

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DEMİR MADENİ ÇALIŞANLARINDA DEMİR, FERRİTİN
VE MALONDİALDEHİD DÜZEYLERİ İLE LİPİD PARAMETRELERİ
ARASINDAKİ İLİŞKİ VE ATEROSKLEROZ GELİŞME RISKİ

UZMANLIK TEZİ
DR. FERAH ARMUTÇU

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ : PROF. DR. AHMET AKER

90147

SİVAS - 1998

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOĞRULAMA MERKEZİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İşbu çalışma jürimiz tarafından BİYOKİMYA Anabilim Dalında TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN.....

ÜYE.....

ÜYE.....

ÜYE.....

ÜYE.....

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretimüyelerine ait olduğunu onaylım.

...../...../1998

Prof. Dr. Yener Gültekin
DEKAN



Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 05. 01. 1984 tarih ve 84/1 No'lu kararıyla kabul edilen tez yazma yönergesine göre hazırlanmıştır.



TEŐEKKÜR

Bu çalıőmanın gerçekleőtirilmesinde baőtta Biyokimya Anabilim Dalı Baőtkanı Sayın hocam Prof. Dr. Atilla ATALAY olmak üzere, tez danıőtman hocam Prof. Dr. Ahmet AKER'e ve anabilim dalımızda görevli, diğer öğretim üyesi hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma teőtekkürlerimi sunarım. Yine alıőtmaya katkı ve desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. M. Zahir BAKICI ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesinden Yrd. Doç. Dr. İsmail TEMEL ile Div-Han Demir Madeni İőtletmeleri A.Ő. yönetim kurulu ve kurum doktoru Mustafa ÇELİK'e de teőtekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1.	GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.	GENEL BİLGİLER	3
2.1.	Serbest Radikaller	3
2.1.1.	Süperoksit Radikali	5
2.1.2.	Hidrojen Peroksit	6
2.1.3.	Hidroksil Radikali	7
2.1.4.	Singlet Oksijen	8
2.2.	Serbest Radikallerin Kaynakları	8
2.2.1.	Dış Etkenler (Eksojen kaynaklar)	8
2.2.2.	İç Etkenler (Endojen kaynaklar)	9
2.3.	Antioksidan Savunma Sistemi	10
2.3.1.	Endojen Antioksidanlar	11
2.3.2.	Eksojen Antioksidanlar	13
2.4.	Lipid Peroksidasyonu ve Etkileri	14
2.4.1.	Lipid Peroksidasyonunda Demirin Önemi	17
2.4.2.	Lipid Peroksidasyon Ürünlerinin Ölçümü	18
2.5.	Demir Kompartmanları ve Metabolizması	20
2.5.1.	Demir Kompartmanları	20
2.5.2.	Emilim, Taşınma ve Atılım	22
2.5.3.	Demir Fazlalığı (Overload)	23
2.5.4.	Serum Demir Tayini	24
2.6.	Plazma Lipid ve Lipoproteinleri	26
2.6.1.	Plazma Lipoproteinleri	27
2.6.2.	Apolipoproteinler	30
2.7.	Lipid Peroksidasyonu ve Ateroskleroz	31
3.	YÖNTEM ve GEREÇLER	36
3.1.	Örneklerin Toplanması ve Çalışma İçin Hazırlanması	36
3.2.	Gereçler	36
3.3.	Gerekli Kimyasal Madde ve Çözeltiler	37
3.4.	Deneylerin Yapılması	37
3.5.	Malondialdehid Deneyi	37
3.6.	İstatistiksel Değerlendirme	40
4.	BULGULAR	41
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	46
6.	ÖZET	60
7.	KAYNAKLAR	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1	: Oksijen Atomunun Orbital Yapısı	3
Şekil 2	: Oksijen Molekülünden Türeyen Oksidan Moleküller	3
Şekil 3	: Moleküler Oksijenin Tek Değerli Ardışık İndirgenmesi	4
Şekil 4	: Enzimatik Antioksidan Mekanizmalar	11
Şekil 5	: Lipid Peroksidasyonunun Şematik Oluşumu	16
Şekil 6	: İnsanda Demir Metabolizmasının Temel Yolları	23
Şekil 7	: Bir Lipoprotein Molekülünün Yapısı	29
Şekil 8	: LDL Oksidasyonu ile Ateroskleroz Gelişiminin Şematik Modeli	33
Şekil 9	: Malondialdehidin Tiobarbitürik Asit ile Reaksiyonu	38
Şekil 10	: Demir ve Ferritin Düzeyleri Ortalamalarının Grafik Şekli	42
Şekil 11	: Deneysel Gruplarına ait MDA Düzeyleri Ortalamalarının Grafik Şekli	42
Şekil 12	: Grupların Lipid Parametreleri Ortalamalarının Grafik Şekli	42

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1	: Başlıca Reaktif Oksijen Türleri	4
Tablo 2	: Enzimatik Reaksiyonlar ile Oksijen Radikali Oluşumuna Örnekler	9
Tablo 3	: Nonenzimatik Reaksiyonlarla Oluşan Reaktif Oksidan Metabolitler	9
Tablo 4	: Serbest Oksijen Radikalleriyle İlgisi Olduğu İleri Sürülen Klinik Durumlar	13
Tablo 5	: Geçiş Metallerinin Lipid Peroksidasyonundaki Etkileri	18
Tablo 6	: Normal İnsanda Demir Kompartmanları	20
Tablo 7	: Reaktif Ürünleri Daha Reaktif Türlerle Çevirmede Metal İyonlarının Rolü	24
Tablo 8	: Biyolojik Demir Kompleksleri ve Onların Oksidatif Radikal Reaksiyonlarında Olası Katkısı	25
Tablo 9	: Ateroskleroz Gelişimi İçin Risk Faktörleri	26
Tablo 10	: İnsan Serum Lipoproteinlerinin Özellikleri ve Bileşiminin Sınıflandırılması	28
Tablo 11	: Oksidatif Olarak (in vitro) Değişikliğe Uğramış LDL' yi Doğal LDL' den Ayıran Özellikler	34
Tablo 12	: Plazma Malondialdehid Deneyi Çalışma Şeması	39
Tablo 13	: Gruplara ait Demir, TDBK, Ferritin ve MDA Düzeyleri	41
Tablo 14	: Gruplara ait Lipid ve Lipoprotein Düzeyleri Ortalamaları	41
Tablo 15	: Bulguların Kruskal-Wallis Varyans Analiziyle Değerlendirilmesi	43

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Biyolojik sistemler moleküler oksijenin normal metabolizma basamaklarında indirgenmesi ile açığa çıkan serbest radikallerin yanısıra, dış etkilerden kaynaklanan serbest radikallere de maruz kalmaktadır.

Hava kirliliği, pestisitler, asbest tozu, sigara, çeşitli karsinojenler ve iyonize radyasyon gibi, çevresel kimyasal etkilerle karşı karşıya kalma sonucu hücrelerde radikallerin çoğaldığı; hipoksi, inflamasyon, ısı, yoğun egzersiz, iskemi, travma ve intoksikasyon gibi durumların radikal oluşumunu etkileyen faktörler olduğu ileri sürülmektedir(1).

Geçiş metallere özellikle demir ve bakır fizyolojik şartlarda çeşitli oksidasyon basamaklarında bulunurlar. Gerçekten demir, Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları yoluyla süperoksit ve hidrojen peroksidin, toksik serbest hidroksil radikallerine dönüşümünü hızlandırarak zararlı oksijen ürünlerinin oluşumunda merkezi bir rol oynar. Lipid peroksidasyonu ve malondialdehid gibi oldukça sitotoksik aldehydlerin ayrışma sürecinde de metal iyonları önemli rol oynamaktadır(2,3).

Süperoksit bağımlı lipid peroksidasyonunun ilerlemesi için ferritinin de bir demir kaynağı olarak fonksiyonu olabileceğinden, in vitro asidik ortamda, ferritinin yanısıra hemosiderinin de bir indirgene gerek olmaksızın lipid peroksidasyonunu stimüle edebileceğinden sözedilmektedir(4,5).

Oksijen türevi serbest radikallerin diabet, kanser, yaşlanma ve reperfüzyon hasarı gibi pek çok patolojik süreçte önemli rolü olduğu artık bilinmektedir (6). Diyetle fazla demir yüklenmiş ratların düşük hepatik antioksidan depo konsantrasyonlarına, lipid peroksidasyonu markerlerinde artış ve hepatik inflamasyonun histolojik kanıtlarına sahip oldukları gösterilmiştir (7).Yapılan çalışmalar hemokromatozlu hastalarda lipid peroksidasyonunun lizozomal fonksiyon bozukluğuna yol açtığını göstermiştir. Deneysel demir fazlalığı oluşturulan bir çalışma lizozomlar, mitokondri ve mikrozoimler gibi karaciğer hücre organellerindeki anormalliklerin lipid peroksidasyonu ile ilişkisini ortaya çıkarmıştır(8).

Son on yılda ateroskleroz patogenezi üzerine yapılan çalışmalar düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidatif modifikasyonunun, aterosklerotik plak oluşumunda çok önemli bir rol oynadığı düşüncesine yol açmıştır. Ateroskleroz gelişiminde lipid peroksidasyonunun önemli ve etken bir rol oynadığına dair kanıtlar gittikçe artmakta, deneysel hayvan çalışmaları ve epidemiyolojik araştırmalardan elde edilen verilerle desteklenmektedir(9). Steinberg'e göre, okside olmuş LDL, doğal LDL'den daha aterojenik olup LDL'nin yükselmiş plazma konsantrasyonları hızlanmış ateroskleroz ile doğrudan ilişkilidir(10).

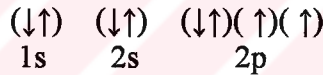
Çalışmadaki amacımız Sivas-Divriği Demir Madeni İşletmesinde uzun süre çalışan işçi ve memurların demir tozlarına maruz kaldıkları düşüncesinden yola çıkarak; maden işçileri ve memurlarda serum demir, total demir bağlama kapasitesi ve ferritin ile lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden olan malondialdehid düzeyleri ve lipid parametreleri arasındaki olası ilişkiyi, işletme ile ilgisi olmayan sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırarak, maden işletmesi çalışanlarının ateroskleroz gelişme riski taşıyıp taşımadıklarını araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Serbest Radikaller:

Serbest radikal, yapısında bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron bulunan, kısa ömürlü reaktif atom veya moleküllerdir. Atom yapısı, bir çekirdek ve çevresinde bulunan değişik sayıda elektronlardan oluşmaktadır. Enerji düzeylerine göre belirli bir düzende yerleşen elektronlar, orbital adı verilen yörüngelerde hareket etmektedirler. Her orbitalde yerleşik iki elektron birbirine zıt yönde ($\downarrow\uparrow$) kendi ekseni etrafında dönmektedir(11).

Oksijen molekülündeki 2 p son orbitali aynı yönde dönen iki elektrona sahiptir. Bu yüzden oksijen atomu diradikal şeklinde ifade edilmektedir. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron bir orbitalden diğerine geçtiğinde veya farklı yönde döndüğünde Singlet oksijen oluşmaktadır. Orbitallerden her birine veya ikisine birden ters dönüşlü bir veya iki elektron yerleşmesiyle radikal oluşmakta olup, doğal oksijen molekülünden değişik sayıda oksidan molekül meydana gelmektedir(12),(Şekil 1,2).



Şekil 1: Oksijen atomunun orbital yapısı (12).

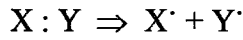
2p	()	()	()	()	()
2p	(↑)(↑)	(↓↑)()	(↓↑)(↑)	(↓↑)(↓↑)	(↑)(↓)
2p	(↓↑)(↓↑)	(↓↑)(↓↑)	(↓↑)(↓↑)	(↓↑)(↓↑)	(↓↑)(↓↑)
2p	(↓↑)	(↓↑)	(↓↑)	(↓↑)	(↓↑)
2s	(↓↑)	(↓↑)	(↓↑)	(↓↑)	(↓↑)
2s	(↓↑)	(↓↑)	(↓↑)	(↓↑)	(↓↑)
1s	(↓↑)	(↓↑)	(↓↑)	(↓↑)	(↓↑)
1s	(↓↑)	(↓↑)	(↓↑)	(↓↑)	(↓↑)
Oksijen molekülü	Singlet oksijen	Süperoksit	Peroksit iyonu	Singlet oksijen	
(³ Σg ⁻ O ₂)	(¹ ΔgO ₂)	(O ₂ ⁻)	(O ₂ ⁻)	(¹ Σg ⁺ O ₂)	

Şekil 2: Oksijen molekülünden türeyen oksidan moleküller (13).

Moleküler oksijenin canlılardaki toksik etkilerinin gerçek nedeni oksijenin aktif türevi olan oksidan radikallerdir.

Serbest radikaller başlıca üç şekilde oluşabilmektedir:

1- Bir molekülü oluşturan kovalent bağın homolitik kopması sonucu, eşlenmiş elektronlardan herbirinin ayrı parçada kalması ile meydana gelebilmektedir.

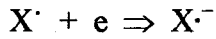


(Eşlenmemiş elektron genellikle üst kısma yazılan bir nokta ile gösterilmektedir.)

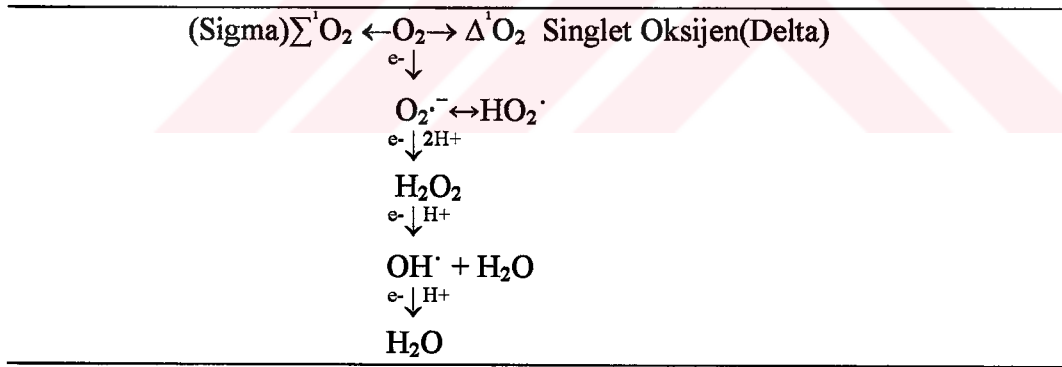
2- Bir molekülün elektron kaybetmesi sonucu oluşabilmektedir.



3- Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile elde edilebilmektedir.



Serbest radikal reaksiyonlarında oksijenin moleküler formu başta olmak üzere; süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve geçiş metal iyonları anahtar konumunda rol oynamaktadır. Oksijenin eşleşmemiş iki elektron taşıma özelliği diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. Oksijenin tam olarak indirgenmesiyle su açığa çıkarken, bu sürecin ara basamaklarında kısmi indirgenmesi sonucunda da reaktif oksijen ürünleri oluşmaktadır(13),(Tablo 1, Şekil 3).



Şekil 3: Moleküler oksijenin tek değerli ardışık indirgenmesi (12).

Tablo 1: Başlıca reaktif oksijen türleri (11,14).

$O_2 \cdot^-$	Süperoksit anyonu	$LOO \cdot$	Peroksi radikali
$HO_2 \cdot$	Hidroperoksil radikali	$LO \cdot$	Alkoksi radikali
H_2O_2	Hidrojen peroksit	1O_2	Singlet oksijen
$OH \cdot$	Hidroksil radikali	$HQ \cdot$	Semikinon radikal

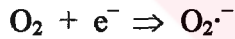
Tablo 1'deki radikallerin yanısıra hemoproteinlere bağlı olarak serbest radikal oluşabilir. Ayrıca hidrojen peroksit (H_2O_2), lipid hidroperoksit ($LOOH$),

hipohalöz asit (HOX), N-halojenli aminler (R-NH-X), ozon (O₃) ve azot dioksit (NO₂) gibi moleküller, bir başka moleküle elektron vererek radikal şekline dönüşebilmektedir(11).

2.1.1. Süperoksit Radikali:

Süperoksit radikali hem çevresel etkenler, hem de organizmadaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle, en çok ve en kolay oluşan oksijen radikalidir. Aerobik canlıların hemen tümünde oksijenin taşınması sırasında hemoglobinden, solunum zincirinde NADPH 'a bağlı dehidrogenazdan ve mitokondrial elektron transport zincirinde, elektron sızması sonucunda oluşmaktadır(2,15).

Canlıda diğer radikallerin oluşumu genellikle süperoksit radikallerinin birikmesine bağlıdır. Oksijen atomunun bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikal anyonu (O₂^{·-}) meydana gelir(12,15).



Süperoksit radikalleri oluştukları anda uzaklaştırılmazlarsa, diğer radikallerin oluşması kaçınılmazdır. İki süperoksidin birleşmesi sonucu gerçekleşen reaksiyonda H₂O₂ ve O₂ meydana gelir.

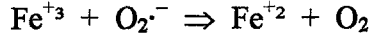


Süperoksit radikallerinin ortamdaki temizlendiği bu tepkimeye dismutasyon tepkimesi adı verilir. Oksijen toksisitesine karşı savunma oluşturan bu enzimatik basamak süperoksit dismutaz tarafından katalizlenir(15).

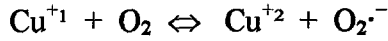
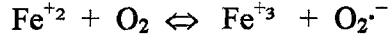
Düşük pH değerlerinde daha reaktif olan süperoksit, oksidan hidroperoksil radikali (HO₂[·]) oluşturmak üzere protonlanır. Süperoksit ile hidroperoksil reaksiyona girince biri okside olurken diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda da oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir(12).



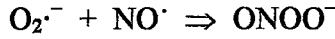
Süperoksit, biyolojik ortamda önemli indirgeyici reaksiyonları indükleyebilir. Örneğin; Sülfidril gruplarının disüflitlere oksidasyonuna, ve ferritin gibi metaloproteinlerdeki, ferrik demirin ferröz demir formuna oksitlenmesine neden olabilir(13,15).



İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu da süperoksit meydana getirebilir, ancak bu reaksiyonlar geri dönüşümlüdürler.



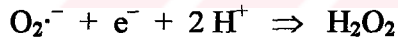
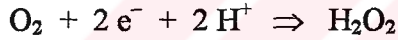
Süperoksidin, fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO \cdot) ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir. Bu da nitrik oksidin normal etkisinin inhibisyonu ile sonuçlanır.



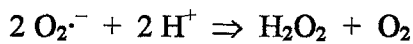
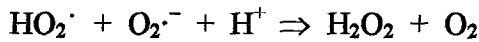
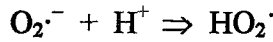
Proteinlere doğrudan zararlı etkileri de olan peroksinitritler, azot dioksit (NO $_2\cdot$) radikali, OH \cdot radikali ve nitronyum iyonu (NO $_2^+$) gibi daha başka toksik ürünlere dönüşürler(12).

2.1.2. Hidrojen Peroksit:

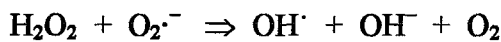
Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron, veya süperoksidin bir elektron alması sonucu hidrojen peroksit oluşur.



Membranlardan kolayca geçebilen H $_2$ O $_2$ ' in biyolojik sistemlerde asıl kaynağı süperoksidin dismutasyonudur. Spontan olarak da meydana gelebilen reaksiyonda önce süperoksit bir proton ile kombine olarak hidroperoksil radikaline dönüşür. Daha sonra iki süperoksit anyonu tepkimeye girerek süperoksit dismutaz enziminin katalizlediği reaksiyonda hidrojen peroksidi meydana getirir(12,14).

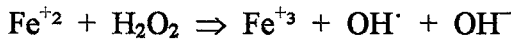
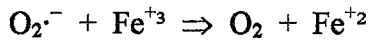


Aslında kendisi serbest radikal olmayan hidrojen peroksidin önemi, süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve toksik etkili serbest oksijen radikali oluşumuna yol açması nedeniyledir.



Haber-Weiss reaksiyonu adı verilen bu reaksiyon katalizör varlığında ya da katalizörsüz meydana gelebilir. Katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerlerken demirle katalizlenen reaksiyon çok hızlıdır(12,15).

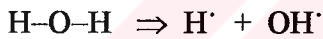
Bu reaksiyonda önce ferri demir süperoksit tarafından ferro demire indirgenir. Daha sonra, bu ferro demir kullanılarak Fenton reaksiyonu ile hidrojen peroksitten hidroksil radikali ve hidroksil anyonu oluşturulur(11,13).



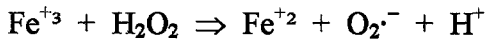
Görüldüğü gibi süperoksit, hem hidrojen peroksit hem de geçiş metalleri (demir ve bakır) indirgeyicisidir. Bu reaksiyonlar iyonize edici radyasyona maruz kalma gibi durumlarda vücut sıvılarında sıkça oluşabilmektedir(13).

2.1.3. Hidroksil Radikali:

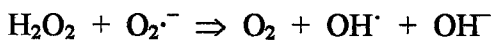
Hidrojen peroksidin geçiş metalleri varlığında indirgenmesiyle meydana geldiği gibi, suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyonla teması sonucunda da oluşabilmektedir.



Hidrojen peroksit her nerede ferroz demir veya kuprik bakır iyonlarıyla karşılaşır (eser miktarlarda bile olsa) hidroksil radikali oluşumuna neden olmaktadır(12,14)



Çoğu ferrik (Fe^{+3}) kompleksler H_2O_2 ile ferröz (Fe^{+2}) demir tuzlarına göre daha yavaş reaksiyona girer. Bu nedenle $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'e daha duyarlı olan ferröz demir aktif demir formu olarak tanımlanabilir(16,17).



(Burada herhangi bir demir tuzu katalizör olarak rol alabilir.) Bir demir tuzu ve hidrojen peroksidin basit bir karışımı bütün radikal reaksiyonları serisini stimüle edebilir(7).

