

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DENEYSEL TIBBİ ARAŞTIRMA
BİLİM DALI

Tez Danışmanları: Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ

Yrd. Doç. Dr. Dikmen DÖKMECİ

ALKOLÜN OLUŞTURDUĞU SERBEST RADİKALLER ÜZERİNE İBUPROFEN ve ERUSİK ASİDİN ETKİLERİ

Meryem AKPOLAT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

T 90485

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Tez no: 62

EDİRNE-2000

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Deneyisel Tıbbi Araştırma Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde hazırlanmış olan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 24-08-2000 tarih, 16 sayılı ve 3 no'lu kararı ile belirlenen aşağıdaki jüri üyeleri tarafından yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28-09-2000

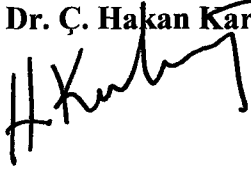
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Müberra Uygun



Üye

Doç. Dr. Ç. Hakan Karadağ



Üye

Yrd. Doç. Dr. Dikmen Dökmeci




Prof. Dr. Kadir Kaymak
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince her zaman yakın ilgi, sevgi ve sonsuz emekleri ile yanımda olan sevgili danışman hocalarım Yrd. Doç. Dr. Dikmen Dökmeci ve Prof. Dr. Tuncay Altuğ'a, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım T. Ü. Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. İsmet Dökmeci'ye, yardım ve desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Dr. Turhan Dost ve sevgili eşi Dr. Neriman Dost'a, biyokimyasal analizlerimde yardımlarını esirgemeyen İ. Ü. Çerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi değerli hocam Doç. Dr. Ahmet Belce'ye, tezimin deneysel çalışmalarını yaptığım İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Labotatuvarında çalışan arkadaşlarım Veteriner Hekim Nurten Kılıç, Tıbbi Biologlar Zatiye Güler, Çetin Karaca ve İbrahim Bayrak'a, eğitimim boyunca her zaman teşvik ve desteklerini gördüğüm annem Yurdagül Akpolat ve babam Cevdet Akpolat'a teşekkür ederim.

Meryem AKPOLAT

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Serbest Radikaller.....	2
2.1.1. Serbest Radikallerin Yapı ve Özellikleri.....	2
2.1.2. Serbest Radikallerin Biyolojik Kaynakları.....	3
2.1.3. Serbest Radikallerin Hücre İçi Kaynakları.....	6
2.1.4. Serbest Radikallerin Reaksiyonları.....	8
2.1.5. Serbest Radikal Reaksiyonlarının Etkileri.....	8
2.1.6. Organizmada Serbest Radikal Reaksiyonlarını Etkileyen Koşullar.....	10
2.2. Lipit Peroksidasyonu.....	11
2.3. Etanol.....	13
2.3.1. Etanol Metabolizması.....	14
2.4. Antioksidanlar.....	17
2.4.1. Sınıflandırma.....	18
2.4.2. Enzimler.....	19
2.4.3. Küçük Moleküller.....	23
2.5. Steroid Olmayan Antiinflatuvar İlaçlar (NSAİİ).....	28
2.5.1. NSAİİ'lerin Başlıcaları.....	30
2.5.2. Profenler (Fenilpropionik Asit Türevleri).....	31
2.5.3. İbuprofen.....	32
2.6. Yağ Asitleri	33
2.6.1. Erusik Asit.....	35
2.7. Peroksizom Prolifere Edici Reseptör (PPAR).....	35
2.7.1. Peroksizom Proliferasyonu.....	36
2.7.2. PPAR Yapı ve Fonksiyonu.....	36
2.7.3. PPAR ve Gen Ekspresyonu.....	37
2.7.4. Antiinflatuvar Özellikler.....	38
2.7.5. PPAR Alfa ve İnflamasyon Cevabı.....	40
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	41
3.1. Gereçler.....	41
3.1.1. Deney Hayvanı.....	41

3.1.2. Etanol Dozu.....	42
3.1.3. İbuprofen Dozu.....	42
3.1.4. Erusik Asit Dozu.....	42
3.1.5. Aletler.....	43
3.2. Yöntemler.....	44
3.2.1. Fosfat Tamponu Hazırlanması.....	44
3.2.2. Karaciğer Dokusu Homojenizasyonu.....	44
3.2.3. MDA Ölçümü.....	44
3.2.4. Cu-Zn-Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Ölçümü.....	46
3.2.5. Katalaz Aktivitesi ölçümü.....	48
3.2.6. İstatistiksel Analiz.....	49
4. BULGULAR.....	50
4.1. Karaciğer Dokusundan Elde Edilen Bulgular.....	50
4.1.1. Karaciğer Dokusu MDA Düzeyleri.....	50
4.1.2. Karaciğer Dokusu SOD Aktivitesi.....	51
4.1.3. Karaciğer Dokusu CAT Aktivitesi.....	52
4.2. Plazma Dokusundan Elde Edilen Bulgular.....	53
4.2.1. Plazma MDA Düzeyleri.....	53
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇ.....	63
7. ÖZET.....	64
8. SUMMARY.....	66
9. KAYNAKLAR.....	68
10. RESİMLEMELER LİSTESİ.....	87
11. ÖZGEÇMİŞ.....	88

Simge ve Kısaltmalar

ADH	: Alkol Dehidrojenaz
bw	: Vücut Ağırlığı
CAT	: Katalaz
COX-1	: Siklooksijenaz-1
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CYP₄₅₀	: Sitokrom P ₄₅₀
DER	: Düz yüzlü endoplazmik retikulum
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ER	: Endoplazmik Retikulum
Fe⁺²	: Ferro demir
Fe⁺³	: Ferri demir
g	: Gram
GGT	: Gama Glutamil Transferaz
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GSH-Tr	: Glutasyon Transferaz
GSSG	: Yükseltgenmiş Glutasyon
Hb	: Hemoglobin
HO₂[•]	: Hidroperoksil radikali
H₂O₂	: Hidrojen peroksid
ip	: İntraperitoneal
iv	: İntravenöz
kg	: Kilogram
L[•]	: Lipit radikali
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
LOO[•]	: Lipit peroksid radikali
LOOH	: Lipit hidroperoksid
LT	: Lökotrien
MDA	: Malondialdehit
MEOS	: Mikrozomal Etanol Okside Edici Sistem

NAD	: Nikotin Adenin Dinükleotid
NBT	: Nitroblutetrazolium
NSAİİ	: Steroid Olmayan Antiinflamatuvar İlaç
O₂[•]	: Süperoksid radikali
OH[•]	: Hidroksil radikali
PG	: Prostaglandin
PMNL	: Polimorf Nüveli Lökositler
PPAR	: Peroksizom prolifer edici reseptör
PUFA	: Poliansatüre Yağ Asidi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
ROO[•]	: Peroksil radikali
SSS	: Santral sinir sistemi
-SH	: Sülfidril grubu
SOD	: Süperoksid Dismutaz
TBARS	: Tiobarbitürik Asit ile Etkileşen Maddeler
TxA₂	: Tromboksan A ₂
XO	: Ksantin Oksidaz
YAEE	: Yağ Asidi Etil Ester
12-HETE	: 12-Hidroeikozatetraenoik Asit
12-HPETE	: 12-Hidro Peroksieikozatetraenoik Asit

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Etanol insan organizmasına zararlı, yüksek dozlarda alındığında toksik olabilecek bir maddedir. Etanol metabolizması reaktif oksijen türlerinin (ROS) meydana gelmesi ile bağlantılıdır ¹. İn vitro olarak, etanol metabolizması ürünü olan asetaldehitin yüksek konsantrasyonlarının ksantin oksidaz veya aldehit oksidaz yolu ile serbest radikalleri açığa çıkarabildiği gösterilmiştir ². Akut veya kronik etanol alımına bağlı lipid peroksidasyonundaki artış oksidatif stres olarak belirtilmiştir ³. Beyinde akut etanol alımından 2 ve 4 saat sonra lipid peroksidasyonunun arttığına dair çalışmalar vardır ^{3,4}. Lipid peroksidler hücrel hasara yol açan, metabolizmayı değiştiren ve dokulardaki kan akımını azaltan güçlü kimyasal maddelerdir. Lipid peroksidasyonunun hedef organlardaki etkilerinden bu bileşiklerin sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Bazı steroid olmayan antiinflamatuvar ilaç (NSAİİ)'lerin serbest radikalleri yakalama ve inaktive etme yeteneğine sahip oldukları ileri sürülmüştür ^{5,6}. Siklooksijenaz enzim inhibisyonu yapan NSAİİ'ler içerisinde yer alan ve spesifik olarak siklooksijenaz-1 (COX-1) enzimini inhibe eden ibuprofen'in de serbest radikalleri yakalama ve inaktive etme yeteneğine sahip olduğu test edilmektedir ⁵.

