

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

99029

FARKLI GENOTİPTEKİ ANKARA KEÇİLERİNDE EKSTRASELÜLLER ANTİOKSİDAN DÜZEYLERİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Bio. Seda ZENGİN

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ulvi Reha Fidancı



Tez No:

2000-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Yüksek Lisans Programı

çerçevesinde yürütülmüş bulunan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

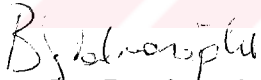
Yüksek Lisans Tezi

olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 26.07.2000



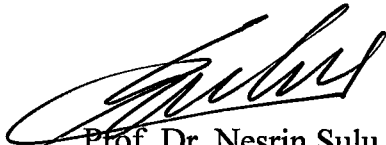
Prof. Dr. Nihat Bayşu
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



Doç. Dr. Berrin Salmanoğlu
Ankara Üniversitesi
Raportör



Prof. Dr. Hilal Karagül
Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Nesrin Sulu
Ankara Üniversitesi



Doç. Dr. Ulvi Reha Fidancı
Ankara Üniversitesi

ÖNSÖZ

Metabolik olayların akışı içerisinde çeşitli basamaklarda oluşabilen serbest radikaller, ömürleri çok kısa olmasına rağmen sahip oldukları paylaşılmamış elektronlar nedeni ile hücrelerde nükleik asitler, protein ve serbest amino asitler, lipidler ve lipoproteinler, karbonhidratlar ve konnektif doku makromolekülleri ile etkileşerek, membran fonksiyonu, metabolizma ve gen dizilimi üzerinde yapısal değişikliğe neden olabilmektedir.

Serbest radikallerin olumsuz etkilerinin önlenmesi amacıyla organizma antioksidatif savunma sistemleri geliştirmiştir. Bu sistemdeki antioksidanların etkileri ile serbest radikal oluşumu bir denge içerisinde. Antioksidatif metabolizmada rol oynayan antioksidanlar son yıllarda intrasellüler, membran ve ekstrasellüler antioksidanlar olarak bir sınıflandırmaya tabi tutulmaktadır. Transferrin, laktoferrin, haptoglobulin, hemopeksin, albumin, seruloplazmin, ekstrasellüler süperoksid dismutaz, ekstrasellüler glutatyon peroksidaz, bilirubin, mukus, ürik asit, glukoz, askorbik asit, eritrosit gibi enzim ve moleküller ekstrasellüler antioksidanlar arasında incelenmektedir.

Tüm dünya'ya Anadolu'dan yayıldığı tartışmasız olarak kabul edilen Ankara keçisi (Angora Goat) varlığı ile Türkler, yüzyıllar boyunca tiftik ve tiftik ürünlerinde ilk sıralarda yer almış, refah seviyelerini yükseltmiş, tiftik ve ürünlerinin dış satımında kontrolü elinde tutmuşlardır. Ancak, önce Güney Afrika Cumhuriyeti, daha sonra da diğer ülkelere verilen Ankara keçilerinin götürüldükleri ülkelerde başarılı ıslahı ve yetiştiriciliği, dünya pazarlarında söz sahibi olmaları sonucunda Türkiye, keçi varlığı ve tiftik üretimi bakımından hızla gerilemiş, konuya son yıllarda ilgisiz kalınmış ve hatta sadece "gen kaynağının" korunması düzeyine inilmiştir.

Farklı genotipteki Ankara Keçileri ile gerçekleştirilen karşılaştırmalı çalışmalar tiftik başta olmak üzere hedeflenen özellikler ve verimlerin genotiplerden etkilendiğini açık bir şekilde göstermektedir. Bu çalışmada Türkiye'de Ankara keçilerinde bugüne kadar çok az araştırılan plazma askorbik asit, serum albumin, bilirubin, glikoz, ürik asit, seruloplazmin gibi kan parametreleri antioksidatif metabolizmanın ekstrasellüler antioksidanları olarak ortaya konulurken, diğer taraftan genotipik özelliklerin ekstrasellüler antioksidanlar üzerindeki etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu yönleri ile farklı genotipteki Ankara keçileri ile gerçekleştirilen ilk çalışma olması tezin orijinalliğini arzetmektedir.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hilal Karagül'e, doktora eğitimimde, tez konumun belirlenmesi ve gerçekleştirilmesindeki yardımlarından dolayı danışmanım Sayın Doç. Dr. Ulvi Reha Fidancı'ya, çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine ve Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Müdürü sayın Talat Gözet'e ve Koyunculuk Şube müdürü sayın Umut Taşdemir'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşum Mekanizmaları.....	1
1.2. Reaktif Oksijen Türleri.....	2
1.2.1. Singlet Oksijen.....	2
1.2.2. Süperoksit Radikali.....	2
1.2.3. Hidrojen Peroksit.....	4
1.2.4. Hipokloröz Asit.....	5
1.2.5. Peroksil ve Hidroksil Radikalleri.....	5
1.3. Oksidatif Stres ve Oksidatif Hasar.....	6
1.3.1. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkisi.....	8
1.3.2. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkisi.....	8
1.3.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlar Üzerine Etkisi.....	8
1.3.4. Serbest Radikallerin Lipidler Üzerine Etkisi.....	9
1.4. Organizmanın Antioksidatif Savunma Sistemi.....	10
1.4.1. İntraselüler Antioksidanlar.....	11
1.4.1.1. Glutasyon Peroksidaz.....	11
1.4.1.2. Süperoksit Dismutaz.....	12
1.4.1.3. Katalaz.....	12
1.4.2. Membran Antioksidanları.....	13
1.4.2.1. α -Tokoferol.....	13
1.4.2.2. β -Karotin.....	14
1.4.2.3. Ubikinon ve Ubikinol.....	14
1.4.3. Ekstraselüler Antioksidanlar.....	15
1.4.3.1. Tranferrin.....	15
1.4.3.2. Hemoglobin, Hemopeksin, Haptoglobin.....	15
1.4.3.3. Seruloplazmin.....	16
1.4.3.4. Albumin.....	17
1.4.3.5. Bilirubin.....	18
1.4.3.6. Ürik Asit.....	18
1.4.3.7. Askorbik Asit.....	19
2. GEREÇ VE YÖNTEM	21
2.1. Gereç.....	21
2.1.1. Materyal.....	21
2.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	21
2.2. Yöntem.....	22

2.2.1.	Plazma Askorbik Asit Düzeyi Ölçümü.....	22
2.2.2.	Serum Albümin Düzeyi Ölçümü.....	23
2.2.3.	Serum Toplam Bilirubin Düzeyi Ölçümü.....	24
2.2.4.	Serum Glukoz Düzeyi Ölçümü.....	26
2.2.5.	Serum Ürik Asit Düzeyi Ölçümü.....	27
2.2.6.	Serum Seruloplazmin Düzeyi Ölçümü.....	29
2.2.7.	İstatistik Değerlendirme.....	30
3.	BULGULAR.....	31
4.	TARTIŞMA.....	36
5.	SONUÇ.....	40
ÖZET		41
SUMMARY		42
KAYNAKLAR		43
EKLER		48



SİMGELER VE KISALTMALAR

ALP	Alkali Fosfataz
AAP	Azobis Amidinopropan
BCG	Bromcreosolgreen
CuZn-SOD	Bakır, çinko içeren süperoksit dismutaz
Ec-SOD	Ekstrasellüler süperoksit dismutaz
Genotip I	Ankara Keçileri
Genotip II	Amerikan X Türk Ankara Keçileri
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
CAT	Katalaz
MDA	Malondialdehit
Mn-SOD	Mangan içeren süperoksit dismutaz
GSSG	Okside glutasyon
GSH	Redükte glutasyon
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiyobarbütirik asit
TCAA	Triklorasetik asit

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Fagositozda serbest radikaller.

Şekil 1.2. Serbest radikallerin hücre membranında yaptığı değişiklikler.

Şekil 3.1.Farklı genotipteki Ankara keçilerinde plazma askorbik asit düzeyleri (mg/dl).

Şekil 3.2. Farklı genotipteki Ankara keçilerinde serum albümin düzeyleri (g/dl).

Şekil 3.3. Farklı genotipteki Ankara keçilerinde serum toplam bilirubin düzeyleri (mg/dl).

Şekil 3.4. Farklı genotipteki Ankara keçilerinde serum glikoz düzeyleri (mg/dl).

Şekil 3.5. Farklı genotipteki Ankara keçilerinde serum ürik asit düzeyleri (mg/dl).

Şekil 3.6.Farklı genotipteki Ankara keçilerinde serum seruloplazmin düzeyleri (mg/dl) .



TABLÖLAR

Tablo 1.1. Antioksidanların hücresel yerleşimlerine göre sınıflandırılması

Tablo 3.1. Farklı genotipteki Ankara keçilerinde plazma askorbik asit, serum albumin, bilirubin, glikoz, ürik asit ve seruloplazmin düzeyleri



1. GİRİŞ

Serbest radikaller bir veya daha fazla paylaşılmamış elektron taşıyan atom veya moleküllerdir (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Halliwell, 1991). Radikaller, orbitallerindeki tek elektrondan dolayı nonradikallere göre oldukça reaktif olup, ömürleri kısadır (Halliwell, 1991; Athar ve Ark., 1993). Organizmada, oksijen ve hidroksil gibi serbest radikallerin yanında hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipokloröz asit (HOCl) gibi radikal olmayan, ancak potansiyel olarak tehlikeli oksijen türevleri de oluşmaktadır. Bu nedenle serbest radikal terimi yanında, bu molekülleri de içine alan reaktif oksijen türleri kavramı da kullanılmaktadır (Bast ve Ark., 1991; Athar ve Ark., 1993; Halliwell, 1993).

Serbest radikallerin olumsuz etkilerinin önlenmesi amacıyla organizma antioksidatif savunma sistemleri geliştirmiştir. Bu sistemdeki antioksidanlar serbest radikal oluşumunu engelleyerek, oksidan maddeleri daha az toksik ürünlere çevirerek, reaktif ürünleri yaşamsal önemi olan hücresel yapılardan uzaklaştırarak veya radikallerin oluşturduğu hasarı tamir ederek etkili olmaktadır (Niki, 1987).

Oluşan serbest radikallerle antioksidan savunma sistemi hemen daima denge halindedir. Serbest radikallerin oluşumunun hızlanması veya antioksidanların azalması sonucu bu dengenin bozulması oksidatif strese ve oksidatif hasara neden olur. Oksidatif stres ve oksidatif hasarın birçok hastalığın patogenezinde ve ilerlemesinde rolü olduğu kanıtlanmıştır (Halliwell, 1987).

1.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşum Mekanizmaları

Aerobik organizmalarda oksijenin her yerde bulunması ve elektron almaya yatkınlığı nedeniyle, hücrelerde oksijen merkezli radikaller sıklıkla oluşur. Normal metabolizmanın dışında organizmanın serbest radikal oluşturduğu başka süreçler de vardır. Antibakteriyel özellikteki aktive fagositler tarafından oluşturulan oksijen radikalleri de doku hasarına neden olabilir. Kinoid gruplar taşıyan antibiyotikler veya metal iyonları bağlanma özelliğindeki diğer antibiyotiklerin terapötik etkileri ve

sitotoksiteleri, oksijen radikali oluşturma özelliklerine bağlanmaktadır. Organizmanın x ve gamma ışınları ile elektromanyetik radyasyon veya parçacık radyasyonu ile karşılaşması sonucu su gibi hücrel moleküllere enerji aktarılır, böylece primer radikaller oluşur. Primer radikaller, daha sonra çözünmüş oksijen ya da hücrel moleküllerle sekonder reaksiyonlara girebilir. Fotokimyasal kirlilik, hiperoksi, pestisitler, anestezikler ve aromatik hidrokarbonlar da hücrelerde serbest radikal hasarına yol açarlar. Bu ksenobiyotikler ya serbest radikal olarak bulunurlar ya da detoksifikasyon süreçlerinde radikal türlere dönüştürülürler (Freeman ve Crapo, 1982).

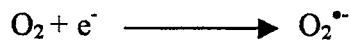
1.2. Reaktif Oksijen Türleri

1.2.1. Singlet Oksijen (1O_2):

Enerji absorpsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış dış elektronları spin değiştirebilir ve bu uyarılmış durumda, dış iki elektron ayrı ayrı veya aynı orbitali işgal edebilir. Oksijenin uyarılmış bu iki formu singlet oksijen (1O_2) adını alır. Singlet oksijen biyolojik sistemlerde oksidatif hasar açısından son derece önemlidir (Fantone, 1982).

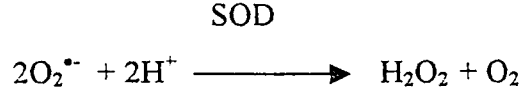
1.2.2 Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$)

Oksijen molekülüne bir elektron girişiyle hemen hemen tüm aerobik hücrelerde süperoksit radikali oluşur. Oluşumunun temel kaynakları mitokondri, kloroplast ve endoplazmik retikulum gibi organellerde bulunan elektron transport sistemlerinde oksijene elektron aktarılmasıdır (Rowley ve Halliwell, 1983; Halliwell ve Gutteridge, 1990; Halliwell, 1991; Halliwell, 1993).

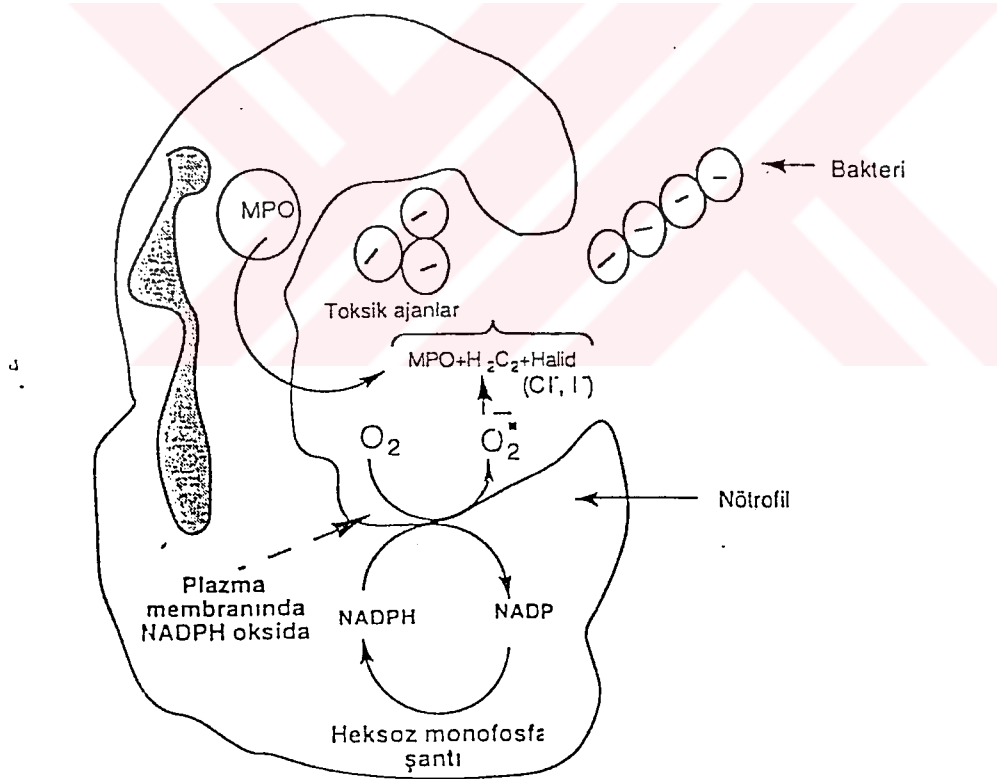


Süperoksit radikalının fagositik hücrelerin aktivasyonu (respiratuar patlama) sonucunda da olduğu bilinmektedir. Nötrofillerde süperoksit radikali oluşturan membran NADPH-oksidad kompleksinin oksijen için K_m 'i vücut sıvılarındaki

oksijen konsantrasyonuna bağlıdır. Fagositlerdeki radikal oluşumu, vücuda giren zararlı bakterilerin yok edilmesinde etkili bir savunma mekanizmasıdır (Şekil 1.1). Oluşan $O_2^{\bullet-}$ daha sonra dismutasyona uğrar. Bu reaksiyonu katalizleyen enzim Superoksit dismutazdır (SOD). Dismutasyon reaksiyonu sırasında iki süperoksit radikalinden biri H_2O_2 'e dönüşürken, diğeri O_2 'e dönüşür (Rowley ve Halliwell, 1983; Halliwell, 1991; Gutteridge, 1995).