Hidroksil radikali oksijen radikalleri içinde en reaktif, bu nedenle de en toksik etkili olan radikaldir. Yarılanma süresi çok kısa olup, üretildiği her yerde

pek çok molekülle tepkimeye girerek radikal tepkimelerini başlatmakta ve hücre- sel hasara neden olabilmektedir(15).

2.1.4. Singlet Oksijen:

Ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan ancak reaktif yapısı nedeniyle dikkat çeken bir diğer oksijen türevidir. Oksijenin paylaşılmamış dış elektronları enerji absorpsiyonu ile spinlerini değiştirebilir. Singlet oksijenin delta formunda (Δ^1O_2) iki elektron aynı orbitalde bulunup, spinleri birbirine zıttır. Sigma formunda (Σ^1O_2) ise, iki elektron ayrı ayrı orbitallerdedir ve spinleri yine birbirine zıttır. Her iki form aldığı enerjiyi ışık enerjisi halinde vererek eski durumlarına dönebilirler(13).

Singlet oksijen radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi, radikal reaksiyonlarının başlamasına da neden olur. OH[•] Radikalinin doymamış yağ asitlerinden H⁺ kopararak başlattığı tepkimelerin aksine, singlet oksijen doymamış yağ asitleri ile tepkimeye girerek hidroperoksitlerin oluşumuna neden olur(15).

2.2. Serbest Radikallerin Kaynakları:

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller ya dış etkenlerin etkisiyle ya da normal metabolizma sırasında üretilmektedir(12,16).

2.2.1. Dış etkenler (Eksojen kaynaklar):

A- Radyasyon: İnsan hem doğal (radon ve kozmik radyasyon) hem de kendi kaynaklarından elektromagnetik radyasyona maruz kalmaktadır. Gama ışınları gibi düşük dalga boylu elektromagnetik radyasyon, organizmada suyu moleküllerine ayırarak OH[•] radikali oluşturabilir(1).

B- Ksenobiyotikler: Bu grupta bir çok madde bulunur. Bunlar vücutta toksik ya da karsinojenik olan reaktif radikallere dönüşürler. Başta hava kirliliği olmak üzere, pestisitler, CCl₄ gibi halojenli hidrokarbonlar, sitostatikler, parakuat gibi toksik kimyasallar, sigara, asbest ve çeşitli karsinojenlerle karşı karşıya kalma sonucunda hücrelerde radikallerin çoğaldığı ileri sürülmektedir(12,15).

Sigara dumanı, akciğerlere alınan başlıca yanmış organik materyal olup; kimyasal ve organik maddelerin yanması ile açığa çıkan özel maddelerin, radikallerin olası kaynakları veya taşıyıcıları olduğu ileri sürülmüştür. Sigara dumanı gaz

fazının in vitro, çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) otooksidasyonunu başlattığı, sigara dumanındaki azot dioksidin preformu olan nitrik oksidin, hemoglobindeki hem demiri ile kolayca reaksiyona girdiği gösterilmiştir(1).

C- Antineoplastik ajanlar: Bleomisin, doksorubisin, adriyamisin.

D- Antibiyotikler.

E- Alışkanlık yapan maddeler: Alkol ve uyuşturucular.

2.2.2. İç etkenler (Endojen kaynaklar):

A-Normal metabolizmanın işleyişi sırasında serbest radikaller oluşabildiği gibi, oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında sürekli olarak serbest radikal üretilir. Bir takım enzim sistemleri moleküler oksijenin süperoksite tek değerli indirgenmesini katalizler(Tablo 2).

Tablo 2:Enzimatik reaksiyonlar ile oksijen radikali oluşumuna örnekler (11).

Hipoksantin + O ₂ → Ksantin + O ₂ ^{·-} + H ₂ O ₂ (Enzimi:Ksantin Oksidaz)
2 NAD [·] + 2 O ₂ → 2 NAD ⁺ + O ₂ ^{·-} (" NADH Oksidaz)
NADPH + 2 O ₂ → NADP ⁺ + 2 O ₂ ^{·-} (" NADPH Oksidaz)
R-CH ₂ -NH ₂ + H ₂ O ₂ → R-CHO + NH ₃ + H ₂ O ₂ (" Amin Oksidaz)
R-CHO + O ₂ → RCOOH + O ₂ ^{·-} (" Aldehid Oksidaz)
H ₂ O ₂ + X + H ⁺ → HOX + H ₂ O (" Peroksidazlar)
R-CH ₂ OH + O ₂ → R-CHO + H ₂ O ₂ (" Galaktoz Oksidaz)

B- Enzimatik olmayan reaksiyonlar sonucu gerçekleşen otooksidasyon sırasında da reaktif oksijen metabolitleri meydana gelmektedir(Tablo 3).

Tablo 3: Nonenzimatik reaksiyonlarla oluşan reaktif oksidan metabolitler(11).

Fe ⁺² + O ₂ → Fe ⁺³ + O ₂ ^{·-}
Hb-Fe ⁺³ + O ₂ → Hb-Fe ⁺³ + O ₂ ^{·-}
Mb-Fe ⁺³ + O ₂ → Mb-Fe ⁺³ + O ₂ ^{·-}
Katekolaminler + O ₂ → Melanin + O ₂ ^{·-}
İndirgenmiş flavin + O ₂ → Flavin semikinon + O ₂ ^{·-}
Koenzim Q (Hidrokinon) + O ₂ → Koenzim Q (Ubikinon) + O ₂ ^{·-}
Tetrahidrobiopterin + 2 O ₂ → Dihidrobiopterin + 2 O ₂ ^{·-}

C- Mitokondrial elektron transport sisteminin yanısıra mikrozomal membran elektron sistemleri de (sitokrom p-450 ve sitokrom b5) serbest radikallerin başlıca üretim kaynaklarıdır.

D- Tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler ve tetrahidrobioterinler gibi küçük moleküllerin otooksidasyonu.

E- Stres: Katekolamin düzeyi artar, katekolaminlerin oksidasyonu da serbest radikal kaynağıdır(12).

F- Biyolojik membranların peroksidasyonu.

G-Diğer oksidatif stres yapıcı durumlar: Hipoksi, inflamasyon, ısı, travma, iskemi, reperfüzyon, intoksikasyon ve yoğun egzersiz gibi durumlar organizmada serbest radikal üretimini tetikleyen durumlardır(11),(Tablo 4).

2.3. Antioksidan Savunma Sistemi:

Yaşamın sürekliliği için hücresel düzeyde hemostazise gerek vardır. Normal koşullarda iç ve dış kaynaklı bir çok stres faktörü hücresel dengeyi sürekli değiştirmektedir. Bu stres yapan faktörlere karşı korunmada, hücrenin kendi geliştirdiği ve serbest radikal zincir reaksiyonlarını inhibe eden bazı bileşikler rol almaktadır. Antioksidanlar denilen bu bileşikler, radikallerle hızla reaksiyona girerek oksidasyonun ilerlemesini önlerler.

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta geliştirilmiş bu mekanizmalar, antioksidan savunma sistemleri adını alır(12,15,16).

Doğrudan etki ile oksidanları inaktif hale getiren antioksidanlar dört farklı mekanizmadan biriyle etkili olabilirler(11):

1- Temizleme (scavenging) etkisi: Oksidanları tutma ve zayıf bir moleküle dönüştürme şeklinde gerçekleştirilen bu etki enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir.

2- Baskılama (quenching) etkisi: Oksidanalara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getiren vitaminler ve flavanoidler bu şekilde etki etmektedirler.

3- Onarma (repairing) etkisi.

4- Zincir koparma (chain breaking) etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını önleyen ağır metaller, hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini bu yolla etkili olmaktadır.

Antioksidan savunmada rol oynayan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı olabilirler:

2.3.1. Endojen Antioksidanlar:

A-Enzimler: Bilinen en tanınmış antioksidan enzimler, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz'dır (11-13),(Şekil 4):

Süperoksit dismutaz: $O_2^{\cdot -}$ molekülünün H_2O_2 'e dismutasyonunu katalizlemektedir. Cu-Zn ve Mn içeren iki tip enzimden, Cu-Zn içereni stoplazmada, diğeri ise mitokondride bulunmaktadır.

Katalaz: H_2O_2 'in suya dönüştürülmesinden sorumlu katalazlar, pek çok dokudaki peroksizomlarda bulunur ve muhtemelen peroksizomal oksidaz enzimleri tarafından oluşturulan peroksidi ortadan kaldırırlar.

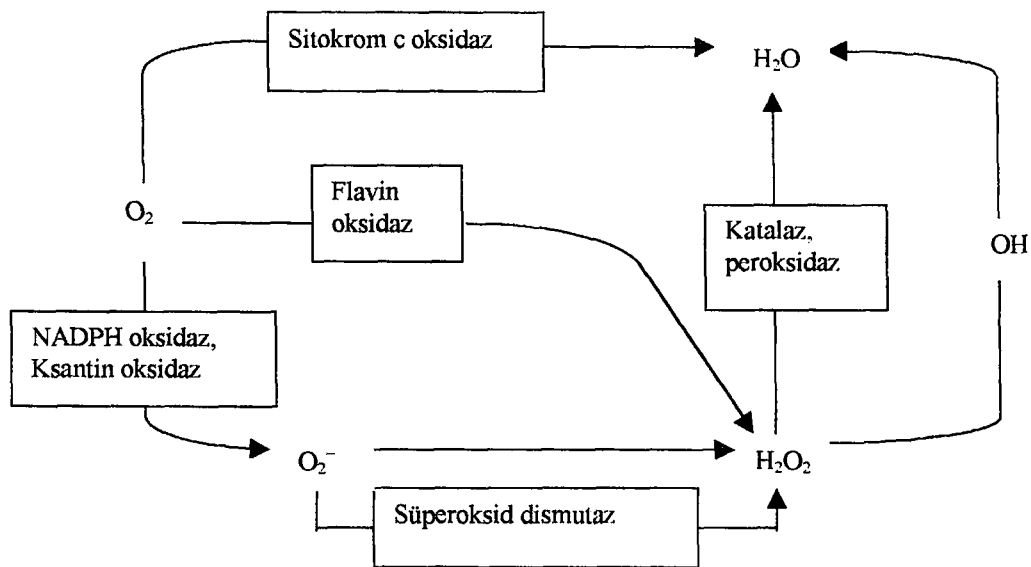
Glutatyon peroksidaz: Redükte glutatyonu (GSH), okside (GSSG) formuna oksitleyerek, sitozol ve mitokondride SOD tarafından üretilen H_2O_2 'i uzaklaştıran major enzimlerdir. Lipid peroksitlerinin indirgenmesini de katalizlerler(17).

Glutatyon redüktaz: Okside glutatyonun, redükte glutatyoona dönüşümünü sağlayarak dolaylı antioksidan etki göstermektedirler.

Glutatyon-S-transferaz: Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynarlar. Lipid peroksitlerine karşı (Se bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek) bir savunma mekanizması oluştururlar(12).

B- Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi.

C- Enzimatik olmayan diğer çeşitli antioksidanlar(12,14-17):



Şekil 4: Enzimatik antioksidan mekanizmalar(11).

Vitamin E: Lipid membranlar ve ekstrasellüler sıvılarda bulunur. Lipid peroksitleri inaktive eder ve lipid peroksit zincirini kırarak lipid peroksidasyonu tepkimelerini engellemektedir.

Vitamin C: Hücre dışı sıvılarda bulunur. Süperoksit ve hidroksil radikalinin doğrudan temizleyicisidir.

β - Karoten: Vitamin A öncülü olup, membranlarda bulunur. Temizleyicidir, peroksitlere doğrudan etkisi de sözkonusudur.

Seruloplazmin: Muhtemelen, süperoksit dismutaz (SOD) benzeri bir mekanizma ile etki gösterir. Ferro demiri yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece serbest radikal oluşumunu inhibe eder.

Transferrin: Dolaşımdaki serbest demiri bağlar.

Ferritin: Dokudaki demiri bağlar.

Ürik asit: Normal plazma konstrasyonlarında süperoksit, hidroksil ve peroksil (ROO⁻) radikallerini temizler.

Albümin: Geçiş metallerini bağlar, lipid hidroperoksit (LOOH) ve hipoklorit (HOCL) toplayıcısıdır.

Bilirubin: Serbest radikal tutucusudur, O₂⁻ ve OH[•] radikal toplayıcısıdır.

Glutatyon: Karaciğerde, genetik bilgiye gerek olmadan glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir tripeptiddir. Çok önemli bir antioksidan olan glutatyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Ayrıca proteinlerdeki, -SH gruplarını da redükte halde tutarak oksidasyondan korur.

Sistein: Serbest radikal ve hipoklorit toplayıcısıdır.

Taurin: Hipoklorit ile reaksiyona girer, ksenobiyotiklere bağlanır.

Glukoz: Hidroksil radikali tutucusudur.

Piruvat: H₂O₂ tutucusudur.

Hemoglobin; oksidanları, Haptoglobulin; hemoglobini, Hemopeksin de serbest hemi bağlayarak antioksidan özellik göstermektedir.

Melatonin: Pineal bezden salınan indolamin yapısında bir hormon olup OH[•] radikalini ortadan kaldıran, son derece etkili bir antioksidandır(11,12).

Tablo 4: Serbest oksijen radikalleriyle ilgisi olduğu ileri sürülen klinik durumlar (2,11).

İskemi/reperfüzyon sendromları	Myokard infarktüsü, kardiopulmoner by pass, organ transplantasyonu, mide mukozasında hasar(stres ülseri, NSAİİ ülseri), barsak iskemisi, nekrotizan enterokolit, şok sonrası KC yetmezliği, beyin iskemisi, akut renal tubuler nekroz
Hiperoksijenasyon sendromları	AC' de oksijen toksisitesi (hiperbarik oksijen), retrolental fibroplazi
İnflamatuvar hastalıklar	Nötrofil fagositozu, romatoid artrit, otoimmün hastalıklar, inflamatuvar kemik hastalıkları, bağ dokusu hastalıkları, immün yetmezlikler
Toksik doku hasarı	Aspirasyon pnömonisi, pankreatit, özofajit, sigara içmenin etkileri, mineral toz pnömokonyozu, kurşun zehirlenmesi (eritrositlerde hasar), oral demir zehirlenmesi(sindirim sistemi hasarı), aminoglikozid ve ağır metal nefrotoksitesisi
Sinir sistemi ve nöromusküler bozukluklar	Nörotoksinler, hipertansif serebrovasküler hasar, parkinson hastalığı, vitamin E eksikliği, muskuler distrofi ve multipl skleroz
Demir fazlalığı	İdiopatik hemokromatoz, diyetle demir fazlalığı (Bantu sendromu), talasemi ve multipl kan transfüzyonları ile tedavi edilen kronik anemiler, nutrisyonel eksiklikler (Kwashiorokor), alkolle indüklenen demir fazlalığı.
Kalp ve kardiyovasküler sistem	Alkol kardiyomyopatisi, adriyamisin kardiyotoksitesisi, Keshan hastalığı (selenyum eksikliği), ateroskleroz
Diğerleri	Yaşlanma, kanser, diabetes mellitus, katarakt, amiloidoz, porfria, periferik ödem, solar radyasyon, termal yanık

2.3.2. Eksojen Antioksidanlar:

İlaçlar: Rekombinant SOD, tümör nekrotizan faktör ve interlökin gibi sitokinler, nötrofil adezyon inhibitörleri, ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, folik asit), NADPH inhibitörleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar ve Ca^{++} kanal blokerleri, asetilsistein, barbitüratlar, mannitol, indapamid ve vitaminler serbest radikal toplayıcı özelliği olan ilaçlar arasındadır(11,12).

Desferroksamin ve dimetil tiyoüre gibi demir redoks döngüsü inhibitörleri ve demir şelatörleri de antioksidan etki gösterirler.

Glutatyon peroksidaz(GSH-Px) aktivitesini artıran Ebselen, selenyumlu bir bileşik olup, iyi bir antioksidandır.

Moleküler oksijenden türeyen oksidatif radikaller iki mekanizmayla uzaklaştırılırlar. Birincisi, toksik radikallerin enzimatik aktivasyonudur. Örneğin glu-

tasyon peroksidaz ve katalaz reaktif oksijen ara ürünlerini suya indirgerler. İkinci mekanizma oksijen radikallerini kimyasal olarak inaktive eden vitamin C, E ve β -karoten gibi, diyetle alınan antioksidanlarla ilgilidir. Kalp damar hastalığına karşı bu antioksidan bileşiklerin etkisi, kısmen LDL'nin oksidasyona karşı korunması ile ilgilidir(17).

2.4. lipid Peroksidasyonu ve Etkileri:

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller permeabiliteyi bozar, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu artırır(11).

Serbest radikaller savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştuğları zaman, organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Serbest radikallere en hassas olan biyomoleküller lipidlerdir. Memeli hücre membranları peroksidatif hasara karşı çok duyarlı olan, fazla miktarda PUFA içermektedir. Bu yağ asitlerinin peroksidasyonu en çok araştırılan radikal tepkimeleri arasında yer almaktadır(11,12).

Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür(10).

Biyolojik membranlarda serbest radikallerle indüklenen lipid peroksidasyonu başlama (initiation), yayılma (propagation) ve sonlanma (termination) basamakları olmak üzere üç basamakta ele alınmaktadır(14,16).

Başlama fazı: Lipid peroksidasyonu organizmada oluşan bir serbest radikal etkisiyle membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri, karbon zincirinin metilen gruplarının birinden, bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Yağ asidi zincirinden bir H ayrılması eşlenmemiş bir elektron ve dolayısıyla C merkezli radikal oluşumuna yol açar. Bir radikal niteliği kazanan lipid, L' (ya da PUFA') şeklinde gösterilir. Eşleşmemiş elektronlara sahip olan demir

ve bakır gibi, geçiş metal iyonları varlığı, peroksidasyonun başlamasını kolaylaştırmaktadır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşik olup, bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle dien konjugatları oluşabildiği gibi, lipid radikalının moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu da lipid peroksil radikali ($LOO\cdot$) meydana gelir(12,16).

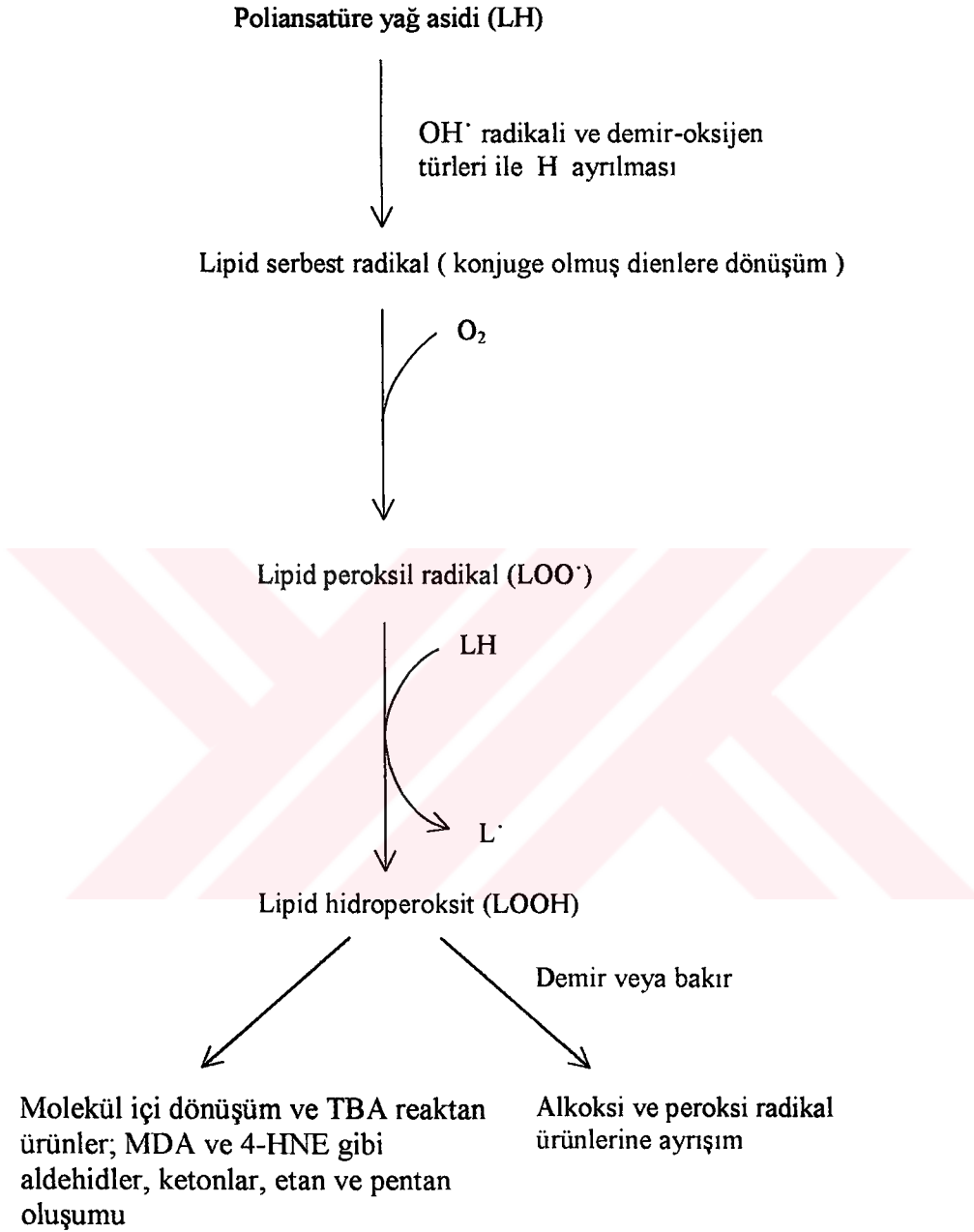
Yayıma fazı: Bu peroksil radikali bir diğer peroksi radikali ile birleşebildiği gibi, membran proteinleri ile de etkileşebilir. Peroksi radikallerinin en önemli özelliği ise, membrandaki komşu yan zincirlerden H atomu ayırarak peroksidatif zincir reaksiyonunu yaymalarıdır. Böylece yan zincirden H atomu ayrılması sonucu her defasında lipid hidroperoksitleri ($LOOH$) ve yeni bir peroksi radikali oluşmaktadır. Peroksidasyon bir defa başladıktan sonra, kendi kendine katalizlenerek devam etmekte ve bu şekilde yüzlerce yağ asidi zinciri lipid hidroperoksitlere çevrilmektedir(13,16).