Polienoik yağ asitleri içerisinde, tekli doymamış yağ asitleri grubunda yer alan erusik asid (C₂₂Δ₁₃)'in antioksidan özelliğinin olup olmadığı araştırma aşamasındadır.

Çalışmamızın amacı; ibuprofen ve erusik asit verilen sıçanlarda akut yüksek dozda etanol uygulamasının plazma ve karaciğer dokusundaki etkilerini araştırmaktır. Bu amaçla karaciğer dokusunda ve plazmada lipid peroksidasyon parametresi olarak malondialdehit (MDA) düzeyleri ve karaciğerde antioksidan enzim aktivitelerinin ölçülmesi planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller

2.1.1. Serbest Radikallerin Yapı ve Özellikleri

Aerobik organizmalar için yaşamın esasını oluşturan oksijen yanlışı bir kimyasal formda ölüme sebep olacak kadar toksiktir. Bu da biyolojinin temel paradoksudur ⁷. Canlılar için oksijenin önemi iki temel fonksiyonu görmesinden kaynaklanır. Bunlardan birincisi oksijenin yapısal bir fonksiyonu olup, canlı organizmaları oluşturan moleküllerin yapısına katılması ve besin kaynağı olan maddelerin yapısındaki ana elementlerden biri olmasıdır. Oksijenin yapısal görevi bütün canlılar için geçerli olup, her canlının yapısındaki 100 atomdan yaklaşık 25'i oksijen atomudur. Oksijenin ikinci temel görevi ise fonksiyonel nitelikte olup; bu görev oksijenin canlılarda meydana gelen oksidasyon tepkimeleri ile solunum sisteminde rol alması şeklindedir. Yapısal görevinden farklı olarak oksijenin bu ikinci temel fonksiyonu aerobik canlılar için geçerlidir ⁸. Solunumla alınan oksijenin % 5 kadarı organizmada serbest radikallere dönüşür. Oksijen radikalleri biyolojik sistemlerin tanıdıkları en reaktif toksik maddeler olup oksijenin toksik etkisinin gerçek nedenidirler ⁸.

Serbest radikaller negatif yüklü elektron sayısının çekirdekdeki pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmadığı moleküllerdir. Temel kimyasal özellikleri dış orbitallerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içermeleridir ⁹. Bu dış orbitallerden her biri birer elektron daha kabul edebilir. Bu orbitallerin tek elektron alması ile süperoksid radikali ($O_2^{\bullet}$), iki elektron alması ile de peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$) oluşur ¹⁰. Hem organik, hem de inorganik moleküller halinde bulunurlar. Stabil değildirler. Elektron konfigürasyonlarını pozitif yüke dengelemeleri gerektiğinden çok aktiftirler. Radikallerin aktif olma özelliği de başlıca difüzyon mesafesi ile ilişkilidir.

Hidroksil radikali (OH[•]) son derece yüksek aktif özellikte olduğundan meydana geldiği hücre bölümünden daha uzağa difüzyona gerek kalmadan derhal oluştuğu yerde reaksiyona girer.

O₂[•] hem çevresel etkenler, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikalidir. Canlılarda diğer radikallerin oluşması çoğunlukla O₂[•]'nin birikmesine bağlıdır ⁸. O₂[•], OH[•]'dan daha az reaktif olduğu için açığa çıktığı hücre bölümünden daha uzak noktalara rahatlıkla difüze olabilir. Ancak bu difüzyon hücre içindeki süperoksit dismutaz (SOD)'ın yüksek konsantrasyonu ile sınırlıdır ¹¹. O₂[•] bir oksitleyici gibi davranarak bir elektron daha alabilir, böylece oluşan peroksi anyonu ortamdaki iki proton alarak hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşturabilir. O₂[•] aldığı elektroni başka bir elektron alıcıya vererek tekrar oksijene oksidlenebilir ve böylece bir indirgeyici olarak davranabilir. İki O₂[•] birbiri ile etkileşerek biri oksidlenirken diğeri ise indirgenir ve böylece H₂O₂ ve oksijen (O₂) meydana gelir:



O₂[•]'nin ortamdaki temizlendiği bu tepkimeye dismutasyon tepkimesi denir.

H₂O₂ ise mitokondriyel membranlar, peroksizomal membranlar ve plazma membranından kolayca difüze olarak toksik etkisini açığa çıktığı noktadan daha uzak hücre bölümlerinde gösterebilir ¹¹.

Çok kısa yaşam süreleri olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleriyle etkileşebilme özelliği göstermektedirler. Serbest radikaller hücrenin tüm fraksiyonlarında oluşabilme özelliğindedirler. Radikal oluşumu hücre tiplerine göre değişiklik göstermesine rağmen, tüm aerobik hücrelerde belirli düzeylerde radikal oluşmaktadır ¹².

2.1.2. Serbest Radikallerin Biyolojik Kaynakları

Aerobik organizmalar için serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Normal metabolizmada moleküler oksijenin % 98'i oksidaz yoluyla suya indirgenirken, kalanı

oksijenaz yoluyla potansiyel olarak toksik reaktif türlere dönüşür¹³⁻¹⁵. Organizmada oksijen türevi serbest radikaller dışında karbon ve kükürt merkezli radikaller de oluşmaktadır.

Tablo 1. Oksijen türevi bileşikler

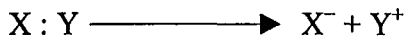
Radikaller	Radikal Olmayanlar
Hidroksil (HO•)	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)
Alkoksik (RO•)	Singlet Oksijen (¹ O ₂)
Peroksil (ROO•)	Ozon (O ₃)
Süperoksit (O ₂ •)	Hipoklorit asit (HOCl)
Nitrik oksit (NO•)	Lipid hidroperoksit (LOOH)
Azot dioksit (NO ₂ •)	Peroksinitrit (ONOO)

Ortaklanmamış elektron, genel olarak üst kısma yazılan bir nokta ile gösterilir. Serbest radikaller 3 yolla meydana gelir:

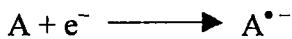
1. Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi



2. Normal bir molekülden tek bir elektron kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalırlar. Böylece serbest radikaller değil, iyonlar meydana gelir.



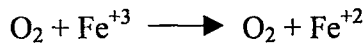
3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler. Cu⁺², Fe⁺³, Mn⁺² ve Mo⁺⁵

gibi geçiş metallerinin de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat, bu iyonlar reaksiyonları katalize ettiklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar ¹⁶.

Oksijenin bir elektron alarak redüksiyonu ve aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonu sırasında negatif yüklü bir ara ürün olan orbitalerinde çiftlenmemiş elektron içeren O₂[•] açığa çıkar. Sitoplazmadaki O₂[•]'nin başlıca kaynağı endoplazmik retikulum (ER)'daki sitokrom P₄₅₀ (CYP₄₅₀) sistemidir ¹⁷. Çok toksik etkili olmayan O₂[•] asıl etkisini daha güçlü oksijen metabolitlerinin açığa çıkmasına yol açarak gösterir. Süperoksid anyon indirgenir. H₂O₂'nin OH[•]'a indirgenmesi bir geçiş metali (çoğunlukla Fe⁺² bazen de Cu⁺) gerektirir. Bu dönüşümler Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları olarak bilinmektedirler:



Fenton reaksiyonu

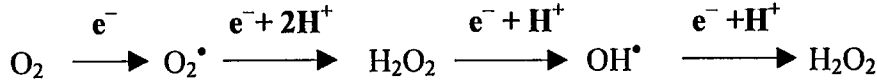


Haber-Weiss Reaksiyonu



O₂[•]'nin protonlanmasıyla da hidroperoksil (HO₂[•]) radikali oluşur. Bu radikalın herhangi bir biyolojik sistemde sitotoksik etkisi olduğu kanıtlanmamasına rağmen; biyolojik membranları kolay geçebilmesi ve yağ asitleriyle direkt etkileşime girebilmesi yönünden önemlidir ¹⁸⁻²⁰.