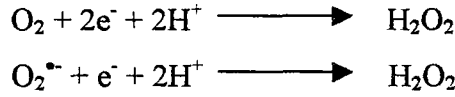
Bu reaksiyon non-enzimatik olarak da yürüyebilir. Ancak, pH 7.4'te reaksiyon hızı, enzimle katalizlenen reaksiyondan dört kat daha hızlıdır (Crapo ve Tierney, 1974; Klebanoff, 1980).



Şekil 1.1 : Fagositozda serbest radikaller (Southorn ve Powis, 1988).

1.2.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Moleküler oksijenin, çevresindeki moleküllerden iki elektron veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi (H₂O₂) meydana getirir (Klebanoff, 1980). H₂O₂ membranlardan kolaylıkla geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır (Boveris ve Ark., 1972; Kellog ve Fridovich, 1977).



Ancak biyolojik sistemlerde, H₂O₂'nin asıl üretimi yukarıda gösterildiği üzere O₂^{•-}'in dismutasyonu ile olur. Böylece O₂^{•-} düzeyi ortamda önemli boyutlara ulaşmadan dismutasyon ile temizlenmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1984).

Hidrojen peroksit radikal değildir. Bütün elektronları çiftleşmiştir. Fakat membranlardan kolaylıkla geçebilir ve kolayca oksijen serbest radikallerini oluşturabilir. Bu nedenle serbest radikal kimyasında önemli bir rol oynar (Jones ve Ark., 1981).

Eğer hücrede O₂^{•-} oluşumu varsa, hücrenin bu hasardan korunması SOD yoluyla değil katalaz (CAT) yoluyla gerçekleşir. Ancak bu durum, hasarın doğrudan doğruya H₂O₂ tarafından oluşturulduğu anlamına gelmez. H₂O₂, O₂, demir veya bakır iyonlarının varlığında hücreye çok daha büyük zarar verir. Bu nedenle, H₂O₂'in uzaklaştırılması biyolojik olarak O₂ uzaklaştırılması kadar avantajlıdır. SOD, H₂O₂'i hücrelerden uzaklaştırmak için katalaz ve Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ile birlikte çalışır. Bu iki enzimden GSH-Px, H₂O₂'in uzaklaştırılmasında katalazdan daha önemli olduğu düşünülmektedir. GSH-Px ve SOD'ın aynı subsellüler bölgelerde (sitozol ve mitokondri) yer aldığı bildirilmiştir (Halliwell, 1991).

1.2.4. Hipokloröz Asit (HOCl)

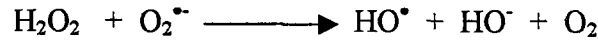
Hipokloröz asit vücutta aktive olmuş nötrofiller tarafından oluşturulan güçlü bir oksidandır. Fagositlerin sitoplazmalarında hem içeren enzim miyeloperoksidaz H_2O_2 ve klorür iyonlarından HOCl oluşumunu katalizler.

Yapılan çalışmalarda tiyol gruplarının HOCl ile kolayca okside oldukları saptanmıştır. Dolayısıyla, HOCl ile oluşacak oksidatif hasara karşı GSH, N-asetilsistein ve merkaptopropiyonil glisin gibi düşük molekül ağırlıklı tiyol bileşikleri etkili koruma sağlar (Halliwell, 1991; Gutteridge, 1995) .

1.2.5 Peroksil ($HO_2^\bullet$) ve Hidroksil ($HO^\bullet$) Radikalleri

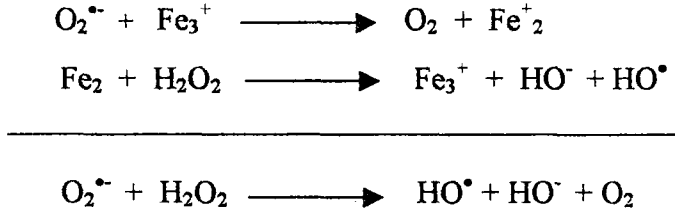
Süperoksitin protonlanması ile $HO_2^\bullet$ oluşur. Peroksil radikalının biyolojik sistemlerde sitotoksik etkisinin olup olmadığı bilinmemektedir. Ancak, superoksitten daha polardır, membranlardan H_2O_2 kadar kolay geçer ve daha reaktiftir. Bu nedenle daha zararlı olabilir. Peroksil radikali yağ asitleriyle doğrudan etkileşebilir; linoleik, linolenik ve araşidonik asitlerin peroksitlerine $HO_2^\bullet$ tarafından dönüştürüldüğü düşünülmektedir (Chance ve Ark., 1979).

Hidrojen peroksidin $O_2^{\bullet-}$ ile reaksiyona girmesi sonucunda ise oldukça reaktif olan hidroksil radikali ($HO^\bullet$) oluşur. Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir (McCord ve Fridovich, 1978; Klebanoff, 1980; Fantone, 1982; Halliwell ve Gutteridge, 1984).



Haber-Weiss reaksiyonu katalizör varlığında ya da katalizörsüz gerçekleşir. Fakat katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda ferri demir (Fe_3^+) süperoksit tarafından ferro demire (Fe_2^+) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak Fenton reaksiyonu olarak da

adlandırılan reaksiyon sonucunda H_2O_2 'den $\text{HO}^\bullet$ ve HO^- üretilir (Klebanoff, 1980; Halliwell, 1987; Southorn ve Powis, 1988; Diplock, 1991).



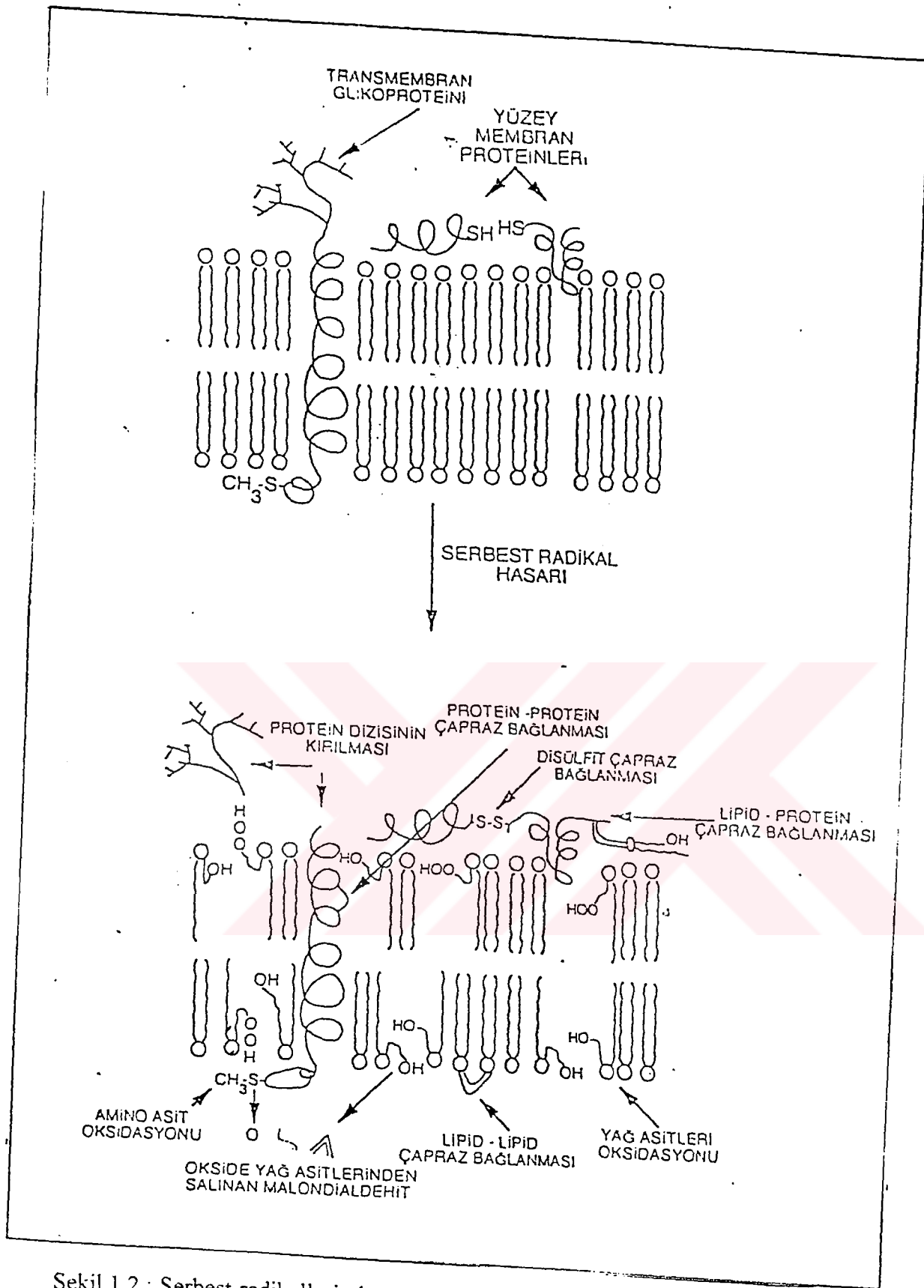
Bakır tuzları $\text{HO}^\bullet$ oluşturmak üzere demir tuzlarından daha yüksek bir hız sabitiyle H_2O_2 ile reaksiyona girerler.



Hidroksil radikali, $\text{O}_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 'den daha güçlü olup hemen hemen bütün biyolojik substratları etkileyebilir. İn vivo olarak oluştuğu bölgede ve yakın çevresinde etkili olur. Dolayısıyla $\text{HO}^\bullet$ 'in yapacağı hasar oluştuğu bölgeye bağlıdır. İn vivo olarak oluşan $\text{HO}^\bullet$ 'in çoğu iyonize edici radyasyon dışında, H_2O_2 'in geçiş metalleri aracılığı ile yıkımından oluşur (Halliwell ve Gutteridge, 1984).

1.3. Oksidatif Stres ve Oksidatif Hasar

Sağlıklı bireylerde oluşan reaktif oksijen türleri ile antioksidan savunma sistemi dengededir. Reaktif oksijen türleri ile antioksidan savunma arasında, reaktif oksijen türlerinden yana bir dengesizlik durumuna, oksidatif stres denilmektedir. Bu durumda ya antioksidan savunma zayıflamıştır, ya reaktif oksijen türlerinin üretimi artmıştır ya da her iki etki bir arada görülür. Oksidatif stresin artma durumunda hücre metabolizmasında önemli değişiklikler şekillenir, hücresel yapılar ve moleküller, özellikle DNA, proteinler ve lipitler hasar görür (Marx, 1987). Şekil 1.2 de serbest radikallerin hücre membranında yaptığı değişiklikler gösterilmiştir.



Şekil 1.2 : Serbest radikallerin hücre membranında yaptığı değişiklikler
(Freeman ve Crapo, 1982)

1.3.1. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkisi

Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin ve sistein içeren proteinlerde serbest radikal etkisiyle değişiklikler şekillenir. Bu amino asitleri taşıyan papain ve gliseraldehit-3-fosfat gibi enzimlerin serbest radikaller tarafından inhibe olduğu bilinmektedir. Sitoplazma ve membran proteinleri de oksidatif stres sonucu çapraz bağlı dimerler veya büyük agregatlar oluştururlar. Hidroksil radikali gibi güçlü radikaller karşısında proteinlerin peptid bağları ve prolin, lizin gibi nisbeten dayanıklı amino asitler de etkilenebilir. Proteinlerin serbest radikal hasarına karşı dayanıklılıkları genel olarak amino asit içeriklerine, duyarlı amino asitlerin protein yapısındaki konumlarına ve oluşan hasarın tamir edilebilirliğine bağlıdır (Warner ve Wispe, 1992; Robbin, 1994).

1.3.2. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkisi

X ışınları, gamma ışıması, UV ışınları ve sıcaklık hücrelerde enerji birikimine, böylece iyonlar, serbest radikaller ve uyarılmış moleküllerin açığa çıkmasına yol açar. İyonize edici radyasyonun neden olduğu mutasyonlar ve hücre ölümleri primer olarak serbest radikallerin DNA üzerindeki etkilerine dayandırılmaktadır. Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde radyasyonla indüklenen ölümlerin % 80'den fazlasına HO[•] neden olmaktadır. (Warner ve Wispe, 1992; Robbin, 1994).

1.3.3 Serbest Radikallerin Karbohidratlar Üzerine Etkisi

Oksidatif radikal hasarı, karbohidratları nisbeten daha az etkilemektedir. Fizyolojik pH ve sıcaklıkta glikoz gibi monosakkaritlerin otooksidasyonu H₂O₂'i, diğer peroksitleri ve oksaldehitleri üretebilir. Monosakkarid otooksidasyonunun da, protein çapraz bağlanmalarına yol açarak agregasyona, sonuçta da bazal membran kalınlaşması, katarakt ve mikroanjyopatiye neden olduğu ileri sürülmektedir (Robbin, 1994).

1.3.4. Serbest Radikallerin Lipidler Üzerine Etkisi

Biyolojik sistemlerde doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerle oksidasyonu, lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipit peroksidasyonu bir zincir reaksiyonudur ve diğer zincir reaksiyonları gibi üç basamaktan oluşur. Bu basamaklar 1 - Başlama (initiation), 2 - Gelişme (propagation) ve 3 - Sonlanma (termination) basamakları olarak adlandırılır (Halliwell, 1984; Sevanian ve Hochstein, 1985; Halliwell ve Gutteridge, 1990; Gutteridge, 1995).

Lipit peroksidasyonunda özellikle C=C çift bağı içeren yağ asitleri hidroperoksitlere okside olurlar. Hidroperoksitler ise, metal katalizörlerin varlığında kompleks hidrokarbon karışımları ve sitotoksik aldehitler oluşturmak üzere yıkılırlar (Halliwell, 1984).