Peroksidasyon zincirinin uzaması; membrandaki lipid/protein oranı, yağ asidi bileşimi, oksijen konsantrasyonu ve E vitamini gibi, zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanların varlığı gibi, birçok faktöre bağlıdır(16).

Sonlanma fazı: Peroksidasyon zincir reaksiyonu ancak, iki serbest radikalin birbirleri ile reaksiyona girip radikal yapısında olmayan kararlı bir ürün oluşturması ile ya da radikal temizleyici reaksiyonlarla sonlandırılır(12).

Plazma membranı adı geçen serbest radikal kaynaklarının hepsiyle stimüle edilebilir. Lipid hidroperoksit ($LOOH$); süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), perhidroksil radikali ($HO_2\cdot$) ya da geçiş metal iyonları ile temas edene dek kararlı bir bileşiktir. Metal iyonları varlığında, diğer zincir reaksiyonlarını başlatıp sürdüren alkoksi radikali ($LO\cdot$) ve peroksi radikali ($LO_2\cdot$) gibi başka radikaller oluşturur. Geçiş metalleri sentezlenmiş olan lipid hidroperoksitlerinin parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize ederler. Böylece zararlı olan radikalleri daha zararlı hale getirirler. Tiyoller, difenoller ve askorbik asit çok az miktarlarda metal iyonu içerseler bile, otooksidasyon sonucu reaktif radikaller üreterek bu sürece katkı yapabilirler(12,13,16),(Şekil 5, Tablo 5).

Geçis metal iyonları varlığında lipid peroksidasyonu ürünleri bazı enzi-



Şekil 5: Lipid peroksidasyonunun oluşum şeması.

Metal katalizli reaksiyonlarla OH[•] radikali veya demir-oksijen türleri, bir membranın çoklu doymamış yağ asidine saldırarak lipid radikal oluşturabilir. Bu radikalın çift bağlarının yeniden düzenlenmesi, konjuge dien oluşumuyla sonuçlanır. Moleküler oksijenin bu lipid radikalle, etkileşmesi sonucunda oluşan lipid peroksil radikal de (LOO[•]) bir başka lipide saldırarak, yeni bir L[•] ve lipid hidroperoksit (LOOH) meydana getirir. LOOH 'e metal iyonlarının etkisiyle alkoksi ve peroksi radikalleri oluşabildiği gibi, reaktif aldehidler, MDA ve 4-HNE gibi bir çok yıkım ürünü lipid peroksidasyonu sonucu oluşmaktadır(5,9).

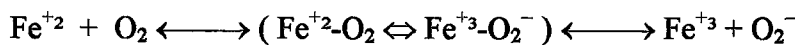
matik tepkimeler ile etan, pentan, malondialdehid benzeri yıkım ürünlerinin yanı sıra kemiluminesans ve fluoresans veren; alkanlar, alkanallar, alkenaller ve 4-hidroksi alkenaller gibi bileşikler oluşturmaktadırlar. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da hücrenin diğer bölgeleri ve reaksiyon bölgesinden daha uzaklara diffüze olarak, hücre ödemi ve damar geçirgenliği artışı gibi hasarlara neden olurlar(11,12).

Çok zararlı etkileri olan lipid peroksidasyonu, doğrudan membran yapısına, reaktif aldehydler üretmek suretiyle de dolaylı olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması yüzünden reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerle meydana gelir. Membran permeabilitesi ve mikroviskozitesi ciddi şekilde etkilenir. Membrana bağlı reseptörlerin ve enzimlerin inaktivasyonuna, membranın sekretuar fonksiyonunun kaybına yol açarlar. Transmembran iyon gradientini bozarak Ca^{+2} gibi iyonlara karşı nonspesifik permeabiliteyi artırır. Mitokondride oksidatif fosforilasyonu çözerler, mikrozomal enzim aktivitelerinde de, değişikliklere yol açarak lizozom gibi organellerin bütünlüğünün kaybolmasına neden olurlar.

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu malondialdehid üretimiyle sonuçlanır. Peroksidasyon sonucu oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Ayrıca diffüze olabilen ve DNA'nın nitrojen bazlarıyla da reaksiyona giren MDA bu özellikleri nedeni ile mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir(11,12,16).

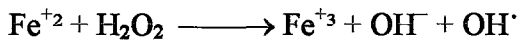
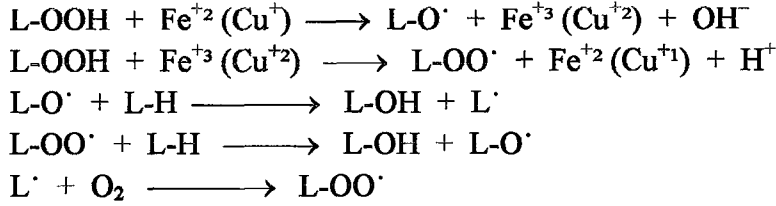
2.4.1. Lipid Peroksidasyonunda Demirin Önemi:

Perferril ($Fe^{+2}-O_2$) gibi çeşitli demir-oksijen kompleksleri H atomu ayırma ve peroksidasyonu başlatma yeteneğine de sahiptir. Kendileri de bir tür serbest radikal olan demir iyonları moleküler oksijen ile elektron transferi reaksiyonlarına katılabilir.

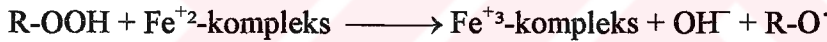


Meydana gelen süperoksit Fenton reaksiyonu ile de $OH\cdot$ radikallerini oluşturabilir.

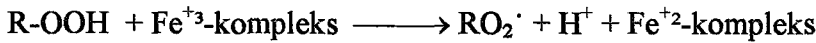
Tablo 5: Geçiş metallere lipid peroksidasyonundaki etkileri (12).



Demirin lipid peroksidasyonundaki ikinci önemli rolü de lipid hidroperoksitlerin oluşumunu hızlandırmalarıdır. Zira saf lipid hidroperoksitler fizyolojik sıcaklıklarda oldukça stabil olup ancak geçiş metal kompleksleri; özellikle, demir tuzları varlığında ayrışmaktadırlar. İndirgenmiş bir demir kompleksi lipid peroksit ile etkileşerek, O-O bağlarının ikiye ayrılmasına ve dolayısıyla alkoksi radikalleri oluşumuna yol açar.



Fe^{+3} kompleksi de oluşan Fe^{+2} -kompleksin alkoksi radikali vermek üzere tekrar reaksiyona girmesiyle, hem peroksi hem de alkoksi radikali oluşturabilir.



İzole membran fraksiyonlarına demir tuzları ilave edildiği zaman, peroksi ve alkoksi radikallerinin oluşmasıyla bu reaksiyonların deney ortamında da gerçekleştiği kanıtlanmıştır(13,19).

2.4.2. Lipid peroksidasyon ürünlerinin ölçümü:

Serbest radikallerin, hastalıkların patogenezindeki rolü anlaşıldıkça bu radikalleri ölçmek için gerekli tekniklere de ihtiyaç artmaktadır. Serbest radikaller son derece reaktif ve kısa ömürlü olduklarından genellikle lipidler, proteinler ve DNA ile reaksiyonları sonucu oluşan, çeşitli son ürünlerin ölçümü gibi, dolaylı metodlar kullanılır(12).

Biyolojik örneklerde lipid peroksidasyonunu ölçme ve tayin etmede çeşitli metodlar kullanılmaktadır. Yağ asitlerinin kütle spektrometri veya HPLC ile analizi, O_2 elektrodu metodu, GSH-Px, siklooksijenaz metodları, pentan ve etan gibi

hidrokarbon gazların ölçümü, ışık emisyon, floresans, TBA testi, dien konjugasyon metodu ve HPLC antikör teknikleri örnek olarak verilebilir(20).

Biyolojik örneklerdeki serbest radikal aktivitesinin ve lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak lipid hidroperoksitlerinin, konjuge dienlerin, MDA dışındaki aldehidlerin, uçucu hidrokarbonların ve lipid peroksidasyonunun floresans ürünlerinin ölçümü; başlıca lipid peroksidasyon ürünleri ölçüm yöntemleri arasında yer alır. En sık kullanılan metod thiobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddelerin (TBARS) ölçümüdür(12).

Yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmakla birlikte, lipid peroksidasyonunun derecesiyle oldukça iyi bir korelasyon gösteren MDA biyolojik materyallerde serbest ve bağlı şekillerde bulunur. Normalde serbest şekli çok az olup, serbestleşmesi ve MDA-TBA kompleksinin oluşması için örneğin düşük pH'da (TCA, HCl veya Glacial asetik asit) ısıtılması gerekir. MDA-TBA kompleksinin oluşturduğu kromojen, n-butanol'e ekstrakte edildikten sonra 532 nm'de absorbans veya 553 nm'de floresans olarak ölçülmektedir(12,20,21).

TBA ile etkileşen aldehidlerin çoğu test işlemi sırasında peroksitlerden ve doymamış yağ asitlerinden de oluşabilmektedirler. Kolay ve nonspesifik olan ölçüm dikkatli kontroller gerektirir. Özgüllüğünün olmayışı nedeniyle, bu metod tenkit edilmekteyse de, Yagi'nin metodu kullanıldığı zaman bu problemlerin ortadan kalktığı, ya da etkilerinin önemsiz olduğu görülmüştür. Zira Yagi'nin spektrofotometrik metodu ve HPLC ile elde edilen sonuçlar arasında iyi bir korelasyon olduğu gözlenmiştir(20,22).

Lipid peroksidasyonun floresans ürünlerinin ölçümü, lipid peroksidasyonunun son ürünlerinin oluşturduğu çeşitli floresans bileşiklerin ölçümü esasına dayanır. Protein, amino asit ve enzimlerdeki amino gruplarına, malondialdehidin çapraz bağlanmasıyla ve MDA gibi aldehidlerin polimerizasyonu ile floresans maddeler oluşmaktadır. Amino gruplarının MDA ile etkileşerek şif bazları oluşturması yalnız asit pH' da gerçekleşirken, nötral pH' da floresans dihidropiridinler de oluşabilmektedir.

Floresans ürünlerin oluşumu minör bir reaksiyon olup çok karmaşık kimyaya sahiptir. Yaşlılık pigmenti olarak bilinen lipofüsin de, lipidlerin oksidatif yıkımının son ürünü olan floresan bir maddedir. Metod çok duyarlı olmasına rağmen, canlıda çoğalan floresan ürünler detaylı karakterize edilmeden, lipid peroksidasyonunun son ürünleri olarak kabul edilmemelidir(12,20).

2.5. Demir Kompartmanları ve Metabolizması :

Çevremizde ve eritrositlerimizde çokluğuna rağmen, demir bir çok konuda eser elementlere benzer. Normalde vücudun çoğu hücrelerinde, plazmada ya da diğer ekstrasellüler sıvılarda çok miktarda bulunan demirin günlük % 1'den daha az bir kaybı ile, vücut, demir birikiminden korunmaktadır(Tablo 6).

2.5.1 Demir Kompartmanları:

Hemoglobin: Yetişkin bir erkek ortalama 4,5 gr kadar demir içerir. Bunun yaklaşık 2,5 gr'ı ağırlığına göre %0,34 demir içeren hemoglobinde bulunur. Normalde tüm hemoglobin demiri eritrositler içinde veya kemik iliğinde eritrosit öncüllerinde tutulmaktadır. Daha az miktarlarda, myoglobin, çeşitli enzimler ve transport proteini transferrinde bulunmaktadır.

Transferrin: Bir organdan diğerine demir transportu apotransferrin adlı bir plazma taşıyıcı protein ile gerçekleştirilmektedir. 75000 Molekül ağırlığına sahip bu β_1 -Globülinin her molekülü iki demir bağlama bölgesine sahiptir. Bu bölgeler bir Fe^{+3} iyonu ile birlikte HCO_3^- iyonu bağlayabilir(23,24).

Tablo 6: Normal insanda demir kompartmanları(23).

Bölüm	Demir içeriği (mg)	Total vücut demiri (%)
Hemoglobin demiri	2000	67
Depo demiri(ferritin,hemosiderin)	1000	27
Myoglobin demiri	130	3,5
Kararsız havuz	80	2,2
Diğer doku demiri	8	0,2
Transport demiri	3	0,08

Apotransferrin- Fe^{+3} kompleksi transferrin adını alır. Normalde plazmada yaklaşık 2,5 mg demir mevcuttur. Pek çok hücrenin sitozolünde de bulunan transferrin hücre içi demir transport proteini olarak da fonksiyon görebilmektedir. Demir bağlı transferrinin OH^- radikali üretimini indüklediği rapor edilmiştir(25).

Ferritin: Major depo bileşigi olup, bir apoferritin kabuk ve içinde kristal kor şeklinde ferrik oksihidroksit (FeOOH)_x' den oluşan küresel bir moleküldür. Apoferritin kabuk yaklaşık 13 nm çapında ve içinde 7 nm çapında bir boşluk şeklinde 24 alt ünite veya monomerden oluşmuştur. Üzerindeki 0,7-1 nm çapındaki 6 delik Fe⁺², askorbik asit ve flavin mononükleotidleri gibi moleküllerin çıkışına izin vermektedir. Deliklerin kenarları demir için enzimatik bağlanma bölgeleri olarak iş görür. İki Fe⁺² iyonu deliğe girerken FeOOH' e oksitlenirler ve kor kristalin yüzeyine tutunmuş olarak salınırlar. FeOOH kor kristal 4000 kadar demir atomu içerebilir, ancak genellikle 2000 ya da daha az demir atomu içermektedir. Ferritinden demir salınımı muhtemelen nonenzimatik olarak, indirgenmiş flavin mononükleotidlerle veya diğer indirgeyici maddelerle indirgenme sonucu gerçekleşebilmektedir. Sonuçta Fe⁺² kristali terkeder ve ferritin kabuğunun bir deliğinden dışarı diffüze olur.

Demirin oksidasyonu veya indirgenmesi hızla meydana gelir. Böylece ferritin hem çok etkili bir demir alıcısı hem de metabolik ihtiyaçlar için derhal kullanılacak bir kaynak rolü oynamaktadır. Neredeyse vücudun tüm hücrelerinde bulunan ferritin, karaciğer hepatositlerinde, kemik iliği ve diğer organların makrofaj sisteminde; hemoglobin ve diğer hem proteinlerinin oluşumunda kullanılabilen demir kaynağını oluşturur(24,25),(Tablo 7,8).

Ferritinin de O₂⁻ ve H₂O₂' den, OH' radikallerinin oluşumunu stimüle ettiği yapılan deneysel çalışmalarla kanıtlanmıştır(4,13).

Depolanmış total vücut demir miktarı erkeklerde çoğunlukla ferritin olarak yaklaşık 800 mg iken, sağlıklı kadınlarda 10-200 mg arasında değişmektedir. Çok az miktarda ferritin, total vücut depo demirine orantılı konsantrasyonlarda serumda da bulunur ve karaciğer hasarı plazmaya fazla miktarda demir salınımı ile sonuçlanır.

Hemosiderin: Diğer depo demir formu hemosiderin, kısmen deproteinize olmuş ferritin biraraya gelmesiyle oluşur. Ferritin aköz çözeltilerde çözünürken hemosiderin çözünmez. Nisbeten fazla kümelerden oluştuğu ve bu yüzden daha küçük yüzey/hacim oranına sahip olduğundan hemosiderinden demir salınımı oldukça yavaştır. Ferritin gibi hemosiderin de predominant olarak karaciğer, dalak

ve kemik iliği hücrelerinde bulunur. Halliwell, hemosiderin demirin de OH⁻ üretimine katılabildiğini göstermiştir, ancak hemosiderin ferritinden daha az aktiftir(13,24).

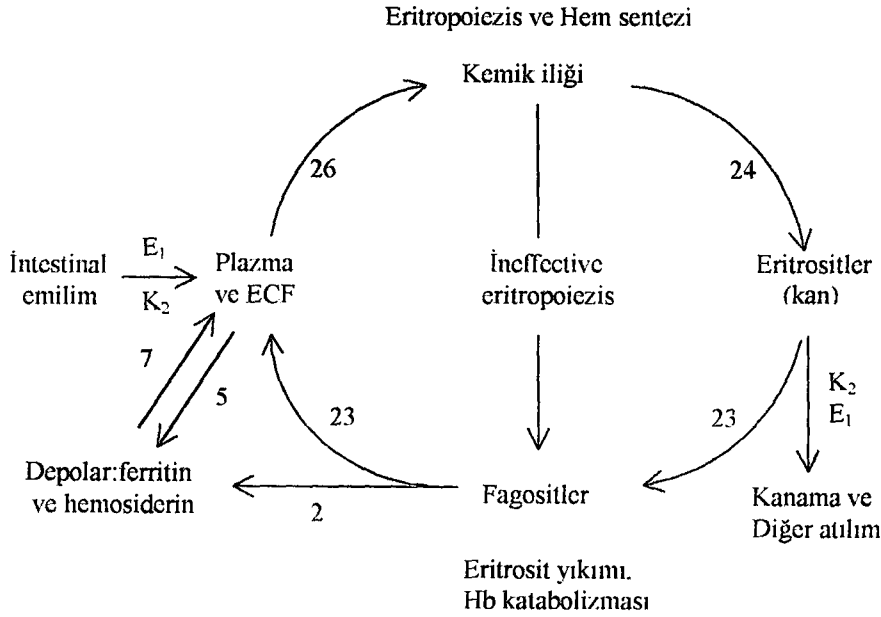
Doku Demiri: Molekülün tamamlayıcı bir parçası veya kofaktör olarak pek çok enzim ve koenzim demire gereksinim duyar, örneğin; peroksidazlar ve sitokromlar, hemoglobin gibi hem proteinlerinin tamamı, Krebs siklusu enzimlerinin yarısı demire gereksinim duyarlar. Vücudun tüm hücrelerinde bulunan bu enzim ve koenzimler topluca, doku demir kompartmanı olarak anılmaktadır. Normalde 8 mg kadar olan bu doku demiri kompartmanı küçüklüğüne rağmen metabolik olarak çok önemli olup, demir eksikliği sürecinde erkenden azalır. Total myoglobin demir içeriği yaklaşık 130 mg kadardır.

Labil Havuz: Normalde 80 mg demir labil (kararsız) havuzda bulunur. Bu bölüm belirli bir anatomik lokalizasyona sahip olmayıp, radyoaktif işaretli demir ile kinetik ölçümlerden çıkarılan bir kavramdır. Muhtemelen ya lenfatik dolaşımında bulunan demir ya da ferritinden başka, çoğu hücreler tarafından hızla alınan ve ya salınan stoplazmik bir demir deposu olduğu düşünülmektedir.

2.5.2. Emilim, Taşınma ve Atılım:

Normalde yaklaşık 1 mg olan demir emilimi esas olarak duodenumda gerçekleşir. Heme aslında doğrudan emilebilmektedir. Emilecek inorganik demir ferröz (Fe⁺²) durumunda olmalıdır. Hem ferritin hem de transferrin intestinal mukozanın emici hücrelerinde mevcut olup, demir emilimini birlikte düzenlediklerine inanılmaktadır. Vücut demir depoları yükseldiği zaman mukozal epitelyumun ferritin içeriği de yükselmekte, transferrin içeriği ise düşmektedir. Mukozal hücrelere giren demir ferritinde tutulmakta, bu hücreler kaybedildiğinde de intestinal lümeneye bırakılmaktadır. Bu mekanizma vücut demir depoları arttığı zaman, demir emilimini azaltır. Buna karşın, demir eksikliğinde mukozal hücre; apoferritin içeriğini azaltıp, transferrin (ve apotransferrin) içeriğini artırarak, demir emilimini hızlandırmaktadır(23,24).

Demir, major metabolizma yoluna plazma transferrininden, hemoglobine dahil edildiği kemik iliğinde retikülosit öncüllerine geçerek katılır. Sonra, olgun



Şekil 6: İnsanda demir metabolizmasının temel yolları (24).

retikülositler olarak dolaşıma katılır ve metabolik olarak yıpranıp fagositler tarafından yutulana kadar, bu hücrelerde yaklaşık 4 ay kalır. Hemoglobinden salınan demir plazma transferrinine geri döner, böylece bir siklus tamamlanırken diğeri başlar(Şekil 6).

Az miktarlarda demir diğer demir bölümlerinde kullanılmak üzere depo ve transport komponentleri arasında sürekli gidip gelmektedir. İntestinal yoldan her gün emilerek bu sıklusa katılan 1-2 mg demir, yine 1-2 mg olan günlük kaybı karşılamaktadır. Demir kaybının çoğu, epitelyal hücreler ile olurken az miktarlarda da eritrositlerdeki demirin idrar ve feçesle kaybı sonucunda oluşmaktadır. Genç kadınlar her bir menstruel siklus ile, 20-40 mg demire karşılık gelen 40-80 ml kan kaybederler. Bu kayıp intestinal mukoza tarafından demir emilimi artırılarak karşılanır. Buna benzer şekilde her bir gebelik sonucu da 600-900 mg demir kaybı (dolayısı ile ihtiyacı) söz konusu olmaktadır(24,25).

2.5.3. Demir Fazlalığı (Overload):

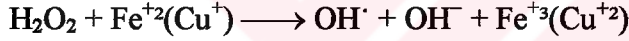
Hemosideroz doku hasarıyla ilişkisi olmayan demir fazlalığını ifade etmede kullanılırken, Hemokromatoz hücresel dejenerasyon ve fibrozis ile seyreden, ve tuttuğu organlara hasar veren demir fazlalığı anlamına gelir. Demir fazlalığı sıklıkla kronik aşırı emilimden kaynaklanır. Nadiren, uzun süre oral veya en-

jeksiyon yoluyla demir alımı neden olur. Kronik alkol kullanımında da görülebi-
leceği ileri sürülmektedir(24).

