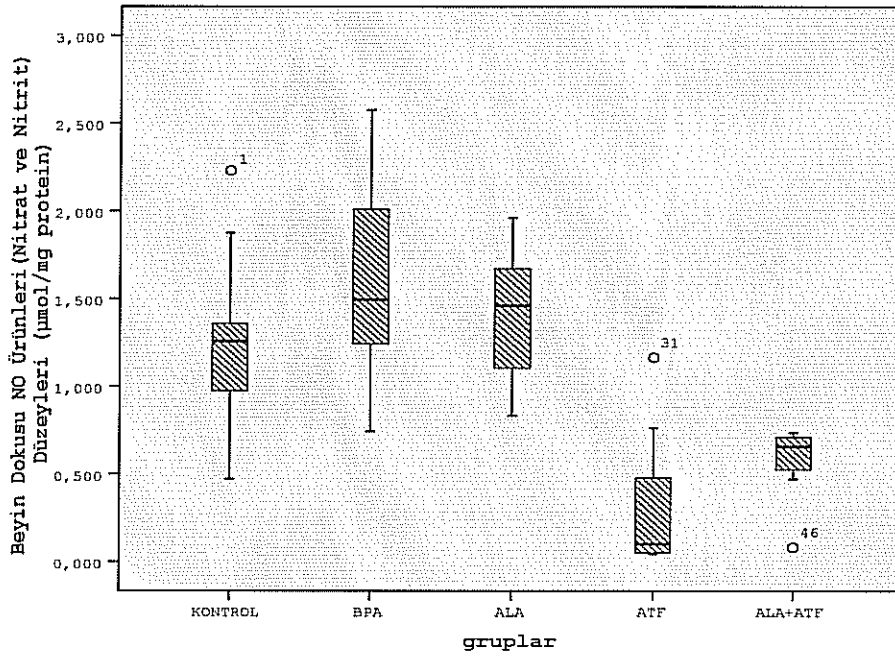


Normal dağılıma uymadığı için Kruskal-Wallis Testiyle değerlendirilen beyin dokusu örneklerine ait AOPP düzeylerinde anlamlı farklılık bulunamadı ($p > 0,05$).

4.8. Beyin Dokusu Nitrik Oksit Ürünleri (Nitrat ve Nitrit) Düzeyi

NO Ürünleri (Nitrat ve Nitrit) Düzeyi kontrol grubunda $1,275 \pm 0,498$ $\mu\text{mol/mg}$ protein, BPA grubunda $1,619 \pm 0,537$ $\mu\text{mol/mg}$ protein, BPA+ α -LA grubunda $1,426 \pm 0,376$ $\mu\text{mol/mg}$ protein, BPA+ α -TF grubunda $0,304 \pm 0,385$ $\mu\text{mol/mg}$ protein, BPA+ α -LA+ α -TF grubunda $0,576 \pm 0,217$ $\mu\text{mol/mg}$ protein olarak ölçüldü.

Grafik 4.8. Beyin Dokusu NO Ürünleri (Nitrat ve Nitrit) Düzeyi



Normal dağılıma uymadığı için Kruskal-Wallis Testiyle değerlendirilen ve buna göre beş grup birbiriyle karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren beyin dokusu NO düzeylerinde ($p < 0,05$), Mann Whitney U testine göre gruplar ikili olarak karşılaştırıldığında BPA grubuna göre anlamlı farklılık bulunamadı ($p > 0,01$).

Tablo 4.6. Beyin dokusu Nitrat ve Nitrit Düzeylerinin BPA grubuyla ikili karşılaştırması

	(I.grup) Kontrol	(II.grup) BPA	(III.grup) BPA+ α -LA	(IV.grup) BPA+ α -TF	(V.grup) BPA+ α -LA+ α -TF
NO	1,275 ^a	1,619	1,429 ^a	0,304 ^a	0,576 ^a

I, III, IV ve V. grup, II. grupla karşılaştırıldığında a: $p > 0,01$

(Mann Whitney U testine göre $p < 0,01$ anlamlı kabul edildi)

Ancak, ikili karşılaştırmalarda BPA'yla birlikte α -TF uygulanan grup ve kombine α -LA ve α -TF uygulanan grupta diğer gruplara göre anlamlı azalma olduğu görüldü. ($p < 0,01$)

Tablo 4.7. Beyin dokusu Nitrat ve Nitrit Düzeylerinin Düzeylerinin ikili karşılaştırması

	(I.grup) Kontrol	(II.grup) BPA	(III.grup) BPA+ α -LA	(IV.grup) BPA+ α -TF	(V.grup) BPA+ α -LA+ α -TF
NO	1,275 ^{ab}	1,619 ^c	1,429 ^c	0,304	0,576

IV. Grup; I. grupla karşılaştırıldığında, a: p=0,001

IV. Grup; II ve III. gruplarla karşılaştırıldığında c: p=0,0001

V. Grup; I. grupla karşılaştırıldığında, b: p=0,003

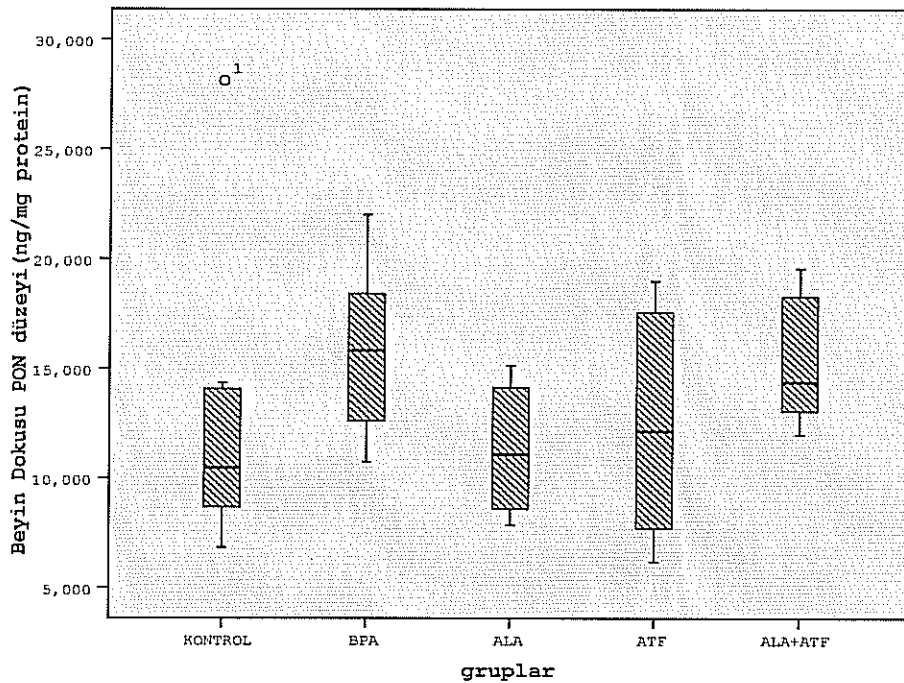
V. Grup; II ve III. gruplarla karşılaştırıldığında c: p=0,0001

(Mann Whitney U testine göre p<0,01 anlamlı kabul edildi)

4.9. Beyin Dokusu Paraoksonaz (PON 1) Düzeyi

PON1 düzeyleri, kontrol grubunda 12,190±6,143 ng/mg protein, BPA grubunda 15,759±4,001 ng/mg protein, BPA+ α -LA grubunda 11,405±2,840 ng/mg protein, BPA+ α -TF grubunda 12,652±4,747 ng/mg protein, BPA+ α -LA+ α -TF grubunda 15,382±2,954 ng/mg protein olarak ölçüldü.