Yağ asitlerinde çift bağ bulunması, komşu karbon atomundaki C-H bağına zayıflatarak molekülden hidrojen atomunun uzaklaştırılmasını kolaylaştırır. Lipitlerdeki $-CH_2-$ den bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması sonucu geride karbon radikali ($^{\bullet}CH-$) kalır. Karbon radikali daha sonra moleküler düzenlenmeye uğrayarak daha kararlı olan konjuge dienleri oluşturur. Konjuge dienler, aerobik koşullarda O_2 ile etkileşerek peroksi radikalini ($ROO^{\bullet}$) oluşturur. Peroksi radikalinin oluşması, reaksiyon zincirinin uzaması açısından önemlidir. Peroksi radikalleri, komşu yağ asiti yan zincirlerinden hidrojen atomunun uzaklaştırılmasını sağlarlar. Böylece yeni bir karbon merkezli radikal oluşur ve bu da hemen oksijen ile reaksiyona girerek yeni bir peroksi radikali oluşturur, reaksiyonlar böylece zincirleme devam eder. Peroksi radikalleri lipit hidroperoksitlerini oluşturmak üzere hidrojen atomlarıyla etkileşebilir veya siklik peroksitleri oluşturabilirler. Bunlar da malondialdehit (MDA) gibi ürünlere yıkılırlar. Zincir reaksiyonu, ortamda E vitamini gibi zincir kırıcı bir antioksidan bulunmadıkça, substrat tükenene kadar devam eder (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Gutteridge, 1995).

Lipid peroksidasyonu sürecine geçiş metalleri iki yolla katılır. Birincisi, peroksidasyonun başlangıç basamağına, yağ asitlerinden hidrojen koparma

özelliğinde bir radikal oluşumuna aracılık ederek katılabilirler. Örneğin, bu özelliğe sahip HO[•] radikali, demir katalizörlüğünde O₂^{•-} ve H₂O₂'den oluşur. Yapılan in vitro çalışmalarda perferil, ferril veya Fe⁺²/Fe⁺³/O₂ gibi demir iyonu oksijen komplekslerinin de peroksidasyonu başlatabileceği önerilmektedir. İkincisi, geçiş metalleri peroksitleri yıkarak peroksidasyonu etkilerler. Peroksit içeren lipid sistemlerinde, peroksitlerin peroksi (ROO[•]) ve alkoksi (RO[•]) radikallerine yıkılarak bunların komşu lipitlerden hidrojen almalarına neden olur (Sevanian ve Hochstein, 1985; Halliwell ve Gutteridge, 1990; Halliwell, 1991; Gutteridge, 1995).

Lipid hidroperoksitlerinin bu kompleks metal iyonlarıyla katalizlenen yıkım ürünleri MDA ve 4-hidroksinanenal gibi aldehitlerdir.

Biyolojik membranlarda görülen yaygın lipid peroksidasyonu membran akışkanlığında değişikliklere, membran potansiyelinde azalmaya, membranın H ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğinde artışa neden olur, hücre ve hücre organellerinin (örneğin lizozomlar) içeriklerinin dış ortama salınmasına yol açar. Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan aldehitler sitotoksiktirler. Lipit peroksitleri ve yıkım ürünleri aldehitler makrofajların etkinliğini baskılar, protein sentezini inhibe eder, enzimleri inaktive eder, membran bileşenlerinin çapraz bağlanmalarına ve polimerizasyonlarına neden olurlar. MDA, kolay diffüze olabildiğinden DNA yapısındaki bazlarla etkileşir. Bu durum, MDA'nın mutajenik, genotoksik ve karsinojenik etkilerini açıklamaktadır (Freeman ve Crapo, 1982).

1.4. Organizmanın Antioksidatif Savunma Sistemi

Antioksidanlar sınıflandırılması enzimatik ve nonenzimatik ya da hücre içi ve hücre dışı antioksidanlar şeklinde yapılmaktadır. Diğer bir sınıflandırma şeklinde ise antioksidanlar, antioksidatif metabolizmadaki rollerine göre primer, sekonder ve tersiyer antioksidanlar olarak sınıflandırılmaktadır (Kargın ve Fidancı, 1997; Kırkali ve Yalçın, 1998). Aşağıda, Tablo 1.1'de antioksidanlar hücresel yerleşimlerine göre sınıflandırılmıştır.

Tablo 1.1 Antioksidanların hücrel yerleşimlerine göre sınıflandırılması

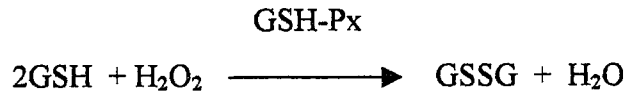
İntrasellüler Antioksidanlar	Membran Antioksidanlar	Ekstrasellüler Antioksidanlar
SOD (Cu, Zn, Mn) ^A Katalaz Glutasyon Peroksidaz (Se) ^A Sitokrom oksidaz (Cu) ^A	α -Tokoferol β -Karotin Koenzim Q Membranın yapısı	Transferrin Laktoferrin Haptogloblin Hemopeksin Albumin Seruloplazmin EC-SOD EC-GSHPx Bilirubin Mukus Ürik asid Glukoz Askorbik asid Eritrosit

A: aktif merkezdeki metal iyonu

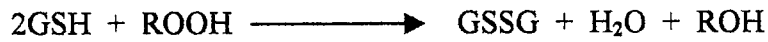
1.4.1. İntrasellüler Antioksidanlar

1.4.1.1. Glutasyon Peroksidaz (EC: 1.11.1.9)

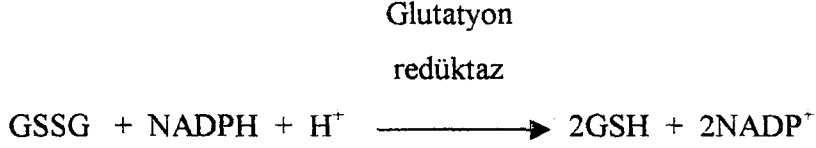
Selenyum bağımlı enzim Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), plazmadaki tek selenoglikoproteindir. Glutasyonu (GSH) okside glutatyona (GSSG) yükseltmek için H_2O_2 'i ve lipid peroksitlerini indirger (Marklund, 1984; Das ve Maulik, 1994).



veya

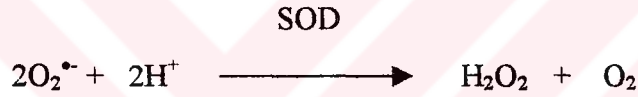


Sağlıklı çalışan bir hücrede GSH/GSSG oranı yüksek olarak korunmaktadır ve yaklaşık 500/1 oranındadır. Hidroperoksitlerin redükte olmasıyla meydana gelen GSSG, glutatyon redüktazın katalizlediği bir tepkime ile tekrar GSH'a dönüşmektedir (Board ve Peter, 1976; Heffner ve Repine 1989).



1.4.1.2. Süperoksit Dismutaz (E.C 1.15.1.1)

SOD, $\text{O}_2^{\bullet-}$ 'in dismutasyonunu sağlar. Bu reaksiyonda oluşan ürün H_2O_2 ise hem içeren katalaz enzimi tarafından parçalanır (Das ve Maulik, 1994).

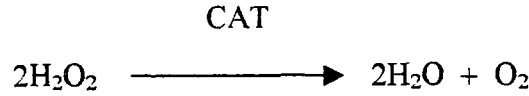


Süperoksit dismutaz'ın (SOD) omurgalılarda iki izoenzimi tanımlanmıştır. Bakır ve çinko içeren CuZn-SOD, sitoplazma ve mitokondri iç membranında saptanmıştır. Mangan içeren enzim, Mn-SOD ise mitokondri matriksinde bulunmaktadır. Bu enzimler hücre dışı sıvılarda çok az miktarlarda bulunurlar.

Hücre dışı sıvılarda bulunan SOD, ekstrasellüler Süperoksit dismutaz (Ec-SOD) olarak adlandırılmaktadır. Dört Cu ve muhtemelen dört Zn içeren tetramerik bir proteindir (Marklund, 1984).

1.4.1.3. Katalaz (E.C. 1.11.1.6)

Katalaz enzimi tetramer yapıda bir hemoproteindir. Prostetik grup olarak yapısında Fe^{+3} içeren bir protoporfirin IX ihtiva eder. Görevi H_2O_2 'i oksijen ve suya parçalamaktır (Percy, 1984).



Hidrojen peroksit oluşumu, farklı dokuda farklı düzeylerde gerçekleştiğinden CAT enzim aktivitesi de dokudan dokuya ve hücreler arasında farklılıklar gösterebilir. CAT, sitokrom sistemi içeren bütün aerobik hücrelerde bulunmaktadır. Enzimin aktivitesi özellikle karaciğer, böbrek ve eritrositlerde yüksektir. Beyin hücreleri, myositler, pankreas hücreleri, akciğer dokusunda ise en düşük oranlarda bulunur (Jones ve Ark., 1981).

Serbest oksijen radikallerine karşı organizma tarafından geliştirilen antioksidan sistem içinde yer alan enzimlerden SOD, CAT ve GSH-Px'in aktivasyon ve inaktivasyon mekanizması karşılıklı etkileşim içindedir. SOD, süperoksit radikalini H_2O_2 'e ve O_2 'ye çevirmekte, H_2O_2 ise CAT ve GSH-Px tarafından parçalanmaktadır. H_2O_2 tarafından SOD'ın inaktivasyonuna karşı koruyucu olarak CAT ve GSH-Px birlikte çalışmaktadır. Buna karşılık SOD'da $\text{O}_2^{\bullet-}$ tarafından CAT ve GSH-Px'a karşı inhibisyonu önler. Çünkü $\text{O}_2^{\bullet-}$, GSH-Px'in redükte formunu okside formuna çevirerek enzimin inaktivasyonuna neden olur (Bast ve Ark., 1991; Erenel ve Ark., 1993).

1.4.2. Membran Antioksidanları

1.4.2.1. α -Tokoferol

Tokoferoller ve tokotrienoller E vitamini olarak adlandırılır. Tokoferolden en etkili olanı alfa-tokoferoldür. Alfa-tokoferolün aromatik halkasının tümüyle metillenmiş olması, hem peroksi radikalleriyle kolay etkileşmesini, hem de reaksiyon sonunda oluşan tokoferoksi radikalının daha kararlı olmasını sağlar (Burton ve Ingold, 1989).

Antioksidan etkilerini temel olarak organik peroksi radikalleri ile etkileşerek gösterirler. E vitamini doku lipitlerini serbest radikal ataklarından korur. Peroksi radikalleri ile çok hızlı tepkimeye girer. Bu yüksek aktivite özellikle membranlarda

önemlidir. Çünkü, lipit peroksi radikalleri ile radikalik zincir reaksiyonlarını kıran kararlı bileşikler (lipit hidroperoksitleri ve tokoferoksi radikali) oluşturur (Heffner ve Repine, 1989).

Yapılan çalışmalarda E ve C vitaminlerinin lipit peroksidasyonuna karşı birlikte etkili oldukları ortaya çıkmıştır (Parcker ve Ark., 1979; Sharma ve Buettner, 1993; Bisby ve Parker, 1995). Dokularda C vitamini düzeyi E vitamininden yüksektir. Buna karşılık E vitamini C vitamininden daha lipofiliktir, bu nedenle biyomembranlarda daha güçlü antioksidan etki gösterir. Vitamin C, tokoferoksi radikalini yeniden E vitaminine dönüştürür, bu sırada oluşan vitamin C radikali NADH bağımlı bir enzim sistemi ile C vitaminine indirgenir (Parcker ve Ark., 1979). α -tokoferolün yeniden oluşması için ubikinol ve tiyollerin de benzer şekilde katkıda bulunduğu belirtilmektedir (Bisby ve Parker, 1995).

1.4.2.2. β -Karotin

Yapılan çalışmalarda β -karotinin in vivo olarak lipitleri peroksidasyona karşı korumada önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Özellikle singlet oksijeni etkisizleştiren bir antioksidandır. β -karotinin radikallerle etkileşmesi diğer antioksidanlarda olduğu gibi hidrojen verme şeklinde değil, radikalle birleşme şeklinde gerçekleşir.

β -karotin ve E vitamininin antioksidan etkileri birbirini tamamlar. β -karotin düşük oksijen basıncında etkili, E vitamini ise yüksek oksijen basıncında etkilidir. Yüksek oksijen basıncında β -karotin prooksidan aktivite gösterir (Burton ve Ingold, 1984; Frei, 1994).

1.4.2.3. Ubikinon ve Ubikinol

Elektron taşınım zincirinde yer alan ubikinonlar ve bunların indirgenmiş formları olan ubikinoller, indirgenme-yükseltgenme reaksiyonlarına giren serbest radikal temizleyicileridir. Mitokondrileri ve elektron taşınımının yer aldığı diğer membranları oksidatif hasara karşı korurlar.

Ubikinolün antioksidan etkisi için iki mekanizma önerilmiştir. Birincisi, ubikinolün peroksi ve alkoksi radikallerini indirgemek için hidrojen sağlaması; ikincisi, E vitamininin okside formu vitamin E fenoksi radikali ile redoks tepkimeye girmesidir. Vitamin E fenoksi radikalının ubikinol ile indirgenmesi sonucu E vitamini yeniden oluşur. E vitamini ve ubikinolün sağladığı antioksidan savunma, oksidanların lokal konsantrasyonlarına, radikalleri okside etme özelliklerine ve membranlardaki dağılımlarına bağlıdır (Kagan ve Ark., 1994).

1.4.3. Ekstrasellüler Antioksidanlar

1.4.3.1. Transferrin

Sağlıklı bireylerin plazmalarında bulunan transferrinin ancak % 20-30'u demir ile yüklüdür. Başka bir deyişle, plazmanın serbest ferrik iyon içeriği sıfırdır. Transferrine bağlı demir iyonları, Fenton reaksiyonu ile HO[•] oluşumuna veya lipit peroksidasyonuna katılmaz. Yapılan in vitro çalışmalarda sağlıklı bireylerin plazmalarının veya transferrinin, demir bağımlı lipit peroksidasyonuna uğrayan mikrozm ya da lipozomlara eklendiğinde, demir iyonlarının transferrine bağlanması nedeniyle, peroksidasyonun inhibe olduğu saptanmıştır. Nötrofillerden salınan ve insan sekresyonlarında bulunan laktoferrin de demir iyonlarını bağlayarak antioksidan etki gösterebilir (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

1.4.3.2. Hemoglobin, Hemopeksin, Haptoglobin

Hemoglobin ve miyoglobin iki mekanizma ile lipid peroksidasyonunu hızlandırabilir. Birinci mekanizma, hemoglobinin hem halkası H₂O₂ veya lipid hidroperoksitleriyle etkileşerek lipit peroksidasyonundan sorumlu bir hemoprotein oluşturmaya dayanır. Methemoglobin ve H₂O₂ arasındaki etkileşimde hemoprotein iki elektron alarak okside olur ve ferril hemoglobin radikali oluşur (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Miles ve Grisham, 1994). Ferrilhemoglobin güçlü bir oksidandır. Subendotelial kanama, hemoliz ve mukozal lipid peroksidasyonunun bir arada görüldüğü ülseratif

kolitin aktif döneminde yapılan çalışmalarda, hemoglobin-katalizli reaksiyonun inflamatuvar doku hasarına aracılık etmede veya var olan hasarı şiddetlendirmede önemli rol oynayabileceği vurgulanmıştır. Ayrıca merkez sinir sistemi, retina, böbrek gibi dokularda da hemoglobinin oksidatif hasar oluşumuna aracılık ettiği ve hasarı şiddetlendirdiği yönünde bulgular bildirilmektedir (Miles ve Grisham, 1994). İkinci mekanizma, H_2O_2 varlığında hemoglobinin ve miyoglobinin hem halkalarının yıkılması, böylece demir iyonlarının proteinden salınmasıdır.