O₂[•] genellikle indirgeyici bir ajan olarak hareket eder ve hücre membranını anyon kanalı üzerinden geçerek birçok maddeyi indirger ²¹⁻²³. Bundan oluşan H₂O₂'in toksisitesinin düşük olmasının yanında hücre membranlarını kolaylıkla geçebilme özelliğı organizma için zararlılığını artırır. H₂O₂ serbest radikal değildir, ancak yüksek konsantrasyonlarda güçlü oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına yol açarak toksik etki gösterebilir. Ortamda Fe⁺² veya Cu⁺² olmadıkça çok yavaş reaksiyonlaşan bu madde geçiş metali iyonunun varlığında çok reaktif OH[•]'ı oluşturur (şekil 1).



Şekil 1. Süperoksit anyonu ve hidroksil radikali oluşumu

$\text{OH}^{\bullet}$ 'in organik moleküllerle reaksiyon sabitinin ($k=10^8\text{-}10^{10} \text{ L. mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) arasında olması onun ileri derecede reaktifliğinin göstergesidir. Bu nedenle $\text{OH}^{\bullet}$ 'in oluştuğu bölgedeki bütün organik moleküller oksidasyona uğramaktadır.

Oluşan H_2O_2 'nin tümü $\text{OH}^{\bullet}$ 'a dönüşmez. Bunu engelleyen iki enzim vardır. Katalaz (CAT, EC: 1.11.1.6) ve glutatyon peroksidaz (GPx, EC:1.11.1.9). Bu enzimler H_2O_2 'den su oluşturur. Her iki enzim de organizmada yaygın olarak bulunur. Ancak dokuya göre biyolojik önemleri ve aktiviteleri değişiklik göstermektedir. Örneğin beyin için GPx daha önemlidir ²⁴.

2.1.3. Serbest Radikallerin Hücre İçi Kaynakları

Hücrede zara bağlı veya serbest olarak bulunan değişik enzimlerin etkisi ile serbest radikaller oluşmaktadır ²⁵⁻²⁷.

Bu oluşum;

- Mitokondrideki elektron transport zinciri reaksiyonlarını,
- ER'deki karma fonksiyonlu oksidaz sistemini,
- Ksantin oksidaz (XO), dopamin β - hidroksilaz, D-amino asid oksidaz, ürat oksidaz gibi enzimlerin etkinliğini,
- Hücre zincirine bağlı NADPH oksidaz, prostaglandin (PG) sentezi ve lipooksijenazların etkinliğini,
- Peroksizomlarda ve lizozomlardaki metabolik olayları kapsamaktadır.

Mitokondriyel elektron transport sistemi: Mitokondriyel sitokrom C oksidaz tarafından oksijenin suya indirgenmesi dört elektron transferi gerektirir. Bu olayda serbest radikal ara ürünleri oluşmaz. İzole edilmiş mitokondrilerde yapılan çalışmalarda organizmanın temel radikal kaynağının iç membranda yerleşen solunum zinciri olduğu anlaşılmıştır. Solunum zincir taşıyıcıları yüksek oranda indirgendiğinde $\text{O}_2^{\bullet-}$ oluşumunu

sağlar. Mitokondriyel radikal oluşumunu etkileyen endojen faktörler solunumu regüle edenlerdir. Bunlar NAD'ye bağlı substratlar, süksinat ADP ve oksijendir ²⁸. Normal süperoksit ve H₂O₂ yapımı mitokondriyel oksijen sarfının yaklaşık % 1-2'sini oluşturur. Eğer oksijen, sitokrom oksidaz tarafından suya redüksiyonu sınırlı olacak miktarlarda bulunursa, artan respiratuvar zincir redüksiyonu ve hücre içinde redükte ko-faktörlerin birikimi, iskemik hücrelerde O₂[•] yapımını kolaylaştırabilir ²⁸.

ER'nin nükleer membranında serbest radikaller, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan oluşur. Sitokrom P₄₅₀ ve b₅ doymamış yağ asitlerini ve ksénobiyotikleri oksidleyebilir ve dioksijeni indirgeyebilir. Ayrıca, flavoprotein içeren sitokrom redüktazlar da otooksidasyonla O₂[•] ve H₂O₂ oluştururlar. Mikrozoal ve nükleer membran sitokromları bir elektron transferinin direkt olarak O₂[•] ya da peroksi-sitokrom komplekslerini dissosiyasyonla H₂O₂ meydana getirebilirler ²⁸. Sıçan karaciğer mikrozoalarında da OH[•]'in yapıldığı belirlenmiştir ²⁹.

Birçok enzim katalitik etkileri sırasında serbest radikal oluşumuna yol açar. XO serbest radikal üretiminde rol alan en önemli enzimdir. Oksijenin H₂O₂'e redüksiyonunda rol oynar. Bunun yanında aldehid oksidaz, flavoprotein dehidrogenaz ve triptofan dioksijenaz enzimlerinin de böyle etkileri vardır ²⁸.

Peroksizomlar H₂O₂'nin hücredeki en önemli kaynağıdır. Peroksizomlarda bulunan D-amino asit oksidaz, L-α-hidroksi asit oksidaz enzimleri H₂O₂ açığa çıkarıcı özelliğe sahiptirler ³⁰⁻³². Mikrozo ve plazma membranlarındaki enzimlerden arasıdonik asit metabolizmasında rol alan lipoksijenaz ve siklooksijenaz, oluşturdukları biyolojik potent maddelerle serbest radikal oluşumunu artırır ²⁸.

Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Çözünabilir özelliği olan ve nötral sıvı ortamda oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarına girebilen hücre komponentlerinden pek çoğu intrasellüler olarak serbest radikalleri açığa çıkarırlar. Bunlar arasında tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler ve tetrahidropterinler bulunur ³⁴. Yukarıdaki maddelerin tümü, dioksijenin redüksiyonunu sağlarken primer olarak O₂[•]'nin meydana gelmesine neden olurlar. O₂[•]'lerin spontan ya da enzimatik dismutasyonu ise ikinci bir ürünü, yani H₂O₂'i açığa çıkarır.

Böylece, $O_2^{\bullet}$ oluşturan hücresel olaylar, dismutasyon nedeni ile H_2O_2 'yi de meydana getirmiş olurlar.

Birçok nedenden ötürü plazma membranı, serbest radikal reaksiyonları için kritik bir yerdir. Ekstrasellüler olarak açığa çıkan serbest radikaller, hücrenin diğer kompartmanları ile reaksiyona girebilmek için ya önce plazma membranını geçmelidir, ya da toksik reaksiyonlarını membranda başlatmalıdır. Membranda bulunan fosfolipidler, glikolipidler, gliseridler, steroller gibi doymamış yağ asitleri ve kolay okside olabilen amino asitleri içeren transmembran proteinleri serbest radikal hasarına açıktır. Ayrıca, serbest radikallerin başlattığı lipid peroksidasyonu, transmembran iyon gradientinin bozulmasına, sekretuar fonksiyonların kaybına ve intrasellüler metabolik olayların inhibisyonuna yol açabilir²⁸.

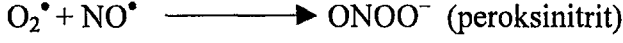
Bu konuda, son zamanlarda dikkatleri çeken bir başka nokta da lipoksijenaz ve siklooksijenaz gibi mikrozomal ve plazma membranına bağlı enzimlerin serbest radikal açığa çıkarmalarıdır. Sözü edilen enzimlerin predominant substratı olan araşidonik asidin biyolojik olarak güçlü ürünlere dönüşümü sırasında bu radikaller meydana gelir²⁸.

2.1.4. Serbest Radikallerin Reaksiyonları

Serbest radikallerin biyolojik reaksiyonlarını genel bir başlık altında incelemek oldukça güçtür çünkü, organizmanın yaşamı boyunca karşılaştığı radikal türleri sürekli değişir. Bilindiği gibi, bir ya da birden fazla tek sayılı elektron içeren bu radikaller, hücrede, geçiş metallerinden oksijen türlerine elektron transferinden açığa çıkarlar. Daha sonra radikal reaksiyon dizileri başlar ki bunlar atom transferlerini içerirler. Hücre içinde bir diğer önemli radikal reaksiyonu, örneğin yağ asitleri ve aromatik halkalarda olduğu gibi, doymamış bağlara radikal eklenmesidir. Serbest radikal reaksiyonları, ilerleyerek hücresel hasarla sonuçlanabilir. Bu tür reaksiyonlar sonsuz olarak sürebildiği gibi serbest radikalleri ortadan kaldıracı bir dizi bileşiklerle sona erdirilebilir. Sözü edilen serbest radikal ortadan kaldıracı ya da temizleyici bileşiklerin bir kısmı hücresel bütünlük için temel olan etkinlikleri azaldığı takdirde sitotoksositeye yol açabilen bileşiklerdir. Diğer bir grup serbest radikal temizleyiciler antioksidan savunma yapan bileşikler olarak adlandırılır ve serbest radikallerin zararlı etkilerine maruz kalan organizmanın canlılığını sürdürmesine yardımcı olurlar³⁵.