Grafik 4.9. Beyin Dokusu PON1 Düzeyleri

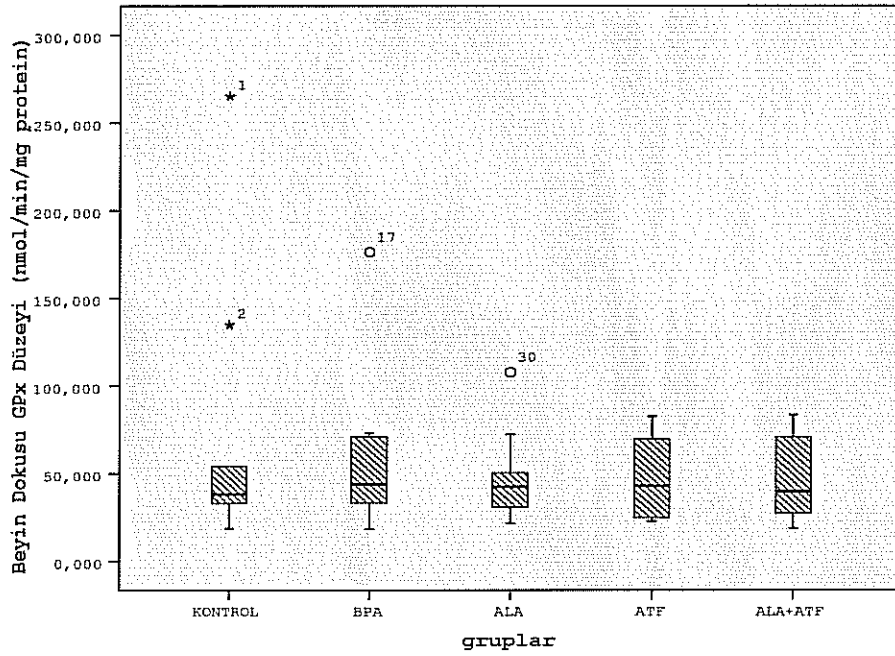


Normal dağılıma uymadığı için Kruskal-Wallis Testiyle değerlendirilen beyin dokusu örneklerine ait PON1 düzeylerinde anlamlı farklılık bulunamadı (p>0,05).

4.10. Beyin Dokusu Glutasyon Peroksidaz (GPx) Düzeyi

GPx Düzeyleri; kontrol grubunda $69,629 \pm 76,05$ nmol/min/mg protein, BPA grubunda $58,640 \pm 45,775$ nmol/min/mg protein, BPA+ α -LA grubunda $47,411 \pm 26,073$ nmol/min/mg protein, BPA+ α -TF grubunda $48,679 \pm 23,369$ nmol/min/mg protein, BPA+ α -LA+ α -TF grubunda $47,207 \pm 25,033$ nmol/min/mg protein olarak ölçüldü.

Grafik 4.10. Beyin Dokusu GPx Düzeyleri



Normal dağılıma uymadığı için Kruskal-Wallis Testiyle değerlendirilen beyin dokularına ait GPx düzeylerinde anlamlı farklılık bulunamadı ($p>0,05$).

5. TARTIŞMA

Plastik malzemelerin günlük yaşamımıza getirdiği kolaylıklarla geniş kullanım alanına sahip olan, içme suyuyla, besin zinciriyle alınan ve çevresel olarak sıklıkla maruz kalınan Bisfenol A (BPA) toksik kimyasal maddelerden biridir. BPA, yüzey gerilimini azaltıcı özelliğiyle endüstriyel alanda sıkça kullanılan alkilfenol bileşiklerine ait bir gruptur. Başta polikarbonat plastikler ve epoksi reçineler olmak üzere pek çok kimyasal ürünün imalatında kullanılırlar. Besin kapları ve çeşitli plastiklerden yiyecek ve içeceklere salınımından dolayı potansiyel toksisitesi araştırmalara konu olmuş ve insan organizmasına toksik ve ksenoöstrojenik etkileri olduğu bulunmuştur. Literatürde yer alan çalışmalarda rat ve farelerde BPA'nın oral alımının üreme üzerine olumsuz etkileri olduğu ve hematopoetik sistemde malignite riskini arttırdığı bulunmuştur (Markey *et al.*, 2001). BPA'nın ciltten emilimi, karaciğer, böbrek ve diğer vital organlarda karsinogenezisle sonuçlanan önemli hasarlara neden olur. Epiklorohidrinle BPA arasında kondensasyonla oluşan ve besin paketleme ürünlerinde kullanılan bir epoksi reçine olan Bisphenol A diglycidyl ether epiklorohidrin (BADGE) ve hidroliz ürünleri, insan lenfosit kültürlerinde sitotoksik ve genotoksik etkiler göstermişlerdir (Suarez *et al.*, 2000). BPA verilen dişi ve erkek farelerde renal tübüllerin rejenerasyonu ve dejenerasyonu gözlenmiştir (Kabuto *et al.*, 2003).

Bisfenoller (BP), Nonilfenoller (NP) ve Oktilfenoller (OP) gibi alkilfenollerin endokrin sistemde oluşturdukları hasarlar yanında, çeşitli organlarda redoks durumunu etkileyerek oksidatif stresi arttırdığı gösterilmiştir (Kabuto *et al.*, 2003; Kabuto *et al.*, 2004). Pek çok çevresel toksik kontaminan madde gibi BPA da hidroksil radikali, superoksit anyonu ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen ürünleri (ROÜ) oluşturarak oksidatif stresi indükler. ROÜ, hücre membran lipitleri, DNA ve proteinlerinde önemli miktarda oksidatif hasara sebep olmaktadır (Bindhumol *et al.*, 2003; Chitra *et al.*, 2003). Antioksidanlar kendi elektronlarından birini verip, elektron çalma reaksiyonlarını sonlandırarak ROÜ'ni nötralize ederler. Hücre ve dokuyu, hücresel hasar ve buna bağlı olarak ortaya çıkan hastalıklardan korurlar (Halliwell, 1995).

Korkmaz ve arkadaşları, yaptıkları çalışmalarında gruplara oral gavaj yoluyla 25 mg/kg/gün Bisfenol A (BPA), Nonilfenol (NP) ve Oktilfenol (OP) uygulamış, BPA, NP ve OP uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre, rat böbrek dokularında lipit

peroksidasyon düzeylerinde anlamlı artış, glutatyon düzeylerinde ise anlamlı azalma olduğunu göstermişlerdir (Korkmaz *et al.*, 2011).

Kabuto ve arkadaşları çalışmalarında; intraperitoneal olarak 25 ve 50 mg/kg/gün dozlarında BPA vererek, BPA'nın her iki dozda da ratların beyin, karaciğer, böbrek ve testis dokularında oksidatif hasar meydana getirdiğini göstermiştir (Kabuto *et al.*, 2003; Kabuto *et al.*, 2004).

Çalışmamızda deney süresince ratlara 25 mg/kg BPA uygulandı (Kabuto *et al.*, 2003; Kabuto *et al.*, 2004; Korkmaz *et al.*, 2011). BPA'nın ratlarda oluşturması muhtemel oksidatif hasarı gözlemlemek ve bu oksidan hasar üzerine Alfa Lipoik Asit (α -LA) ve Alfa Tokoferol'ün (α -TF) ayrı ayrı ve kombine uygulanmasının olumlu etkisinin olup olmadığını belirlemek için Malondialdehit (MDA), İleri Protein Oksidasyon Ürünleri (AOPP), Nitrik Oksit (NO) düzeyleri ve antioksidan enzimler olan Glutatyon Peroksidaz, Paraoksonaz (PON1) düzeyleri ölçüldü.

α -LA ve α -TF gibi antioksidan madde desteklerinin, deneysel BPA toksikasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif hasarı iyileştirici etkisinin olup olmadığının incelenmesi; epoksi reçine, polikarbonat plastiklerin imalatında, diş tedavi malzemeleri, ambalaj endüstrisi, besin kaplarının iç kaplamasında yaygın olarak kullanılan BPA'dan korunmada bu antioksidanların kullanımının koruyucu etkisinin anlaşılabilmesini sağlayacaktır.