Plazmada hemoglobin için haptoglobin, hem içinse hemopeksin gibi bağlayıcı proteinler vardır. Hemoglobinin haptoglobuline, hemin hemopeksine bağlanması, lipid peroksidasyonunun etkilerini azaltır. Hemoglobin-haptoglobin ve hem-hemopeksin kompleksleri plazmadan hızla temizlenirler. Böylece hemoglobin ve hemopeksinin oksidan etkileri önlenmiş olur (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

1.4.3.3. Seruloplazmin

Plazmada bakır taşıyan enzim olan seruloplazminin demir metabolizmasında da önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Seruloplazminin antioksidan aktivitesi, $O_2^{\bullet-}$ ve diğer reaktif oksijen türlerini temizlemesine ve Fe^{+2} 'yi Fe^{+3} 'e dönüştürerek Fenton reaksiyonunu önlemesine dayandırılmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Fox ve Ark., 1995).

Yapılan in vitro bir çalışmada, bazı deney ortamlarında seruloplazminin prooksidan davranış gösterebildiği öne sürülmüştür (Fox ve Ark., 1995). Başka bir çalışmada, $O_2^{\bullet-}$ ve nitrik oksit reaksiyonu sonucu oluşan peroksinitritin seruloplazminden bakırın salınmasına yol açtığı ve enzimin ferroksidaz aktivitesini yitirdiği saptanmıştır (Swain ve Ark., 1994).

Yapılan klinik çalışmalarda aterosklerozun da içinde bulunduğu çeşitli kalp damar hastalıklarında, serum seruloplazmin düzeylerinin arttığı belirlenmiştir. Genel olarak seruloplazmin düzeyi ile orantılı olan bakır konsantrasyonunun iskemik kalp hastalıkları için bağımsız risk faktörü olabileceği yönünde görüşler vardır. Yapılan

bir diğerk çalışmada, serumda yüksek bakır konsantrasyonunun myokard infarktüsü için risk faktörü olabileceğini vurgulanmışlardır. Yazarlar, bakırın artmasına paralel olarak, bu metali % 90-95 oranında bağlayan seruloplazminin de artabileceğini belirtmektedirler (Salonen ve Ark., 1991).

1.4.3.4. Albumin

Albumin yağ asitleri, safra pigmentleri gibi pek çok maddenin taşıyıcısıdır. İnsan albumini bakır iyonları için de bağlanma bölgeleri içerir (Halliwell, 1988). Bu nedenle, bakır iyonlarına bağımlı lipit peroksidasyonunu ve HO• oluşumunu önler. Albumine bağılı bakır iyonları H₂O₂, O₂• ve askorbat ile etkileşerek HO• oluşturabilir. Ancak oluşan HO•'nin çözeltiye sızması albumin molekülü tarafından önlenir. Bu sırada albumin molekülü hasar görürse de, bu hasar albuminin plazma konsantrasyonunun yüksek olması ve turnover'nin hızlı olması (yarı ömrü yaklaşık 20 gün) nedeniyle biyolojik açıdan önemsizdir (Gutteridge ve Wilkins, 1983; Halliwell, 1988; Halliwell ve Gutteridge, 1990). Hasar gören albumin proteolitik olarak hızla yıkılarak ortamdan uzaklaştırılır. Albumin demir iyonları aracılığı ile HO• oluşumunu normalde inhibe etmez. Ancak, plazmada 4 g/dl gibi yüksek bir konsantrasyonda bulunması HO• radikalini temizleyebileceğini düşündürmektedir (Halliwell, 1988; Halliwell ve Gutteridge, 1990).

HOCl, miyeloperoksidaz tarafından oluşturulan güçlü bir oksidandır. HOCl'nin zarar verdiği en önemli hedef α-1-antiproteazdır. α-1-Antiproteaz inhibisyonu, elastaz aktivitesinin kontrol edilememesiyle sonuçlanır (Halliwell, 1988; Hu ve Ark., 1993).Yapılan bir çalışmada plazmaya HOCl/OCl• eklenmesiyle askorbik asit ve SH gruplarının hızla okside olduğu saptanmıştır (Hu ve Ark., 1993). Plazma SH grupları büyük ölçüde albumin molekülünde bulunurlar ve bunların HOCl/OCl•'nin kantitatif olarak en önemli temizleyicileri olduğu öne sürülmektedir. Plazmaya askorbat eklendiğinde, HOCl/OCl•'nin bu antioksidan tarafından daha etkin temizlendiği belirlenmiştir. HOCl ve OCl•'nin in vivo olarak hücum ettiği en önemli hedef SH gruplarıdır, dolayısıyla albumin önemli bir koruyucu antioksidandır (Halliwell, 1988; Hu ve Ark., 1993).

Öte yandan, albuminin peroksi radikallerini de temizlediği belirtilmektedir. İn vitro yapılan bir çalışmada, azo bileşiği 2,2'-azobis (2-amidinopropan) hidroklorid (AAP) kullanılarak anaerobik koşullarda AAP-C radikali oluşturulmuş, bu radikalin plazmadan uzaklaştırılmasında proteinlerin etkili olduğu görülmüştür. AAP-C radikalinin temizlenmesinde temel proteinin albumin olduğu vurgulanmaktadır (Soriani ve Ark., 1994).

1.4.3.5. Bilirubin

Safra pigmentleri, hemin in vivo oksidatif yıkımı ile oluşan açık zincirli tetrapollerdir. Primer katabolik ürün biliverdindir. Memelilerde biliverdin daha sonra sitozolik bir enzim olan biliverdin redüktaz ile bilirubine dönüştürülür. Bilirubin yağda çözünen, sitotoksik ve atılması gereken bir ürün olarak tanımlanır.

Hemoproteinlerin yıkımı sonucu oluşan bilirubin safra ve bağırsaklar yoluyla atılır. Bilirubin ve biliverdinin bağırsakta A vitamini ve linoleik asiti oksidatif hasara karşı koruduğu belirtilmektedir. Bilirubin konjuge çift bağlı reaktif oksijen atomları taşıması nedeniyle antioksidan özelliktedir (Stocker ve Ark., 1987).

1.4.3.6. Ürik Asit

Purin metabolizmasının son ürünü olan ürik asitin askorbat gibi güçlü bir elektron donörü olduğu ve askorbatın bazı fonksiyonlarını üstlenebileceği ilk olarak 1970'de Proctor tarafından önerilmiştir (Proctor, 1970). Ürik asitin in vivo antioksidan olarak etki gösterebileceği daha sonra çeşitli araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (Kittridge ve Willson, 1984; Maples ve Mason, 1988; Aruoma ve Halliwell, 1989; Halliwell ve Gutteridge, 1990).

İn vitro yapılan çalışmalarda ürik asitin eritrositleri singlet oksijen hasarına karşı koruduğu, lipid peroksidasyonunu durdurduğu, hemoglobinin nitrit ile oksidasyonunu azalttığı, hyaluronik asitin oksidatif yıkımını engellediği, HOCl'i temizlediği, demir

ve bakır iyonlarını bağlayarak serbest radikal oluşumunu önlediği gösterilmiştir (Auroma ve Halliwell, 1989; Maples ve Mason, 1988; Halliwell ve Gutteridge, 1990). Ürik asitin aynı zamanda $\text{HO}^\bullet$ radikalini temizleyerek $\text{HO}^\bullet$ 'in laktat dehidrogenaz ve maya alkol dehidrogenazı gibi bazı enzimleri inaktive etmesini önlediği belirtilmektedir (Kittridge ve Willson, 1984; Maples ve Mason, 1988).

1.4.3.7. Askorbik Asit

L-askorbik asitin çoğu biyolojik sistemde bulunduğu ve hücre dışı sıvılarda en önemli antioksidan olduğu düşünülmektedir. Bu vitaminin antioksidan özelliğinin yanı sıra önemli hücresel görevlerinin olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda askorbik asitin $\text{O}_2^\bullet$, H_2O_2 , $^1\text{O}_2$, HOCl , $\text{HO}_2^\bullet$ ve $\text{HO}^\bullet$ gibi türleri temizlediği gösterilmiştir. Plazma lipidleri ile yapılan çalışmalarda askorbatın $\text{HO}_2^\bullet$ ile başlatılan lipid peroksidasyonunu protein tiyoller, ürat, bilirubin, alfa-tokoferol gibi diğer plazma bileşenlerinden daha etkin inhibe ettiği belirlenmiştir. Askorbat, sulu fazda $\text{HO}_2^\bullet$ radikallerini lipid peroksidasyonunu başlatmadan yakalayarak biyomembranları oksidatif hasara karşı korur.

Askorbatın diğer önemli bir etkisi, yağda çözünen zincir kırıcı antioksidan α -tokoferolün aktivitesini artırarak peroksidasyonu azaltmasıdır. İn vitro çalışmalarda askorbatın tokoferol radikallerini azalttığı, tokoferolün radikalleri etkisizleştirme aktivitesini düzenlediği gösterilmiştir (Sies ve Ark., 1992).

İN vitro yapılan çalışmalarda askorbik asitin prooksidan etki gösterebileceği saptanmıştır. Askorbik asit, Fe^{+3} veya Cu^{+2} ile birlikte bulunduğu poliansature yağ asitlerinin peroksidasyonunu hızlandırmaktadır (Bast ve Ark., 1991). Askorbat bu iyonları indirgemekte ve bu nedenle H_2O_2 varlığında $\text{HO}^\bullet$ oluşmaktadır. Askorbik asit radikali (dehidroaskorbat anyon radikali), diğer radikallere göre daha az reaktiftir (Rowley ve Halliwell, 1983).

Bu tez çalışmasında, yukarıda verilen literatür bilgileri ışığında farklı genotipteki Ankara keçilerinde, genotipin antioksidatif metabolizmanın ekstrasellüler antioksidanları üzerindeki etkileri incelenmeye çalışılmıştır.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Materyal

Çalışmanın hayvan materyalini Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsünde aynı bakım ve besleme şartlarında yetiştirilen 15 yerli Ankara keçisi (Genotip I) ile Amerika Birleşik Devletlerinde tiftik yönünde ıslah edilen ve Türkiye'ye getirilen tekelerin yerli Ankara Keçisi dişileri ile çiftleştirilmesinden elde edilen 15 Amerikan × Türk Ankara keçileri (Genotip II) oluşturmıştır. Kan örnekleri farklı genotiplerdeki, bir yaşındaki dişi Ankara keçilerinin Vena jugularis'inden heparinli vakumlu tüpler kullanılarak alınmıştır. Analizler Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen plazma örneklerinde lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak seçilen malondialdehit (MDA) düzeyleri ve antioksidatif metabolizmanın ekstrasellüler antioksidanları plazma askorbik asit düzeyleri ile serum örneklerinde albumin, glikoz, toplam bilirubin, ürik asit ve seruloplazmin düzeyleri aynı gün içerisinde ölçülmüştür.

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Analizler sırasında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarlarında bulunan Sartorius 2432 hassas terazi, Orion 720A pH-metre, Nüve geri soğutmalı ısıtıcı, Heraeus Minifuge RF termosantrifüj, Wifug x-1 santrifüj, Eppendorf 3200 santrifüj, Sutjeska Boegard su banyosu, Shimadzu UV-1202 spektrofotometre, Eppendorf ve Transpette otomatik pipetler ve çeşitli cam malzemeler kullanılmıştır.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Plazma Askorbik Asit Düzeyi Ölçümü

Plazma askorbik asit düzeyi ölçümü Kway (1978) tarafından bildirilen yöntemle gerçekleştirilmiştir.

2.2.1.1. Testin prensibi :

Fosfotungstik asitin proteinleri çöktürdükten sonra askorbik asit ile reaksiyona girerek renkli kompleks oluşturması esasına dayanır.

2.2.1.2. Kullanılan ayırıcılar :

- a- Renk ayırıcı : 20 g sodyum tungstat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve 10 g disodyum hidrojen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) bir erlene aktarıldı. Isıtılarak 30 ml distile suda eritildi. Başka bir beherde 15 ml distile su ve 5 ml sülfirik asit (H_2SO_4) karışımı hazırlandı. Hazırlanan ilk çözelti 250 ml'lik bir kaynatma balonuna alınarak üzerine su + sülfirik asit karışımı küçük porsiyonlar halinde ve devamlı karıştırılarak ilave edildi. 70 °C de 2 saat geri soğutmalı ısıtıcıda kaynatıldı. Oda ısısında soğutuldu.
- b- Askorbik asit stok standart çözeltisi (50 mg/dl) : 50 mg L-askorbik asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) 100 ml % 0,5' lik okzalik asit ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$) solüsyonu ile eritildi.
- c- Askorbik asit çalışma standart çözeltisi (1 mg/dl) : Stok standart çözeltisinden 1 ml alındı ve % 0,5'lik okzalik asit solüsyonu ile 25 ml'ye tamamlandı.

2.2.1.3. Testin yapılışı :

Kör, standart ve test olarak işaretlenmiş santrifüj tüplerine sırasıyla 2 ml distile su, 2 ml çalışma standardı ve 2 ml plazma konuldu. Üzerlerine 2'şer ml renk ayırıcı ilave edildi. Karıştırıldı ve 30 dakika oda ısısında bekletildi. Tekrar karıştırıldıktan sonra 3000 rpm'de 15

dakika santrifüj edildi. Spektrofotometrede 700 nm’de köre karşı standart ve testin absorbensları okundu.

2.2.1.4. Hesabı :

Aşağıdaki formülden faydalanılarak plazma askorbik asit düzeyi mg/dl olarak hesaplandı.

$$\text{Vitamin C (mg/dl)} = \frac{\text{Testin absoransı}}{\text{Standartın absoransı}} \times \text{Standartın Konsantrasyonu}$$

2.2.2. Serum Albumin Düzeyi Ölçümü

Serum albumin düzeyi ölçümünde Bromcreozolgreen metodu kullanılmıştır (Tiftik, 1996).

2.2.2.1. Testin prensibi :

Asit pH’da katyon haline geçen albuminin bazik boyalara affinite göstererek kompleks teşkil etmesi ve bu kompleksin absorbensının 628 nm’de ölçülmesi esasına dayanır.