2.1.5. Serbest Radikal Reaksiyonlarının Etkileri

İki serbest radikal karşılaştığında, çiftleşmemiş elektronlarını birleştirerek bir kovalent bağ oluştururlar. Bu şekilde süperoksid ve nitrik oksid çok hızlı reaksiyonlaşır:



Fizyolojik pH'da peroksinitrit direkt olarak proteinlerde hasar oluşturur ve nitronium iyonu (NO_2^+), nitrojen dioksit gazı ve $OH^{\bullet}$ gibi toksik etkili bileşiklere parçalanır. Bu şekilde fazla $NO^{\bullet}$ 'nun toksisitesi O_2 ile etkileşimine bağlıdır.

Serbest radikal reaksiyon zinciri atom transferlerini içerir. Yağ asitleri ve aromatik halkalarda olduğu gibi doymamış bağlara radikal eklenmesi de hücre içinde gerçekleşen diğer bir radikal reaksiyonudur³⁶⁻³⁸.

Çeşitli patolojik durumlarda normalden fazla miktarda serbest oksijen radikali oluşmasıyla veya organizmanın antioksidan sisteminin yetersiz kalmasıyla artan serbest radikaller hücrenin çeşitli bileşenleri ve hücre dışı makromoleküller ile etkileşerek hücrede yapısal ve fonksiyonel bozukluğa neden olurlar. Oksijen radikallerinden etkilenebilecek başlıca vücut kimyasal maddeleri arasında proteinler (enzimler ve kollajen), nörotransmitterler, nükleik asitler, deoksiribonükleik asit (DNA) ve hücre membranlarının başlıca bileşenleri olan yağ asitleri bulunmaktadır^{33,39}.

Serbest radikaller hücre ve dokularda birçok zarara yol açmaktadır. Bu zararlar şöyle sıralanabilir:

- a) DNA'nın tahrip olması,
- b) Nükleotid yapılı ko- enzimlerin yıkımı,
- c) Tiollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiol / disülfid oranının değişmesi,
- d) Protein ve lipidlerde kovalen bağlantılar yapması,
- e) Enzim aktivitelerinde ve lipid metabolizmasındaki değişiklikler,
- f) Mukopolisakkaritlerin yıkımı,

- g) Proteinlerin tahrip olması ve protein “turnover”ının artması,
- h) Lipid peroksidasyonu zar yapısı ve fonksiyonunun değişimi,
- ı) Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması,
- i) Seroid ve yaş pigmenti denilen bazı maddelerin birikimi,
- j) Kollajen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapilerdeki aterofibrotik değişikliklerin oluşması ⁴⁰.

2.1.6. Organizmada Serbest Radikal Reaksiyonlarını Etkileyen Koşullar

Organizmanın prooksidan-antioksidan dengesi birçok faktöre bağlıdır. Bunlar eksojen ve endojen olarak iki ana bölümde incelenebilir. Ancak bu faktörler genellikle birlikte etkilidirler ¹⁶.

Eksojen Faktörler

1.Diyetsel

- Çok doymamış yağ asitlerince zengin beslenme
- Alkol
- Fazla kalorili beslenme (obesite)
- Hayvansal proteinlerce zengin beslenme
- Aşırı demir ve bakır alınması
- Az sebze ve meyve yenmesi
- Yiyeceklerin uygun olmayan koşullarda saklanması ve hazırlanması
- Yemek pişirme yöntemlerindeki hatalar

2 Çevresel

- Sigara dumanı
- Hava kirliliği (O₃, NO₂, SO₂, hidrokarbonlar)
- Diğer kirleticiler (Asbest, pestisitler vs.)
- Radyasyon

3 İlaçlar

- Antikanser ilaçlar (Adriamisin vs.)
- GSH tüketen ilaçlar (Asetaminofen, kokain vs.)

Endojen Faktörler

1 Fiziksel egzersiz / sedanter yaşam

2 Stres

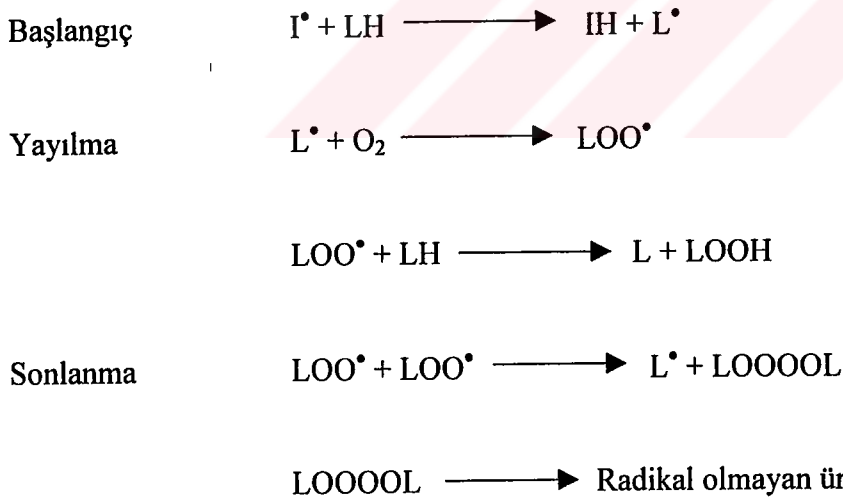
3 Yaşlılık

4 Doku hasarı ve kronik hastalıklar (Ateroskleroz, kanser, kronik inflamasyon, iskemi-reperfüzyon hasarı vs.)

5 Diyetel antioksidanların sağlanmasını etkileyen koşullar (iştahsızlık, kolestaz, malabsorbsiyon vs.)

2.2. Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çok doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olay olarak tanımlanmaktadır ¹⁵. Lipid peroksidasyonu üç fazdan oluşur: Başlangıç, çoğalma (yayılma) ve sonlanma (şekil 2).



Şekil 2. Lipid peroksidasyonunun fazları ⁷.

Biyolojik hasarla karakterize radikal reaksiyonlar arasında en belirgin olanı lipid peroksidasyonudur. Hücre membranlarının oksijen radikallerine maruz kalması lipid peroksidasyon reaksiyonlarını uyarır. Lipid peroksidasyonu bir zincir reaksiyonu olup daha ileri bir peroksidasyonu başlatan serbest radikaller için devamlı bir kaynak sağlar ⁴³.

Peroksidasyona en duyarlı olanlar doymamış yağ asidleridir. Lipid peroksidasyonu organizmada oluşan kuvvetli bir radikal etkisi ile zar yapısında bulunan konjuge olmayan çok doymamış yağ asidi zincirindeki α -metilen gruplarından bir hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlamaktadır^{21,25,26,38}. Biyolojik sistemlerde bu serbest radikalın süperoksit anyonu ve $\text{OH}^\bullet$ olduğu kabul edilmektedir. Bununla birlikte, lipid peroksidasyonunun uyarılmasında asıl etkili radikalın $\text{OH}^\bullet$ olduğu benimsenmektedir. Bu radikal $\text{O}_2^\bullet$ 'den ya da H_2O_2 'den Fe'nin katalitik etkisi altında oluşmaktadır¹⁰. $\text{OH}^\bullet$ radikalleri özellikle reaktiftirler. Bunlar miyokardiyal hücrelerden veya polimorf nüveli lökositler (PMNL) gibi dolaşımdaki hücrelerden üretilebilirler⁴⁴.