Çalışmamızda; deney gruplarından II. gruba sadece günde 25 mg/kg BPA uygulanırken, I. ve II. grup dışındaki diğer gruplara BPA ile birlikte antioksidan olarak 100 mg/kg α -LA ve 20 mg/kg α -TF uygulanmasıyla bu antioksidanların muhtemel oksidatif hasarı engelleyip engellemediğini araştırdık. Yapılan çalışmalarda, α -TF'ün nonilfenollerin oksidan etkilerine karşı koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiş (Okai *et al.*, 2000; Chitra *et al.*, 2003; Chitra and Mathur, 2004), ancak α -TF'ün ve α -LA'nın BPA'nın muhtemel oksidan etkilerine karşı koruyucu etkileri ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. α -LA, hem hücrelerde doğal olarak bulunan hem de diyetle alınıp hücrelere taşınarak dihidrolipoik asite (DHLA) indirgenen etkili bir serbest radikal temizleyicidir. α -LA/DHLA oksidasyon/redüksiyon çifti, α -TF, L-askorbik asit, ubikinon ve glutatyondan daha güçlü bir redoks potansiyeline sahiptir (Packer *et al.*, 1995). α -LA/DHLA çifti tarafından okside glutatyon, dehidroaskorbat veya ubikinonun indirgenmesi, biyolojik sistemlerde okside formlarından E vitamini (α -TF)'nin rejenerasyonu ile sonuçlanır (Packer *et al.*, 1995; Packer *et al.*, 1997a; Moini *et al.*,

2002). Thioredoksini redükte ederek radikal okside şeklinden α -TF'ün rejenerasyonunu sağlar (Packer and Tritschler, 1996). α -LA'in bu özelliğinden dolayı, çalışmamızda α -TF ile birlikte α -LA uygulayarak, α -TF'ün etkisini potansiyalize edip etmediğini ve tek olarak kullanımlarına göre kombine kullanımlarının daha kuvvetli bir antioksidan etki oluşturup oluşturmadığını göstermeyi hedefledik.

Finkel ve Holbrook'un çalışmalarında iki hafta 100 mg/kg olarak ve diğer çeşitli çalışmalarda 25-100 mg/kg dozunda uygulanan α -LA'in, antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırarak lipid peroksidasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Finkel *et al.*, 2000).

Arivazhagan ve arkadaşlarının yaptıkları iki ayrı deneysel çalışmada ise 7 veya 14 günlük sürelerde farklı gruplar oluşturarak günlük 50, 100, 150 ve 200 mg/kg dozlarında α -LA periton içine uygulanmış ve sonuçlara göre lipid peroksidasyonunu inhibe edebilen etkin doz olarak günlük 100 mg/kg dozu seçilmiştir. Bizim de çalışmamızda kullandığımız doz olan 100 mg/kg/gün α -LA'in ratlarda plazma α -TF ve tam kan C vitamini düzeyini arttırdığı, karaciğer ve böbrek mitokondrilerinde de aynı şekilde bu vitaminlerin düzeyinde artışa sebep olduğunu göstermişlerdir (Arivazhagan *et al.*, 2001a, b).

Karaca ve arkadaşları, dietilnitrozaminin karaciğerdeki toksik etkilerini belirlemek ve bu toksik etkilere bağlı meydana gelebilecek oksidatif strese karşı α -LA'in koruyucu etkilerini araştırmak için yaptıkları çalışmada, 100 mg/kg/gün α -LA uyguladıkları grupta, sadece dietilnitrozamin uygulanan gruba göre MDA düzeyinde anlamlı azalma ve glutatyonda ise anlamlı artış olduğunu göstermişlerdir. Çalışmada α -LA'in fenton tipi reaksiyon ile oluşan hidroksil radikallerinin miktarını azaltmada etkili olduğu, peroksit ve süperoksit radikallerini de uzaklaştırdığı gösterilmiştir (Karaca ve ark, 2007).

Erşahin ve arkadaşları, siklosporinle oluşturdukları oksidatif streste günlük 100 mg/kg α -LA uygulamışlar ve yaptıkları çalışmanın sonunda, verilen dozda α -LA'in, antioksidan enzim aktivitesinde etkili olduğunu göstermişlerdir.

Mehranjani ve arkadaşları, günlük 250 mg/kg para nonilfenolün indüklediği oksidatif hasara karşı 100 mg/kg α -TF uyguladıkları çalışmalarında, α -TF'ün rat testis dokularındaki bu oksidatif hasarı geri çevirebildiğini göstermişlerdir (Mehranjani *et al.*, 2009).

Chitra ve Mathur, nonilfenolle indüklenen oksidatif strese karşı E vitamininin (α -TF) etkisini araştırdıkları çalışmalarında bizim de çalışmamızda kullandığımız doz olan günlük 20 mg/kg α -TF uygulamışlar, çalışmanın sonunda uygulanan dozdaki α -TF'ün, testis dokusunda nonilfenolün indüklediği oksidatif stresi geri çevirdiğini göstermişlerdir (Chitra and Mathur, 2004).

Çalışmamızın sonunda, kontrol grubunun serum ve beyin dokularına ait örnekleriyle, sadece BPA uygulanan gruba ait örnekler karşılaştırıldığında, MDA düzeylerindeki istatistiksel olarak anlamlı artış ($p<0,05$), uyguladığımız doz ve sürede BPA'nın oksidatif hasara sebep olduğunu gösterdi.

Bindhumol ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada BPA'nın rat karaciğerinde antioksidan kapasiteyi azaltarak oksidatif strese yol açtığı ve C vitamini uygulamasının bu oksidatif stresi geri çevirdiği gösterilmiştir. Patolojik durumlara karşı gelişen savunma mekanizmasında önemli role sahip olan ROÜ'nin fazla miktardaki birikimi dokulara zarar verir. Antioksidan enzim düzeylerindeki düşüş ise ROÜ'e karşı hareket eden primer antioksidan sistemdeki düşüşü gösterir. Mitokondri, ROÜ birikiminin en çok görüldüğü yer olduğundan, antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki en önemli düşüş de mitokondriyal fraksiyonlarda görülmektedir (Bindhumol *et al.*, 2003).

Chitra ve arkadaşlarının, düşük dozlarda BPA'nın oksidatif stres yapıcı etkisinin olup olmadığının gösterilmesi için NOEL'in (No Observed Effect Level) altındaki 0.2, 2 ve 20 μ g/kg doz aralığında yaptıkları çalışmada, BPA uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre doza bağlı olarak ratların epididimal sperm motilitesi ve sayısında düşüş, antioksidan enzim düzeylerinde anlamlı azalma, hidrojen peroksit düzeyi ve lipid peroksidasyonunda anlamlı artış olduğu görülmüştür. BPA'nın yükselen dozlarının daha fazla ROÜ oluşumuna sebep olarak ve antioksidan enzimlerin düzeylerini düşürerek rat epididimal spermelerinde oksidatif hasara sebep olduğu gösterilmiştir (Chitra *et al.*, 2003).

Fujisawa ve arkadaşları , BPA metabolitlerinin prooksidan aktivitesini, BPA monoglukuronidin en önemli metabolit olduğunu, BPA'nın hidroksile BPA'ya ve daha ileri dönüşümle bisfenol-o-kinon ve bisfenol semikinona dönüştüğünü göstermişlerdir (Fujisawa *et al.*, 2000; Kabuto *et al.*, 2003).

Obata ve Kubota, BPA'nın peroksidaz ve hepatik mikrozomal p450 sistemi ile hidroksil radikali oluşumunu arttırdığını, BPA'ya ait kinon ve semikinon

metabolitlerinin DNA-BPA ürünleri oluşturabildiklerini göstermişlerdir (Atkinson and Roy, 1995a, b; Obata and Kubota, 2000).