2.2.2.2. Kullanılan ayıraçlar :

- a- Bromcreosolgreen (BCG) ayıracı: 108.0 mg BCG’nin sodyum tuzu, 8.85 süksinik asit, 100 mg Sodyum azit ve 4 ml Brij-35 (% 30 g) 800-900 ml distile suda çözündürüldükten sonra pH’sı % 25’lik NaOH ile 4.15-4.25’e ayarlandı ve distile su ile litreye tamamlandı. Spektrofotometrede 628 nm’de distile suya karşı absoransı kontrol edildi ve yaklaşık 0.150’ye ayarlandı.
- b- BCG kör ayıracı: İçerisinde BCG konulmadan yukarıda bildirilen ayıraç hazırlandı.

c- Albumin Standardı

2.2.2.3. Testin yapılışı :

Dört tüp alınarak sırası ile kör, BCG kör, test ve standart olarak işaretlendi. BCG-Kör işaretli tüpe 5 ml BCG-kör ayırıcı, diğer tüplere 5'er ml BCG ayırıcı kondu. Kör işaretli tüpe 20 µl distile su BCG-Kör ve test işaretli tüplere 20'şer µl serum ve standart işaretli tüpe 20 µl standart kondu. Tüpler karıştırıldı ve 30 saniye içerisinde distile suya karşı 628 nm'de absorbansları okundu.

2.2.2.4. Hesabı :

Aşağıdaki formülden faydalanılarak serum albumin düzeyi g/dl olarak hesaplandı.

$$\text{Albumin (g/dl)} = \frac{\text{Test Abs.} - (\text{Kör Abs.} + \text{BCG-Kör Abs.})}{\text{Standart Abs.} - (\text{Kör Abs.} + \text{BCG-Kör Abs.})} \times \text{Standart Konsantrasyonu}$$

2.2.3. Serum Toplam Bilirubin Düzeyi Ölçümü

Serum toplam bilirubin düzeyinin ölçümünde Van der Berg metodundan faydalanılmıştır (İmren ve Turan, 1985).

2.2.3.1. Testin prensibi :

Plazma veya serum ehrlich (Diazo) ayırıcı (diazotize sülfanilik asit) ile reaksiyona sokulur. Ortamdaki bilirubin ayıraçla reaksiyona girer ve bilirubin miktarı ile doğru orantılı olarak

renkli bir bileşik (pembe-kırmızı) olan azobilirubini oluşturur. Renk 2 saat kadar dayanıklıdır. Oluşan azobilirubinin absorbanı spektrofotometrede ölçülür.

2.2.3.2. Kullanılan ayırıcılar :

- a- Diazo A Ayırıcı: 1 g sülfonilik asit üzerine 15 ml yoğun HCl eklendi. Süzöldü ve distile su ile litreye tamamlandı.
- b- Diazo B Ayırıcı: 0.5 g NaNO₂ suda çözünerek distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Işıktan korundu.
- c- Diazo Ayırıcı: Analizlerden hemen önce 10 ml diazo A ve 0.3 ml diazo B karıştırılarak taze hazırlandı.
- d- Metil Alkol : Analiz saflığında kullanıldı.
- e- % 1.5 HCl : 15 ml yoğun HCl distile su ile bir litreye tamamlandı.
- f- Bilirubin Standart Stok Çözeltisi: 10 mg bilirubin 100 ml balon joje içerisinde biraz kloroformda çözöldü ve kloroform ile 100 ml'ye tamamlandı. Koyu renkli şişede ve buzdolabında saklandı.
- g- Bilirubin Standart Çalışma Çözeltisi: 10 ml stok çözeltiden alındı ve metil alkol ile 100 ml'ye tamamlandı. Böylece 0.01 mg/ml konsantrasyonda bilirubin çözeltisi elde edildi.

2.2.3.3. Testin yapılışı :

Serumda toplam bilirubin tayini için 1 ml serum alınır ve distile su ile 10 kez sulandırıldı. Daha sonra iki deney tüpü alındı, kör ve test olarak işaretlendi. Kör işaretli tüpe 5 ml absolut metanol ve 1 ml % 1.5 HCl, test işaretli tüpe 5 ml absolute metanol ve 1 ml diazo ayırıcı kondu, karıştırıldı. Kör ve test işaretli tüplere daha sonra 4'er ml sulandırılmış serum eklendi. Karıştırıldıktan sonra oda ısısında 15 dakika beklendi. Daha sonra 540 nm de köre karşı testin absorbanı okundu.

2.2.3.4. Hesabı :

Metil alkol kullanılarak bilirubin standart stok çözeltisinden (% 10 mg) % 0.1 mg, 0.5 mg, 1 mg, 2 mg ve 3 mg'lık standart çözeltiler hazırlandı. Bu standart çözeltilerden 9 ml ve kör için 9 ml metanol alındı. Üzerlerine 1'er ml diazo ayıracı eklendi ve oda ısısında 30 dakika bekletildi. Sürenin sonunda 540 nm de spektrofotometrede absorbansları okundu. Sonuçlar, bilirubin konsantrasyonları ile birlikte milimetrik kağıda işlendi ve standart eğri çizildi. Test sonuçları mg/dl olarak bu eğriden hesaplandı ve sulandırma katsayısı ile çarpıldı.

2.2.4. Serum Glikoz Düzeyi Ölçümü

Serum glikoz düzeyinin belirlenmesinde Glikoz oksidaz yöntemi kullanılmıştır (Karagül ve Ark. 1999).

2.2.4.1. Testin prensibi :

Glikoz oksidaz metodu, peroksidazla birlikte renk oluşması esasına dayanır. Glikoz oksidaz, glikozun glikuronik aside dönüşümünü katalize eder.

2.2.4.2. Kullanılan ayıraçlar :

- a- 1 M Sodyum Hidroksit Çözeltisi (NaOH) : 40 g NaOH tartıldı ve bir miktar distile suda çözülerek litreye tamamlandı.
- b- 0.5 M Çinko Sülfat Çözeltisi (ZnSO₄) : 80.77 g ZnSO₄. 7H₂O tartıldı. Bir miktar distile suda çözüldü ve litreye tamamlandı.
- c- Enzim-Kromojen Ayırıcı (Glikoz Oksidaz Enzimi): Bohringer- Mannheim firmasının hazırladığı ticari çözelti kullanıldı (Nr: 1040871).
- d- Glikoz Standardı (% 100 mg) : 250 mg glikoz tartıldı ve 250 ml'lik balon jojede bir miktar distile suda çözüldükten sonra 250 ml' ye tamamlandı.

2.2.4.3. Testin yapılışı :

İki tüp alındı ve tüplere 3'er ml distile su kondu. Tüpün birisine 0.4 ml serum, diğerine de standart çözelti kondu ve karıştırıldı. Daha sonra tüplere 0.5 ml 1 M NaOH ve 0.5 ml 0.5 M ZnSO₄ ilave edildi, karıştırıldı. 5 dakika 2000-3000 rpm'de santrifüj edildi. Bu deproteinizasyon işleminden sonra üç temiz deney tüpü alındı ve test, standart ve kör olarak işaretlendi. Test tüpüne 0.1 ml örneğin supernatantından, standart tüpüne 0.1 ml standart supernatantından, kör işaretli tüpe de 0.1 ml distile su kondu. Her üç tüpe de 5'er ml enzim ayırıcı eklendi ve 37 °C su banyosuna kondu ve 15 dakika bekletildi, sonra oda ısısında soğutuldu. Kör ile spektrofotometrenin sıfır ayarı 415 nm'de yapılarak test ve standart tüplerin absorbansları okundu.

2.2.4.4. Hesabı :

Aşağıdaki formülden faydalanılarak serum glikoz düzeyi mg/dl olarak hesaplandı.

$$\text{Glikoz (mg/dl)} : \frac{\text{Testin Absorbansı}}{\text{Standartın Absorbansı}} \times 100$$

2.2.5. Serum Ürik Asit Düzeyi Ölçümü

Serumda ürik asit miktarı tayini hidroksilamin-fosfotungstat metodu ile gerçekleştirilmiştir (Karagül ve Ark. 1999).

2.2.5.1. Testin prensibi :

Alkali çözeltide ürik asit fosfotungstik asidi indirger ve mavi renk meydana gelir. Rengin absorbanşı spektrofotometrik olarak ölçülür.

2.2.5.2. Kullanılan ayıraçlar :

- a- Tungstat Hidroksilamin Ayırıcı: İki farklı çözeltinin eşit miktarları ile hazırlandı.
 - Na-Tungstat Çözeltisi: 120 g Na-tungstat 180 ml distile suda eritilerek hazırlandı.
 - Hidrosiamonyumklorid Çözeltisi: 120 mg hidroksiamonyumklorid distile suda eritildi ve 100 ml'ye tamamladı.
- b- Fosfotungstik Asit Çözeltisi: 50 g Na-tungstat 400 ml distile suda eritildi, üzerine 40 ml % 85'lik H_3PO_4 ilave edildi ve geri soğutucuda 4 saat kaynatıldı. Soğutuldu ve distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.
- c- Notelson Tungstik Asit Çözeltisi: Bu çözelti de 2 farklı çözeltinin eşit miktarlarda karıştırılmasıyla elde edildi. Test günü taze olarak hazırlandı.
 - 0.15 N H_2SO_4 Çözeltisi
 - % 2.2'lik Na-Tungstat Çözeltisi
- d- Ürik Asit Standart Çözeltisi (% 4 mg): 1 L'lik balon joje'ye 40 mg ürik asit konu. 0.3 g lityum karbonat 100 ml suda eritildi, süzüldü ve ısıtılarak ürik asit üzerine aktarıldı. Ürik asit eriyinceye kadar çalkalandı. Soğutuldu, üzerine 20 ml % 40 formalin ve 15 ml 1 N H_2SO_4 eklendi, distile su ile litreye tamamlandı. Kahverengi şişede buzdolabında saklandı. Deney sırasında bu çözelti 20 defa sulandırılarak 2 µg/ml konsantrasyonda kullanıldı.

2.2.5.3. Testin yapılışı :

Bir deney tüpüne 0.1 ml serum ve 1.9 ml tungstik asit konu, karıştırıldı ve 3 dakika bekletildi. Daha sonra 5 dakika 1500 rpm’de santrifüj edildi. Üç tüp alındı test, kör ve standart olarak işaretlendi. Kör işaretli tüpe 1 ml distile su, test işaretli tüpe 1 ml serum süpernatantı ve standart işaretli tüpe 1 ml sulandırılmış standart çözelti konu. Daha sonra bütün tüplere 5’er ml tungstat hidroksilamin ayıracı ve 2’şer ml fosfotungstik asit ayıracı ilave edildi. Tüpler karıştırıldı ve 2 saat oda ısısında bekletildi. Kör tüpüne karşı test ve standart tüplerinin absorbansları spektrofotometrede 690 nm’de okundu.

2.2.5.4. Hesabı :

Aşağıdaki formülden faydalanılarak serum ürik asit düzeyi mg/dl olarak hesaplandı.

$$\text{Ürik Asit (mg/dl)} : \frac{\text{Testin Absorbansı}}{\text{Standartın Absorbansı}} \times 4$$

2.2.6. Serum Seruloplazmin Düzeyi Ölçümü

Ravin tarafından tarif edilen yöntem kullanılmıştır (İmren ve Turan, 1985).

2.2.6.1. Testin prensibi :

Serüloplazmin, renksiz p-fenilendiaminin oksidasyonunu kataliz ederek mavi viyole renkli bir oksidasyon ürünü meydana getirir. Renkli oksidasyon ürününün meydana gelme oranı, serum serüloplazmin konsantrasyonuyla orantılıdır. Serüloplazmin konsantrasyonu, pH: 5.5’de, 37 °C de p-fenilendiaminin oksidasyon oranından tayin edilir.

2.2.6.2. Kullanılan ayıraçlar :

- a- p-Fenilendiamin - 2HCl: 5 g/L deiyonize suda çözündü. Testten hemen önce hazırlandı.
- b- 1 mol/L Asetik Asit: 60 ml glasial asetik asit, deiyonize su ile litreye tamamlandı.
- c- 1 mol/L Sodyum asetat: 136 g sodyum asetat deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı.
- d- 400 mmol/L Asetat tampon: 1,2 ml asetik asit, 20 ml sodyum asetata ilave edilerek, pH: 5.5'ye ayarlandı, deiyonize su ile 50 ml'ye tamamlandı. Buzdolabında muhafaza edildi.
- e- Sodyum azit (5 g/L)

2.2.6.3. Testin yapılışı :

Kör ve test tüpü olarak iki tüp alındı. Kör ve test işaretli tüplere 0.1 ml serum ve 8'er ml asetat tampon çözeltisi kondu. Sadece kör işaretli tüpe 1 ml sodyum azid çözeltisi ilave edildi. Daha sonra her iki tüpe de 1'er ml p-fenilendiamin çözeltisi eklendi. Tüpler alt üst edilerek iyice karıştırıldı. 37 °C'de su banyosunda ve karanlıkta 1 saat bekletildi. İnkübasyon periyodundan sonra, numune tüplerine 1 ml Na Azit kondu ve alt üst edildi. Buzlu su içerisinde yarım saat bekletildi. Spektrofotometrede 530 nm'de testin absorbansı köre karşı okundu.

2.2.6.4. Hesabı :

$$\text{mg/dl Serüloplazmin} = \text{Testin Absorbansı} \times 87.5^*$$

(*) Holmberg-Laurell faktörü = p-Fenilendiamin oksidaz testindeki optik dansiteyi, serumda ve standart testteki % mg serüloplazmine çevirme faktörüdür.

2.2.7. İstatistik Değerlendirme

Gruplara ait sonuçların istatistik değerlendirilmesinde t-testinden faydalanılmıştır (Düzgüneş ve Ark. 1983).

3. BULGULAR

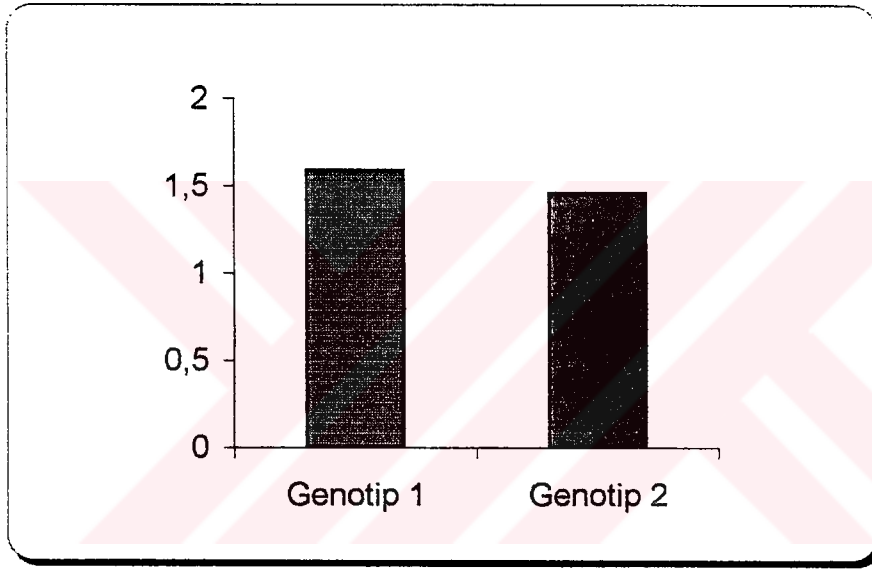
Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın Ankara-Lalahan'da bulunan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü'nde yetiştirilen yerli (Türk) Ankara Keçileri (Genotip I) ve Amerikan × Türk Ankara keçilerinden (Genotip II) alınan kan örneklerinde gerçekleştirilen plazma askorbik asit düzeyleri ile serum albumin, bilirubin, glikoz, ürik asit, seruloplazmin düzeylerine ait veriler ve gruplar arasındaki t-testi sonuçları Tablo 3.1 de toplu halde verilmiştir.