Serbest radikal etkisi ile çok doymamış yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidi zincirinin radikal niteliğini kazanmasına neden olmaktadır. Böylece oluşan lipid radikali ($\text{L}^\bullet$) dayanıksız bir yapıya sahip olduğundan, bir dizi spontan değişikliğe uğramaktadır. Önce, molekül içi çift bağ aktarılması (rezonans) ile dien konjugatları oluşmaktadır. Daha sonra, $\text{L}^\bullet$ 'nin moleküler oksijen ile reaksiyonlaşması ile lipid peroksit radikali ($\text{LOO}^\bullet$) meydana gelmektedir. Bu $\text{LOO}^\bullet$ 'lar da zar yapısındaki diğer çok doymamış yağ asidlerini etkileyerek yeni $\text{L}^\bullet$ 'lerin oluşmasını sağlamakta, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşmektedir. Bu otokatalitik reaksiyonlar LOOH 'ın aldehit ve diğer karbonil bileşikleriyle etan, pentan gibi uçucu gazlara dönüşmesi ile sona ermektedir^{41,42}.

Aldehitler en toksik ürünlerdir. Plazma MDA konsantrasyonu non-enzimatik oksidatif lipid peroksit dekompozisyonunun neticesidir. İki den fazla çift bağ içeren yağ asidlerinin otooksidasyonunda veya eikozanoid sentezinde serbestleşen siklik endoperoxidler MDA'nın asıl kaynağıdır^{19,20}.

MDA, proteinlerin amino gruplarına, fosfolipidler veya nükleik asidlere bağlanarak toksik etkisini gösterir. MDA miktarı, tiyobarbitürik asit testi ile ölçülmekte ve bu yöntem lipid peroksit düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, peroksidasyon sırasında oluşan dien konjugatlarının ölçümü de, in vivo lipid peroksitlerinin düzeyini yansıtmaları açısından giderek önem kazanmaktadır. LOOH 'ın parçalanması ile oluşan etan, bütan ve pentan gibi gazların tayini de, son yıllarda lipid peroksidasyon göstergesi olarak değerlendirilmektedir²⁰.

İn vivo olarak peroksidasyon “hem” bileşikleri ve trombositler ile lökositlerde ve diğer yerlerde bulunan lipoksijenazlar tarafından katalizlenir⁴³.

Lipid peroksidler hücresel hasara yol açan, metabolizmayı değiştiren ve dokulardaki kan akımını azaltan güçlü kimyasal maddelerdir. PG sentetazı inhibe ederek prostasiklin ve tromboksan A₂ arasında dengesizliğe yol açarlar^{15,21}.

Lipid peroksidasyonunun; zar lipid yapısındaki değişiklikler nedeni ile zar işlevinin bozulması, oluşan serbest radikallerin enzimler ve diğer hücre bileşenleri üzerine etkisi, son ürünler olan aldehitlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden olduğu düşünülmektedir. Her üç olayın da eşit derecede veya birlikte etkili oldukları ileri sürülmektedir. Bununla birlikte, aldehit yapıları bileşiklerin uzun yaşam süreli ve zarları geçebilme özelliğinde olması, lipid peroksidasyonunun hedef organlardaki etkilerinden bu bileşiklerin sorumlu olduğunu düşündürmektedir.

2.3. Etanol

Etanol insanların yaşam tarzına bağlı olarak değişik rol oynayan önemli organik bileşiklerden biridir. Canlılarda birbiri ile çelişkili olmak üzere iki etkisi görülür: Besinsel enerji kaynaklarının bir parçasıdır ve aynı zamanda insan sağlığına zararlı bir maddedir. Alkolün insan organizmasına verdiği sistematik zararlar iyi bilinmektedir. Özellikle karaciğer, pankreas, kalp ve beyin olmak üzere vücutta birçok organda zararlı etki gösterir. Vitamin ve minerallerin biyolojik fonksiyonlarını azaltır ve alkol kullanıcılarının beslenmelerinin bozulmasına yol açar.

Etanol metabolizması ROS'un meydana gelmesiyle bağlantılıdır¹. Etanol ile indüklenmiş karaciğer toksisitesinin mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen, ROS ve lipid peroksidasyonu etanol ile indüklenmiş karaciğer hasarının sebebi olabilir⁴⁵. Akut veya kronik etanol alınımına bağlı lipid peroksidasyonundaki artış oksidatif stres olarak gösterilmiştir. Rouach ve ark'ları 2.3 g/kg verilen akut etanolün 2 ve 4 saat sonra sıçan serebellumunda lipid peroksidasyonunu artırdığını belirlemişlerdir³.

Birkaç inceleme, entoksikasyon meydana getirici tek bir doz etanol uygulandıktan sonra sıçanlarda serbest yağ asitlerinin düzeylerinde yükseliş meydana geldiğini göstermiştir. Muhtemelen, alkol dehidrojenaz (ADH) tarafından etanolün oksidasyonunun doğurduğu [NADH] / [NAD⁺] oranında bir artışın neden olduğu sitrik asit siklusu aktivitesinde ve yağ asiti oksidasyonunda azalış ve karaciğer tarafından triaçilgliserol sentezinde artış meydana geldiğine dair sağlam kanıtlar vardır ⁴⁶.

Deneyssel ve klinik çalışmalar, kronik alkol kullanımının karaciğerde sitosolde bulunan GSH ve membranda bulunan α -tokoferol içeriğindeki azalmayla bağlantılı olduğunu göstermiştir ¹. Sıçanlarda akut etanol intoksikasyonunun karanlıkta serum melatonin düzeylerini azalttığı ve oksidatif hasara neden olduğu bulunmuştur. Kronik etanol alınımına bağlı olarak yapılan deneyssel çalışmalarda da sıçan testisinde MDA'da artış ve testiste atrofi gözlenmiştir ⁴⁷.

2.3.1. Etanol Metabolizması

Etanolle indüklenen oksidatif stres karaciğerde çok daha fazla etkilidir, çünkü etanol metabolizması başlıca karaciğerde yer alır, karbondioksit ve su oluşumuyla sonlanır. Etanolün asetaldehite dönüşümü etanol metabolizmasında hız sınırlayıcı basamaktır. Bu dönüşümde üç enzim sistemi görev yapar.

Karaciğer hücresinde etanol metabolizması için üç ana yol bulunur ve bunların herbiri farklı subsellüler bölümlerde yer alır. Etanol metabolizmasında rol oynayan enzimler:

1. Sitosolde yer alan ADH
2. ER'de lokalize mikrozomal etanol okside edici sistem (MEOS)
3. Peroksizomlarda lokalize CAT ⁴⁸.

1. Alkol dehidrojenaz: Sitosolde yer alan ADH, etanolü aldehite oksitler ve reaktif oksijen ürünleri oluşturur. Koenzim olarak nikotin adenin dinükleotid (NAD⁺) kullanır. Memelilerde en yüksek aktivite karaciğerde görülür. Diğer organlardaki aktivite karaciğerdekinin %15'i kadardır. ADH 391 aminoasitten oluşan bir enzimdir. Etanolün

yanında primer ve sekonder alkolleri, ω hidroksilli yağ asitlerini oksitler. Ancak diğer alkollere ve substratlara K_m 'i düşüktür.



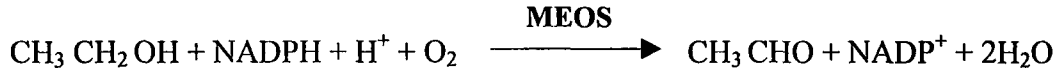
Bu ADH aracılı oksidasyonda NAD^+ redükte formu olan NADH'a çevrilir. Bunun sonucunda sitosolün redoks potansiyeli belirgin şekilde değişir⁴⁹.

NADH/NAD^+ oranındaki belirgin artış çok önemli metabolik sonuçlar doğurur. Laktat/Piruvat oranı artar. Bu durum laktik asidoza yol açar⁴⁹. Kandaki yüksek laktik asid düzeyi hiperürisemiye neden olur⁵⁰. Alkol tarafından indüklenmiş ketoz ve artmış pürin yıkımı⁵¹ da hiperürisemiye artırabilir. Artan pürin indirgenmesinin diğer bir olası sonucu XO tarafından oksijen türlerinin üretimidir⁵². Artmış NADH/NAD^+ oranı lipogenezin artmasına ve hipoglisemiye neden olur⁴⁸. Sitrik asit siklusunun aktivitesi azalır. Yağ asidi oksidasyonunun azalmasına bağlı olarak trigliserid sentezi artar. Bu durumda karaciğer yağlanması ortaya çıkar.