Atkinson ve Roy, BPA'nın reaktif bir metaboliti olan 4,5-bisphenol-o-kinon ve majör DNA ürününün rat karaciğer DNA'sında peroksidaz aktivasyonu varlığında okside olduğunu göstermiştir (Atkinson and Roy, 1995b, a)

Pekçok çevresel kontaminan madde oksidatif stresi indükleyip reaktif oksijen ürünlerinin (ROÜ) oluşumuna sebep olarak sitotoksik davranış gösterir. Dokularda biriken ROÜ, antioksidan savunma sistemi tarafından temizlenir. Çevresel kontaminan maddeler hücrelerdeki prooksidan/antioksidan dengeye zarar verir (Bindhumol *et al.*, 2003; Chitra *et al.*, 2003; Chitra and Mathur, 2004).

BPA, yağ dokusunda birikip, ksenobiyotiklerin aktivasyonu, inaktivasyonu ve atılımının düzenlenmesinde rol oynayan sitokrom p-450'ye bağlı oksidan enzimler aracılığıyla 5-hidroksibisfenole ve daha sonra da 4,5, bisfenol-o-kinon'a çevrilir (Atkinson and Roy, 1995a, b).

İzole rat hepatositlerine BPA inkübasyonu yapılarak BPA'nın hepatik mitokondrilerdeki metabolizması ve sitotoksik etkileri araştırılmış, BPA'nın önce hepatositlerde hızlı bir şekilde en önemli metaboliti olan BPA-glukuronide dönüştüğü görülmüştür. BPA'nın sebep olduğu sitotoksiste hücre içi enerji düzeyiyle ilgili olup mitokondriler bu bileşiğin önemli hedefleridir (Atkinson and Roy, 1995a, b; Nakagawa and Tayama, 2000). Fenolik hidroksil grubu mitokondriyal solunumun inhibisyonu için gerekli iken, hidrokarbon köprüünün uzunluğu, molekülün hidrofobisitesini artırıp membrandan geçişini kolaylaştırarak mitokondriyal disfonksiyona öncülük eder (Kehrer *et al.*, 1990). BPA, oksidatif fosforilasyonda ayrılmaya ve mitokondriyal solunumu inhibe ederek mitokondriyal fonksiyon hasarına sebep olarak ATP'nin hücresel düzeyini düşürüp sitotoksik özellik gösterir (Atkinson and Roy, 1995a, b).

Serbest radikaller yüksek reaktiviteleri ile membran çoklu doymamış yağ asitleriyle etkileşip lipid peroksidasyonunu başlatırken, bu şekilde oluşan lipid peroksitleri kolaylıkla yıkılarak başta Malondialdehit (MDA) olmak üzere çeşitli ürünler meydana getirirler.

Bu ürünlerin çok hızlı bir şekilde farklı ürünlere değişmesi ve saptanmalarının zorluğu nedeniyle çalışmamızda lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA düzeylerini ölçtük. Beyin dokusu ve serum örneklerinde sadece BPA uygulanan grupta lipid peroksidasyonu düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı görüldü.

Sadece BPA uygulanan grup, BPA ile birlikte ayrı ayrı ya da kombine α -LA ve α -TF uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında, serum örneklerinde BPA grubuna göre lipit peroksidasyonunda anlamlı azalma görülürken ($p<0,05$), beyin dokusunda lipit peroksidasyonu üzerine olan etkisinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmeyen bir azalma görüldü.

Kabuto ve arkadaşları çalışmalarında; intraperitoneal olarak 25 ve 50 mg/kg/gün dozlarında BPA uygulayarak, BPA'nın beyin, karaciğer, böbrek ve testis dokularında hidrojen peroksit düzeyini arttırdığını, hidrojen peroksitin de kolayca hidroksil radikale dönüşerek redükte glutatyonda düşüş ve okside glutatyonda artışa sebep olabileceğini göstermişlerdir. BPA uygulamasının dokularda doza bağlı olarak, biyojenik makromoleküler peroksidasyon indeksi olan TBARS düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir (Kabuto *et al.*, 2003; Kabuto *et al.*, 2004).

Chitra ve arkadaşlarının 0.2, 2 ve 20 μ g/kg doz aralığında BPA uygulayarak yaptıkları çalışmada, BPA uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre doza bağlı olarak lipit peroksidasyonu düzeyinde anlamlı artış olduğunu göstermişlerdir (Chitra *et al.*, 2003; Chitra and Mathur, 2004).

Sajiki ve arkadaşları, düşük doz BPA uyguladıkları çalışmalarında, BPA'nın ROÜ ile etkileşimi sonucunda antioksidan enzim düzeylerini azalttığını ve lipit peroksidasyonunu arttırdığını göstermişler (Sajiki and Yonekubo, 2003, 2004; Sajiki *et al.*, 2010). Bu bulgular, çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularla paralellik göstermekte, BPA'nın toksik etkilerinden bir kısmının lipit peroksidasyonu üzerinden meydana geldiğini düşündürmektedir.

BPA ile birlikte ayrı ayrı ve kombine olarak α -LA ve α -TF uyguladığımız gruplarda, sadece BPA uygulanan grupla karşılaştırıldığında beyin dokusu ve serum örneklerinde lipit peroksidasyonu düzeylerinde BPA grubuna göre anlamlı azalma tespit ederken ($p<0,05$), kontrol grubuna göre ise anlamlı farklılık olmadığını gördük ($p>0,05$). Bu uyguladığımız dozlarda antioksidanların BPA'nın oluşturduğu oksidatif hasarı geri çevirdiğini göstermektedir. Ancak, BPA ile birlikte ayrı ayrı α -LA ya da α -TF uygulanan gruplarla, kombine α -LA ve α -TF uygulanan grup arasında beyin dokusu ve serum örneklerinde anlamlı fark görülmemesi, serum lipit peroksidasyonunu önleyici etkileri karşılaştırıldığında α -LA ve α -TF'ün kombine kullanımlarının herhangi bir avantaj sağlamadığını gösterdi.

Chitra ve Mathur'un yaptıkları başka bir çalışmalarında, benzer şekilde nonilfenollere maruziyetin oksidatif strese sebep olduğu, lipid peroksidasyon düzeyini arttırırken antioksidan enzimleri aktive ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada bizim de çalışmamızda kullandığımız antioksidan maddelerden biri olan α -TF kullanılmış, α -TF'nin nonilfenollere bağlı ortaya çıkan oksidatif hasarı geri çevirebildiği gösterilmiştir (Chitra *et al.*, 2003; Chitra and Mathur, 2004).

Okai ve arkadaşlarının çalışmalarında nonilfenolün oksidan etkileri, α -TF ve beta karotenin nonilfenolün meydana getirdiği hücre hasarı üzerine onarıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (Okai *et al.*, 2000).

Bulmuş ve arkadaşları, α -LA kullandıkları çalışmalarında; hiperhomosisteinemi oluşturulan gruptaki eritrosit glutatyon düzeylerinin anlamlı olarak azaldığını, α -LA uygulanan grupta ise anlamlı artış olduğunu görmüşler, α -LA'nin hiperhomosisteineminin oluşturduğu lipid peroksidasyonunu geri çevirdiğini ve eritrosit glutatyon düzeyinde anlamlı bir artışa neden olduğunu öne sürmüşlerdir (Bulmuş, 2006).

Shila ve arkadaşları; arsenik intoksikasyonu oluşturdukları ratların bir grubuna 60 gün süreyle günde 70 mg/kg α -LA uygulayarak; ratların beyin dokularında anlamlı olarak artan lipid peroksidasyon düzeylerinin, α -LA uygulanması ile anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir (Shila *et al.*, 2005a; Shila *et al.*, 2005b).