Tablo 7: Reaktif ürünleri daha reaktif türlere çevirmede, metal iyonlarının rolü (2).

$O_2^{\cdot-}$	\xrightarrow{a}	OH^{\cdot}
H_2O_2	\xrightarrow{a}	OH^{\cdot}
Lipid peroksitleri (ROOH)	\xrightarrow{b}	RO^{\cdot} (alkoksi), ROO^{\cdot} (peroksi) radikali ve sitotoksik aldehidler
Tiyoller(RSH)	\xrightarrow{c}	$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , tiyil (RS^{\cdot}), OH^{\cdot}
NAD(P)H	\xrightarrow{c}	$NAD(P)^{\cdot}$, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot}
Askorbik asit	\xrightarrow{d}	Semidehidroaskorbat radikali, OH^{\cdot} , H_2O_2 , askorbatın yıkım ürünleri
Katekolaminler, ilgili spontan oksidlenebilen moleküller	\xrightarrow{e}	$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} , semikinonlar (veya oksidlenmiş bileşiklerden ayrılmış öz- deş radikaller)

a: Fe veya Cu'la katalizlenen Haber-Weiss reaksiyonu



b: Fe/Cu; lipid peroksit ayrışımı metal iyon bağımlıdır, sonunda; MDA ve 4-HNE gibi sitotoksik ürünler oluşur.

c: Fe/Cu + O_2 ; Bilinen otooksidasyonların çoğu az miktarda geçiş metal iyonları ile başlatılabilmekte ve serbest radikal mekanizmalarıyla ilerletilmektedir.

d: Cu/Fe; Bakır iyonu askorbik asit ayrışmasında özellikle etkilidir ve askorbat-Cu veya askorbat-Fe kompleksleri sitotoksikdirler.

e: Fe/Cu/Mn + O_2

Doku demir fazlalığı kalp, karaciğer ve pankreası tutan klinik sendromlara yolaçar. Doku demir alımı (uptake), hem transferrin bağımlı hem de bağımsız süreçlerle oluşurken, demir fazlalığı sendromlarında doku alımı, predominant olarak transferrin bağımsız mekanizmalar yoluyla meydana gelir(24,25).

2.5.4. Serum Demir Tayini:

Serum demir konsantrasyonu, serum transferrinine bağlı demiri (Fe^{+3}) gösterir, serbest hemoglobin olarak serumda taşınan demiri içermez. Serum pH'sının düşürülmesiyle transferrinden salınan demir, Fe^{+3} 'den Fe^{+2} 'ye indirgenmekte ve reaktif grubun, $-N=C-C=N-$ içeren bir kromojen ile kompleksler yapması sonucu, metal katyonlar iki nitrojen arasında şelatlanmaktadır. Demir-kromojen kompleksi, oldukça yüksek soğurulma özelliğine sahiptir ve absorbanı, örnekteki

demir konsantrasyonuna orantılıdır. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan iki kro-mojen; bathophenantroline ve ferrozine' dir. Normalde serum demir düzeyleri, metoda bağlı olarak değişmekle birlikte, erkeklerde 65-170 µg/dl kadınlarda ise 50-170 µg/dl aralığındadır(24).

Tablo 8: Biyolojik demir kompleksleri ve onların oksidatif radikal reaksiyonlarında olası katkısı(13).

Demir kompleksi	Lipid peroksitlerin alkoksi ve peroksi radikallerine dönüşümü	Fenton reaksiyonu ile OH ⁻ radikali oluşumu
Fosfat esterlerine (ATP gibi) gevşek olarak bağlanan demir	evet	evet
K.hidratlar ve organik asitler (sitrat, deoksiriboz)	evet	evet
DNA	evet ?	evet
Membran lipidleri	evet	evet
Mineral yağlar, asbest, silikatlar	evet	evet
Proteinlere sıkıca bağlanan;		
Non-hem demir: Ferritin	evet	evet (demir salınıncı)
Hemosiderin	zayıfca	zayıf (" ")
Laktoferrin	hayır	sadece demir salınırsa
Transferrin	hayır	" " "
Hem demiri: Hemoglobin	evet	evet (demir salınırsa)
Myoglobin	evet	evet (" ")
Sitokrom C	evet	evet (" ")
Katalaz	zayıf	gözlenmedi

Total demir bağlama kapasitesi (TDBK), esas olarak transferrinin bağlayabildiği maksimum demir konsantrasyonunun ölçümüdür. Demir eksikliğinde artarken, kronik inflamatuvar hastalıklar ve malignensilerde azalır. Hemokromatoziste de sıklıkla azalmaktadır. Referans değerleri 250-450 µg/dl arasındadır.

Plazma demirinin yaklaşık %1'ini bulunduran ferritin, kanda çok düşük konsantrasyonda bulunur. Plazma ferritin konsantrasyonları, vücut depoları ile dengede olup, depo bölümlerindeki demir miktarı değişikliklerini yansıtmaktadır. Demir eksikliği anemisinin gelişmesinde erken bir habercidir. Diğer yandan kronik enfeksiyonlar, romatoid artrit ve renal hastalıklar gibi kronik inflamatuvar bozukluklar; özellikle, lenfomalar, lösemi, göğüs kanseri ve nöroblastom gibi bir çok malignenside artmış serum ferritin konsantrasyonu düzeylerine raslanmaktadır. Serumda normal düzeyleri; erkeklerde 20-250 ng/ml, kadınlarda 10-120 ng/ml

arasındadır. Plazma ferritin düzeyi hemosideroz ve hemokromatozlu hastalarda da artmaktadır.

Demir fazlalığında; serum demiri artmış, transferrin saturasyonu artmış (N: %15-45), TDBK ise normal veya azalmıştır(24).

2.6. Plazma Lipid ve Lipoproteinleri:

Kanda total kolesterol düzeylerinin, 200 mg/dl'nin altında olması istenmektedir. Kolesterol düzeyi 350 mg/dl'nin üzerinde olan hastalar koroner arterlerde erken ateromatöz tıkanma gelişmesi ve erken yaşta iskemik kalp hastalığı belirtileri ortaya çıkması açısından yüksek risk altındadır. Bununla birlikte dikkatler artık, kan kolesterolündeki hafif ve orta derecedeki yükselmelere yönelmiştir. Zira, kalp krizlerinin çoğunluğu, total kolesterol düzeyi 210-240 mg/dl arasında olanlarda ortaya çıkmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki erişkinlerin yaklaşık % 50'sinin kolesterol düzeyleri bu aralıktadır. 240 mg/dl'nin üzerindeki bir total kolesterol düzeyi, yüksek kan kolesterolü olarak kabul edilmektedir. KAH açısından özellikle risk altında olan bu kişilerde hipertansiyon, diyabet ve sigara alışkanlığının bulunması bu riski daha da artırmaktadır(26).

Yüksek trigliserit düzeylerinin KAH'da pozitif bir rol oynadığı konusu henüz tartışmalı olmakla birlikte, hem hiperkolesterolemi hem de hipertrigliseridemi ateroskleroz için önemli risk faktörleri olarak kabul edilmektedir. 200-400 mg/dl trigliserit düzeyleri sınırda kabul edilmektedir. Karaciğerden salgılanan trigliseritten zengin VLDL'nin yüzeyinde Apolipoprotein B ve öteki lipoproteinler vardır. VLDL artıkları karaciğer tarafından doğrudan alınabildiği gibi LDL'ye de dönüşebilir(18,26),(Tablo 9).

Tablo 9: Ateroskleroz gelişimi için risk faktörleri (27).

-
- Erkek cinsiyet
 - İskemik kalp hastalığı aile hikayesi (55 yaş öncesi bir ebeveyn veya kardeşde)
 - Hipertansiyon
 - Hiperlipidemi
 - Sigara içme (genellikle günde 10 sigaradan fazlası)
 - Düşük HDL kolesterol (35 mg/dl altı)
 - Diabetes Mellitus
 - Serebrovasküler hastalık veya tıkaçıcı periferik damar hastalığı
 - Aşırı şişmanlık (% 30 üzerinde fazla ağırlık)
 - Yüksek lipoprotein (a)
-

2.6.1. Plazma Lipoproteinleri:

Plazma lipoproteinleri, apolipoproteinler olarak adlandırılan özgün proteinler ve lipidlerin moleküler kompleksleridir. Bu dinamik partiküllerin sentez, yıkım ve plazmadan uzaklaştırılmaları sabit bir denge durumundadır. Serbest yağ asitlerinin dışında fizyolojik olarak ve klinik tanıda önemli olan, dört ana lipoprotein tanımlanmıştır;

Bunlar, (1) şilomikronlar; triaçilgliserollerin barsak absorpsiyonundan türemiştir, (2) çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL veya pre- β); triaçilgliserollerin karaciğer dışına verilmesinde işlev görürler, (3) düşük dansiteli lipoproteinler (LDL veya β); VLDL katabolizmasının son basamağını temsil ederler, (4) yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL veya α lipoproteinler); şilomikronlar, VLDL ve kolesterol metabolizması ile ilişkilidirler(28).

Bağırsak mukoza hücrelerinde üretilen, şilomikronlar besinsel triaçilgliserol, kolesterol ve kolesterol esterlerini periferik dokulara taşırlar. Apolipoprotein B-48 içeren şilomikronların yapısında, triaçilgliserolleri parçalayan enzim lipoprotein lipazın aktivatörü apo C-II' de bulunur. Karaciğerde üretilen VLDL' ler, olgunlaşmamış partiküller olarak salıverilmekte olup apolipoprotein B-100 ve A-I içermektedir. Bu lipoproteinler büyük çoğunlukla triaçilgliserollerden oluşmuştur. Fonksiyonları triaçilgliserölü karaciğerden periferik dokulara taşımaktır. Triaçilgliserolleri, lipoprotein lipaz tarafından yıkılıp birtakım değişikliklere uğradıktan sonra VLDL, plazmada LDL'ye dönüştürülmektedir(18).

Kolesterol taşıyıcı temel bir lipoprotein olan LDL, kolesterolü ve fosfolipidleri periferik hücelere taşımaktadır. Normal olarak doğrudan sentez edilmeyen LDL, VLDL katabolizması sırasında bir yan ürün olarak meydana gelmektedir. Lipid içeriği %13 trigliserit, %48 kolesterol ve %28 fosfolipidden oluşan LDL molekülünün apoproteinlerini B-100 oluşturmaktadır. Periferik dokulara kolesterol taşıma işlevini; hem hücre yüzeyine temas ettiklerinde, hücrelerin membranları üzerine serbest kolesterolü bırakarak, hem de apo B-100'ü tanıyan hücre yüzey membranlarındaki reseptörlere bağlanarak yaparlar. İşlev gören LDL reseptörlerinin eksikliği plazma LDL düzeyinde önemli bir artışa neden olur ve böylece plazma kolesterolü de yükselir.

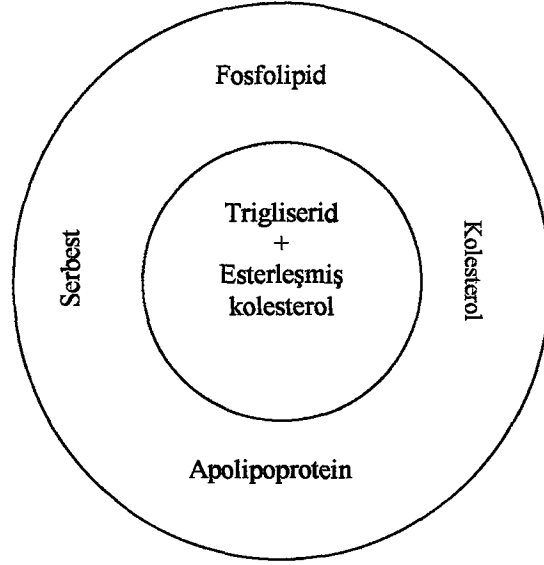
Tablo 10: İnsan serum lipoproteinlerinin özellikleri ve bileşiminin sınıflandırılması (24).

	Şilomikron	VLDL	IDL	LDL	HDL
Mol. Ağırlığı	0.4-30x10 ⁹	5-10x10 ⁶	3.9-4.8x10 ⁶	2.75x10 ⁶	1.75-3.6x10 ⁵
Çap(nm)	>70	25-70	22-24	19.6-22.7	4-10
Dansite	<1.006	<1.006	1.006-1.019	1.019-1.063	1.063-1.21
Elektroforetik Hareketi	Başlangıç	Pre-β	Pre-β, β arası	β	α
Bileşim (%);					
Serbest Kolest.	2	5-8	8	13	6
Esterleşmiş Kol.	5	11-14	22	39	13
Fosfolipid	7	20-23	25	17	28
Trigliserid	84	44-60	30	11	3
Protein	2	4-11	15	20	50
Apoprotein İçeriği; A-I	7.4	eser	-	-	67
A-II	4.2	eser	-	-	22
B-100	eser	36.9	50-70	98	eser
B-48	22,5	eser	eser	-	-
Sentezi	Barsak	KC, barsak	Dolaşım	Dolaşım	Barsak, KC

LDL alımı için oldukça özgün reseptör aracılı yola ek olarak, dolaşımdaki makrofajlar yüksek düzeyde çöpçü reseptör aktivitesine sahiptir. Geniş bir ligand bağlama özgüllüğüne sahip bu reseptörler, kimyasal olarak değişikliğe uğramış LDL' nin endositozuna aracılık edebilirler. Dolaşımdaki LDL'yi reseptörler tarafından tanınabilen ligandlara dönüştüren kimyasal değişiklikler, apo B'nin asetilasyonu veya oksidasyonudur(11,18).

Apo B'nin değişiminde başlatıcı basamak LDL'lerdeki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonudur. LDL reseptörleri tarafından alınan aksine, makrofajlar tarafından alınan değişikliğe uğramış LDL hücre içi kolesterol düzeylerini düzenlemez, bu yüzden de kolesterol bu hücrelerde birikmeye başlar. Değişmiş LDL'lerin makrofajlar tarafından aşırı alımı bu hücrelerin köpük hücrelerine dönüşmesine neden olur. Köpük hücreleri de aterosklerotik plak oluşumuna katılırlar(18,26).

HDL partikülleri karaciğerde sentezlenir ve ekzositoz ile kana salıverilirler. Apo C-II'nin dolaşımdaki deposu olarak görev yaparlar. Ekstrahepatik doku



Şekil 7: Bir lipoprotein molekülünün yapısı (24).

lardan serbest kolesterolü uzaklaştırmak ve esterleştirmek, kolesterol esterlerini VLDL ve LDL'ye (triacilgliserollerle yer değiştirerek) transfer etmek, kolesterol esterlerini de KC'e taşımak gerçekleştirdikleri önemli işlevlerdir. HDL karaciğerde yıkılır ve kolesterol salıverilir(18).

Lipoproteinler hem lipidleri plazmada taşıırken çözünür tutmak hem de kendi lipid içeriklerini dokulara verebilmek için etkili bir mekanizma işlevini yerine getirirler. İnsanlarda dağıtım sistemi diğer hayvanlardan daha az gelişmiştir, bu yüzden insanlarda lipidlerin (özellikle kolesterolün) dokularda yavaş yavaş biriktiği görülmektedir. Bu lipid birikimi, kan damarlarının daralmasına neden olan, aterosklerotik plak oluşumuna katkıda bulunduğu potansiyel olarak hayatı tehdit edici olmaktadır(18).

Kan akışındaki türbülans ve arter çatallanmalarında ve/veya büklümlerde kesme gerilimindeki dalgalanmalar, endotel zedelenmesi ve işlev bozukluğuyla sonlanır. Bu duruma LDL kolesterol, diabet, sigara alışkanlığı, viral enfeksiyon, immün kompleksler, tanımlanmamış toksinler ve elementlerin neden olduğu izlenimi kuvvetlidir. Plazma lipoproteinlerinin, özellikle LDL ve VLDL'nin kronik olarak yükselmesinin, artmış ateroskleroz insidansı ile ilişkili olduğu bir çok epidemiyolojik çalışmada bulunmuştur(26,29).

Dokularda demir miktarının artmasının yol açan demir fazlalığı, aynı zamanda myokard infarktüsü riskinin artmasıyla da ilişkilidir. Bağlı olmayan inorganik demirin, reaktif oksijen radikallerinin (özellikle H_2O_2 'in oldukça reaktif OH⁻ radikallerine dönüşümünü) oluşumunu artırdığı ve oluşan oksijen radikallerinin LDL oksidasyonuna yol açtığı bilinmektedir(18).

Plazma LDL kolesterol düzeylerinin de 130 mg/dl'nin altında olması arzu edilir. 139-159 mg/dl arası risk açısından sınırdadır, 160 mg/dl'nin üzeri de koroner arter hastalığı (KAH) bulunmayanlar için yüksek risk kabul edilmektedir.

LDL kolesterol şu şekilde hesaplanır: $LDL = T. Kolesterol - HDL - TG / 5$

Düşük HDL kolesterol düzeyi de risk faktörlerinden olup, ortalama KAH riski 39 mg/dl düzeyindedir. HDL kolesterolü KAH insidansıyla ters yönde güçlü bir ilişki göstermekte olup, 60 mg/dl'nin üzerindeki HDL kolesterolü, koruyucu özellikte negatif bir risk faktörüdür. HDL'nin küçük hücrelerinden oksitlenmemiş LDL'yi taşıdığı hipotezi ileri sürülmektedir; oksitlenmemiş LDL kolesterol potansiyel olarak ters yönde taşınabilmektedir.

2.6.2. Apolipoproteinler:

Lipoprotein partiküllerinin yapısı bir bileşeni olarak işlev görürler. Ayrıca hücre yüzey reseptörleri için tanıma bölgeleri sağlarlar ve lipoprotein metabolizmasında yer alan enzimlerin aktivatörü veya koenzimi olarak da rol oynarlar. Yapı ve işlevleri açısından Apo A-I ve Apo C-II gibi alt sınıflara ayrılırlar, ancak birçoğunun fonksiyonu henüz bilinmemektedir(18),(Tablo 10).

Apolipoprotein A1: HDL'deki major proteinler olup, glomikronlarda da bulunur. HDL kütlelerinin %50'si protein olup %90 kadarı Apo A-I ve Apo A-II'den oluşmaktadır. Sentezlandığı yer henüz aydınlatılmamışsa da, A-I ve A-II'nin incebarsak ve karaciğer, veya her ikisinden kaynaklandığını düşündüren deneysel kanıtlar vardır. Fonksiyonu tamamen açıklığa kavuşmasa da HDL'de yapısı bir role sahip olduğu kesindir. Apo A1 Lesitin karnitin ağıl transferazın (LCAT) aktivasyonunda ve ekstraselüler dokulardan serbest kolesterolün çıkarılmasında da rol oynar. Yıkımının gerçekleştiği doku karaciğer, böbrek ya da olasılıkla her ikisidir(24).

Apolipoprotein B: Saf olarak çözünmezliği nedeniyle en az karakterize edilen apolipoproteindir. HDL hariç diğer lipoproteinlerin başlıca proteini olup, İnsanda en az iki şekilde bulunabildiği gösterilmiştir. Daha çok bulunan form Apo B-100 olarak bilinir ve karaciğerde sentezlenir. Diğer form Apo B-48 olup, incebarsak duvarında sentezlendiğine inanılmaktadır. Apo B' de diğer lipoproteinler gibi farklı immünolojik özelliklere sahip olduğundan bu; dolaşan Apo B düzeylerini tanımlama ve miktar tayininde kullanılan çeşitli polivalan antiserum ve monoklonal antikorların üretimine yolaçmıştır. VLDL olarak KC'den ayrılan Apo B'nin hepatik sentezi kg başına günde 10 mg'dır. Apo B pasif bir role sahip olduğu VLDL'nin, LDL'ye dönüşmesiyle ekstrahepatik hücelere lipid dağıtımında önemli bir rol üstlenir. Sinir sistemi ve kırmızı kan hücreleri dışında, bütün dokular LDL şeklinde Apo B için reseptörlere sahiptir. Reseptör bağımlı yol aracılığıyla hücreye alınan Apo B derhal lizozomal enzimler tarafından amino asit içeriklerine yıkılarak katabolize edilmektedir. Bir kısım Apo B' de temizleyici bir yolu içine alan reseptör bağımlı olmayan süreçler ile katabolize edilmektedir. Bu sürecin ateroskleroz gelişiminde önemli olabileceği düşünülmektedir. KAH riskinin değerlendirilmesinde, aterosklerozlu hastaların artmış plazma Apo B düzeylerinin, azalmış HDL kolesterol ve artmış LDL kolesterol düzeylerinden, daha kesin ayırdedici olduğunu destekleyen çalışmalar vardır(18,24).

2.7. Lipid Peroksidasyonu ve Ateroskleroz:

Aterosklerozun patogenezi ile serbest radikal reaksiyonları, lipid peroksidasyonu ve LDL'nin oksidatif modifikasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren kanıtlar giderek önem kazanmaktadır. Son yıllarda, ateroskleroz oluşturulan deney hayvanlarında ve aterosklerotik damar hastalıklarında, yoğun bir şekilde araştırılan bu ilişki konusundaki çalışmalar halen devam etmektedir(30).

Lipid peroksitleri hem yağ çizgilerinin, hem de ileri aterosklerotik lezyonların oluşmasında etkili olmaktadır. İnsanlarda ve deney hayvanlarında yapılan çalışmalara göre lipid peroksitlerinin ateroskleroz etyopatogenezindeki rolünün çok yönlü olduğu belirlenmiştir. Sitotoksik etkili olan oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyon ürünleri, damarların endotel tabakasında hasar oluşturarak, LDL infiltrasyonunu, trombosit adezyon ve agregasyonunu, büyüme faktörleri salgılan-

masını, prostasiklin/tromboksan denge bozukluğunu, iltihabi hücre birikimi ve düz kas hücre proliferasyonunu provoke ederler(10,29,30).