Meydana gelen asetaldehit metabolik olarak son derece reaktif ve toksiktir. Karaciğerde asetaldehitin lipid peroksidasyonunu uyardığı gösterilmiştir. In vitro olarak, asetaldehit metabolizması XO veya aldehit oksidaz yolu ile serbest radikalleri açığa çıkarabilir, ancak in vivo ortamda anlamlı olarak böyle bir mekanizmanın oluşabilmesi için asetaldehit konsantrasyonunun oldukça yüksek olması gereklidir. Proteinlere ve diğer hepatik makromoleküllere bağlanır ve bu bileşiklere karşı antikor oluşumuna neden olur. Dolayısıyla alkolik karaciğer hasarı olan hastaların serumunda genellikle bu antikora rastlanır⁵³. Hücrelerdeki mikrotübüler sistem, asetaldehit tesiri ile bozulur ve protein atılımı durur. Tutulan proteine eş miktarda su da tutulur ve bundan dolayı karaciğer hücreleri şişer.

2. Mikrozomal etanol oksitleyici sistem: Alkol ayrıca düz endoplazmik retikulum (DER) üzerinde lokalize sitokrom P450 bağımlı MEOS tarafından da metabolize edilebilir⁵⁴⁻⁵⁶. MEOS tarafından etanolün metabolizması sırasında meydana gelen oksijen radikalleri alkolik karaciğer hasarına neden olur⁷¹. Hepatositlerdeki mikrozomal fraksiyonlar ile etanol etkileşimi, DER'deki proliferasyonla sonuçlanan alkol kullanımının incelenmesiyle gösterilmiştir⁵⁴⁻⁵⁶. DER üzerinde lokalize olan ve özellikle P4502E1 (CYP2E1) enziminin

aktif olduğu MEOS alkol tarafından indüklenebilir ^{57,58} ve koenzim olarak NADPH kullanır. Karaciğerde mikrozomal enzimler NADPH ve O₂ varlığında metanolü fomaldehite oksitleyebilir. Etanol, sistemde metanolden %50 daha hızlı metabolize olur. Reaksiyonun optimum pH'ı 6.8-7.4 arasındadır. MEOS'un etanole karşı Km'i (8-10 mM), karaciğer ADH'ı ile (0.2-2 mM) kıyaslandığında oldukça yüksektir. Bu nedenle ADH düşük kan etanol konsantrasyonlarında etanolün büyük kısmını oksitleyen enzimdir.



Bu indüksiyon kronik alkoliklerin aşırı alkole toleransını açıklar.

Yapılan çalışmalarda kronik alkolizmde CYP2E1'in, etanolün oksitlenmesi sonucu hidroksietil radikallerinin meydana gelmesinde ve dolayısıyla lipid peroksidasyonu sonucu karaciğer hasarının oluşumunda rolü olduğu gösterilmiştir ^{29,59-62}.

Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda, CYP2E1 enzimini indüklemek ve lipid peroksidasyonunu artırarak karaciğer hasarı meydana getirmek amacıyla kronik alkol uygulamasının en uygun metodunun intragastrik gavajla besleme olduğu gösterilmiştir ^{29,62-64}.

Serum γ-glutamil transferaz (GGT) aktivitesini göstermek, karaciğer hastalığı olan kronik alkolikleri olmayanlardan ayırt etmede yardımcıdır ^{65,66}. GGT'nin değişik dokularda aktivite gösterdiği ve farklı izoenzimlerinin olduğu bulunmuştur ⁶⁷.

Yapılan pekçok çalışmada, alkol kullanımı sonucunda karaciğer ve plazmada lipid peroksidasyonunda ve GGT aktivitesinde artış olduğu gösterilmiştir ⁶⁸. Bir araştırmada alkol alınımları ile birlikte, doymuş yağ asidi olarak lipid peroksidasyonunu inhibe eden tokoferol ve tokotrienollerini içeren palmoil ihtiva eden diyetle tedavi sonunda, lipid peroksidasyonunda ve CYP2E1 aktivitesinde azalma olduğu gözlenmiştir ⁶⁹. Diğer bir araştırmada ise, alkol ile birlikte kahve kullanımının karaciğerde GGT'yi inhibe edebileceği ve alkole bağlı karaciğer hasarına karşı koruyucu olabileceği bildirilmiştir ⁷⁰.

3. Katalaz: Peroksizomlarda lokalizedir. H₂O₂ varlığında, in vitro olarak CAT etanolün asetaldehite oksitlenmesini katalizler. CAT varlığında etanolün önemli bir kısmı

beyinde asetaldehite dönüşür. Bu reaksiyon ancak H₂O₂ konsantrasyonları yeterli ise oluşabilir. Beyinde yüksek ADH ve/veya CAT aktivitelerinin asetaldehit sentezini artırarak etanolün zararlı etkisine katkıda bulunduğu; yüksek aldehit dehidrojenaz aktivitesinin ise asetaldehit konsantrasyonunu ve dolayısıyla etanolün zararlı etkilerini azalttığı söylenebilir.



CAT'ın hepatic etanol metabolizmasında rolü yoktur. Peroksizomlarda yağ asitlerinin β-oksidasyonu yoluyla yüksek miktarlarda H₂O₂ açığa çıkarsa CAT'ın etanol metabolizmasına katılımının artabileceği ileri sürülmüştür⁴⁸. Ancak bu olay ADH aktivitesi yokluğunda gözlemlenebilir.

2.4. Antioksidanlar

Oksijenli yaşamla birlikte aerobik organizmalar oksijen kaynaklı radikalleri oluşturmaya başlamışlardır. Bununla eş zamanlı olarak, serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki hassas dengenin korunamadığı durumlarda hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır.

Antioksidanların ilk belirlenen etkileri, zar yapısında bulunan lipidlerin peroksidasyona karşı korunması olmuştur. Bunun sonucu olarak, başlangıçta antioksidanlar lipid peroksidasyonunu engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Günümüzde ise, antioksidanların tanımı lipidlerin yanı sıra proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi diğer hedef molekülleri koruyucu etkilerini de içerecek şekilde genişletilmiştir. Böylece antioksidanlar, hedef moleküllerdeki oksidan hasarı engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmakta ve bu tanımla bağlantılı olarak antioksidanların etkileri farklı şekillerde olabilmektedir¹⁶.

Memeli hücrelerinde oksidan ürünlere karşı korunma üç prensip içinde gerçekleşmektedir:

- 1- Oluşan radikallerin detoksifikasyonu
- 2- Radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi
- 3- Radikal oluşumunun sınırlandırılması

Oksijen radikallerine karşı savunma sistemleri, enzimler ve düşük molekül ağırlıklı serbest radikal tutucuları olmak üzere iki grupta toplanırlar. Savunmada öncelikle etkili olanlar enzim sistemleridir. Antioksidan savunmanın önemli bir kısmını süperoksid ve H_2O_2 'i temizleyen özel enzimler oluşturur. Bunlar SOD , CAT, GPx, glutatyon reduktaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimleridir. Bu enzimlerin aktivitesi, serbest radikallerin sentez ve yıkılma hızına, beslenme ile eser elementlerin (Mn, Se, Fe, Zn, Cu) alınmasına bağlıdır ^{9,12}.

Enzimsel savunma dışında düşük molekül ağırlıklı serbest radikal tutucularını lipidde eriyebilir özellikte olanlar ve sitoplazmada bulunanlar olmak üzere iki grupta toplayabiliriz. E vitamini ve β -karoten lipidde eriyebilir özellikte antioksidan özellikli vitaminlerdir. GSH, ürik asid, bilirubin ve askorbik asid sitoplazmik yerleşim gösteren antioksidan etkili maddelerdir.

Plazmada yaklaşık 300 μ M konsantrasyonda bulunan ürik asid, hemoglobin (Hb)'i peroksid oksidasyonundan ve eritrositleri lipid peroksidasyonundan korur. Bu özellikleri ile ürat serbest radikal temizleyicisi olarak kabul edilebilir ¹¹.

2.4.1. Sınıflandırma

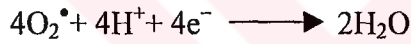
Antioksidanlar çeşitli kriterlere göre gruplanabilirler ¹⁶.

- 1) Yapılarına göre
 - a) Enzimler
 - b) Enzim olmayan proteinler, küçük moleküller
- 2) Kaynaklarına göre
 - a) Organizmaya ait olanlar (endojen antioksidanlar)
 - b) Dışarıdan alınanlar (eksojen antioksidanlar)
- 3) Çözünürlüklerine göre

- a) Suda çözünenler
- b) Lipidlerde çözünenler
- 4) Yerleşimine göre
 - a) Hücre içinde bulunanlar
 - b) Plazma ve diğer ekstraselüler sıvılarda bulunanlar

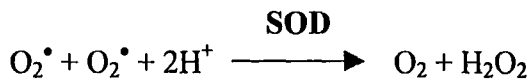
2.4.2. Enzimler

Sitokrom oksidaz: Mitokondrilerde solunum zincirinin en son basamağında yer alan ve bakır içeren bir enzimdir. Solunum zincirindeki görevini sürdürürken $O_2^{\bullet}$ 'nin suya dönüşümünü de sağlar.