Balachandar ve arkadaşları kardiyak toksisite oluşturdukları ratlarda α -LA'nin kalp dokusu α -TF ve C vitaminleri düzeyinde artışa sebep olduğunu göstermişlerdir (Balachandar *et al.*, 2003).

Biewenga ve arkadaşları, kuvvetli bir antioksidan olan α -LA'nin hidroksil, lipid peroksil ve nitrik oksit radikallerine karşı antioksidan rol oynadığını, singlet oksijen ve hidrojen peroksitle de etkileşime girerek, lipid peroksidasyon düzeyini azalttığını göstermişlerdir (Biewenga *et al.*, 1997).

Çalışmamıza benzer şekilde Marangon ve arkadaşları, alfa lipoik asit ve alfa tokoferolün sinerjik etki potansiyelini değerlendirmek için diyabetik nöropatili hastalara, üç hafta süreyle günlük 600 mg α -LA ve 400 IU α -TF uygulayarak idrarda F₂ izoprostanlarının ve protein karbonil ürünlerinin düzeyi ölçülmüş ve AAPH (2-amidinopropan hidroklorid) ile oksidasyon oluşturulduktan sonra, her iki grupta da plazma karbonillerinde anlamlı artış, AAPH indüksiyonundan sonra alfa lipoik asit verilen grupta plazma karbonil düzeylerinde anlamlı azalma olduğunu göstermişlerdir.

α -TF'ün tek başına ve α -LA ile kombine uygulanması plazma karbonil düzeylerinde anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır. Çalışmanın sonucunda, α -LA'in insan plazmasında LDL oksidasyonunu ve üriner F₂ izoprostanlarını azalttığı, antioksidan etkisiyle LDL oksidasyonundan koruduğu, diyabetik hastalarda da polinöropati ve makrovasküler hastalık oluşumundan koruduğu gösterilmiştir. Sadece α -LA uygulandığında plazma karbonil düzeyleri anlamlı olarak düşerken, α -TF'ün tek başına anlamlı bir etkisinin görülmemesi, α -LA ve α -TF'ün kombine uygulanmasının plazma karbonil düzeylerinde anlamlı bir farklılığa sebep olmadığı gösterilmiştir (Marangon *et al.*, 1999). Marangon ve arkadaşlarının elde ettiği bulgular çalışmamızın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda BPA'nın oksidan etkilerine karşı ayrı ayrı ve kombine olarak α -LA ve α -TF uygulayarak rat beyin dokuları ve serumlarındaki etkileri gözlemlememiz, nöronal dokunun yüksek oksijen içeriği, demir konsantrasyonu ve çoklu doymamış yağ asit miktarıyla oksidatif hasara duyarlı olmasıyla ilişkilidir. Kullandığımız antioksidanlardan biri olan α -LA'in nöronal hücrelerdeki oksidatif hasara bağlı olarak ortaya çıkan yaşlanmaya karşı güçlü bir antioksidan olduğu bilinmektedir (Arivazhagan *et al.*, 2001a, b; Arivazhagan *et al.*, 2002).

Rat beyni, diğer organlara göre toksik madde birikimi daha fazla olduğu için oksidatif hasara yüksek duyarlılığı ile *in vivo* araştırmalarda kullanışlı bir model oluşturmaktadır. Beynin yaşlanması, demir iyonları ve oksijen serbest radikallerinin partisipasyonu ile birlikte olan oksidatif mekanizmaları içerir. Arivazhagan ve arkadaşları, beyinde yaşlanmayla birlikte lipid peroksidasyon ürünleri ve protein karbonil içeriğinin arttığını, oksidatif ürünlerin birikiminin oksijen tüketim oranı ile ilgili olduğunu göstermişlerdir. α -LA'in fenton tipi reaksiyonlarda oluşan serbest radikalleri temizleyebilme özelliğine bağlı olarak deneysel α -LA uygulaması, lipid peroksidasyonu ve protein karbonil içeriğinin yaşlı ratlarda anlamlı bir şekilde azalmasına sebep olmuştur. Hücresel membran bütünlüğünün korunması da oksidatif reaksiyonları nötralize eden mekanizmalara bağlıdır. α -LA, membranlardan geçebilme kapasitesine bağlı olarak hem hidrofobik hem de hidrofilik ortamlarda birikebilmekte, serbest radikalleri temizleyebilmesi ve demiri şelatlayıcı etkiye sahip olmasıyla lipid peroksidasyonunu ve protein karbonil içeriğini azaltabilmektedir. Protein ve lipidlerin uğradığı oksidatif hasar, nükleik asit dengesini de etkiler. Ratların DNA ve RNA içeriğindeki belirgin düşüşle birlikte ortaya çıkan DNA lezyonları da çeşitli protein

ürünlerinin birikimi ile hücre ölümü ve doku fonksiyon bozukluğuyla sonuçlanır. ROÜ, kenar zincir aminoasit rezidülerinde oksidasyona, dolayısıyla proteinlerin çapraz bağlanması ve protein parçalanması ile sonuçlanan protein zincir oksidasyonuna sebep olmaktadır. α -LA, ratların beyin dokusuna ait protein içeriğinde artışa, protein yıkılımını azaltarak ve nitrojen dengesi oluşturarak oksidatif stresin azalmasına sebep olmakta, okside membran proteinlerini tamir ederek membran bütünlüğünü sağlamakta ve hücresel içeriklerin kaybından korumaktadır. Çalışmanın sonuçları, α -LA'nın nükleik asit ve proteinleri oksidatif hasardan koruduğunu göstermektedir.

Biyomoleküler hasardan korunmada defans sistemlerinden biri olan α -LA'nın, DNA hasarını da içeren çok çeşitli oksidatif strese karşı korunmada rol alan bir kofaktör olması ve kan beyin bariyerini kolaylıkla geçebilmesiyle beyindeki oksidatif hasarı ve dolayısıyla yaşlanmayı önlemedeki rolü önemlidir (Arivazhagan *et al.*, 2002).

Beyin ve sinir sistemi dokuları için merkezi önem taşıyan tiyol antioksidanı olan glutatyon sadece endojen olarak bulunurken, alfa lipoik asitin diyetle alınabiliyor olması çeşitli nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde önemli hale gelmesine sebep olmuştur. Ekzojen olarak alınabilen alfa lipoik asit, mitokondriyal disfonksiyona karşı antioksidan olarak hareket eder. Mitokondriyal kalsiyum transportunu da inhibe ederek hücre içi kalsiyum miktarının düzenlenmesinde önemli etkilere sahiptir. Serbest radikalleri temizlediği gibi geçiş metallerini şelatlama ve hücre içi glutatyon düzeyini artırma özelliklerine de sahiptir (Packer and Tritschler, 1996).

Çalışmamızda beyin dokusu ve serum örneklerine ait AOPP düzeyleri değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamadı. Bulgularımız, uyguladığımız doz ve sürede BPA'nın protein oksidasyonuna sebep olmadığını gösterdi.

Arivazhagan ve arkadaşlarının ratlara 7 ve 14 gün süreyle intraperitoneal yolla 100 mg/kg α -LA uygulayarak, beyin dokusunda lipid peroksidasyonu ve protein karbonil içeriğini değerlendirdikleri çalışmalarında, metabolik bir antioksidan olan DHLA'nın deney gruplarında nükleik asit ve protein içeriğini arttırırken, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonunun azaldığını göstermişler. ROÜ, kenar zincir aminoasit rezidülerinde oksidasyona, dolayısıyla proteinlerin çapraz bağlanması ve protein parçalanması ile sonuçlanan protein zincir oksidasyonuna sebep olmaktadır. α -LA, membranlardan geçebilme kapasitesine bağlı olarak hem hidrofobik hem de hidrofilik ortamlarda birikebilmekte, serbest radikalleri temizleyebilmesi ve demiri

şelatlayıcı etkiye sahip olmasıyla lipit peroksidasyonunu ve protein karbonil içeriğini azaltabilmektedir. α -LA, ratların beyin dokusuna ait protein içeriğinde artışa, protein yıkılımını azaltarak oksidatif stresin azalmasına sebep olur. Ayrıca bu çalışmada, α -LA'nın okside membran proteinlerini tamir ederek membran bütünlüğünü sağlamasıyla hücrel içerik kaybından koruduğu gösterilmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar, α -LA'nın nükleik asit ve proteinleri oksidatif hasardan koruduğunu göstermiştir (Arivazhagan *et al.*, 2002).