Tablo 3.1. Farklı genotipteki Ankara Keçilerinde plazma askorbik asit düzeyleri ile serum albumin, bilirubin, glikoz, ürik asit ve seruloplazmin düzeyleri

Testler		Genotip I	Genotip II	F	Sig.
Askorbik asit (mg/dl)	Min.	0,50	0,23	0,02	$p \geq 0,05$
	Maks.	3,54	2,71		
	$\bar{x} \pm Sx$	$1,59 \pm 0,21$	$1,46 \pm 0,18$		
	N	15	15		
Albumin (g/dl)	Min.	2,7	2,5	0,52	$p \geq 0,05$
	Maks.	3,2	3,1		
	$\bar{x} \pm Sx$	$2,90 \pm 0,03$	$2,76 \pm 0,04$		
	N	15	15		
Bilirubin (Total) (mg/dl)	Min.	0,00	0,00	0,07	$p \geq 0,05$
	Maks.	0,10	0,20		
	$\bar{x} \pm Sx$	$0,08 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$		
	N	15	15		
Glikoz (mg/dl)	Min.	44,00	50,00	0,00	$p \geq 0,05$
	Maks.	78,00	80,00		
	$\bar{x} \pm Sx$	$60,33 \pm 2,30$	$63,60 \pm 2,36$		
	N	15	15		
Ürik Asit (mg/dl)	Min.	0,10	0,00	336,0	$p \leq 0,001$
	Maks.	0,10	0,10		
	$\bar{x} \pm Sx$	$0,10 \pm 0,00$	$0,04 \pm 0,01$		
	N	15	15		
Seruloplazmin mg/dl	Min.	9,97	11,02	4,57	$p \leq 0,05$
	Maks.	30,36	26,80		
	$\bar{x} \pm Sx$	$21,31 \pm 1,53$	$17,50 \pm 0,99$		
	N	15	15		

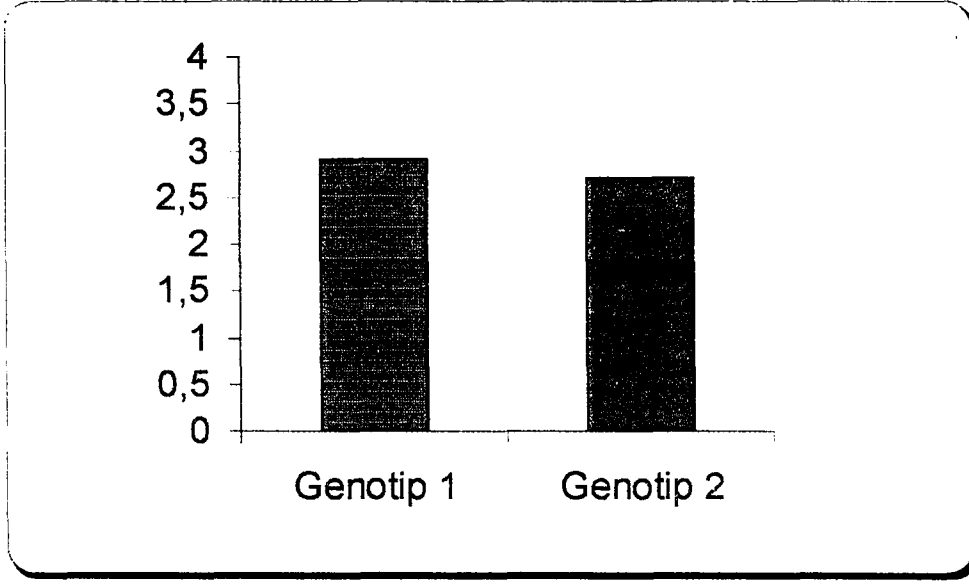
Ayrıca, her iki genotipteki Ankara keçilerine ait plazma askorbik asit düzeyleri ile serum albumin, bilirubin, glikoz, ürik asit, seruloplazmin düzeylerine ait sonuçlar Şekil 3.1-3.7 de ayrı ayrı grafikler halinde gösterilmiştir. İncelenen parametrelere ilişkin bireysel değerler ise ‘Ekler’ bölümünde Ek-Tablo 1 ve 2’de yer almaktadır

Analiz sonuçlarına göre Askorbik asit düzeyleri Genotip I Ankara keçilerinde 0,50 – 3,54 mg/dl arasında ve ortalama $1,59 \pm 0,21$ mg/dl, Genotip II Ankara keçilerinde 0,23 – 2,71 mg/dl arasında ve ortalama $1,46 \pm 0,18$ mg/dl olarak belirlendi (Tablo 3.1, Şekil 3.2). Genotipler arasında istatistik olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p \geq 0,05$).



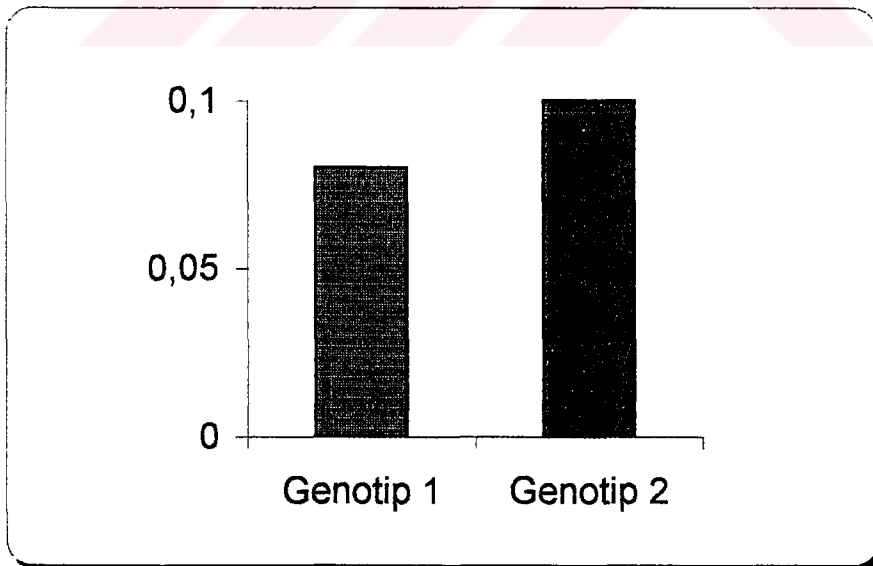
Şekil 3.1. Farklı genotipteki Ankara keçilerinde plazma askorbik asit düzeyleri (mg/dl)

Serum albümin düzeyleri Genotip I Ankara keçilerinde 2,70-3,20 g/dl arasında ve ortalama $2,9 \pm 0,03$ g/dl, Genotip II Ankara keçilerinde ise 2,50- 3,10 g/dl ve ortalama $2,7 \pm 0,04$ g/dl olarak ölçüldü (Tablo 3.1, Şekil 3.3). Farklı genotiplere ait ortalama albumin değerleri arasında istatistiksel önemde fark saptanmadı ($p \geq 0,05$).



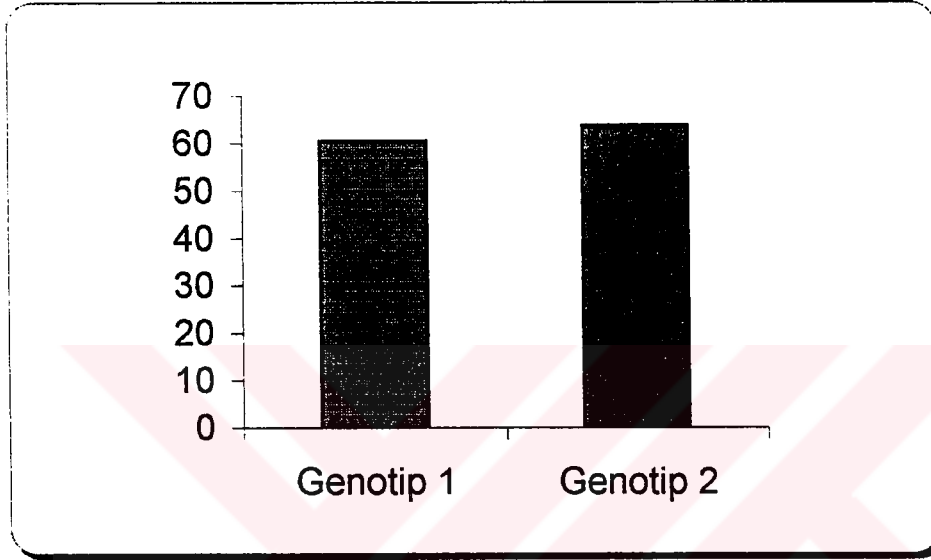
Şekil 3.2. Farklı genotipteki Ankara keçilerinde serum albumin düzeyleri (g/dl)

Serum total bilirubin düzeyleri Genotip I Ankara keçilerinde 0,00 – 0,10 mg/dl arasında ve ortalama $0,08 \pm 0,09$ mg/dl, Genotip II Ankara keçilerinde de 0,00 – 0,20 mg/dl arasında ve ortalama $0,10 \pm 0,01$ mg/dl olarak belirlendi (Tablo 3.1, Şekil 3.4). Bilirubin değerleri arasında da istatistik anlamlı fark gözlenmedi ($p \geq 0,05$).



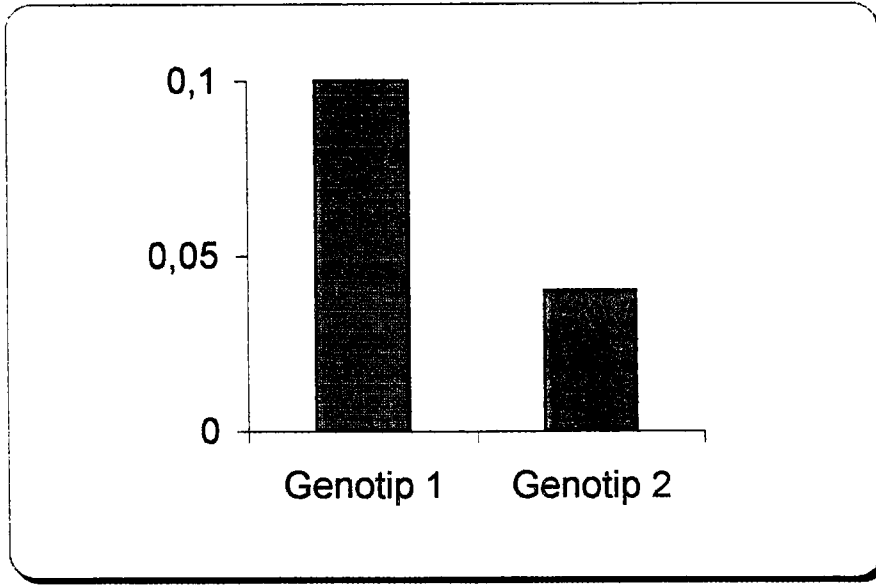
Şekil 3.3. Farklı genotipteki Ankara keçilerinde serum toplam bilirubin düzeyleri (mg/dl)

Serum glukoz düzeyi Genotip I Ankara keçilerinde 44.0 – 78.0 mg/dl arasında ve ortalama $60,33 \pm 2,30$, Genotip II Ankara keçilerinde ise 50.0 - 80.0 mg/dl arasında ve ortalama $63,6 \pm 2,36$ mg/dl olarak ölçüldü (Tablo 3.1, Şekil 3.5). Farklı genotiplere ait ortalama glikoz değerleri arasında istatistiksel önemde fark saptanmadı ($p \geq 0,05$).



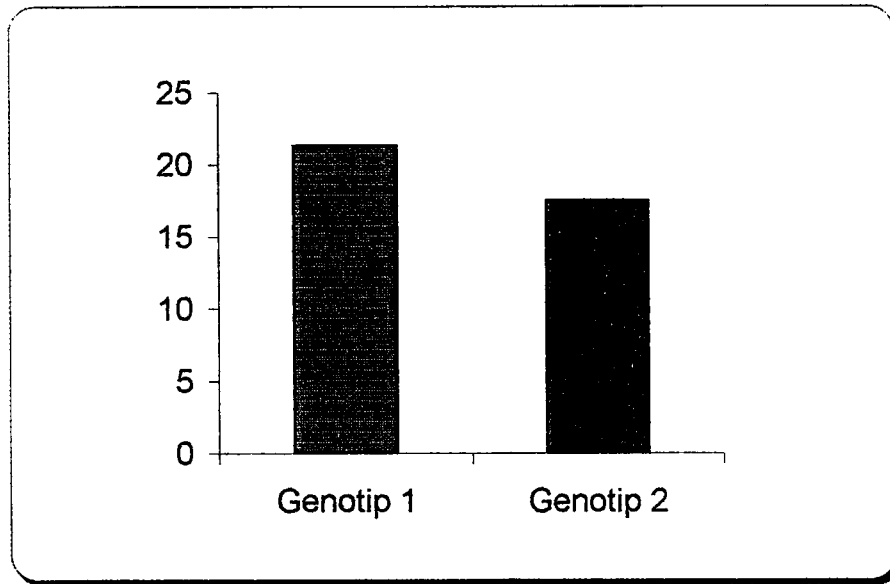
Şekil 3.4. Farklı genotipteki Ankara keçilerinde serum glikoz düzeyleri (mg/dl)

Serum ürik asit düzeyleri Genotip I Ankara keçilerinde 0,10 – 0,10 mg/dl arasında ve ortalama $0,10 \pm 0,00$ mg/dl, Genotip II Ankara keçilerinde 0,00 – 0,10 mg/dl arasında ve ortalama $0,04 \pm 0,01$ mg/dl olarak belirlendi (Tablo 3.1, Şekil 3.6). Genotip II Ankara keçilerinin serum ürik asit düzeylerinin Genotip I Ankara keçilerinden $p \leq 0,001$ istatistik önem düzeyinde daha düşük olduğu saptandı.



Şekil 3.5. Farklı genotipteki Ankara keçilerinde serum ürik asit düzeyleri (mg/dl)

Sonuçlardan genotiplerin serum seruloplazmin düzeyleri üzerinde etkili olduğu gözlemlendi. Genotip I Ankara keçilerinin seruloplazmin düzeylerinin 9,97 – 30,36 mg/dl arasında değiştiği, ortalama değerin $21,31 \pm 1,53$ olduğu, bu değerin genotip II Ankara keçilerinde 11,02 – 26,80 mg/dl arasında ve ortalama $17,50 \pm 0,99$ mg/dl olduğu gözlemlendi (Tablo 3.1, Şekil 3.7). Seruloplazmin düzeylerinin genotipler arasında istatistiksel olarak $p \leq 0,05$ düzeyinde anlamlı farklılık gösterdiği anlaşıldı.