Ancak, $O_2^{\bullet}$ 'lerin oluşumu çoğu kez enzimin kapasitesini aşar ve diğer enzimlerin devreye girmesi ile $O_2^{\bullet}$ 'nin zararlı etkileri engellenir¹⁶.

Süperoksid dismutaz (SOD: EC: 1.15.1.1): SOD, aerobik solunum sırasında, mitokondrial elektron transfer zincirinde ve diğer redoks reaksiyonları sonucunda oluşan serbest radikal $O_2^{\bullet}$ 'i H_2O_2 'e dönüştürerek hücreyi koruyan bir enzimdir. SOD enzimi aşağıdaki reaksiyonu katalizleyerek $O_2^{\bullet}$ 'nin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar. Böylece hücre içindeki $O_2^{\bullet}$ düzeylerini azaltır.



SOD'ın fizyolojik görevi hücreleri $O_2^{\bullet}$ 'nin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Oksijen kullanımı yüksek olan dokularda SOD aktivitesi fazladır. Buna karşılık ekstraselüler sıvıda SOD aktivitesi çok düşüktür^{11,72}.

SOD'ın dört farklı izoenziminin varlığı gösterilmiştir. Bunlardan biri, ökaryotların hücre sitozolünde ve membranlar arası boşlukta bulunan bakır ve çinko içeren izoenzimi

(CuZn- SOD)'dir ⁸. Ekstrasellüler sıvıda CuZn- SOD'un EC-SOD olarak adlandırılan farklı bir formu bulunur ⁷³.

Mn içeren iki tür SOD enzimi vardır. Bunlardan biri hücrelerde mitokondri matriksinde, diğeri E. Coli ve Streptococcus mutans gibi bakterilerin matriksinde bulunur ⁷⁴⁻⁷⁶.

Prokaryotlarda Fe-SOD ve Mn-SOD enzimleri bulunur. Her iki enzimin aminoasid dizilişleri benzerdir. Molekül ağırlığı 39000 Dalton olan Fe-SOD molekül başına +3 değerlikli bir demir iyonu içerir ve birbirine eşit iki alt birimden oluşur ⁸.

İnsanda Cu-Zn SOD ve Mn-SOD enzimlerini kodlayan genler sırası ile 21q 21.1 ve 6q 21 numaralı kromozomlarda bulunur ⁷⁷.

SOD enziminin bütün izoenzimlerinde enzimin aktif merkezindeki metalin, kelat yapıcı ajanlar kullanılarak uzaklaştırılması katalitik aktivitenin kaybına yol açmakta, metalin tekrar sağlanmasıyla aktivite yeniden kazanılmaktadır ⁸.

İnsan SOD enzimi oldukça stabildir. Eritrositlerden izolasyon işlemi sırasında Hb'yi denatüre etmek için kloroform ve etanolle muamele edildiğinde aktivitesi bozulmaz. Buna karşılık siğır SOD enzimi 100 °C'de 30 sn tutulursa inaktive olur. pH'ı 7.8 olan 0.1 mM EDTA içeren fosfat tamponunda 75 °C'de 6.5 dk'da enzim, aktivitesinin yarısını kaybeder ³⁴.

Cu-Zn SOD: Ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında bulunan 32 000 Dalton molekül ağırlığında bir enzimdir. Enzim disülfid köprüsü ile bağlanan, birbirinin aynı iki alt üniteden oluşmuştur ve her alt ünite birer atom Cu^{2+} ve Zn^{2+} içermektedir.

Cu-Zn SOD, siyanür tarafından tersinir olarak inhibe edilir. Total SOD aktivitesinin % 85'ini oluşturur ⁷⁸.

Mn-SOD: Mitokondride bulunan bir enzimdir. Dört alt üniteden oluşur ve molekül ağırlığı 80 000 daltondur ⁷⁹.

Mn-SOD siyanür tarafından inhibe edilmez. Kloroform ve etanol tarafından inhibe edilir. Total SOD aktivitesinin % 15'ini oluşturur ⁷⁶.

Katalaz (CAT, EC: 1.11.1.6): CAT solunum yapan tüm organizmalarda bulunan ve iki önemli fonksiyonu olan bir enzimdir⁸⁰.

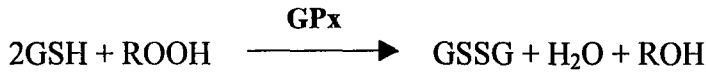
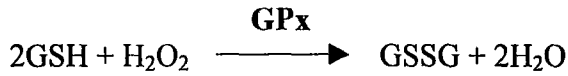
1. H_2O_2 'in O_2 ve su vermek üzere ayrıştırılması (zehirsizlendirme reaksiyonu).
2. 1 mol peroksidin parçalanması ile oluşan reaksiyon sonucunda metanol, etanol, formik asid veya fenollerin yükseltgenmesi (peroksidaz aktivitesi).



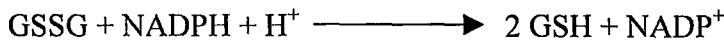
CAT enzimi mol başına 4 atom demir içerir, peroksizomlarda yerleşmiştir ve tetramer yapıdadır.

CAT O_2^* ile inhibe olur. Oksidatif hasara çok kolaylıkla maruz kalabilen eritrosit gibi hücrelerde CAT aktivitesi yüksektir^{81,82}. CAT hidrojen peroksid, metil hidroperoksid gibi küçük moleküllere etki eder, lipid hidroperoksidlerine etki etmez.

Glutasyon peroksidaz (GPx, EC: 1.11.1.9): Sitozolde yerleşik bir enzim olan GPx, tetramer yapıdadır, dört selenyum atomu içerir, enzimin aktif bölgesinde selenosistein bulunur ve yaklaşık olarak 85 000 dalton ağırlığındadır. GPx, H_2O_2 ve lipid peroksidlerin indirgenmiş GSH'la reaksiyona girerek, su ve yükseltgenmiş GSH oluşturmalarını katalizleyen bir enzimdir⁸³.



GPx'in iki substratı vardır. Substratlarından biri olan peroksidler, alkole indirgenirken, diğer substrat olan GSH yükseltgenir. Oluşan yükseltgenmiş glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği bir başka reaksiyonla tekrar indirgenmiş GSH'a dönüşür.

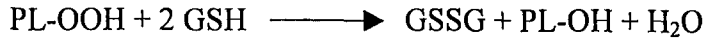
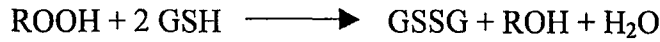
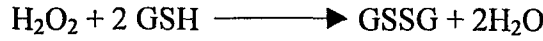


İnsan dokularında iki GPx formu belirlenmiştir⁸⁴:

a) Se-bağımlı GPx: Substrat olarak H_2O_2 'i kullanır.

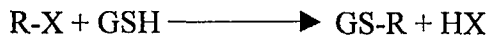
b) Se-bağımsız GPx: Substrat olarak organik hidroperoksidleri kullanır.

Yapısı ve fonksiyonları çok yakın zamanda aydınlatılabilmiş olan bir diğer GPx, “fosfolipid-hidroperoksid glutatyon redüktaz” enzimidir. Bu enzim de selenyum içerir, ancak monomerik yapıdadır. Zar yapısındaki fosfolipid hidroperoksidlerini, alkollere indirgeyerek E vitamininin yetersiz olduğu durumlarda peroksidasyona karşı koruma sağlar⁷².

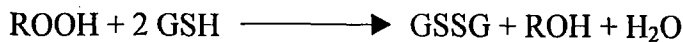


İndirgenmiş GSH, E ve C vitaminleri, β -karoten gibi endojen ve eksojen kaynaklı antioksidan maddeler de antioksidan savunma sisteminin nonenzimatik bileşenleridir.

Glutatyon transferaz (GSH-Tr): Dimerik yapıdadır. Esas olarak sitozolde bulunur, çok sayıda izoenzimi vardır. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda önemli rolleri olan GSH-Tr çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin GSH'la konjugasyonunu katalizler.