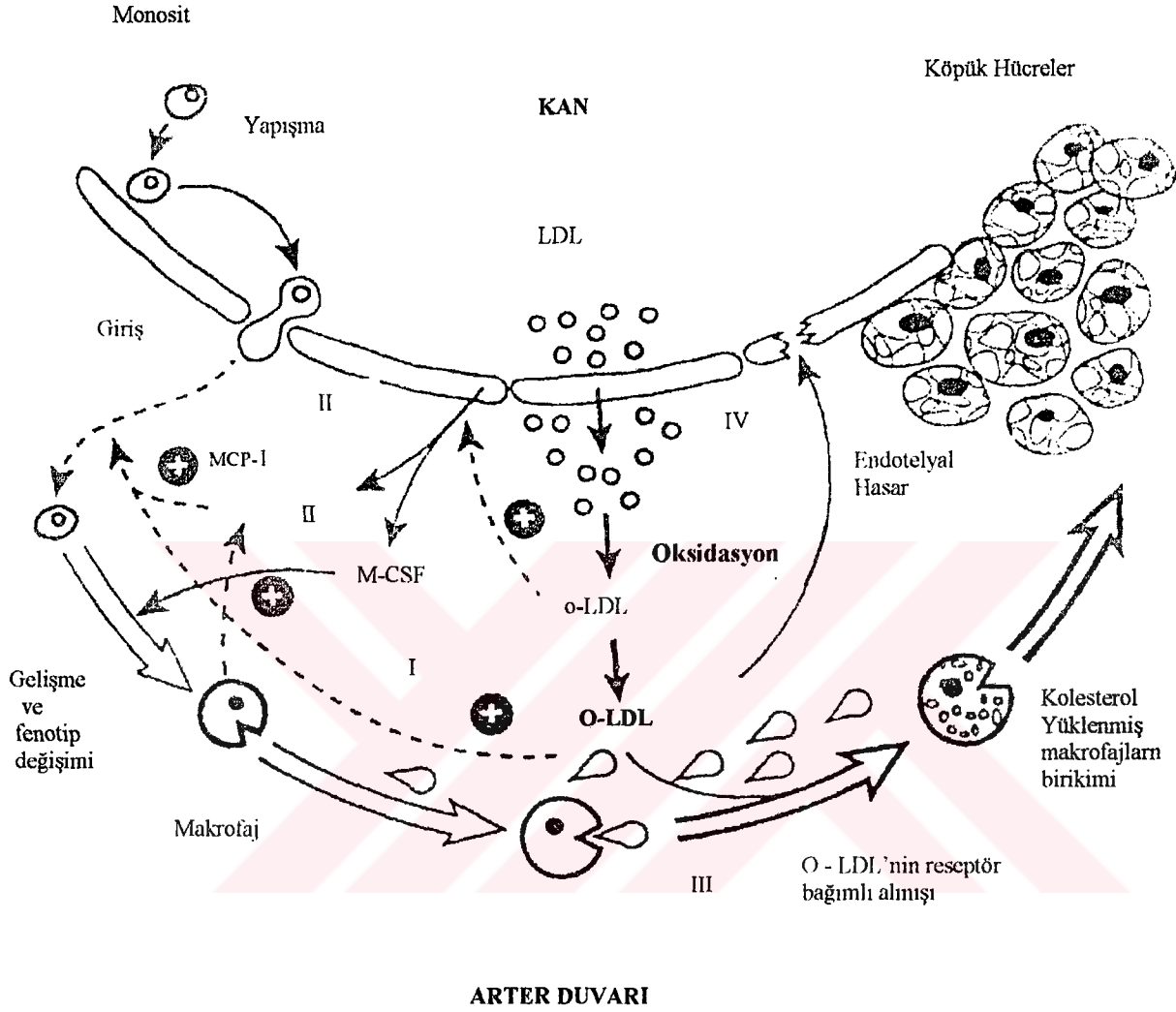
Aterosklerotik lezyonlarda biriken kolesterol primer olarak LDL dahil plazma lipoproteinlerinden oluşur. Aterosklerotik lezyonların başlangıcında lipid yüklü köpük hücreleri subendotelyal yüzeyde birikmiş olarak bulunurlar. İlerleyen süreçte bu hücrelerin çoğu ölür ve plak oluşumuyla sonuçlanan yağ çizgileri meydana gelir. Köpük hücrelerinin çoğu, doku makrofajlarından veya kemotaktik faktörlere cevap olarak vasküler intimaya giren ve endotelyum altına yerleşmeye başlayan monositlerden oluşur(10,31).

LDL'nin oksidasyonu iki basamakta gerçekleşir: Önce, sadece lipid yapısını etkileyen ılımlı bir oksidasyon oluşurken, daha ileri basamakta hem lipid hem de protein kısmını kapsayan bir oksidasyon olur. İn vitro LDL'nin oksidasyonunda damar sisteminin tüm hücreleri (endotelyal hücreler, düz kas hücreleri, trombosit, monosit ve makrofajlar) rol oynar. LDL, hücreden bağımsız sistemde ise demir ve bakır gibi geçiş metal iyonlarının düşük konsantrasyonları ile okside olabilmektedir. Bu oksidasyonda Cu^{+2} iyonları özellikle etkilidir(30,32).

Oksitlenmiş LDL köpük hücrelerinin oluşumuyla ilişkilidir. o-LDL'nin Apo B/E reseptörler tarafından tanınmadığı; damarların endotel altı bölgesinde makrofajlar ve düz kas hücrelerinin yüzeyinde bulunan çöpçü reseptörler tarafından tanındığı ve kontrol dışı bir mekanizma ile alınarak aşırı kolesterol birikimine yol açtığı bilinmektedir(10,22).

Endotel hücrelerini etkileyen bu oksitlenmiş LDL, bazı kimyasal bileşiklerin sentezini uyardığı için proaterojen olarak kabul edilmektedir. Sentezi uyarılan bu bileşiklerden;

- A- Monosit kemoatraktan molekül (MCP-1)'ün monositleri arter duvarına çektiği,
- B- Özel bir monosit adezyon molekülünün monositlerin, endotel hücrelerine yapışmasını sağladığı,
- C- Koloni stimüle edici faktör (M-CSF)'ün de monositlerin makrofajlara farklılaşmasını sağladığı bildirilmiştir(31,32).



- I : Okside LDL'de bulunup, doğal LDL'de bulunmayan kemotaktik faktörlerle dolaşımdaki monositlerin yakalanması
- II : Subendotelyuma yerleşen makrofajların hareketinin ve intimadan çıkma yeteneklerinin inhibisyonu
- III : Köpük hücrelerin oluşmasına neden olan yerli makrofajlar tarafından o-LDL'nin uptake'nde artış
- IV: Endotelial bütünlüğün kaybına yol açan o-LDL'nin sitotoksitesi

Şekil 8: LDL oksidasyonu ile ateroskleroz gelişiminin şematik modeli (10,31).

LDL 2,5 milyon dalton molekül ağırlıklı küresel bir partikül olup, merkezindeki kor yaklaşık 1600 kolesterol esteri ve 200 trigliserit molekülü içerir. Bu da yaklaşık 700 fosfolipid molekülü ve 600 serbest kolesterol molekülünden oluşmuş

tek tabaka bir kabuk ile çevrelenmiştir. Dış tabakada gömülmüş yaklaşık 500 bin dalton molekül ağırlığına sahip protein, Apo B adını alır ki; bu doğal LDL'de LDL reseptörlerince tanınan proteindir. LDL'nin oksidasyonu, lipid peroksidasyonu ürünleri ile Apo B'nin bazı parçalarının (lizin kalıntılarının ϵ -amino grupları özellikle hassas) kimyasal modifikasyonundan çok çabuk etkilenir. Lipoprotein yapısındaki oksidasyonun ilerlemesi Apo B-100'ün daha ufak peptitlere ayrılmasına, histidin, lizin ve prolin içeriğinde azalmaya neden olur. LDL'nin çoklu doymamış yağasidi ve antioksidan içeriğinin azaldığı, lizolesitin içeriğinde ise artış olduğu bildirilmiştir. LDL'nin modifikasyonu; asetil-LDL, asetoasetil-LDL ve MDA-LDL şeklinde olur. Bu şekilde modifiye olmuş partiküller artık, LDL reseptörlerine bağlanamaz, fakat LDL reseptörlerinden farklı asetil-LDL (scavenger) reseptöre bağlanırlar ve makrofajlar tarafından alınırlar(9,10,12,32),(Şekil 7,8).

Serbest esterleşmiş şekilde kolesterol molekülü içeren LDL partikülü, başlıcaları linoleik, araşidonik ve decasohexoenik asit olan, çoklu doymamış yağ asitleri ve farklı lipid türlerinde ortalama 2600 kadar da bağlı yağ asidi içermektedir. Dolayısıyla LDL yalnız kolesterol bakımından zengin olmayıp lipid peroksidasyonuna oldukça duyarlı olduğu bilinen çoklu doymamış yağ asitlerince de zengindir. Major antioksidan α -tokoferolden başka yaklaşık 7 molekül antioksidan herbir LDL partikülünde mevcut olup bu yağasitlerini korumaktadır(9)

LDL oksidasyonu makrofajlar, endotelial hücreler, düz kas hücreleri, lenfositler veya bir kısım prooksidanların kullanıldığı hücre bağımsız sistemlerde in vitro inkübasyonla başarılabilmektedir(30).

Tablo 11: Oksidatif olarak (in vitro) değişikliğe uğramış LDL'yi doğal LDL'den ayıran özellikler (10).

- Asetil LDL veya temizleyici reseptör yoluyla köpük hücre oluşumuna öncülük eden artmış uptake
 - LDL reseptörü aracılığıyla azalmış uptake oranı
 - Artmış negatif yük
 - Artmış lizolesitin içeriği
 - Oksidasyon nedeniyle azalmış çoklu doymamış yağasidi içeriği
 - Kolesterolün okside şeklinin artmış içeriği
 - Apo B 100'ün parçalanması; azalmış histidin, lizin ve prolin içeriği
 - Dolaşımdaki monositler için artmış aktivite
 - Sitotoksisite
-

LDL'nin oksidasyonu, okside proformdan veya metal iyonlarının varlığında lipid alkoksi, lipid peroksi ve hidroksil radikalleriyle ilgili olarak ayrışan lipooksijenaz ürünü lipid hidroperoksitleri veya hidrojen peroksitten meydana gelebilir. Oluşan karbon merkezli PUFA radikali derhal komşu PUFA'dan bir H atomu ayırır ve biçimi değişen yeni PUFA radikali lipid peroksil radikali ve moleküler O₂ ile etkileşerek lipid hidroperoksit oluşumuna, dolayısıyla zincir uzamasına yol açar(5,9,16).

Peroksidasyon reaksiyonları sonucu oluşan aldehid gruplarının, LDL apo-proteinini modifiye ederek onun reseptör ilgisini değiştirdiği ve neticede modifiye LDL'nin makrofajlar tarafından kontrolsüz bir şekilde alınıp, damar cidarında depolanmasına yol açtığı ifade edilmektedir. Başlangıçta, köpük hücre karakterinde ortaya çıkan modifiye LDL bakımından zengin makrofajlar, antimikrobiyal fonksiyonları gereği aşırı derecede serbest oksijen radikali üretimine de yol açarak ceroid (polimerize okside lipidler) adını alan çözünmez karakterli bir lipid-protein kompleksinin oluşmasına neden olurlar. Bu kompleksin, aterosklerotik plak oluşumunda önemli fonksiyona sahip olduğu düşünülmektedir. Ceroid bakımından zengin plak yapısında, oksitlenmiş modifiye kolesterol ve yağ asidi türevleri fazla miktarda bulunmasına rağmen, linoleik ve araşidonik asit gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin olmaması sebest radikal hasarının, bu oluşumdaki rolünü açıkça ortaya koymaktadır(12,18,33),(Tablo 11).

İntimadaki antioksidan gücün zayıf olması, bu bölgeye gelen LDL'nin tutulma süresinin uzun olması ve serumun antioksidan potansiyelden yoksun kalması oksidasyonu kolaylaştırıcı faktörlerdir. LDL'nin oksidasyona duyarlılığını, taneceğin antioksidan içeriğinin yanısıra, çoklu doymamış yağ asidi içeriğine bağlı olduğu bilinmektedir(9,32).

Lipid peroksitlerinin ateroskleroz patogenezindeki rolünün, sadece LDL'nin oksidasyonu ile kısıtlı olmadığı düşünülmektedir. Genel kanı ateroskleroz oluşumunun lipid peroksidasyonundaki artış ile birlikte olmasıdır. Ancak bazı araştırmacılar (daha ileri bir yorumla) lipid peroksitlerinin, diğer risk faktörlerinden bağımsız olabileceğini ileri sürmüşlerdir(32).

3. YÖNTEM VE GEREÇLER

3.1. Örneklerin Toplanması ve Çalışma İçin Hazırlanması:

Bu araştırma Divriği Demir Madeni İşletmesinde çalışan 32 işçi (Yaş±1 S. Sapma), (42.19±5.92) ve 26 memur (39.58±6.46) ile, kontrol grubu olarak maden işletmesiyle ilgisi olmayan 14 sağlıklı (42±4.08) kişiden alınan kan örnekleri üzerinde yapıldı.

İşçi ve memur grubundan örnek almak için Sivas il merkezine 180 km. uzaklıkta bulunan Divriği ilçesine gidildi ve 12 saat açlık sonrası, alınan venöz kanlar iki kısma ayrıldı. Serum demir, TDBK, ferritin ve lipid parametrelerinin tayini için cam tüplere alınan kan örneklerinden Hettich EBA 3S masa santrifüjünde (3000 x g'de 10 dk.) serumları ayrıldı.

MDA tayini için de, lityum heparinli polipropilen tüplere alınan kan örneklerinden; Heraus Minifuge 2 soğutmalı santrifüjde, (+4 °C, 1500 x g' de 10 dk.) santrifüjlendikten sonra plazma örnekleri elde edildi. Bu örneklerde oluşabilecek otooksidasyonu önlemek için 1 ml plazmaya 10 µl EDTA (1,34 mmol/L) ve aynı miktarda GSH (0,65 mmol/L) ilave edildi(21,34).

Kontrol grubunu oluşturan 14 kişiden de, 12 saat açlık sonrası alınan kanlar aynı işlemlere tabi tutularak serum ve plazma örnekleri elde edildi. Bu arada ateroskleroz gelişiminde risk faktörlerinden olması nedeniyle, deneklere sigara içip içmedikleri de sorularak kaydedildi.

Elde edilen plazma örnekleri ve bir miktar serum (Apo AI ve B tayini için) İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Laboratuvarı'na götürüldü. Örnekler çalışma gününe kadar derin dondurucuda (-20 °C) saklandı.

3.2. Gereçler:

- 1-Terazi (Scaltec SBA 31)
- 2-Balon joje (50, 100 ml)
- 3-Pipet (20, 200µl, 1ml)
- 4-Vorteks (Nüvemix)
- 5-Santrifüj (Hettich EBA 3S, Heraus Minifuge 2)
- 6-Su banyosu (LKB Bromma)
- 7-Spektrofotometre (LKB Novaspec II)

8-Spektrofluorometre (Hitachi 4010)

9-Otoanalizör (Kodak Ektachem 500, Hitachi 911, Olympus AU 600)

3.3. Gerekli Kimyasal Madde ve Çözeltiler:

1- Heparin (lityum tuzu) 50 bin Ü.

2- 2-Thiobarbituric asid (4,6 Dhydroxypyri-midine-2-thiol) 25 gr.

3- n-Butanol (Butyl alcohol) 500 ml.

4-Malonaldehide bis dimethyl acetal (1,1,3,3-Tetramethoxy-propane) 100 ml. Sigma firmasından satın alınarak, EDTA, GSH, HCl ve NaH₂PO₄. H₂O Biyokimya Ana Bilim Dalı'ndan sağlandı.

3.4. Deneylerin Yapılması:

Serum demir düzeyleri, Johnson & Johnson firmasının ticari kiti kullanılarak, Kodak Ektachem 500 otoanalizörde kolorimetrik slayt yöntemiyle çalışıldı. Total demir bağlama kapasitesi (TDBK) düzeyleri de yine, aynı firma tarafından üretilen reaktifler ile Starr'ın Alüminyum mini kolon yöntemi kullanılarak tayin edildi(35).

Serum ferritin düzeyleri Bio M'eriux firmasının (Ferritin EIA) ticari kiti kullanılarak, enzim immünassay yöntemiyle tayin edildi.

Serum trigliserit ve T. kolesterol düzeyleri Boehringer Mannheim firmasının ticari kitleri kullanılarak enzimatik kolorimetrik yöntem ile Hitachi 911 otoanalizörde çalışılırken, HDL kolesterol tayinleri Biobak firmasının kiti kullanılarak, VLDL ve LDL'nin fosfotungstik asit ve magnezyum klorür ilave edilerek çöktürülmesi yöntemiyle tayin edildikten sonra;

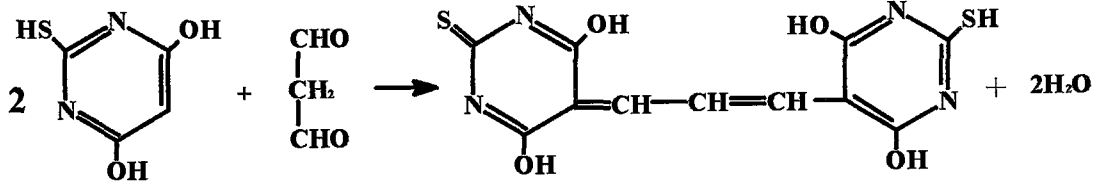
$$\text{LDL kolesterol} = \text{Total Kolesterol} - \text{HDL Kolesterol} - \text{Trigliserit} / 5$$
formülünden yararlanarak, LDL düzeyleri de tayin edildi(36).

Apo AI ve Apo B düzeyleri, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastahanesi biyokimya laboratuvarında, Olympus AU 600 otoanalizörde (İmmünotürbidimetrik yöntem ile) çalışıldı.

3.5. Malondialdehid Deneyi:

Plazma malondialdehid düzeyleri Wasowicz ve arkadaşlarının önerdiği metod modifiye edilerek çalışıldı. Bu metotta, asidik ortamdaki tiobarbitürik asit 95 °C'de MDA ile kompleks yaparak pembe renkli kromojen oluşturur (Şekil 9).

Bu kromojenin n-butanol ekstraktı floresans spektrofotometrede ekstinksiyon; 525 nm, emisyon; 547 nm dalga boyunda ölçülür ve önceden hazırlanan malondialdehid standart eğri grafiği kullanılarak, örnek MDA düzeyleri tayin edilir(21).



Şekil 9: Malondialdehidin tiobarbitürik asit ile reaksiyonu (12).

1- 29 mmol/L TBA çözeltisi: Önce 75 mM NaH₂PO₄ tamponu (pH 2,8) hazırlandı. Bunun için 1,035 gr NaH₂PO₄.H₂O bir miktar deiyonize suda çözülerek 80 ml' ye tamamlandıktan sonra, bu tampona 0,418 gr TBA katılarak çözünmesi sağlandı ve pH'sı 2,8'e gelinceye kadar 0,1 N HCl ilave edildi. Daha sonra deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2- Stok standart çözeltisi (20 mmol/L): 329 µL 1,1,3,tetramethoxypropane (MDA) alınarak 100 ml etanolde çözüldü.(4 °C' de 1 ay stabildir)

3-Çalışma standart Çözeltisi:

- A-)10 µmol/L: Stokdan 5 µl alınarak deiyonize su ile 10 ml'ye tamamlandı.
- B-) 8 µmol/L: A çözeltisinden 0,8 ml alındı, 0,2 ml deiyonize su eklendi.
- C-) 6 µmol/L: " " 0,6 ml " 0,4 ml " " "
- D-) 4 µmol/L: " " 0,4 ml " 0,6 ml " " "
- E-) 2 µmol/L: " " 0,2 ml " 0,8 ml " " "
- F-) 1 µmol/L: " " 0,1 ml " 0,9 ml " " "
- G-) 0,8 µmol/L: F çözeltisinden 0,8 ml alındı, 0,2 ml deiyonize su eklendi.
- H-) 0,6 µmol/L: " " 0,6 ml " 0,4 ml " " "
- I-) 0,4 µmol/L: " " 0,4 ml " 0,6 ml " " "
- J-) 0,2 µmol/L: " " 0,2 ml " 0,8 ml " " "
- K-) 0,1 µmol/L: " " 0,1 ml " 0,9 ml " " "

(Stabil olmayan bu standart çözeltiler her gün hazırlanmak zorundadır.)

4- 6 mol/L HCl: % 37'lik stok HCl çözeltisinden 5 ml alınarak deiyonize su ile 10 ml'ye tamamlandı.

Tablo 12: Plazma MDA deneyi çalışma şeması:

	Numune	Numune körü	Standart	Standart körü
Deiyonize su	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Plazma	50 µl	50 µl	—	—
Standart	—	—	50 µl	50 µl
TBA çözeltisi	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

5 sn. vortekslelendikten sonra tüpler inkübasyona kaldırıldı.

İnkübasyon	95 °C	25 °C	95 °C	25 °C
------------	-------	-------	-------	-------

İnkübasyondan çıkarılan tüpler su altında biraz soğutulduktan sonra buz içine konarak tamamen soğumaları ve reaksiyonun durması sağlandı.

6 M HCl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
n-Butanol	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml

Tüpler yaklaşık 5 dk. çalkalanarak ekstraksiyonun tamamlanması sağlandı. Örnek tüpleri 1500 x g' de 10 dk santrifüj edildikten sonra, üstte kalan butanol fazı ölçümlerde kullanılarak, standartlarla birlikte 525 nm ekstinksiyon ve 547 nm emisyonunda spektrofotometrik ölçümler yapıldı(Tablo 12).

Hazırlanan standart örneklerin fluoresans değerleri arbitrary ünite olarak aşağıdaki gibi spektrofotometrede okundu:

- 0,2 µmol MDA → 9,03
- 0,4 " MDA → 12,94
- 0,8 " MDA → 18,15
- 1 " MDA → 22,57
- 2 " MDA → 34,89
- 4 " MDA → 54,23
- 6 " MDA → 79,62 değerleri elde edildi.