Şekil 3.6. Farklı genotipteki Ankara keçilerinde serum seruloplazmin düzeyleri (mg/dl)

4. TARTIŞMA

Farklı genotipteki Ankara Keçileri ile gerçekleştirilen karşılaştırmalı ilk çalışma İmeryüz (1959) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada Amerikan Ankara Keçisi tekesinden elde edilen yavrularla aynı doğumlu, aynı şartlarda bulunan yerli teke yavruları doğum ağırlığı, canlı ağırlık, tiftik verimi ve beden ölçüleri yönünden incelenmiştir. Bu ve daha sonra gerçekleştirilen benzeri çalışmaların sonuçları farklı genotipteki Ankara keçilerinde hedeflenen özellikler ve verimlerin genotiplerden etkilendiğini açık bir şekilde göstermektedir. Ancak, genotiplerin kan parametreleri ve antioksidatif metabolizmadaki etkilerini gösteren çalışmalar yok denecek kadar sınırlı kalmıştır. Bu alanda gerçekleştirilen bir çalışmada Çamaş (1986), Ankara keçilerinde bazı verim özellikleri ile GSHPx, glutatyon redüktaz (GR) ve alkali fosfataz (ALP) aktiviteleri arasındaki ilişkileri incelemiştir.

Genotipin antioksidatif metabolizmadaki etkilerinin gösterilmesinin amaçlandığı bu çalışmada yerli (Türk) Ankara keçileri ile Amerikan × Türk Ankara keçilerinde ekstrasellüler antioksidanların düzeyleri ölçülmüştür. Bu yönü ile çalışma, Ankara keçilerinde gerçekleştirilen ilk çalışma olup orijinallik taşımaktadır.

Yüksek miktarda oksijen türevi serbest radikallerin meydana gelmesi biyolojik sistemlerdeki yapı taşları üzerinde olumsuz etki yapmaktadır. Bu maddelerin çoğunluğunun normal hücresel işlevlerin sonucu meydana gelmesine karşın söz konusu maddelerin vücuttaki oranlarının artışı ve antioksidan sistem olarak adlandırılan savunma mekanizmalarının yetersiz oluşu; hücrelerin yapısında, işlevlerinde ve genetik aktivitelerinde önemli hasarlara neden olmaktadır. Olaylar yalnız hücreleri etkilemeyip, aynı zamanda hücre dışı molekülleri de etkisi altına almaktadır (Dennery ve Stevenson, 1995; Benaron ve Bowen, 1991).

Genotipin antioksidatif metabolizmada oluşturduğu değişikliklerin incelenmesi için seçilen ekstrasellüler antioksidanlardan plazma askorbik asit, serum albumin, toplam

bilirubin, glikoz, ürik asit, seruloplazmin düzeyleri ölçülmüştür. Sonuçlardan tiftik veriminin artırılmasına yönelik melezlemeler sonucunda elde edilen Genotip II Ankara keçilerinde, sadece serum ürik asit ve seruloplazmin düzeylerinin bu durumdan etkilendiğini anlaşılmaktadır (Tablo 3.1; Şekil 3.1 – 3.7).

Askorbik asitin hidroksil, süperoksit anyon ve suda çözünen peroksil radikallerinin temizlenmesi, karsinojenik nitrozaminlerin inaktif ürünlere redüklenmesi, singlet oksijenin yakalanması, aktif nötrofillerin sebep olduğu peroksidasyona karşı plazma lipidlerini koruma gibi çeşitli fonksiyonları vardır (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Genotip I Ankara keçileri ve Genotip II Ankara keçilerinin plazma askorbik asit düzeyleri Genotip I Ankara keçilerinde 1.59 mg/dl ve Genotip II Ankara keçilerinde 1.46 mg/dl'dir (Tablo 3.1 ve Şekil 3.2). Farkın istatistik önemi bulunmamaktadır ($p \geq 0,05$).

Albümin bir serum proteindir ve proteinlerin önemli bir bölümünü oluşturur. Bakır iyonunu bağlayarak, bakır iyonuna bağlı lipid peroksidasyonunu ve $HO^{\bullet}$ oluşumunu inhibe eder (Bast ve Ark., 1991). Albumin kanda yağ asitlerini taşır ve safra bilirubinlerini de bağlar (Stocker ve Ark., 1990). Genotip I Ankara keçileri ve Genotip II Ankara keçilerinin serum albumin değerleri keçiler için bildirilen normal değerler arasında (2.7-3.9 g/dl) kalmıştır (Altıntaş ve Fidancı, 1993). Bu değer Genotip I Ankara keçilerinde 2.9 g/dl ve Genotip II Ankara keçilerinde 2.7 g/dl'dir (Tablo 3.1 ve Şekil 3.3). Farkın istatistik önemi bulunmamaktadır ($p \geq 0,05$).

Stocker ve Ark. (1987) yaptıkları bir çalışmada, in vitro olarak bilirubinin lipid peroksidasyonunu konsantrasyona bağımlı olarak önlediğini göstermişlerdir. Mikromolar düzeydeki bilirubin homojen çözeltilerde veya multilameller lipozomlarda deneysel olarak oluşturulan peroksi radikallerini etkin bir şekilde temizleyebilmektedir. Normalde intestinal yolda bilirubin ve biliverdinin oksidatif yıkımı önlediği düşünülmektedir (Stocker ve Yorihiro, 1987). Bilirubin konjuge çift bağdan oluşan ve reaktif hidrojen atomu bulunduran bir yapıya sahiptir. Bu nedenle antioksidan özellikler

gösterdiği varsayılmaktadır (Benaron ve Bowen, 1991). Ancak, farklı genotipteki Ankara keçilerinin serum total bilirubin düzeyleri arasında istatistik anlam taşıyan fark gözlenmemiştir ($p \geq 0,05$). Genotip I Ankara keçilerinde ortalama serum toplam bilirubin düzeyi 0,08 mg/dl ve Genotip II Ankara keçilerinde 0,10 mg/dl olarak ölçülmüştür. Genotip I Ankara keçileri ve Genotip II Ankara keçilerinin serum toplam bilirubin değerleri (Tablo 3.1 ve Şekil 3.4) keçiler için bildirilen normal değerler arasında (0,0-0,1 mg/dl) kalmıştır (Altıntaş ve Fidancı, 1993).

Ancak total bilirubin, konjuge olmayan bilirubin, mono- ve di-şeker bilirubin konjugatları ve delta bilirubin gibi çeşitli fraksiyonlardan oluşmaktadır. Bu fraksiyonlardan hangisinin daha etkin olarak antioksidatif etkili olduğu bilinmemektedir. Wu ve Ark. albumin bağlı ankonjuge bilirubinin kültür hepatositlerini ve sıçan karaciğerini oksiradikal hasarına karşı koruduğunu göstermişlerdir. Bir başka çalışmada ise bilirubinin insan ventrikül miyositlerini ve eritrositleri bilinen antioksidanlardan daha etkili koruduğu saptanmıştır (Wu, 1994).

Farklı genotipteki Ankara keçilerinin serum glikoz değerleri arasında da önemli bir fark gözlenmemiştir. Genotip I Ankara keçilerine ait ortalama 60,33 mg/dl ve Genotip II Ankara keçilerinin 63,60 mg/dl düzeyindeki serum glikoz değerleri (Tablo 3.1 ve Şekil 3.5) keçiler için bildirilen normal değerler arasında (50,0- 75,0 mg/dl) kalmıştır (Altıntaş ve Fidancı, 1993).

Ürik asit antioksidan olarak demir ve bakır iyonlarını bağlayarak etkisizleştirir. Ayrıca, singlet oksijen, hipoklorit, hidroksil, süperoksit ve peroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerini temizleyerek de antioksidan etki gösterir. Ürik asidin lipid radikalleri üzerinde etkisi yoktur. Ayrıca askorbik asidi oksidasyona karşı korumaktadır (Heffner ve Repine, 1989; Halliwell ve Gutteridge, 1990). Genotip I Ankara keçilerinde ortalama serum ürik asit düzeyi 0,10 mg/dl ve Genotip II Ankara keçilerinde ise 0,04 mg/dl olarak ölçülmüştür. Keçiler için bildirilen normal serum ürik asit değerleri 0,3-1,0 mg/dl arasındadır (Altıntaş ve Fidancı, 1993). Amerikan $\times$ Türk Ankara keçilerinin (Genotip

II) serum ürik asit düzeyi normal değerin altında ve Genotip I Ankara keçilerine ait 0,1 mg/dl'nin altında kalmıştır (Tablo 3.1 ve Şekil 3.6). Bu azalma $p \leq 0.001$ düzeyinde istatistik anlam taşımaktadır.

Bir α_2 - glikoprotein olan seruloplazminin görevi yalnızca bakır taşımak değildir. Diğer özellikleri arasından ilki ferroz iyonlara karşı oksidan etkisidir. Fe^{+2} yi Fe^{+3} 'e okside eder. Bu sırada da oksijeni suya çevirir. Ferroksidaz aktivitesi demir iyonuna bağlı lipid peroksidasyonunu ve H_2O_2 ' den $HO^\bullet$ oluşumunu inhibe etmesini sağlar. Fe^{+2} , Fe^{+3} 'e dönüşünce transferrine sıkıca bağlanır ve depolanarak etkinliği önlenir. Transferrin bulunmadığında dahi seruloplazmin kuvvetli bir antioksidan olarak görev yapar (Pacht ve Davis, 1988). Seruloplazminin antioksidan aktivitesi çeşitli deneysel çalışmalarla ispatlanmıştır. Bu alanda yapılan bir çalışmada, serumda seruloplazminin antioksidan aktiviteye α -tokoferolden daha büyük katkı sağladığını gösterilmiştir. Seruloplazminin mikrozomal membranlarda, doku homojenatlarında, saflaştırılmış poliansature yağ asitlerinde ve fosfolipit veziküllerinde lipit oksidasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Ek olarak, proteinler ve DNA'nın hasar görmesini önlediği, serbest radikallerle başlatılan hücre hasarı ve lizisine karşı hücrel koruma sağladığı saptanmıştır (Fox ve Ark.,1995). Genotip I Ankara keçilerine ait ortalama 21,31 mg/dl ve Genotip II Ankara keçilerinin 17,50 mg/dl düzeyindeki (Tablo 3.1 ve Şekil 3.7) serum seruloplazmin değerleri arasındaki fark $p \leq 0.001$ düzeyinde istatistik anlam taşımaktadır.

5. SONUÇ

Bu çalışmada farklı genotipteki Ankara keçilerinde genotipik farklılıkların hayvanlarda antioksidatif metabolizmada değişiklere neden olduğu gözlenmiştir. Amerikan × Türk Ankara keçilerinde antioksidatif metabolizmanın ekstrasellüler antioksidanlarının düzeylerindeki sınırlı değişiklikler, ekstrasellüler antioksidanların sekunder antioksidan karakteri taşıması ile ilgili gözükmeğdir. Sonuçta ekstrasellüler antioksidanlardan ürik asit ve seruloplazmin, genotipik değişikliklerden daha çok etkilenmiş ve bu ekstrasellüler antioksidanların düzeyleri azalmıştır.

Sonuç olarak farklı genotipteki Ankara keçilerinde ilk kez gerçekleştirilen bu çalışmada, genotipik değişikliklerin antioksidatif metabolizmayı etkilediği görülmüştür. Serbest radikaller ve ekstrasellüler antioksidanlar arasındaki dengede, sekunder karakterli antioksidanlardan ürik asit ve seruloplazmin daha aktif davranmıştır.

Genotipin antioksidatif metabolizma üzerindeki etkileri yönünde gerçekleştirilecek diğer çalışmalarda, antioksidatif metabolizma ile ilgili daha fazla parametrenin hayvanların verimleri ile birlikte ele alınarak incelenmesi yerinde olacaktır.

6. ÖZET

Genotipin peroksidatif ve antioksidatif metabolizma üzerindeki etkilerinin gösterilmesinin amaçlandığı bu çalışmada, farklı genotipteki, yerli Ankara keçileri (Genotip I) ile Amerikan × Türk Ankara keçilerinde (Genotip II) lipid peroksidasyonu ve ekstrasellüler antioksidanların aktiviteleri incelenmiştir.

Farklı genotipteki Ankara keçilerinden sağlanan kan örneklerinde serbest radikallerinin etkisinin gösterilmesi için plazma malondialdehit düzeylerinin ölçümüne başvurulmuştur. Antioksidatif metabolizmadaki değişikliklerin incelenmesinde ise ekstrasellüler antioksidanlardan plazma askorbik asit düzeyi ile serum albumin, toplam bilirubin, glikoz, ürik asit ve seruloplazmin düzeyleri ölçülmüştür.

Plazma malondialdehit düzeyleri Ankara keçilerinde $9,98 \pm 2,16 \mu\text{mol/L}$ iken Amerikan × Türk Ankara Keçilerinde $14,34 \pm 0,74 \mu\text{mol/L}$ olarak ölçülmüştür. Fark istatistik olarak $p \leq 0,05$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur.

Farklı genotipteki Ankara keçilerinde plazma askorbik asit, serum albumin, bilirubin ve glikoz düzeyleri arasında istatistik anlam taşıyan farklılıklar gözlenmemiştir ($p \geq 0,05$). Serum ürik asit ve seruloplazmin düzeyleri genotip I Ankara keçilerinde $0,10 \pm 0,00 \text{ mg/dl}$ ve $21,31 \pm 1,53 \text{ mg/dl}$, genotip II Ankara keçilerinde $0,04 \pm 0,01 \text{ mg/dl}$ ve $17,50 \pm 0,99 \text{ mg/dl}$ olarak belirlenmiş olup Amerikan × Türk Ankara keçilerinin (Genotip II) serum ürik asit düzeyi $p \leq 0,001$ ve serum seruloplazmin düzeyi ise $p \leq 0,05$ istatistik önemde azalmıştır.

Sonuç olarak, Ankara keçilerinde genotipik iyileştirmeler peroksidatif metabolizmada değişikliklere neden olmuştur. Amerikan × Türk Ankara keçilerinde peroksidatif metabolizmadaki artışa antioksidatif metabolizmanın ekstrasellüler antioksidanlarının cevabı sınırlı kalmıştır. Bu durum ekstrasellüler antioksidanların sekonder antioksidan karakteri taşımasına bağlanmıştır. Artan lipid peroksidasyonuna cevap sadece ürik asit ve seruloplazmin'den gelmiş ve bu ekstrasellüler antioksidanların düzeyleri azalmıştır.

Anahtar Kelimeler : Ankara keçisi, Genotip, Antioksidatif metabolizma, Ekstrasellüler antioksidanlar

SUMMARY

Extracellular Antioxidant Levels of Angora Goats In Different Genotype

Lipid peroxidation and extracellular antioxidant levels in Turkish angora goats (Genotype I) and American x Turkish crossbred angora goats (Genotype II) were investigated, the purpose was to show the effects of genotype on the peroxidative and antioxidative metabolism.