Çalışmamızda beyin dokusu ve plazma örneklerine ait Glutasyon Peroksidaz (GPx) düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamadı ($p>0,05$). Uyguladığımız doz ve sürede BPA'nın GPx düzeyleri üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığını gördük.

Enzimatik antioksidan sistemler lipit peroksidasyonuna karşı doğal koruyucular olup, Glutasyon Peroksidazın (GPx) lipit hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Redükte glutasyon ve tüm tiyoller peroksidatif hasarı önler (Karaca ve ark., 2007).

Kabuto ve arkadaşları, alkilfenollerin ROÜ oluşumunu indüklediğini, BPA, NP ve OP uygulanmasının, lipit peroksidasyonunda artışa sebep olduğunu göstermişlerdir. Antioksidan olarak davranan glutasyon, aynı zamanda glutasyon redüktaz ve glutasyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin yapısına katılır (Kabuto *et al.*, 2003; Kabuto *et al.*, 2004). Artmış ROÜ'nin detoksifikasyonu, glutasyonun indirgenmiş şekli olan GSH'nın oksitlenmiş dimer şekli olan GSSG'ye dönüşümü ile sağlanır. GPx'in katalizlediği bu reaksiyonda, GSH enzim aktivitesi için gereklidir. Hücreler serbest radikal ataklarına maruz kaldığında GSSG oluşumu metabolik sınırı aşar. (Karafakıoğlu, 2007) BPA, NP ve OP; glutasyonun azalmasında etkilidir. Bu çalışmalara benzer olarak BPA verilmesi yüksek dozlarda daha bariz bir etkiyle canlı dokulardaki glutasyon içeriğini etkiler (Kabuto *et al.*, 2003; Kabuto *et al.*, 2004; Rashid *et al.*, 2009). BPA maruziyetinden sonra antioksidan savunmanın ilk basamağını oluşturan Superoksit dismutaz, superoksit radikalini hidrojen peroksit'e çevirir, bu da katalazla redükte glutasyon kullanılarak yıkılır. Katalaz aktivitesindeki düşüş, BPA'ya maruz kaldıktan sonra karaciğer mitokondri ve mikrozomlarının hidrojen peroksiti elimine etmekteki yetersizliğini gösterir. Glutasyon düzeyi ve glutasyon peroksidaz aktiviteleri azalmıştır. Bu durum aynı zamanda, mitokondri ve mikrozomlardaki fazla

miktarda Reaktif Oksijen Ürünlerinin sebep olduğu bir enzim inaktivasyonuna bağlı olabilir (Pigeolet *et al.*, 1990).

Çalışmamızda beyin dokusu ve serum örneklerine ait NO düzeyleri değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı.

Çok reaktif bir radikal olup önemli bir oksidatif biyolojik sinyal molekülü olarak çeşitli fizyolojik süreçlerde rol alan NO, sıvı ortamda birkaç saniyeden daha kısa bir yarı ömre sahipken, düşük oksijen konsantrasyonu olan ortamlarda daha stabildir. Hem sulu hem de yağlı ortamda çözünmediği için stoplazma ve plazma membranından difüze olabilirler. Hücre dışı alanda nitrik oksit, oksijen ve suyla reaksiyona girerek nitrat ve nitrit anyonlarını oluşturur (Valko *et al.*, 2007).

Superoksit radikali nitrik oksitle reaksiyona girerek reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitriti oluşturur. Kendisi de bir radikal olan nitrik oksitin etkisi inhibe olurken, oluşan peroksinitritlerin proteinler üzerine direk zararlı etkileri vardır. Proteinlerin yapısını bozarak normal fonksiyonlarını inhibe edebilir (Akkuş, 1995). Oluşan peroksinitrit anyonu DNA kırıklarına ve lipid peroksidasyonuna neden olabilen güçlü bir oksidatif ajandır (Carr *et al.*, 2000).

Çalışmamızda beyin dokusu ve serum örneklerine ait PON1 düzeyleri değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamadı.

Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, organofosfatlara karşı koruma, bakteriyel endotoksinlerden kaynaklanan toksisiteye karşı koruma ve LDL ve HDL oksidasyonunun engellenmesinde görev alan PON1'in, Cu^{+2} 'in indüklediği lipoprotein oksidasyonunu inhibe ettiği düşünülmektedir (Aviram *et al.*, 1998).

6. SONUÇ

1. Uyguladığımız doz ve sürede BPA'nın lipit peroksidasyonuna sebep olduğu beyin dokusu ve serum örneklerinde tespit edildi.
2. α -LA ve α -TF' ün ayrı ayrı ve kombine kullanımlarının lipit peroksidasyonunu önlediği serum örneklerinde tespit edildi. Ancak antioksidan kullanılan grupların beyin dokusu örneklerinde lipit peroksidasyon düzeyinde tespit ettiğimiz azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.
3. Serum ve beyin dokusu örneklerinde protein oksidasyonu tespit edilmedi.
4. Nitrik oksit düzeyleri, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında α -LA verilen gruplarda serum düzeyinde; α -TF uygulanan gruplarda beyin dokusunda anlamlı olarak azalmıştı ancak bu farklılık BPA uygulanan gruplarda yapılan ikili karşılaştırmalarda tespit edilemediğinden değerlendirilmedi.
5. Çalışmamızda antioksidan enzim düzeylerinin BPA tarafından etkilenmediği görüldü.
6. Serum ve beyin dokularına ait örneklerde, BPA ile birlikte ayrı ayrı ve kombine olarak uygulandığında α -LA ve α -TF'ün etkileri arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı farklılığın olmaması, BPA'nın oluşturduğu hasara karşı kullandığımız antioksidanların uyguladığımız doz ve sürede birbirlerine göre üstünlüğünün olmadığını, ayrıca kombine kullanımlarının da tek başına kullanımlarına göre daha etkili olmayıp avantaj sağlamadığını gösterdi.