X eksenine TBARS (µmol/L olarak MDA), Y eksenine fluoresans arbitrary (tanımlanamayan) ünite yerleştirilerek, standart eğri grafiği çizildi. Daha sonra bu grafik yardımıyla, örneklerin okunan fluoresans değerlerine karşılık gelen MDA konsantrasyonları µmol/L olarak hesaplandı.

3.6. İstatistiksel Değerlendirme:

Bulguların istatistiksel değerlendirmesinde, Windows SPSS paket bilgisayar programında, Kruskal-Wallis varyans analizi kullanılarak, gruplar arasında fark olup olmadığı belirlendi. Farklılık gösteren grup ya da gruplar belirlenirken de Man-Whitney U testi kullanıldı. Ölçümler sonucunda elde edilen bulgular, aritmetik ortalama \pm standart hata olarak verildi(37).



4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen ve yaşları 31-55 arasında değişen maden işçilerinin yaş ortalaması: 42.2, yaşları 31-52 arasında olan memurların: 39.6 ve yine yaşları, 38-50 arasında olan kontrol grubunun da: 42 olup, çalışanlar ve kontrol grubunu oluşturan tüm denekler erkeklerden oluşmaktaydı.

Maden işçilerinin çalışma süreleri ortalama olarak yaklaşık 16, memur ve idari personelin 11 yıl idi.

İşçilerden meydana gelen birinci grupta serum demir düzeyleri ortalaması; 129 ± 6.77 µg/dl, TDBK ortalaması; 422.69 ± 10.33 µg/dl ve ferritin düzeyleri ortalaması da; 161.41 ± 16.3 µg/L olarak bulundu. Memurlar ve idari personelden oluşan ikinci grupta demir düzeyleri ortalaması; 125.77 ± 8.62 µg/dl, TDBK ortalaması; 420.73 ± 11.6 µg/dl ve ferritin düzeyleri ortalaması da; 120.08 ± 13.2 µg/L ve kontrol grubunun oluşturduğu üçüncü grupta da bu değerler, aynı sıra ile 67.64 ± 3.20 µg/dl, 435.5 ± 13.51 µg/dl ve 90.07 ± 14.41 µg/L olarak bulundu.

Plazma malondialdehid düzeyleri ortalaması ise 1. grup da; 2.25 ± 0.18 µmol/L, 2. grupta 1.73 ± 0.10 µmol/L ve 3. grupta da 0.79 ± 0.07 µmol/L olarak bulundu (Tablo 13, Şekil 10,11).

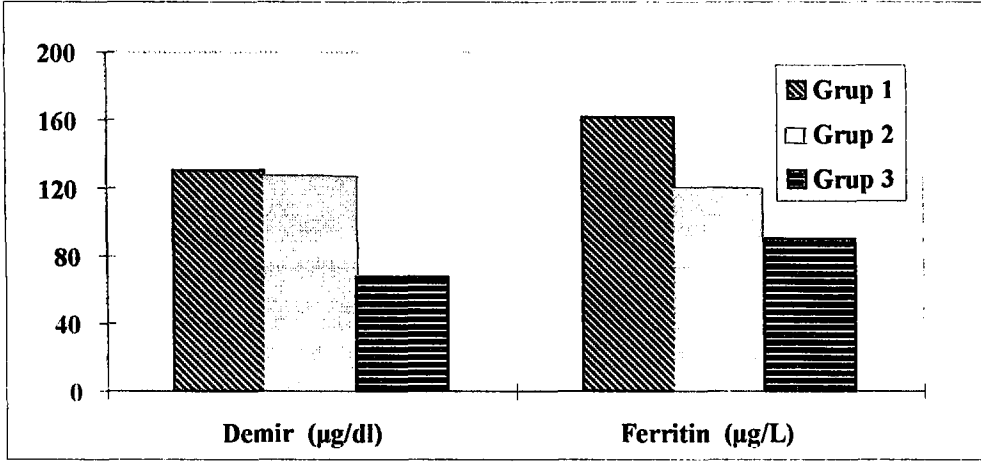
Tablo 13: Gruplara ait demir, TDBK, ferritin ve MDA düzeyleri (Ort. ± S.hata)

	Demir (µg/dl)	TDBK (µg/dl)	Ferritin (µg/L)	MDA (µmol/L)
Grup 1 (n=32)	129.41 ± 6.77	422.69 ± 10.33	161.41 ± 16.30	2.25 ± 0.18
Grup 2 (n=26)	125.77 ± 8.62	420.73 ± 11.60	120.08 ± 13.20	1.73 ± 0.10
Grup 3 (n=14)	67.64 ± 3.20	435.50 ± 13.51	90.07 ± 14.41	0.79 ± 0.07

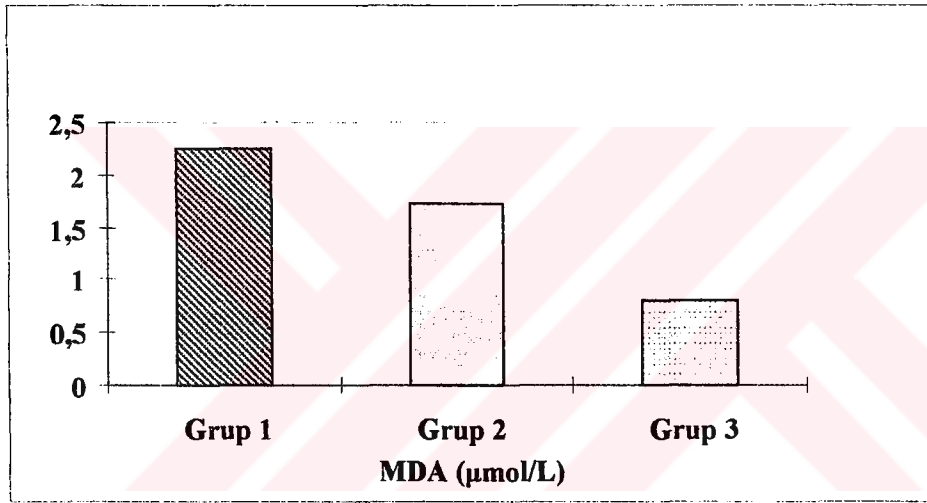
Gruplara ait trigliserit, total kolesterol, HDL ve LDL kolesterol ile apolipoprotein AI ve apolipoprotein B'den oluşan, lipid düzeyleri ortalamaları da tablo da görülmektedir (Tablo 14, Şekil 12).

Tablo 14: Gruplara ait, lipid ve lipoprotein düzeyleri ortalamaları (mg/dl)

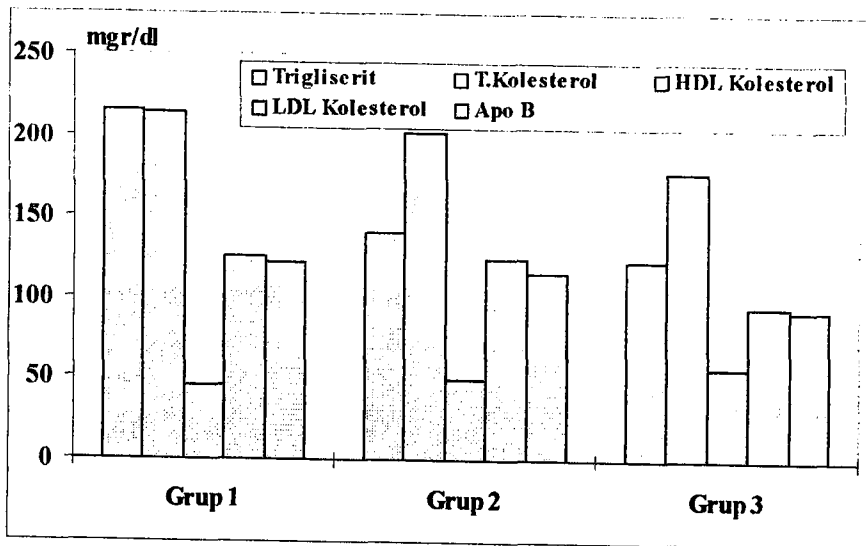
Gruplar	Trigliserit	T. kolesterol	HDL kolest.	LDL kolest.	Apo AI	Apo B
1 (n=32)	215.69 ± 18.1	214.31 ± 6.5	45.84 ± 1.3	125.50 ± 6.9	121.00 ± 3.1	121.91 ± 4.8
2 (n=26)	140.31 ± 11.0	201.81 ± 7.2	49.38 ± 1.5	124.73 ± 7.1	121.42 ± 2.9	115.62 ± 4.8
3 (n=14)	123.0 ± 9.1	177.07 ± 4.5	57.07 ± 1.6	95.36 ± 4.9	125.79 ± 2.7	91.86 ± 2.9



Şekil 10: Demir ve ferritin düzeyleri ortalamalarının grafik şekli.



Şekil 11: Deney gruplarına ait MDA düzeyleri ortalamasının grafik şekli.



Şekil 12: Grupların lipid parametreleri ortalamalarının grafik şekli.

İstatistiksel değerlendirmede verilerimiz normal dağılışa uygunluk göstermediğinden, her üç gruba ait serum demir, TDBK, ferritin ve lipid parametreleri

Tablo 15: Bulguların Kruskal-Wallis varyans analiziyle değerlendirilmesi

Parametre	Grup	n	A.Ortalama ± S.hata	KW değeri	p (önemlilik derecesi)
Demir	1	32	129.41 ± 6.77	24.43	< 0.05
	2	26	125.77 ± 8.62		
	3	14	67.64 ± 3.20		
TDBK	1	32	422.69 ± 10.33	0.97	> 0.05
	2	26	420.73 ± 11.60		
	3	14	435.50 ± 13.51		
Ferritin	1	32	161.41 ± 16.30	9.83	< 0.05
	2	26	120.08 ± 13.20		
	3	14	90.07 ± 14.41		
MDA	1	32	2.25 ± 0.18	32.53	< 0.05
	2	26	1.73 ± 0.10		
	3	14	0.79 ± 0.07		
Trigliserit	1	32	215.69 ± 18.15	11.82	< 0.05
	2	26	140.31 ± 11.01		
	3	14	123.00 ± 9.19		
T.Kolesterol	1	32	214.31 ± 6.52	11.34	< 0.05
	2	26	201.81 ± 7.29		
	3	14	177.07 ± 4.56		
HDL Kol.	1	32	45.84 ± 1.34	16.35	< 0.05
	2	26	49.38 ± 1.53		
	3	14	57.07 ± 1.65		
LDL Kol.	1	32	125.50 ± 6.95	7.42	< 0.05
	2	26	124.73 ± 7.18		
	3	14	95.36 ± 4.97		
HDL/T.Kol.	1	32	0.23 ± 0.01	14.66	< 0.05
	2	26	0.26 ± 0.02		
	3	14	0.33 ± 0.02		
LDL/T.Kol.	1	32	0.57 ± 0.02	7.42	< 0.05
	2	26	0.61 ± 0.01		
	3	14	0.53 ± 0.02		
Apo AI	1	32	121.00 ± 3.15	2.99	> 0.05
	2	26	121.42 ± 2.96		
	3	14	125.79 ± 2.78		
Apo B	1	32	121.91 ± 4.80	14.18	< 0.05
	2	26	115.62 ± 4.84		
	3	14	91.86 ± 2.98		
Apo B/AI	1	32	1.03 ± 0.05	15.24	< 0.05
	2	26	0.97 ± 0.05		
	3	14	0.73 ± 0.03		

ile plazma malondialdehid düzeyleri arasında fark olup olmadığı Kruskall-Wallis varyans analizi kullanılarak karşılaştırıldı(Tablo 15).

Analiz sonucuna göre, istatistiksel fark gösteren grup ya da gruplar belirlenirken de, Man-Whitney U testi kullanıldı.

Ayrıca ateroskleroz risk tayini amacı ile kullanılan, HDL ve LDL kolesterolün, total kolesterole ve apo AI'in apo B'ye oranları da hesaplandı. Hesaplanan bu değerler de tablo 15'de verilmiştir.

İşçilerin yaş ortalaması 42.2 ± 1.05 , 2.grubun 39.6 ± 1.27 ve kontrol grubunun da 42 ± 1.09 olup, yaş bakımından gruplar arası fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p > 0.05$).

Birinci grup (işçiler), ikinci grup (idari personel ve memurlar) ve üçüncü gruba (kontrol grubu) ait serum demir düzeyleri karşılaştırıldığında; gruplar arası fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Kruskall-Wallis varyans analizine göre, tüm parametrelerdeki, gruplar arası istatistiksel fark değerleri tablo 15'de verilmiştir. Analiz sonucuna göre, fark gösteren grup ya da gruplar Man-Whitney U testi kullanılarak belirlendi. Buna göre, demir düzeyleri ikişerli karşılaştırıldığında, 1. ile 2. grup arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz iken ($p > 0.05$), 1. ile 3. ve 2. ile 3. gruplar arasındaki fark, önemli ($p < 0.05$) bulundu.

TDBK yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p > 0.05$).

Ferritin düzeyleri karşılaştırıldığında, 1. ile 2. ve 1. ile 3. grup arasındaki fark önemli ($p < 0.05$) bulunurken, 2.ile 3. grup arasındaki fark önemsiz ($p > 0.05$) bulundu.

Plazma MDA düzeyleri karşılaştırıldığında, 1. ile 2. grup arasındaki fark önemli ($p < 0.05$) bulunurken, 1. ile 3. ve 2. ile 3. gruplar arasındaki fark oldukça önemli ($p < 0.001$) bulundu.

Lipid parametrelerinden trigliserit düzeyleri yönünden 1. ile 2. ve 2. ile 3. grup arasındaki fark önemli ($p < 0.05$) bulunurken, 2 ile 3. grup arasında fark önemsiz ($p > 0.05$) bulundu.

Gruplara ait T. kolesterol, HDL ve LDL kolesterol düzeyleri ile, HDL'nin T.kolesterole ve LDL'nin T. kolesterole oranı değerleri yine ikişerli olarak

karşılaştırıldığında, her bir parametre için aynı şekilde olmak üzere; 1. ile 2. grup arasındaki farklar önemsiz ($p > 0.05$) bulunurken, 1. ile 3. ve 2. ile 3. grup arasındaki farklar önemli ($p < 0.05$) bulundu.

Apo AI düzeyleri yönünden, üç grup arasında fark olmakla birlikte, bu istatistiksel olarak önemsizdi ($p > 0.05$).

Apo B düzeyleri karşılaştırıldığında ise, yine 1. ile 2. grup arasındaki fark önemsiz ($p > 0.05$) iken, 1. ile 3. ve 2. ile 3. grup arasındaki fark istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) bulundu.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ:

Demir katalizli reaktif oksijen türlerinin oluşumu, diabet, ateroskleroz, kanser, myokard enfarktüsü, enfarktüs sonrası reperfüzyon hasarı ve demir fazlalığı durumlarını içine alan bir çok hastalığın patogenezi ile ilişkilendirilmiştir(2,18).

Dokularda demir miktarının artmasına yol açan demir fazlalığı, çeşitli patolojik durumlarla sonuçlanabilmektedir. Bağlı olmayan inorganik demirin hem reaktif oksijen radikalleri oluşumunu artırarak, hem de lipid peroksidasyonu sürecine katılarak değişik hastalıkların etyopatogenezinde rol oynadığı, yapılan hayvan deneyleriyle birlikte, pek çok klinik çalışmadan elde edilen verilerle de kanıtlanmıştır(8,13,38).

Metal iyonları lipid peroksitlerin sitotoksik ürünlere ayrışımını kolaylaştırır ve hasarlı dokularda lipid peroksidasyonu sağlıklı olanlardan daha hızlı ilerler. Bu dokularda peroksidasyona yatkınlıktaki artış, antioksidanların inaktivasyonunun ve metal iyonlarının hücre içinden serbestleşmesinin neticesidir. Aterosklerotik lezyonlardaki demir bağlayan proteinlerin, makrofajlarca üretilen $O_2^{\cdot-}$ ve OH^{\cdot} radikallerine maruz kaldıklarında bu yapılardan, demir iyonu salınımına neden olabilecekleri ileri sürülmüştür. Deney hayvanlarında demirin iskemik myokardiyal hasarı hızlandırdığı da bulunmuştur(12,32).

Dabbagh ve arkadaşları karbonil demir diyeti ile demir fazlalığı oluşturulan ratlarda karaciğer ve plazma antioksidan düzeylerinin azaldığını, hepatik hasara bağlı demir fazlalığının, plazma lipid profilinde de değişikliklere neden olduğunu göstermişlerdir. Çalışmada α -tokoferol, askorbik asit gibi antioksidanların kontrol grubuna göre düşük, lipid hidroperoksitlerin yanısıra, trigliserit ve kolesterol düzeylerinin de kontrollerden yüksek olduğunu bulmuşlardır(38).

Demir fazlalıklı hastaların plazmasında Bleomycin ile tayin edilebilen demir komplekslerinin, radikal reaksiyonlarının etkili hızlandırıcıları olduğu bulunmuştur. Gutteridge, düşük molekül ağırlıklı demir komplekslerinin ölçümü için bleomycin ile DNA'nın yıkımına dayanan yeni bir metodla, idiopatik hemokromatozlu hasta serumlarında 1.3-19.4 $\mu\text{mol/L}$ arasında demir bulmuşlardır. Bu, transferrine bağlı olmayan

plazma demirinin gösterildiği, tamamıyla doymuş transferrinli talasemik hastalarda bulunan, düşük molekül ağırlıklı demir kompleksinden oluşmaktaydı.

Düşük molekül ağırlıklı demir kompleksleri zararlı oksijen ürünlerinin oluşumunda etkilidirler. İnsan plazmasında demirin serbest radikal oluşumu katalizine katılmasında başlıca koruyucu mekanizma, onun transferrine bağlanmasıdır. Gutteridge'nin çalışmasının dikkate değer yönü, transferrine bağlı olmayan plazma demirinin (NTPI), demir fazlalığının toksik etkileriyle doğrudan ilişkili olmasıydı(19). Son olarak Hersko, rat kalp kültür hücrelerinde düşük molekül ağırlıklı demirin, myokardiyal uptake'nin transferrin demirinkinden 200 kat daha fazla olduğunu göstermiştir ki, bu uptake artmış lipid peroksidasyonu ile sonuçlanmaktadır(39).

Nielsen ve çalışma arkadaşları HPLC ve atomik absorpsiyon spektroskopi metodu ile, diyetine 3.5.5-trimethylhexanoyl-ferrocene (demir) yüklenen ratlarda yüksek miktarlarda, serumda transferine bağlı olmayan demir, karaciğer homojenat ve sitozolik fraksiyonunda da, düşük molekül ağırlıklı demir varlığını göstermişlerdir(40).

Reaktiflerdeki demirin TBAR madde konsantrasyonlarına etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, deney ortamına ilave edilen ferröz (Fe^{+2}) demirin TBAR madde oluşumunu hızla artırdığı, ferrik (Fe^{+3}) demir konsantrasyonunun ise ancak 20 μM 'e ulaştığı zaman TBAR madde oluşumunda artış meydana getirdiği gözlenmiştir. Duthie ve arkadaşları bunu, transferrine bağlanan ferrik demirin, transferrin tamamen doyduktan sonra, Fenton katalizörlüğü için substrat oluşturma olasılığına yorumlamışlardır(34).

Biz atomik absorpsiyon veya bleomycin ile tayin metodu gibi, değişik metodlarla tayin edilen, transferrine bağlı olmayan demiri tayin edemesek de, demir madeninde çalışan işçi ve memur gruplarında, kontrol grubuna oranla yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı, serum demir düzeyleri bulduk. Maden işçilerinde serum demir düzeyleri $129.41 \pm 6.77 \mu g/dl$ işletmede çalışan diğer personelde $125.77 \pm 8.62 \mu g/dl$ olarak bulunurken, kontrol grubunda $67.64 \pm 3.20 \mu g/dl$ olarak bulundu. Birinci grup ile 2. grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken ($p > 0,05$), her iki

grup ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlı ($p < 0,05$) bulundu. TDBK düzeyleri yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p > 0,05$) değildi.

Son zamanlarda H_2O_2 ve heme'in fizyolojik konsantrasyonlardaki bileşiminin, in vitro LDL'nin hızlı peroksidasyonuna neden olduğu ve yıkılan hem halkasından serbest demir salındığı kanıtlanmıştır(41).

Demir fazlalığı olan herediter hemokromatozlu hastalarda, transferrine bağlı olmayan serbest demir serumda mevcut olup, konsantrasyonu ferritin konsantrasyonu ile son derece ilişkilidir. İskemik myokard hasarının demir şelatlayıcı tedavi ile sınırlandırılabilirdiği veya önlenemediğini destekleyen birçok çalışma vardır. Demir şelatyonunun ratlarda postiskemik lipid peroksidasyonunu önlediğinde bulunmuştur.

Salonen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada demir fazlalığının KAH için bir çok risk faktörü ile ilişkisi olduğunu göstermişlerdir. Buna göre Serum ferritini, kan glukozu, trigliserit, HDL kolesterol ve Apo B konsantrasyonu ile anlamlı ilişkilere sahipti. Hepatik demir depoları ve HDL kolesterol seviyeleri arasında ise ters ilişki vardı(41).

Onların örneklerinde buldukları $166 \mu\text{g/L}$ olan serum ferritin konsantrasyonu ortalaması daha önce yapılan popülasyon çalışmalarında gözlenen erişkin erkek ortalamasından biraz yüksek idi. Washington eyaletinde yaşları 18-45 arasında olan 1564 erkekte median $94 \mu\text{g/L}$ bulunurken, İzlanda'da yapılan bir başka çalışmada da yaşları 25-74 arasında değişen rasgele seçilmiş 925 erkekte, ortalama serum ferritin konsantrasyonu $198 \mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur.