Plasma MDA levels of angora goats in different genotypes were analysed to show the effects of free radicals. Ascorbic acids in plasma, albumin, total bilirubin, glucose, uric acids and ceruloplasmin in serum as extracellular antioxidant were analysed to investigate the change in antioxidative metabolism.

Plasma MDA levels of Turkish angora goats and American x Turkish crossbred angora goats were measured $9,98 \pm 2,16 \mu\text{mol/L}$ and $14,34 \pm 0,74 \mu\text{mol/L}$, respectively. The difference was statistically significant ($p \leq 0.05$). There were no statistically significant differences between the plasma ascorbic acids, serum albumin, bilirubin and glucose levels of angora goats in different genotype ($p \geq 0.05$). Serum uric acids and ceruloplasmin levels were found $0,10 \pm 0,00 \text{ mg/dl}$ and $21,31 \pm 1,53 \text{ mg/dl}$ in genotype I, $0,04 \pm 0,01 \text{ mg/dl}$ and $17,5 \pm 0,99 \text{ mg/dl}$ in genotype II, respectively. Significantly decrease were found both in serum uric acid ($p \leq 0.001$) and ceruloplasmin ($p \leq 0.05$) levels of angora goats in genotype II.

It was concluded that; the genotypical change in angora goats may affect the peroxidative metabolism. Extracellular antioxidants response were limited to the increasing peroxidative metabolism in American x Turkish crossbred angora goats since extracellular antioxidants are seconder antioxidant. Uric acids and ceruloplasmin have a protective response against the increasing lipid peroxidation since decreased levels were observed in these intracellular antioxidants.

Key words: Angora Goat, Genotype, Antioxidative metabolism, Extracellular Antioxidants.

KAYNAKLAR

- ALTINTAŞ, A., FİDANCI, U.R. (1993): Evcil hayvanlarda ve insanda kanın biyokimyasal normal değerleri. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.* 40(2): 173-186
- ARUOMA, OL., HALLIWELL B. (1989). Inactivation of α_1 -antiproteinase by hydroxyl radicals. *FEBS Lett.*, 244:76-80.
- ATHAR M., ABDULLA M., SULTANA S., FAULER, A., PERO, R. (1993).Free radicals and trace elements. *J Trace El Exp Med .*, 6:67-73.
- BAST, A., HAENEN, GRMM., DOELMAN, CJA. (1991). Oxidants and antioxidants: State of art. *Am J Med.*, 91 (Suppl 3C) : 2S-13S.
- BENARON, DA., BOWEN, F. (1991). Variation of serum bilirubin rise in newborn infants with the type of illness, *The Lancet*, 338: 78-81.
- BISBY, RH., PARKER, AW.(1995). Reactions of ascorbate with the α -tocoperoxy radical in micellar and bilayer membrane system. *Arch Biochem Biophys.*, 317:170-8.
- BOARD, P.G., PETER, WD. (1976). A simple test for glutathione peroxidase and selenium deficiency. *Vet .Rec.*, 99: 144-145.
- BOVERIS, A., OSHINO N., CHANGE B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, 128 : 617-630.
- BURTON, GW., INGOLD, KU. (1984) β -Carotene: An unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224: 569-73.
- BURTON, GW., INGOLD, KU. (1989).Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant *Ann NY Acad Sci.*, 570: 7-23.
- CHANGE , B., SIES, H., BOVERIS, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol. Rew.*, 59: 527-540.
- CRAPO, DJ., TIERNEY, F.D. (1974). Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity . *Am.J.Physiol.*, 226:1401-1407.
- ÇAMAŞ, H. (1986). Ankara Keçilerinin Kanlarında Glutatyonperoksidaz ve Kan Serumlarında Glutatyon redüktaz , Alkali fosfataz Aktiviteleri ile Keçilerin Bazı Verim Özellikleri Arasındaki İlişkiler Üzerine Araştırmalar . *Doğa Bilim Dergisi* , 10: 38-42.
- DAS, DK., MAULIK, N. (1994). Antioxidant effectiveness in ischemia-reperfusion tissue injury. *Methods Enzymol*, 233: 601-10.
- DENNERY, P., STEVENSON, DK. (1995). Management of neonatal hemolytic hyperbilirubinemia , *Diseases of The Fetus and Newborn*, 2nd Ed, Reed GB, Chapman and Hall , London,;100:1453-1460.

- DIPLOCK, A. (1991) Antioxidant nutrients and disease prevention : an overview. *Am.J.Clin.Nutr.*, **53**: 189S-93S.
- DÜZGÜNEŞ, O., KESİCİ, T., GÜRBÜZ, F. (1983): İstatistik Metodları. A.Ü. Ziraat Fakültesi Ders Kitabı, 229, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
- ERENEL, G., ERBAL, D., ARICIOĞLU, A. (1993). Free radicals and antioxidant systems. *Mater. Med.Pol.*, **25**:(1),37.
- FANTONE , J.C. (1982). Role of oxygen- derived free radicals and metabolites in leukocytedependent inflammatory reactions. *Am.J.Pathol.*, **107**: 397-418.
- FOX, PL., MUKHOPADHYAY, C., EHRENWALD, E. (1995). Structure,oxidant activity and cardiovascular mechanism of human ceruloplasmin. *Life Sci.*, **56**: 1749-58.
- FREEMAN, BA., CRAPO, JD . (1982). Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, **47**:412-27.
- FREI, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanism of action. *Am J Med.*, **97**(Suppl 3A):5S-12S.
- GUTTERIDGE, JMC.(1995).Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* ., **41**:1819-28.
- GUTTERIDGE, JMC., WILKINS, S. (1983) Copper salts dependent hydroxyl radical formation damage to proteins acting as antioxidants. *Biochim Biophys Acta.*, **759**:38-41.
- HALLIWELL , B.(1984) .Oxygen poisonous: the nature and medical importance of oxygen radicals. *Med Lab Sci.*, **41** :157-171.
- HALLIWELL, B. (1987). Oxygen radicals and human disease *Ann.Int.Med.***107**:526-545.
- HALLIWELL, B. (1988) .Albumin - an important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol* ; **37**: 569-71.
- HALLIWELL, B. (1991) Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* ,**91** (Suppl 3C) 142S-23S
- HALLIWELL, B. (1993). The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* ;**23** (Suppl 1): 118-26.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, JMC. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet.*, **ii**:1396-7.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, JMC.(1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*, **280**: 1-8.
- HEFFNER, J.E., REPINE, J.E. (1989). Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am.rev.Respir.Dis.*, **140**: 531-554.

- HU, M.-L., LOUIE, S., CROSS, CE., MOTCHNIK, P., HALLIWELL, B. (1993). Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *J Lab Clin Med* ; 121: 257-62.
- İMERYÜZ, F. (1959). Amerikadan gelen 6/53 tek adlı Ankara keçisi tekesinin 1,5 ve 2,5 yaşındaki yavrularıyla aynı yaşta olan Ankara keçilerimizin beden ölçüleri , tiftik verimi , doğum ve canlı ağırlıkları üzerinde mukayeseli araştırma . *Lalahan Zoo. Araş.Ens.Derg.*, 1:1.
- İMREN, A.H., TURAN, O. (1985): Klinik Tanıda Laboratuvar. Beta Basın Yayın Dağıtım, İstanbul.
- JONES, DP., EKLOW, L., THOR, H., ORRENIUS, S. (1981). Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H_2O_2 . *Arch. Biochem. Biophys.*, 210:505.
- KAGAN, VE., SERBINOVA, EA., STOYANOVSKY, DA., KHWAJA, S., PACKER, L. (1994). Assay of ubiquinones and ubiquinols as antioxidants. *Methods Enzymol*, 224: 343-54.
- KARAGÜL, H., ALTINTAŞ, A., FİDANCI, U.R., SEL, T. (1999): Temel Biyokimya Uygulamaları. Medisan Yayınevi, Medisan Yayın Serisi 38, Ankara
- KARGIN , F., FİDANCI , U.R. (1997) Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif hasar. *Türk Veteriner Hekimliği Dergisi*, 9(2) :26-28.
- KELLOG, E.W., FRIDOVICH, I. (1977) Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymatically generated superoxide and hydrogen peroxide . *J. Biol. Chem.*, 252: 6721-6725.
- KIRKALI, G., YALÇIN, S. (1998). Oksidatif Stresin Ölçülmesi ve Standardizasyonu. İçinde : Türk Biyokimya Derneği (1998): Klinik Laboratuvarlarda Standardizasyon ve Kalite Güvencesi Toplantı Kitabı s.305-312.
- KITTRIDGE, KJ., WILLSON, RL. (1984). Uric acid substantially enhances the free radical induced inactivation of alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett.*, 170: 162-4.
- KLEBANOFF, JS. (1980). Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann. Int. Med.*, 93:480-489.
- KWAY, A. (1978). A simple colorimetric method for ascorbic acid determination in blood plasma. *Clin. Chim. Acta*, 86: 153-157.
- MAPLES, KR., MASON, RP. (1988) Free radical metabolite of uric acid. *J Biol Chem.*, 263: 1709-12.
- MARKLUND, S. (1984). Extracellular superoxide dismutase in human tissue and human cell lines. *J Clin Invest* ; 74: 1398-403.
- MARX , JL. (1987). Oxygen free radicals linked to many diseases. *Science*, 235: 529-31.

- MCCORD, J.M., FRIDOVICH, I.(1978). The biology and pathology of oxygen radicals. *Ann. Int. Med.*, **89**:122-127.
- MILES, AM., GRISHAM, MB. (1994) Antioxidant properties of aminosalicylates *Methods Enzymol* , **234**: 554-72.
- NIKI, E. (1987). Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, **44**: 227-253.
- PACTH , E.R., DAVIS , W.B. (1988). Role of transferrin and ceruloplasmin in antioxidant activity of lung epithelial lining fluid. *The Am Phys Soci* , **23**: 2092-2099.
- PARCKER, JE., SLATER, TF., WILLSON, RL.(1979).Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* ;**278**: 73-4.
- PERCY , M.E.(1984)Catalase : an old enzyme with a new role? *Can.J.Biochem, Cell.Biol.*,**62**:1006-1014.
- PROCTOR, P.(1970). Similar functions of uric acid and ascorbate in man? *Nature*, **228**: 868.
- ROBBIN, S.(1994). Pathologic Basis of Disease, *Frederick J,5 th Edition Philadelphia, Chapter 1*: 11-14.
- ROWLEY, DA., HALLIWELL, B. (1983). Superoxide dependent and ascorbate dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of copper salts: A physiologically significant reaction? *Arch Biochem Biophys.*, **225** 279-84.
- SALONEN, JT., SALONEN, R., KORPELA, H., SUNTIONEN, S., TUOMILEHTO, J. (1991). Serum copper and the risk of acute myocardial infarction: A prospective population study in men in Eastern Finland. *Am J Epidemiol*, **134**: 268-76.
- SEVANIAN, A., HOCHSTEIN, P. (1985). Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann Rev Nutr.*, **5**: 365-90.
- SHARMA, MK., BUETTNER, GR. (1993). Interaction of Vitamin C and vitamin E during free radical stress in plasma: An ESR study. *Free Rad Biol Med.*,**14**: 649-53.
- SIES, H., STAHL, W., SUNDGUIST, AR. (1992). Antioxidant functions of vitamins. Vitamin E and C, beta carotene and other carotenoids. *Ann NY Acad Sci.*, **669**: 7-21.
- STOCKER, R.,YORIHIO, Y. (1987). Billirubin is an antioxidant of possible physiological importance, *Science Reports*, **235**: 1044-1046.
- SOUTHORN, PA., POWIS, G. (1988). Free radicals in medicine. Chemical nature and biological reaction. *Mayo Clin Proc*, **63** : 381-389.
- SORIANI, M., PIETRAFORTE, D., MINETTI, M. (1994). Antioxidant poential of anaerobic human plasma:Role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. *Arch Biochem Biophys* ; **312**: 180-8.

- STOCKER ,R., MC DONAGH AF., GLAZER, AN., AMES, BN. (1990) Antioxidant activities of bile pigments: Biliverdin and bilirubin. *Methods Enzymol* ; **186**: 301-9.
- STOCKER, R., YAMAMOTO, Y., MC DONAGH, AF., GLAZER, AN., AMES, BN. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, **235**: 1043-46.
- SWAIN, JA., USMAR, VD., GUTTERIDGE, JMC. (1994). Peroxynitrite releases copper from ceruloplasmin: Implications for atherosclerosis. *FEBS Lett.*, **342**: 49-52.
- TİFTİK, A.M. (1996): Klinik Biyokimya. Mimoza Yayınları, Konya.
- WARNER, B., WISPE, J.R. (1992). Free radical – mediated diseases in Pediatrics, *Seminars in Perinatology* , **16**:(1) :47-57.
- WU, TW.(1994). Is serum bilirubin a risk factor for coronary artery disease? *Clin Chem.*, **40**: 9-10.





EKLER

Ek Tablo 2. Farklı genotipteki Ankara Keçilerinde plazma askorbik asit, serum albumin, total bilirubin, glikoz, ürik asit ve seruloplazmin düzeyleri

No	Askorbik Asit mg/dl		Albumin g/dl		Total Bilirubin mg/dl		Glikoz mg/dl		Ürik Asit mg/dl		Seruloplazmin mg/dl	
	Genotip I	Genotip II	Genotip I	Genotip II	Genotip I	Genotip II	Genotip I	Genotip II	Genotip I	Genotip II	Genotip I	Genotip II
1	2,04	1,78	2,70	2,70	0,10	0,10	78,00	69,00	0,10	0,00	27,03	11,02
2	1,95	2,71	3,10	2,90	0,10	0,20	57,00	63,00	0,10	0,00	22,13	15,75
3	2,00	0,80	2,90	2,70	0,10	0,10	53,00	51,00	0,10	0,00	24,23	19,77
4	2,26	1,66	2,90	2,90	0,10	0,10	51,00	65,00	0,10	0,00	9,97	19,25
5	2,26	1,07	2,90	2,60	0,10	0,10	64,00	58,00	0,10	0,00	17,53	15,31
6	0,52	0,23	2,90	3,10	0,10	0,10	55,00	61,00	0,10	0,10	24,15	16,36
7	0,50	2,19	2,80	2,90	0,10	0,00	73,00	80,00	0,10	0,10	14,70	18,72
8	0,54	0,88	3,00	2,70	0,10	0,10	68,00	50,00	0,10	0,00	27,21	14,35
9	1,23	1,52	2,80	2,50	0,10	0,00	44,00	55,00	0,10	0,10	16,62	18,63
10	3,54	0,92	3,00	2,70	0,10	0,10	59,00	80,00	0,10	0,00	30,36	12,60
11	0,85	2,19	3,20	2,50	0,00	0,10	56,00	57,00	0,00	0,00	23,18	26,80
12	1,80	1,35	2,70	2,80	0,10	0,10	67,00	59,00	0,10	0,00	16,62	18,80
13	1,23	2,33	2,80	2,70	0,10	0,20	57,00	67,00	0,10	0,10	17,06	22,20
14	1,59	1,90	3,00	2,90	0,00	0,10	66,00	68,00	0,00	0,10	29,66	16,01
15	1,64	0,50	2,80	2,80	0,10	0,10	57,00	71,00	0,10	0,10	19,25	16,97