7.KAYNAKLAR

- Akkuş, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya, 1-132.
- Arivazhagan, P., Ramanathan, K., Panneerselvam, C., 2001a. Effect of DL-alpha-lipoic acid on mitochondrial enzymes in aged rats. *Chem Biol Interact* 138, 189-198.
- Arivazhagan, P., Ramanathan, K., Panneerselvam, C., 2001b. Effect of DL-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidants in mitochondria of aged rats. *J Nutr Biochem* 12, 2-6.
- Arivazhagan, P., Thilakavathy, T., Ramanathan, K., Kumaran, S., Panneerselvam, C., 2002. Effect of DL-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and protein oxidation in various brain regions of aged rats. *J Nutr Biochem* 13, 619-624.
- Atkinson, A., Roy, D., 1995a. In vitro conversion of environmental estrogenic chemical bisphenol A to DNA binding metabolite(s). *Biochem Biophys Res Commun* 210, 424-433.
- Atkinson, A., Roy, D., 1995b. In vivo DNA adduct formation by bisphenol A. *Environ Mol Mutagen* 26, 60-66.
- Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R., Bisgaier, C., Newton, R., Rosenblat, M., Erogul, J., Hsu, C., Dunlop, C., La Du, B., 1998. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 1617-1624.
- Balachandar, A.V., Malarkodi, K.P., Varalakshmi, P., 2003. Protective role of DLalpha-lipoic acid against adriamycin-induced cardiac lipid peroxidation. *Hum Exp Toxicol* 22, 249-254.
- Baskol, G., Baskol, M., Yurci, A., Ozbakir, O., Yucesoy, M., 2006a. Serum paraoxonase 1 activity and malondialdehyde levels in patients with ulcerative colitis. *Cell Biochem Funct* 24, 283-286.
- Baskol, G., Karakucuk, S., Oner, A.O., Baskol, M., Kocer, D., Mirza, E., Saraymen, R., Ustdal, M., 2006b. Serum paraoxonase 1 activity and lipid peroxidation levels in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmologica* 220, 12-16.
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272, 20313-20316.
- Biewenga, G.P., Haenen, G.R., Bast, A., 1997. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol* 29, 315-331.
- Biles, J.E., McNeal, T.P., Begley, T.H., Hollifield, H.C., 1997. Determination of bisphenol-A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food-simulating liquids. *J Agr Food Chem* 45, 3541-3544.
- Bindhumol, V., Chitra, K.C., Mathur, P.P., 2003. Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology* 188, 117-124.
- Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., Monks, T.J., 2000. Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol* 13, 135-160.
- Bulmuş, F. G., 2006. Kronik hiperhomosisteinemi oluşturulan ratlarda alfa lipoik asitin plazma ve çeşitli dokularda oksidan antioksidan sistem üzerine etkilerinin araştırılması üzerine tez çalışması.
- Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.Y., Reidy, J.A., Needham, L.L., 2008. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect* 116, 39-44.

- Carr, A.C., McCall, M.R., Frei, B., 2000. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1716-1723.
- Chaudiere, J., Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* 37, 949-962.
- Chin, Y.P., Miller, P.L., Zeng, L., Cawley, K., Weavers, L.K., 2004. Photosensitized degradation of bisphenol A by dissolved organic matter. *Environ Sci Technol* 38, 5888-5894.
- Chirico, S., Smith, C., Marchant, C., Mitchinson, M.J., Halliwell, B., 1993. Lipid peroxidation in hyperlipidaemic patients. A study of plasma using an HPLC-based thiobarbituric acid test. *Free Radic Res Commun* 19, 51-57.
- Chisolm, G.M., Steinberg, D., 2000. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 28, 1815-1826.
- Chitra, K.C., Latchoumycandane, C., Mathur, P.P., 2003. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology* 185, 119-127.
- Chitra, K.C., Mathur, P.P., 2004. Vitamin E prevents nonylphenol-induced oxidative stress in testis of rats. *Indian J Exp Biol* 42, 220-223.
- Correa-Reyes, G., Viana, M.T., Marquez-Rocha, F.J., Licea, A.F., Ponce, E., Vazquez-Duhalt, R., 2007. Nonylphenol algal bioaccumulation and its effect through the trophic chain. *Chemosphere* 68, 662-670.
- Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A., 2005. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev* 24, 55-99.
- de Grey, A.D., 2002. Bioremediation meets biomedicine: therapeutic translation of microbial catabolism to the lysosome. *Trends Biotechnol* 20, 452-455.
- Demirbilek, M. E., Kilic, N., Komurcu, H. F., Okhan Akin, K., 2007. Advanced Oxidation Protein Products in Aged with Dementia. *American Journal of Immunology* 3 (2): 52-55.
- Drevet, J.R., 2006. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol Cell Endocrinol* 250, 70-79.
- Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18, 872-879.
- Feldman, D., Krishnan, A., 1995. Estrogens in unexpected places: possible implications for researchers and consumers. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7, 129-133.
- Finkel, D., Pedersen, N.L., Berg, S., Johansson, B., 2000. Quantitative genetic analysis of biobehavioral markers of aging in Swedish studies of adult twins. *J Aging Health* 12, 47-68.
- Fujisawa, S., Atsumi, T., Satoh, K., Kadoma, Y., Ishihara, M., Okada, N., Nagasaki, M., Yokoe, I., Sakagami, H., 2000. Radical generation, radical-scavenging activity, and cytotoxicity of eugenol-related compounds. *In Vitro Mol Toxicol* 13, 269-280.
- Gaido, K.W., Leonard, L.S., Lovell, S., Gould, J.C., Babai, D., Portier, C.J., McDonnell, D.P., 1997. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol Appl Pharmacol* 143, 205-212.
- Gueraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, P.M., Huc, L., Jouanin, I., Siems, W., Uchida, K., 2010. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res* 44, 1098-1124.
- Halden, R.U., 2010. Plastics and health risks. *Annu Rev Public Health* 31, 179-194.

- Halliwell, B., 1987. Free radicals and metal ions in health and disease. *Proc Nutr Soc* 46, 13-26.
- Halliwell, B., 1995. Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Ann Rheum Dis* 54, 505-510.
- Halliwell, B., Chirico, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 57, 715S-724S; discussion 724S-725S.
- Han, D., Handelman, G., Marcocci, L., Sen, C.K., Roy, S., Kobuchi, H., Tritschler, H.J., Flohe, L., Packer, L., 1997. Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. *Biofactors* 6, 321-338.
- Haramaki, N., Han, D., Handelman, G.J., Tritschler, H.J., Packer, L., 1997. Cytosolic and mitochondrial systems for NADH- and NADPH-dependent reduction of alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med* 22, 535-542.
- Hasselberg, L., Meier, S., Svoldal, A., 2004. Effects of alkylphenols on redox status in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquat Toxicol* 69, 95-105.
- Kabuto, H., Amakawa, M., Shishibori, T., 2004. Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. *Life Sci* 74, 2931-2940.
- Kabuto, H., Hasuike, S., Minagawa, N., Shishibori, T., 2003. Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues. *Environ Res* 93, 31-35.
- Kadoma, Y., Fujisawa, S., 2000. Kinetic evaluation of reactivity of bisphenol A derivatives as radical scavengers for methacrylate polymerization. *Biomaterials* 21, 2125-2130.
- Kang, J.H., Asai, D., Katayama, Y., 2007. Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. *Crit Rev Toxicol* 37, 607-625.
- Karaca, E.G., Sözbilir, N. B., 2007. Dietilnitrozamin Verilen Ratlarda Alfa Lipoik Asidin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması. *The Medical Journal of Kocatepe* 7: 11-17
- Karafakıoğlu, Y. S., 2007. Nonilfenol toksikasyonuna karşı maruz bırakılan ratlarda taurinin malondialdehit, glutatyon, superoksit dismutaz ve nitrik oksit üzerine etkilerinin araştırılması üzerine tez çalışması.
- Kehrer, J.P., Jones, D.P., Lemasters, J.J., Farber, J.L., Jaeschke, H., 1990. Mechanisms of hypoxic cell injury. Summary of the symposium presented at the 1990 annual meeting of the Society of Toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* 106, 165-178.
- Korkmaz, A., Aydoğan, M., Kolankaya, D., Barlas, N., 2011. Vitamin C coadministration augments bisphenol A, nonylphenol, and octylphenol induced oxidative damage on kidney of rats. *Environ Toxicol* 26, 325-337.
- Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L., Wenzel, A., 2003. Endocrine Disruptors in the environment. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 75, No. 5, pp. 631-681.
- Liochev, S.I., Fridovich, I., 2002. Superoxide and nitric oxide: consequences of varying rates of production and consumption: a theoretical treatment. *Free Radic Biol Med* 33, 137-141.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Marangon, K., Devaraj, S., Tirosh, O., Packer, L., Jialal, I., 1999. Comparison of the effect of alpha-lipoic acid and alpha-tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 27, 1114-1121.
- Markey, C. M., Michaelson, C. L., Sonnenschein, C., Soto, A. M., 2001. Alkylphenols and Bisphenol A as Environmental Estrogens. *The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 3, Part L Endocrine Disruptors, Part I* (ed. by M.Metzler) Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Marnett, L.J., 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424, 83-95.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C., 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 16, 577-586.
- Matsugo, S., Yan, L.J., Konishi, T., Youn, H.D., Lodge, J.K., Ulrich, H., Packer, L., 1997. The lipoic acid analogue 1,2-diselenolane-3-pentanoic acid protects human low density lipoprotein against oxidative modification mediated by copper ion. *Biochem Biophys Res Commun* 240, 819-824.
- Mehranjani, M.S., Noorafshan, A., Momeni, H.R., Abnosi, M.H., Mahmoodi, M., Anvari, M., Hoseini, S.M., 2009. Stereological study of the effects of vitamin E on testis structure in rats treated with para-nonylphenol. *Asian J Androl* 11, 508-516.
- Michalowicz, J., Duda, W., Stufka-Olczyk, J., 2007. Transformation of phenol, catechol, guaiacol and syringol exposed to sodium hypochlorite. *Chemosphere* 66, 657-663.
- Mihaich, E.M., Friederich, U., Caspers, N., Hall, A.T., Klecka, G.M., Dimond, S.S., Staples, C.A., Ortego, L.S., Hentges, S.G., 2009. Acute and chronic toxicity testing of bisphenol A with aquatic invertebrates and plants. *Ecotoxicol Environ Saf* 72, 1392-1399.
- Moini, H., Packer, L., Saris, N.E., 2002. Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol* 182, 84-90.
- Murray, R. K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennely P.J., Rodwell V. W., Weil P. J., 2009. *Harper's Illustrated Biochemistry*, Lange, U.S.
- Nagel, S.C., vom Saal, F.S., Thayer, K.A., Dhar, M.G., Boechler, M., Welshons, W.V., 1997. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect* 105, 70-76.
- Nakagawa, Y., Suzuki, T., Tayama, S., 2000. Metabolism and toxicity of benzophenone in isolated rat hepatocytes and estrogenic activity of its metabolites in MCF-7 cells. *Toxicology* 156, 27-36.
- Nakagawa, Y., Tayama, S., 2000. Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol* 74, 99-105.
- Obata, T., Kubota, S., 2000. Formation of hydroxy radicals by environmental estrogen-like chemicals in rat striatum. *Neurosci Lett* 296, 41-44.
- Okai, Y., Higashi-Okai, K., Machida, K., Nakamura, H., Nakayama, K., Fijita, K., Tanaka, T., Taniguchi, M., 2000. Protective effects of alpha-tocopherol and beta-carotene on para-nonylphenol-induced inhibition of cell growth, cellular respiration and glucose-induced proton extrusion of bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 187, 161-165.
- Packer, L., Kraemer, K., Rimbach, G., 2001. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* 17, 888-895.
- Packer, L., Roy, S., Sen, C.K., 1997a. Alpha-lipoic acid: a metabolic antioxidant and potential redox modulator of transcription. *Adv Pharmacol* 38, 79-101.
- Packer, L., Tritschler, H.J., 1996. Alpha-lipoic acid: the metabolic antioxidant. *Free Radic Biol Med* 20, 625-626.
- Packer, L., Tritschler, H.J., Wessel, K., 1997b. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med* 22, 359-378.
- Packer, L., Witt, E.H., Tritschler, H.J., 1995. alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 19, 227-250.