Artmış depo demirinin KAH'deki rolünün deneysel ilk kanıtını sağlayan Salonen'in çalışması, yükselmiş serum ferritin düzeylerinin, akut myokard infarktüsü için güçlü bir risk faktörü olabileceğini göstermiş olup, bu riskin serum LDL kolesterol konsantrasyonu 193 mg/dl veya üzerinde olanlarda, diğerlerinden daha yüksek olduğu bulunmuştur(41).

Dai ve arkadaşları düşük askorbat konsantrasyonlarının ferritinden demir salıncı yeteneğe sahip olduğunu ve böylece LDL'nin demir katalizli oksidasyonunu uyularak TBAR madde oluşumunu ve elektroforetik mobilitayı artırdığını göstermiş-

tir. Eser miktarlarda geçiş metalleri varlığında düşük askorbat konsantrasyonları makrofaq ceroid oluşumunu artırırken, yüksek askorbat konsantrasyonları onu inhibe etmektedir. Ferritin varlığında da LDL oksidasyonuna askorbatın etkisinin konsantrasyona bağlı olarak değiştiiğini gözlediler. 15-30 µM askorbat LDL oksidasyonunu stimüle ederken 250 µM askorbat inhibe etmektedir. oėalan kanıtlar, geçiş metallerinden demirin, bu süreçte önemli bir rol oynayabileceğini ve ferritin-askorbat kombinasyonunun in vivo LDL oksidasyonunun fizyolojik bir aracısı olabileceğini düşündürmektedir(33).

Demir fazlalığında intrasellüler labil demir havuzundaki olası artışın lipid peroksidasyonunu katalitik olarak aktive etmesi sözkonusudur. Britton ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, hepatik mikrozomal proteinin mg'ı başına MDA miktarının, demir miktarındaki artışa paralel olduğunu ve Desferroksamin enjeksiyonundan sonra MDA miktarında belirgin azalma meydana geldiğini göstermişlerdir(42).

Feritin ve hemosiderinin, lizozomlarda lipid peroksidasyonunu stimüle ettiği ve OH' radikali oluşumunda $O_2^{\cdot-}$ 'in ferritinden demir salınımını sağlayarak, Haber-Weiss reaksiyonu yoluyla lipid peroksidasyonuna yol açtığı gösterilmiştir(4,13).

Uzun süreli demir tozu inhalasyonunun çelik ve kaynak yapan dökümhane işçilerinde pnömokonyoz ve akciğer kanserinin indükleyicisi olabileceğinden, yine metal işçileriyle, demir madeni ocaklarında çalışan işçilerde ve transfüzyon bağımlı talasemi hastalarında, artmış larinks ve akciğer kanseri insidansından sözedilmektedir(27,43).

Rat karaciğer mikrozomlarında MDA ile tayin edilen lipid peroksidasyonu, genellikle demir madenlerinde ya da asbestoz fiberlerinin kontaminantları olarak bulunan çözünmez demir içeren; pyrite, magnetite, nemalite ve demir özü gibi mineraller ile indüklenebilmektedir(44).

Bizim elde ettiğimiz bulgularda, maden işçilerinin serum ferritin düzeyleri ortalaması 161 ± 16.3 µg/L olup, işçilerin memur ve kontrol grubundan daha yüksek ferritin düzeylerine sahip olduğu gözlendi. Demir tozları ile doğrudan ve yakından te-

ması olan işçilerde, 370 ve 440 µg/L gibi, yüksek serum ferritin düzeylerine sahip olanlar da vardı. 2. Grubun ferritin düzeyleri ortalaması 120.08 ± 13.2 µg/L, 3. grubun ise 90.07 ± 14.4 µg/L olup, gruplar karşılaştırıldığında, 1. ile 2. ve 1. ile 3. grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) iken, 2. ve 3. grup arasındaki fark ise anlamsız ($p > 0.05$) idi. Bu da işçilerde diğer işletme çalışanlarından ve kontrol grubundan daha çok demir birikimi ve fazlalığı olabileceğine dikkatimizi çekmektedir. Serum demir düzeylerinde olduğu gibi, işletme çalışanlarının serum ferritin düzeylerinin de kontrol grubundan farklı bulunması ve gruplar arasındaki farklılığın, plazma MDA düzeylerindeki farklılıklara da paralel olması dikkat çekici bulundu. Bu sonuçlar bize, serum demir ve ferritin düzeylerindeki artış ve farkın, plazma MDA düzeylerindeki artış ve farklılıktan sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

İlk kez 1952 yılında insan ateroskleroz plaklarında lipid peroksidasyonu saptanmış ve lezyonun boyutu ile lipid peroksidasyon düzeyleri arasında bir paralellik olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda ateroskleroz oluşturulan deney hayvanlarında ve aterosklerotik damar hastalıklarında yoğun bir biçimde araştırılan bu ilişki konusundaki çalışmalar halen devam etmektedir(32).

Lipid peroksidasyonu ile LDL ve arteriyel duvar proteinlerinin modifikasyonu aterosklerozun patogeneğinde belirtilmiştir. Ateroskleroz gelişmesinde en aktif lipidler düşük dansiteli lipoproteinler olup, aterosklerotik lezyonlarda biriken kolesterol primer olarak LDL dahil plazma lipoproteinlerinden oluşur. Ateroskleroz gelişiminin ilk belirtisi arter duvarı endotel hücrelerinde LDL'lerin birikerek yağ çizgileri oluşumuna zemin hazırlamasıdır(9). Steinberg ve arkadaşları, kültürde geliştirilen okside LDL'lerin endotel hücreleri hasarlandırıldığını kanıtlamışlardır(10).

Aterosklerotik insan dokularında artmış lipid peroksidasyonu olduğu ve aterosklerotik lezyonlu hastalarda arteriyel duvar ve plazmada ölçülen yüksek MDA düzeyleri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Yine ateroskleroz için önemli risk faktörlerinden biri artmış LDL konsantrasyonu olup, in vivo aterosklerotik lezyonlarda oksidatif olarak modifiye olmuş LDL'nin gösterilmesi, bu süreçteki rolüne destek oluşturmaktadır(45,46).

LDL' nin oksidatif partikülleri köpük hücre oluşumunda aterosklerotik lezyonlarda ve koroner kalp hastalığında rol oynayabilir. Probucol, butillenmiş hidroxitoluene ve α -tokoferol gibi antioksidanların hayvanlarda lezyon oluşumu veya aterosklerotik plakların gerilemesine yol açtığı farmakolojik çalışmalarda kanıtlanmıştır. Oksidatif olarak modifiye olmuş LDL, potansiyel olarak endotelial hücrelere de toksiktir(47,48).

Houglum ve arkadaşları 5-13 hafta %3 karbonil demir verilen ratlarda hepatic lipid peroksidasyonunda iki kat artış olduğunu ve spesifik bir antiserum kullanarak demir ile birlikte periportal hepatositlerin sitozolünde yerleşen MDA-lizin (aldehid) proteinin varlığını immünohistokimyasal olarak belirlemişlerdir. Ayrıca demir fazlalıklı hayvanların plazma proteinlerinde de MDA ve 4-HNE varlığını göstermişlerdir(49).

Çoklu doymamış yağ asitlerinin demir katalizli peroksidasyonu; proteinler, fosfolipidler ve DNA'ya kovalent olarak bağlanabilen MDA ve 4-HNE gibi oldukça reaktif aldehidlerin oluşumuyla sonuçlanır. Okside-LDL, antimalondialdehid-LDL antikoru kullanılarak hiperlipidemik tavşanlar ve insanlardan sağlanan, aterosklerotik plaklarda tanımlanmış ve serumlarında da bu moleküllere karşı oluşmuş antikolar bulunmuştur(50,51).

Tavşan aortik lezyonları ve insan aterosklerotik lezyonlarında immünohistokimyasal olarak kanıtları bulunan bu sonuçlar, aterosklerotik lezyonlarda o-LDL'nin varlığı ile uyumlu olup, modifiye LDL, MDA ve 4-HNE'ün aterogeneze rolü olduğunu desteklemektedir(49,52).

Çalışmamızda, Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak spektrofotometrik TBA metodu ile ölçülen plazma MDA düzeyleri bakımından, gruplar arasında yine istatistiksel olarak önemli farkların olduğunu gözlemledik. Maden işçilerinde plazma MDA düzeyleri ortalaması $2.25 \pm 0.18 \mu\text{mol/L}$, 2.grupda $1.73 \pm 0.10 \mu\text{mol/L}$, 3. (kontrol) grubunda da $0.79 \pm 0.07 \mu\text{mol/L}$ olarak bulundu. İşçi ve memur grubu arasındaki istatistiksel fark anlamlı ($p < 0.05$) bulunurken, işçi ve kontrol grubu ile, me-

mur ve kontrol grubu arasındaki istatistiksel farkın daha anlamlı ($p < 0.001$) bulunması, işletme çalışanlarının eksojen bir serbest radikal kaynağı olarak demir tozlarının bulunduğu çalışma ortamından etkilendiği hipotezini doğrulamaktadır.

İnsan plazma lipoproteinlerinden peroksidasyona en duyarlı lipoprotein LDL olup peroksidasyon süreci LDL'lerin tüketiminde ve biyolojik özelliklerinde bir çok değişikliğe yol açar. Endotel hücreler ve makrofajlar tarafından uptake'inde artış meydana gelen o-LDL, makrofajlarda kolesterol esterleri birikimine neden olur. Çöpçü reseptör yoluyla LDL uptake'i düzenlenemediği için de hücre lipid elde etmeye devam eder.

Stringer ve arkadaşları 100 aterosklerozlu hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, yüksek plazma lipid peroksit ve trigliserit düzeyleri saptayarak, lipid peroksitleri ile trigliserit düzeyleri arasında zayıf fakat önemli bir korelasyon varlığını, buna karşın lipid peroksitleri ve total kolesterol düzeyleri arasında ki ilişkinin önemli olmadığını belirlemişlerdir(22).

Koroner kalp hastalarından izole edilmiş kan trombositlerinde MDA konsantrasyonunun arttığı bulunmuştur. Lipid peroksitleri prokoagulan üreterek ve trombosit agregasyonunu artırarak antitrombin-III aktivitesini inhibe etme yeteneğine de sahiptirler ki; bu özellikler ateroskleroz komplikasyonları ile ilgili olabilir(53).

İnsandan ve aterosklerotik lezyonlardan ekstrakte edilen LDL'lerin hemen hemen in vitro o-LDL'nin tüm fizikokimyasal ve immünolojik özelliklerine sahip olduğu gözlenmiştir. Salonen ve arkadaşları 2 yıldan fazla süren çalışmalarında, carotid aterosklerozun ilerlemesinde serum örneklerinde, MDA ile modifiye olmuş LDL'ye karşı otoantikor titresi varlığının bağımsız bir belirteç olduğunu göstermişlerdir. Bu ilişki, sigara içme ve yüksek LDL kolesterol konsantrasyonuna eş olacak güçlü bir ilişkiydi. Bu çalışmadan elde edilen veriler, o-LDL'nin aterogenezdeki rolünü destekleyen ek bilgiler sağlamıştır(54).

100 Koroner arter hastalıklı ve 100 periferik arter hastalıklı kişi ile bu hastalıklara ait klinik semptomu olmayan 100 sağlıklı kişide, plazma lipid peroksitlerinin

tayin edildiği bir başka çalışmada, her iki gruptaki hastalarda lipid peroksit konsantrasyonları sağlıklı kontrollerden daha yüksek bulunmuştur. Kanda lipid peroksitleri artışının ateromatöz değişikliklerin orijinal nedeni mi yoksa, sekonder bir fenomen mi olduğu konusu tartışmaya açık olmakla birlikte, lipid peroksitleri tayini lipid metabolizmasının izlenmesinde çok önemli ilave bilgiler verebilecek gibi görünmektedir. Bu nedenle kanda lipid peroksidasyonu ürünlerinin tayini, klinik semptomlu aterosklerozlu hastalarda özellikle önemli olabilecek ve önerilebilecektir(55).

LDL oksidasyonuna yol açan durumlar, bunların olası kardiyovasküler risk faktörlerinden olabileceğini akla getirmektedir. Asetilasyon ve malondialdehidasyon gibi, LDL'nin farklı kimyasal ve biyolojik modifikasyonları, makrofajlarda mevcut bir reseptörle etkileşerek köpük hücre oluşumunu indüklemeye, daha önce tanımlanmış, Apo B/E reseptörden farklıdır. Çok merkezli bir çalışmada poligenik hiperkolesterolemik hastaların düşük apoprotein B/E reseptör aktivitesine ve artmış bir LDL yarı ömrüne sahip olduğu gözlenmiştir.

Probukol antioksidan etkisi iyi bilinen lipid düşürücü bir ilaçtır. Lipid peroksidasyonunun bir indeksi olarak TBAR madde ölçümü ile, bir grup hiperkolesterolemik hastada ve karşılaştırıldıkları kontrol grubunda, probukol tedavisinin plazma ve LDL'de lipid peroksidasyonuna etkisi araştırılmış ve tedavi sonunda hiperkolesterolemik hastalarda HDL ve LDL kolesterol düzeyleri ile, apo AI ve apo B düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. Probukolün LDL oksidasyonundaki azalmaya etkisi plazma lipidlerindeki azalma etkisinden daha fazla olup, lipid düşürücü etkisinden bağımsız olduğu görülmüştür(56).

Hiperkolesterolemik ratlardan alınan plazmanın, artmış lipid oksidasyonu gösterdiği ve yine son zamanlarda major HDL proteini Apo AI'in, LDL oksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. HDL'deki apo AI ve apo AII'nin oksidasyonu takiben yapısal değişikliklere maruz kaldığı görülmüştür ki, HDL kolesterol bu yüzden in vitro oksidasyona diğer lipoproteinlerden daha dirençli olabilir.

Lipoprotein oksidasyonu hazır substrat varlığına bağlıdır, bu şekilde hasta lipoproteinlerinde artmış kolesterol ester düzeyleri, yükselmiş oksidasyon oranına katkıda bulunabilir. Lavy ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada hasta VLDL, LDL ve HDL oksidasyonu normokolesterolemik örnek lipoproteinleri ile karşılaştırılığında, sırası ile; %44, %71 ve %54 daha fazla TBAR madde oluşumu göstermiştir(57).

LDL'nin oksidasyonunun, aterosklerotik hastalıklı kişiler ve sağlıklı kontroller arasında fark göstermesi oldukça önemlidir. Rengström ve arkadaşları aterosklerozun şiddeti ile LDL'nin oksidasyona hassasiyeti arasındaki ilişkiyi göstermişlerdir. Plazmada LDL miktarının artması arteriyel intimada da LDL artışına yol açmakta ve oksidasyona uğrayan LDL düzeylerinin artmasıyla olay, kendi kendini sürdüren bir kısır döngüye dönüşmektedir. Böylece kan LDL düzeyleri yüksek olan kişiler ateroskleroz gelişimine, düşük olanlardan daha meyilli olmaktadır. Bu sürece VLDL, IDL ve şilomikron kalıntıları da katılabilir(58,59).

12 Dislipidemik ve 12 normolipidemik olmak üzere toplam 24 aterosklerotik kardiyovasküler hastalıklı örnek ile yaş uyumlu 18 sağlıklı kontrolde, LDL'nin kimyasal bileşiminin tayin edildiği ve apo B/kolesterol oranının hesaplandığı, Schreier ve arkadaşlarının çalışmasında; dislipidemik olsun olmasın, kardiyovasküler hastalıklı hastaların trigliseritten zengin LDL partiküllerine ve LDL'de artmış apo B/kolesterol oranına sahip olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada, kardiyovasküler hastaların her iki subgrubundan sağlanan LDL fraksiyonları da yükselmiş trigliserit içeriğine sahip idi. Bu sonuçlar da koroner lezyonların derecesi ile, LDL'nin oksidasyona hassasiyeti ve trigliseritten zengin LDL partiküllerini ilişkilendiren Rengström'ün sonuçları ile uyumlu bulunmuştur(46).

Antikor ile yapılan çalışmalar ve aterosklerotik lezyonlarda ceroid birikimi, plak içinde daha fazla lipid peroksidasyonu oluştuğunu kuvvetle ima etmektedir. Ceroidce zengin plak yapısında oksitlenmiş modifiye kolesterol ve yağ asidi türevlerinin fazla miktarda olmasına rağmen, linoleik ve araşidonik asit gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin olmaması serbest radikal hasarının bu oluşumdaki rolünü açıkça ortaya koymaktadır(13,33).

Lipoproteinlerin apoprotein, kolesterol, kolesterol esterleri ve trigliserit içerikleri metal katyonlara maruz kalma veya hücreler ile karşılıklı etkileşme sonucu, oksijen ile oksitlenebilmektedir. 23 Koroner arter hastalıklı ve 23 sağlıklı kontrol grubunda yapılan çalışmada, izole LDL ve VLDL'de oksitlenmiş kolesterol (4-cholesten 3-one, 20 α -OH kolesterol) bulunmuştur. KAH'lı kişilerden sağlanan artmış okside kolesterol içeriğine sahip LDL'lerin, peroksidatif değişikliğe daha eğilimli oldukları görülmüştür(60).

Yükselmiş plazma kolesterol düzeyli hastalar o-LDL oluşumu için daha fazla risk taşımaktadır. A. pektoris ve M. infarktüsülü hastalarda yapılan çalışmada plazma MDA, fibrinojen, trigliserit ve LDL düzeylerinde, her iki grupta da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli artış bulunurken, HDL kolesterol düzeylerinde önemli bir azalma olduğu bulunmuştur. M. infarktüsülü hastalarda T.kolesterol düzeylerinin de kontrollerden yüksek olduğu, Regresyon analizi yapıldığında da; MDA-trigliserit, MDA-T.kolesterol, MDA-LDL kolesterol, MDA-fibrinojen ve T.kolesterol-LDL kolesterol arasında anlamlı pozitif korelasyon olduğu, buna karşın Trigliserit-HDL kolesterol arasında ise negatif korelasyon olduğu gösterilmiştir(45).

Hiperkolesterolemi ve hipertrigliserideminin ateroskleroz için önemli risk faktörleri olduğu bilinmektedir. İnsanda plazma kolesterolü ile arteryal lipoprotein konsantrasyonu arasında sıkı bir ilişki vardır. 40 Hiperlipidemili ve 40 sağlıklı örnek üzerinde yapılan çalışmada, hiperlipidemili grupta plazma, eritrosit ve lenfosit MDA konsantrasyonlarının anlamlı düzeyde yüksek olduğu bulunmuştur(61).

Bizim çalışmamızda, lipid parametreleri yönünden 1.ve 2. grubun oluşturduğu işletme çalışanlarında, kontrol grubuna göre anlamlı artış ve değişikliklerin olduğu bulundu. İşletme çalışanları arasında da, işçilerin bazı parametrelerde memur grubundan farklı sonuçlara sahip olduğu gözlemlendi. Trigliserit düzeyleri yönünden işçiler, hem 2. hem de 3. gruptan daha yüksek trigliserit düzeylerine sahip olup, bu istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bulundu. Ancak 2. ve 3. grup arasındaki fark anlamlı değildi ($p > 0.05$). Total kolesterol düzeyleri karşılaştırıldığında, 1.ve 2. grup arasın-

daki fark önemsiz ($p > 0.05$) iken, 1. ve 3. grup ile 2. ve 3. grup arasındaki fark önemli bulundu ($p < 0.05$). Trigliserit ve kolesterol düzeyleri yönünden işçilerin diğer gruplardan daha yüksek ortalamalara sahip olması, Dabbagh'ın demir fazlalıklı ratlarda bulunduğu, yüksek kolesterol ve trigliserit düzeyleri ile uyumlu idi. Öte yandan işçilerde diyet tedavisi önerilebilecek kadar yüksek düzeylerin varlığı da gözlemlendi.

LDL düzeyleri yönünden de işletme çalışanları arasında, artmış kolesterol düzeyleri ile paralellik gösteren yüksek LDL düzeyleri vardı. LDL düzeyleri ortalamasının yine, hem işçiler hem de memur grubunda kontrol grubundan yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0.05$) bulundu. İşletme çalışanlarında kontrol grubuna oranla daha yüksek LDL düzeyleri ortalamasının yanında, HDL düzeylerinin de kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). Yüksek kolesterol düzeyleri bulunan çalışanlar arasında, yüksek risk kabul edilen 160 mg/dl'nin üzerinde LDL kolesterol düzeyleri varlığı da dikkat çekici bulundu.

Risk yönünden değerlendirmek amacıyla hesaplanan HDL/T.kolesterol ve LDL/T.kolesterol yönünden de 1.ve 2. grup ile kontrol grubu arasında anlamlı fark olduğu ($p < 0.05$) bulundu. Apo AI yönünden, kontrol grubuna göre fark olmakla birlikte, istatistiksel olarak önemsiz ($p > 0.05$) bulunurken, apo B düzeyleri bakımından gruplar arasındaki fark önemli ($p < 0.05$) bulundu. LDL'nin başlıca lipoproteini olan apo B düzeylerinin, LDL kolesterol düzeylerindeki artış gibi işletme çalışanlarında ve özellikle işçilerde yüksek bulunması, dikkat çekiciydi. Yine risk açısından değerlendirmek amacıyla hesaplanan apo B/AI oranlarının da özellikle işçilerde arttığı ve işletme çalışanlarının kontrol grubuna göre yüksek apo B/AI oranına sahip olduğu ($p < 0.05$) gözlemlendi(Tablo 15).

Sigaranın lipid ve lipoproteinlere doğrudan etkili olduğu, trigliserit konsantrasyonunu artırırken, HDL kolesterol konsantrasyonunu azalttığı bulunmuştur. Sigara dumanının gaz fazı, in vitro doymamış yağ asitleri oksidasyonuna yol açmaktadır. Sigara dumanının ferritinden demir salınımını tetikleyerek ,oksidan kapasiteyi artırdığı da bildirilmiştir. Sigara dumanında bulunan serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif

stres, lipid peroksidasyonunda artmaya ve sonuçta MDA düzeylerinde yükselmeye neden olur(62,63).

Sigara içenlerin vücut sıvıları LDL ile inkübe edildiğinde; LDL'nin, izole makrofajlar tarafından artmış uptake'ne yol açan, LDL modifikasyonu ile sonuçlandırıldığı gösterilmiştir(13). Ancak 17 sigara içen ve 19 içmeyen örnek üzerinde yapılan çalışmada, sağlıklı içicilerin LDL'si, sağlıklı içmeyenlerin LDL'si ile karşılaştırıldığında, in vitro oksidatif modifikasyona daha meyilli olduğuna dair kanıt bulunamadı. Bununla birlikte sigara içen ve içmeyenler birlikte değerlendirildiğinde oksidasyon esnasındaki MDA oluşumu ile apo B, LDL kolesterol, T.kolesterol ve trigliserit konsantrasyonları arasında pozitif ilişki olduğu tesbit edilmiştir(62).

Yapılan bir başka çalışmada, en az 5 yıldır günde bir paket sigara içen 21 kişi ve sağlıklı içmeyen 20 kişiden, sigara içenlerin hem serum hem de eritrosit MDA düzeyleri önemli oranda yüksek bulunmuştur. Ayrıca her iki grup serum ferritin düzeylerinin karşılaştırıldığı çalışmada da, sigara içen grubun eritrosit ve serum MDA düzeylerinin içmeyen gruba göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (63,64).

KAH'nın major risk faktörlerinden olan sigaranın serum lipid parametrelerine etkisini değerlendirmek amacı ile, 31 sigara içen ve 31 içmeyen sağlıklı kişiler ile 29 koroner arter hastası üzerinde yapılan çalışmada; sigara içenler ile KAH'lı kişiler içmeyenlerle karşılaştırıldığında, T.kolesterol, trigliserit, LDL-kolesterol düzeyleri ile apo B/apoAI ve LDL kol./T. kol. oranları içmeyenlere göre önemli derecede yüksek, HDL kolesterol ve apo AI düzeyleri ile HDL kol./T.kol. oranı ise anlamlı derecede düşük bulunmuştur(65).

Çalışmamızda, ateroskleroz gelişiminde risk faktörlerinden biri olan sigara içme yönünden istatistiksel değerlendirme yapılmamakla birlikte, işletme çalışanlarında, sigara içenlerin MDA ortalamasının içmeyenlere göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. İşçi grubunda sigara içenlerin MDA ortalaması: 2.46 µmol/L, içmeyenlerin 2.01 µmol/L iken, memur grubunda da aynı sıra ile: 2.00 µmol/L ve 1.52 µmol/L olduğu gözlemlendi.

Aterosklerozun bilinen risk faktörlerinden biri olan sigara kullanımının spesifik prooksidan bir mekanizmaya sahip olmasının yanında, eksojen serbest radikal kaynağı olarak demir tozlarına maruz kalan çalışanlarda lipid peroksidasyonu oluşumuna katkı yapacağı muhakkaktır. Dolayısı ile yüksek serum demir ve ferritininin yanısıra, yüksek lipid parametrelerine sahip olan işletme çalışanlarından sigara içenlerin, içmeyenlere göre daha fazla riske sahip olacağı söylenebilir.

Vitamin C, karotenoidler ve vitamin E gibi antioksidanların arteriyel duvarda monositler ile seçici olarak etkileşebilen LDL'nin oksidatif modifikasyonunu bloke ederek aterosklerozu önleyebileceği ileri sürülmektedir. Jialal ve arkadaşları deney ortamında β -karotenin askorbat ve α -tokoferol gibi, LDL oksidasyonunu inhibe ettiğini göstererek, aterosklerozun önlenmesinde önemli bir role sahip olabileceği görüşünü ileri sürmüşlerdir.

Diyetle alınan antioksidanlar ile azalmış ateroskleroz riski arasındaki ilişkiyi destekleyen deneysel veriler çoğalmakla birlikte epidemiyolojik kanıtlar sınırlıdır. 16 Avrupa ülkesinde yapılan çalışmada, vitamin E konsantrasyonu ile kardiyovasküler hastalık arasında güçlü bir ters ilişki olduğu görülmüştür(66,67).

Sonuç olarak; Divriği demir madeni işletmesi çalışanlarında serum demir ve ferritin düzeylerinde kontrol grubuna göre farklılık olması, aynı şekilde yüksek plazma MDA düzeyleri bulunması, çalışanların ve özellikle işçilerin çalışma ortamından etkilendiğini düşündürmektedir. MDA düzeylerindeki artışın, demir tozu ve demir içeren mineral tozlarına bağlı olarak oluşabilen serbest radikal ve lipid peroksidasyonu oluşumundan ileri gelebileceği düşünülmektedir.

Lipid peroksidasyonunun ateroskleroz gelişimindeki rolünü gözönüne alırsak; özellikle işçilerin, demir madeninde çalışmalarının ateroskleroz gelişimi yönünden, bilinen risk faktörlerinden ayrı bir risk faktörü oluşturabileceğini, bize telkin etmektedir. Hipetrigliseridemi, hiperkolesterolemi, hiperlipoproteinemi ve sigara içme gibi diğer risk faktörleriyle birlikte ele alındığı zaman bu risk, daha da önem kazanmakta ve bu risklere karşı önlem alınmasını gerektirmektedir.

Bu anlamda işletme çalışanlarının çalışırken maske takmaları, sigara içmeyi bırakmaları, hiperlipidemi yönünden diyetlerine dikkat ederek, diyetlerinde antioksidan vitaminler içeren sebze ve meyvaları daha fazla bulundurmaları tavsiye edilebilir. Ayrıca, işletmenin de çalışanlarının yılda en az bir defa serum demir, ferritin ve lipid parametre düzeylerini tayin ettirmeleri, demir tayini için gerekirse bir atomik absorpsiyon spektrometri cihazı satın almalarının yararlı olacağı kanısındayız.



6. ÖZET

Bu çalışmada Sivas-Divriği Demir Madeni İşletmesi çalışanlarında, kan demir ve ferritin düzeyleri ile lipid peroksidasyonu son ürünü malondialdehid düzeyleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Ayrıca, çalışanların lipid parametreleri de tayin edilerek ateroskleroz gelişme riski yönünden değerlendirilmiştir.

Seçilen 32 işçi, 26 memur ve idari personel ile, işletme ile ilgisi olmayan 14 sağlıklı kişiden alınan kan örneklerinde; serum demir, TDBK, ferritin düzeyleri ve lipid parametreleri otoanalizör ile, plazma MDA düzeyleri ise spektrofotometrik metod kullanılarak tayin edildi.

Kontrol ve deney gruplarından elde edilen bulgular Kruskal-Wallis varyans analizi ve Mann-Whitney U testiyle istatistiksel olarak karşılaştırıldı. İşletme çalışanlarında kontrol grubuna kıyasla yüksek demir ve ferritin düzeyleri ($p < 0,05$) bulundu. Plazma MDA düzeylerinin de işçilerde, hem memur ($p < 0,05$) hem de kontrol grubundan ($p < 0,001$) daha yüksek olduğu bulundu.

Lipid peroksidasyonu ve yıkım ürünlerinden olan MDA'nın ateroskleroz gelişimindeki rolü nedeniyle, lipid parametre düzeyleri karşılaştırıldığında, yine işletme çalışanlarında; trigliserit, total ve LDL kolesterol ile apolipoprotein B düzeylerinin kontrol grubundan yüksek olduğu ($p < 0,05$), buna karşın HDL kolesterol düzeylerinin düşük olduğu ($p < 0,05$) bulundu.

TDBK ve apo AI düzeylerinin ise, gruplar arasında istatistiksel fark göstermediği ($p > 0,05$) gözlemlendi.

Sonuç olarak işletme çalışanlarının, çalışma ortamından etkilendiği ve bunun ateroskleroz gelişimine katkıda bulunabilecek, bir risk faktörü olabileceği kanısına varılmıştır.

SUMMARY:

Association between serum iron, ferritin and malondialdehyde (MDA) which is the lost product of lipid peroxidation were investigated in the Miners and officers of Sivas-Divriği Mine Company in this study.

Serum samples were obtained from 32 miners, 26 personnels who were working in the company and 14 healthy controls who were selected from out of the company. The levels of serum iron, total ironbinding capacity ferritin and lipid parameters were detected with autoanalyser whereas the levels of the plasma MDA were measured using spectrofluorometry.

The results which were obtained from experimental groups and control were assessed with Kruskal-Wallis variance analysis and Mann-Whitney U tests.

Our results demonstrated that, in both Miners and Company Workers, serum iron and ferritin levels were detected to be increased compare to control group ($p < 0.05$), whereas plasma MDA levels were increased in miners more than company workers ($p < 0.05$) and control group ($p < 0.001$).

Because of undesirable role of MDA as an underlying mechanism of development of atherosclerosis. We also intended to evaluate the changes in lipid parameters. Triglyceride, total cholesterol, LDL cholesterol and apolipoprotein B levels were found to be increased ($p < 0.05$), while HDL cholesterol levels were detected to be decreased ($p < 0.05$). Total iron binding capacity and apo AI levels were observed that have not been changed in miners and officers compare to controls and workers of the company ($p > 0.05$).

In conclusion, miners were found to be effected from the working environment and this effect could be a risk factor of development of atherosclerosis in miners.

7. KAYNAKLAR

- 1- Arslan R., Şekeroğlu R., Bayıroğlu F.: Serbest radikal türlerinin membran lipid peroksidasyonuna etkileri ve hücrel antioksidan savunma. **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Derg.** 2: 137-142, 1995.
- 2- Halliwell B.: Oxidants and human disease. Some new concepts. **FASEB J.** 1: 358-364, 1987.
- 3- Henle E. S., Linn S.: Minireview; Formation, prevention and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. **J. Biol. Chem.** 272, 31 (1): 19095-19098, 1997.
- 4- Thomas C. E., Morehouse L. A., Aust S.D.: Ferritin and superoxide-dependent lipid peroxidation. **J. Biol. Chem.** 260,6: 3275-3280, 1985.
- 5- Britton R.S.: Metal-induced hepatotoxicity. **Semin. Liv. Dis.** 16 (1):3-13, 1996.
- 6- Lunec J.: Free radicals; their involvement in disease processes. **Ann. Clin. Biochem.** 27: 173-182, 1990.
- 7- Arora S.A., Gores J.G.: The role of metals in ischemia/reperfusion injury of the liver. **Semin. Liv. Dis.** 16 (1): 31-38, 1996.
- 8- Bacon B.R., Britton S.R.: The pathology of hepatic iron overload; a free radical-mediated process? **Hepatology** 11 (1): 127-137, 1990.
- 9- Esterbauer H., Wag G., Puhl H.: Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. **Br. Med. Bull.** 49 (3): 566-576, 1993.
- 10- Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., Khoo J.C., Witztum J.L.: Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **N. Engl. J. Med.** 320; 915-924, 1989.
- 11- Onat T., Emerk K.: **Temel Biyokimya.** Saray medikal yayıncılık 2. baskı: Radikal kavramı ve oksijen radikalleri, 520-528, Lipidler, 407-496, İzmir 1997.
- 12- Akkuş İ.: **Sebest radikaller ve fizyopatolojik etkileri** Mimoza yayınları, 1-132 Konya 1995.
- 13- Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: Free radicals and metal ions in human disease. An overview. **Methods Enzymology** 186: 1-85, 1990.
- 14- Southorn P.A., Powis G.: Free radicals in Medicine; I- Chemical nature and bio-

- logic reactions; II- Involvement in human disease. **Mayo Clin. Proc.** 63: 381-408,1988.
- 15- Kılınç K.: Oksijen radikalleri; üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. **Biyokimya Dergisi** 10 (2): 59-89, 1985.
- 16- Köse K., Doğan P.: Lipid peroksidasyonu. **Erciyes Tıp Dergisi** Ek sayı: 340-350, 1992.
- 17- Halliwell B.: Free radicals, antioxidants and human disease; curiosity, cause or consequence?: **Lancet** 344: 721-724, 1994.
- 18- Tokulligil A., Dirican M., Ulukaya E.: **Lippincott serisi Biyokimya** (çeviri) 2. Baskı. Nobel tıp kitabevi Bölüm 20; 205-228. 27; 303-318, İstanbul 1997.
- 19- Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: Review article; Oxygen toxicity, oxygen radicals, transitions metals and disease. **Biochem. J.** 219: 1-14, 1984.
- 20- Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Elsevier Science Publishers** 15: 129-135, 1990.
- 21- Wasowicz W., Neve J., Peretz A.: Optimized steps in fluorometric determination of TBARS in serum importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. **Clin. Chem.** 39 (12): 2522- 2526, 1993.
- 22- Stringer M. D., Görög P. G., Freeman A., Kakkar V. V.: Lipid peroxides and atherosclerosis. **Br. Med. J.** 298: 281-284, 1989.
- 23- Beutler E., Litchman M.A., Coller B.S., Kipps T.J.: **Williams Hematology** 5th (international) edition, Chapter 34: 369-380, 1995.
- 24- Burtis A.C., Ashwood R.E.: **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. Second Edition. W. B. Saunders Company. Chapter 23; 1019-1024, 37; 2059-2066, 1994.
- 25- Lesnefsky J.E.: Tissue iron overload and mechanism of iron-catalyzed oxidative injury. **Free radicals in diagnostic medicine**. Plenum Press 129-144, 1994.
- 26- Canbek E. N.: **Kalp hastalıkları tanı ve tedavisi** Turgut yayıncılık (çeviri) cilt 2: 379-383, İstanbul 1998.
- 27- Wilson J.D., Braunwald E.: **Harrisons's Principles of Internal Medicine**

- 12th (international) edition. Volume 1: 994-1001, 2: 1059-1061, 1991.
- 28- Menteş G., Ersöz B.: **Harper'ın Biyokimyası**. Barış kitabevi (çeviri), Lipid taşınması ve depolanması 292-310, İstanbul 1993.
- 29- Russell R.: The pathogenesis of atherosclerosis - an update. **N. Engl. J. Med.** 314 (8): 488-499, 1986.
- 30- Russell R.: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature** 362: 801-809, 1993.
- 31- Steinberg D.: Antioxidants and atherosclerosis. A current assesment. **Circulation** 84 (3): 1420-1424, 1991.
- 32- Seven A., Candan G.: Radikal ve lipid peroksit düzeyini artıran etkenler. **Biyokimya Dergisi** 20 (4): 43-56, 1995.
- 33- Dai L., Winyard P.G., Zhang Z., Blake D.R., Morris C. J.: Ascorbate promotes low-density lipoprotein oxidation in the presence of ferritin. **Biochim. Biophys. Acta** 1304: 223-228, 1996.
- 34- Duthie G.G., Morrice P.C., Ventresca P.G., McLay S.J.: Effect of storage, iron and time of day on indices of lipid peroxidation in plasma from healthy volunteers. **Clin. Chim. Acta** 206: 207-213, 1992.
- 35- Starr R.T.: Use of an alumina column in estimating total iron binding. **Clin Chem.** 26; 156-158, 1980.
- 36- Norbert W. Tietz: **Clinical Guide Laboratory tests**. Second edition. Saunders Company 367-369, 1990.
- 37- Microsoft Windows: **SPSS istatistik programı**. Sürüm 6.0 1989-1993.
- 38- Dabbagh A., Mannion T., Lynch S.M., Frei B.: The effect of iron overload on rat plasma and liver oxidant status in vivo. **Biochem. J.** 300: 799-803, 1994.
- 39- Hershko C.: Annotation; Non-transferrin plasma iron. **Br. J. Haematology** 66: 149-151, 1987.
- 40- Nielsen P., Düllmann J., Wulfhekel U., Heinrich H.C.: Non-transferrin-bound-iron in serum and low-molecular-weight-iron in the liver of dietary iron-loaded rats. **Int. J. Biochem.** 25 (2): 223-232, 1993.
- 41- Salonen J. Nyssönen K., Korpela H., Tuomiletho J., Seppanen R., Salonen R.: High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction

- in Eastern Finnish men. **Circulation** 86: 803-811, 1992.
- 42- Britton R.S., Ferrali M., Magiera C.J., Recknagel R.O., Bacon B.R.: Increased prooxidant action of hepatic cytosolic low-molecular-weight iron in experimental iron overload. **Hepatology** 11 (6): 1038-1043, 1990.
- 43- Crihton R., Ward R.: Iron metabolism in health and disease. **Biochemist** Aug.-Sept. 12-17, 1996.
- 44- Fontecave M., Jaquen M., Mansuy D., Costa D., Zalma R., Pezerat H.: Microsomal lipid peroxidation and oxy-radicals formation are induced by insoluble iron-containing minerals. **Biochem. Biohys. Res. Commun.** 173 (3): 912-918, 1990.
- 45- Köse K., Doğan P., Ünal A., Çetin M., Köker A. H.: The relationship between plasma lipid parameters, fibrinogen and lipid peroxidation in patients with angina pectoris and acute myocardial infarction. **Türk J. Med. Sci.** 27: 435-439, 1996.
- 46- Schreier L. E., Saguinetti S., Mosso H., Lopez G. I., Sırı L., Wikinski L. W.: Low-density lipoprotein composition and oxidability in atherosclerotic cardiovascular disease. **Clinical Biochemistry** 29 (5): 479-487, 1996.
- 47- Kardinaal A.F.M., Kok F.J., Ringstad J., Aracena J.G., Mazaev V.P., Kohlmeier L.: Antioksidants in adipose tissue and risk of myocardial infarction: the EURAMIC study. **Lancet** 342: 1379-1384, 1993.
- 48- Parthasarathy S., Young S. G., Witztum J. L., Pittman R. C., Steinberg D.: Probucol inhibits oxidative modification of low-density lipoprotein. **J. Clin. Invest.** 77: 641- 644, 1986.
- 49- Houghlum K., Filip M., Witztum J. L., Chojkier M.: Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal protein adducts in plasma and liver of rats with iron overload. **J. Clin. Invest.** 86: 1991-1998, 1990.
- 50- Haberland E.M., Fong D., Cheng L.: Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of watanabe hyperlipidemic rabbits. **Science** 241: 215-218, 1988.
- 51- Boyd C.H., Gown A.M., Wolfbauer G., Chait A.: Direct evidence for a protein recognized by a monoclonal antibody against oxidatively modified LDL in atherosclerotic lesions from a watanabe heritable hyperlipidemic rabbit.

- Am. J. Pathol.** 135 (5): 815-825, 1989.
- 52- Palinski W., Rosenfeld M.E., Hertluala S.Y., Gurtner G.C., Socher S.S., Butler S.W., Parthasarathy S., Carew T.E., Steinberg D.: Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86: 1372-1376, 1989.
- 53- Buczynski A., Wachowicz B., Kornatowska K.K., Tzaczewski W., Kedziora J.: Changes in antioxidant enzymes activities, aggregability and malonyldialdehyde concentration in blood platelets from patients with coronary heart disease. **Atherosclerosis** 100: 223-228, 1993.
- 54- Salonen T. J., Herttuala S.Y., Yamamoto R., Butler S., Korpela H., Salonen R., Nyysönen K., Palinski W., Witztum J.L.: Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. **Lancet** 339: 883-887, 1992.
- 55- Plachta H., Bartnikowska E., Obara A.: Lipid peroxides in blood from patients with atherosclerosis of coronary and peripheral arteries. **Clin. Chim. Acta** 211: 101-112, 1992.
- 56- Masana L., Bargallo M. T., Plana N., LaVille A., Casals I., Rosa S.: Effectiveness of probucol in reducing plasma low-density lipoprotein cholesterol oxidation in hypercholesterolemia. **Am. J. Cardiol.** 68: 863-867, 1991.
- 57- Lavy A., Brook G.J., Dankner G., Amotz A.B., Aviram M.: Enhanced in vitro oxidation of plasma lipoproteins derived from hypercholesterolemic patients. **Metabolism** 40 (8): 794-799, 1991.
- 58- Rengström J., Nilsson J., Tornvall P., Landou C., Hamsten A.: Susceptibility to low density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. **Lancet** 339: 1183-1186, 1992.
- 59- Kaplan V.I., Levinson S.S.: Apolipoprotein and related testing as markers for coronary artery disease. **Lab. Medica İnt.** 15 (4): 12-14, 1998.
- 60- Liu K., Cuddy T. E., Pierce G. N.: Oxidative status of lipoproteins in coronary disease patients. **Am. Heart J.** 123: 285-290, 1992.
- 61- Efe H.: Hiperlipoproteinemililerde; plazma, eritrosit, lenfosit ve nötrofil antioksidan enzim aktivitelerinin lipid peroksidasyonu ve çeşitli lipid parametreleriyle ilişkilerinin incelenmesi. K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. **Doktora**

tezi Trabzon 1996.

- 62- Siekmeier R., Wülfroth P., Wieland H., Grob W., Marz W.: Low-density lipoprotein susceptibility to in vitro oxidation in healthy smokers and nonsmokers. **Clin. Chem.** 42 (4): 524-530, 1996.
- 63- Şekeroğlu R., Aslan R., Tarakçıoğlu M., Algün E., Kara M., Özbay B.: Sigara kullananlarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan aktivite. **Tüberküloz ve Toraks** 45 (2) : 105-109 1997.
- 64- Şekeroğlu R., Aslan R., Tarakçıoğlu M., Özbay B., Köylü H., Algün E.: Sigara, ferritin, oksidatif stres. **Klinik Laboratuvar Araştırma Dergisi** 1 (2): 55-58 1997
- 65- Kaleli S., Akkuş İ., Koçyiğit A., Aköz M. Vural H. Şekeroğlu R.: Sigara içen ve içmeyen sağlıklı kişilerle, koroner kalp hastalarında; Apo AI, Apo B ve bazı lipid parametrelerinin tayini. **T. Klin. Kardiyoloji** 7: 204-208, 1994.
- 66- Jialal I., Norkus E.P., Cristol L., Grundy S.M.: β -Carotene inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. **Biochim. Biophys. Acta** 1086: 134-138, 1991.
- 67- Kelly J. F.: Use of antioxidants in the pervention and treatment of disease. **J. İnt. Fed. Clin. Chem.** 10 (1): 21-23, 1998.