- Parcell, S., 2002. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern Med Rev* 7, 22-44.
- Pershad Singh, H.A., 2007. Alpha-lipoic acid: physiologic mechanisms and indications for the treatment of metabolic syndrome. *Expert Opin Investig Drugs* 16, 291-302.
- Petersen, D.R., Doorn, J.A., 2004. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med* 37, 937-945.
- Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., Zachary, M.D., Remacle, J., 1990. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev* 51, 283-297.
- Pottenger, L.H., Domoradzki, J.Y., Markham, D.A., Hansen, S.C., Cagen, S.Z., Waechter, J.M., Jr., 2000. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol Sci* 54, 3-18.
- Rashid, H., Ahmad, F., Rahman, S., Ansari, R.A., Bhatia, K., Kaur, M., Islam, F., Raisuddin, S., 2009. Iron deficiency augments bisphenol A-induced oxidative stress in rats. *Toxicology* 256, 7-12.
- Richter, C.A., Birnbaum, L.S., Farabollini, F., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Talsness, C.E., Vandenbergh, J.G., Walser-Kuntz, D.R., vom Saal, F.S., 2007. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol* 24, 199-224.
- Ross, R., 1993. Atherosclerosis: current understanding of mechanisms and future strategies in therapy. *Transplant Proc* 25, 2041-2043.
- Rubin, B.S., Soto, A.M., 2009. Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. *Mol Cell Endocrinol* 304, 55-62.
- Sajiki, J., Yanagibori, R., Kobayashi, Y., 2010. Study of experiment on leaching of bisphenol A from infant books to artificial saliva. *Nihon Eiseigaku Zasshi* 65, 467-470.
- Sajiki, J., Yonekubo, J., 2003. Leaching of bisphenol A (BPA) to seawater from polycarbonate plastic and its degradation by reactive oxygen species. *Chemosphere* 51, 55-62.
- Sajiki, J., Yonekubo, J., 2004. Leaching of bisphenol A (BPA) from polycarbonate plastic to water containing amino acids and its degradation by radical oxygen species. *Chemosphere* 55, 861-867.
- Shila, S., Kokilavani, V., Subathra, A., Panneerselvam, C., 2005a. Brain regional responses in antioxidant system to alpha-lipoic acid in arsenic intoxicated rat. *Toxicology* 210, 25-36.
- Shila, S., Subathra, M., Devi, M.A., Panneerselvam, C., 2005b. Arsenic intoxication-induced reduction of glutathione level and of the activity of related enzymes in rat brain regions: reversal by DL-alpha-lipoic acid. *Archives of Toxicology* 79, 140-146.
- Sies, H., 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 27, 916-921.
- Stadtman, E.R., 2004. Role of oxidant species in aging. *Curr Med Chem* 11, 1105-1112.
- Stadtman, E.R., Levine, R.L., 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25, 207-218.
- Staples, C.A., Dorn, P.B., Klecka, G.M., O'Block, S.T., Harris, L.R., 1998. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 36, 2149-2173.
- Steinbrecher, U.P., 1999. Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1436, 279-298.

- Suarez, S., Sueiro, R.A., Garrido, J., 2000. Genotoxicity of the coating lacquer on food cans, bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), its hydrolysis products and a chlorohydrin of BADGE. *Mutat Res* 470, 221-228.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44-84.
- Van Haaften, R.I., Evelo, C.T., Penders, J., Eijnwachter, M.P., Haenen, G.R., Bast, A., 2001. Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by tocopherols and alpha-tocopherol derivatives. *Biochim Biophys Acta* 1548, 23-28.
- van Haaften, R.I., Haenen, G.R., van Bladeren, P.J., Bogaards, J.J., Evelo, C.T., Bast, A., 2003. Inhibition of various glutathione S-transferase isoenzymes by RRR-alpha-tocopherol. *Toxicol In Vitro* 17, 245-251.
- Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W.V., 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 24, 139-177.
- Watson, A.D., Berliner, J.A., Hama, S.Y., La Du, B.N., Faull, K.F., Fogelman, A.M., Navab, M., 1995. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 96, 2882-2891.
- Witko-Sarsat, V., Gausson, V., Descamps-Latscha, B., 2003. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? *Kidney Int Suppl*, S11-14.
- Yıldız, N., 2009. Çevresel Östrojenlerden Bisfenol A ve oktilfenolün erkek sıçanlarda subkronik etkileri üzerine tez çalışması.
- Ying, G.G., Williams, B., Kookana, R., 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates--a review. *Environ Int* 28, 215-226.
- Young, I.S., Woodside, J.V., 2001. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 54, 176-186.