Bazı GSH-Tr izoenzimleri selenyumdan bağımsız GPx aktivitesi gösterir ve araşidonik asid hidroperoksidlerinin metabolizmasını sağlarlar.



2.4.3. Küçük Moleküller

Askorbik asid (C vitamini): Askorbik asid, suda çözünür vitaminlerdendir. İnsanlarda sentezlenmediğinden diyetle alınması gerekir. Özellikle yeşil renkli taze sebze,

meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunur. İnce barsaklardan kolayca emilir. Isıtılmaya dayanıksız, dondurulmaya dayanıklıdır. Dokularda ve plazmada askorbat iyonu şeklinde bulunur. En yüksek askorbat içeren dokular timus, adrenal bez ve korpus luteumdur⁸⁵.

Askorbik asitin organizma için önemi, indirgeyici gücünün yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Bu özelliği ile hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Kollajen sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir. Askorbik asid, semidehidroaskorbat radikali üzerinden dehidroaskorbik aside yükseltgenir. Askorbik asid aynı zamanda güçlü bir antioksidandır; $O_2^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$ ve singlet oksijen ile kolayca reaksiyona girerek onları etkisizleştirir. Sulu fazda bulunmasına karşın lipid peroksidasyonunu başlatıcı radikalleri temizleyerek lipidleri ve zarları da oksidan hasara karşı korur. E vitamininin rejenerasyonunda görev alır, tokoferoksil radikalının alfa-tokoferole indirgenmesini sağlar. Böylece E vitamini ile birlikte etkin bir şekilde düşük dansiteli lipoprotein (LDL)'i oksidasyona karşı korur. Ayrıca antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller.

Askorbik asid, ferri-demiri (Fe^{+3}) ferro-demire (Fe^{+2}) indirgeyen $O_2^{\bullet}$ dışındaki tek hücre içi moleküldür. Bu etkisiyle, Fe^{+3} 'i indirger, Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksid ile etkileşmeye uygun olan Fe^{+2} 'e dönüştürür ve $O_2^{\bullet}$ 'nin üretimine neden olur. Bu özelliği C vitamininin pro-oksidan etkiye sahip olmasına neden olmaktadır^{16,85}.

Glutasyon: GSH, başta karaciğerde olmak üzere pek çok dokuda yüksek düzeylerde bulunan glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir tripeptiddir. Suda çözünen önemli bir antioksidan ve indirgeyici bir ajandır. GSH'ın pek çok metabolik görevi vardır. GPx, GSH redüktaz ve GSH-Tr gibi enzimlerin substratı veya ko-substratıdır. GSH serbest radikaller ve peroksidlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidan hasara karşı korur. Ayrıca, protein yapısındaki sülfidril (-SH) gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu engeller. Amino asidlerin membrandan transportunu sağlar. Hb'nin methemoglobine dönüşmesini önler. İndirgenmiş GSH çeşitli reaksiyonlarda yükseltgenerek, yükseltgenmiş glutatyona (GSSG) dönüşür. GSSG'nin tekrar indirgenmesi NADPH'nin de kullanıldığı bir reaksiyonla olur. Bu şekilde dokularda GSH / GSSG oranı yüksek tutulur ($> 100:1$)^{16,85}.

E vitamini: E vitamini tokoferol ve tokotrienol türevlerini kapsayan bir vitamindir. Doğal olarak alfa, beta, gama, delta, eta ve zeta gibi çeşitli şekilleri bulunmaktadır. Bunların hepsi, izoprenoid takısı içeren bileşiklerdir. Antioksidan aktivitesi en yüksek olan tokoferol alfa-tokoferoldür. Yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip olan aromatik halka, aktif kısmını oluşturur ve molekülün antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır. Bitkisel yağlar ve tohumlar, E vitamininden zengin kaynaklardır ⁸⁶. Ayrıca E vitamini bitkisel yağların sabunlaşmayan kısımlarında, yer fıstığı, badem, pamuk yağı ve keten tohumunda da bulunur. Zeytinyağında eser miktarda bulunur. Diyetle alınan E vitamini yağda çözünmüş haldedir, yağ sindirimi sırasında açığa çıkar ve emilir. Emilebilmesi için safra asiti düzeylerinin de normal sınırlarda olması gerekir. E vitamini herhangi bir taşıyıcı protein olmadan pasif difüzyonla emilir. Dokularda, mitokondri ve mikrozoimler gibi membrandan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur. Çok güçlü bir antioksidan olarak, zarsal fosfolipidlerin yapısındaki çok doymamış yağ asitlerini (poliansatüre yağ asitleri, PUFA) serbest radikallerin etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Bir alfa-tokoferol molekülü 100 molekül PUFA'nın peroksidasyonunu engelleyebilir. E vitamini, $O_2^{\bullet}$ ve $OH^{\bullet}$ 'ı, singlet oksijeni, lipid peroksidlerini ve diğer radikalleri indirger, nitrik oksid ile de reaksiyona girebilir. E vitamini ile GPx serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler: GPx oluşan peroksidleri ortadan kaldırırken E vitamini peroksidlerin yapımını engeller. E vitamini, selenyum metabolizmasında da önemli rol oynar. Selenyum, hem E vitamininin hem de lipidlerin emilimi için gereklidir. Ayrıca, E vitamininin lipoproteinler içinde tutulmasına yardımcı olur. E vitamini ise selenyum kaybını önleyerek veya onu aktif şekilde tutarak organizmanın selenyum ihtiyacını azaltır. E vitamininin zincir kırıcı antioksidan olarak başlıca fonksiyonu, lipid peroksidlerini etkisizleştirerek peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır. Bu sırada oluşan tokoferoksil radikali stabil bir moleküldür, glukronik asid ile konjuge olur ve safra yolu ile atılır ^{85,86}.

Karotenoidler ve retinoidler: Karotenoidler havuç, domates, fasulye, portakal ve diğer narenciyelerde bulunan bitki pigmentleridir. A vitamininin metabolik ön maddesi olarak beta-karoten bu karotenoidlerden başlıcasıdır. Retinoidler plazmada lipoproteinler ve retinol-bağlayıcı protein aracılığıyla taşınırlar. Beta-karoten ve nikopen gibi retinoidler LDL yapısında yer alır ve LDL'yi oksidasyona karşı korurlar. Karotenoidler hücreleri oksidan strese karşı üç farklı şekilde korurlar ^{16,85}:

- a) Flaviner ve porfirinler gibi triplet uyarıcıların zararlı etkilerini baskılama,
- b) Singlet oksijeni baskılama,

c) $ROO^{\bullet}$ 'nın temizlenmesi.

Karotenoidlerin antikarsinojen oldukları bilinmektedir. Ancak bu etki ve biyolojik etkileri antioksidan özelliğinden bağımsızdır.

Übikinonlar: Übikinonlar lipidlerde çözünen ve izoprenoid takı içeren kinon türevleridir. Soya yağı, et, balık gibi besinlerde ve bazı sebzelerde bulunurlar. İndirgenmiş şekilleri olan übikinoller, übikinonlara kıyasla antioksidan olarak çok daha etkilidirler. İnsanlarda bulunan temel übikinon, übikinon-10 (Koenzim Q)'dur. Esas görevi olan solunum zincirindeki redoks taşıyıcılığının yanında, oksijen kaynaklı radikaller ve singlet oksijen ile etkileşerek lipid peroksidasyonunun başlamasını ve biyomoleküllerin hasar görmesini engeller¹⁶.

Flavonoidler: Lipidlerde çözünen antioksidanlar sınıfından olan flavonoidler bitkilerdeki kırmızı, mavi ve sarı renk pigmentlerini oluşturan polifenollerdir. Başlıca besinsel kaynakları elma, portakal, limon gibi meyveler ile patates, karnabahar gibi sebzelerdir. Şarap ve çay gibi bitkisel kaynaklı içeceklerde de bulunurlar. Flavonoidlerin farklı yollarla lipid peroksidasyonunu engellediği belirlenmiştir¹⁶.

- a) Peroksidasyonu başlatan radikalleri tutarlar,
- b) Metal iyonlarını bağlarlar,
- c) Radikal oluşturuvcu enzimleri inhibe ederler.

Ancak bazı flavonoidlerin metal iyonlarıyla etkileşerek pro-oksidan etki yaptığı da saptanmıştır.

Melatonin: En zararlı radikallerden $OH^{\bullet}$ 'ı ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Melatoninin $OH^{\bullet}$ ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüştüğü ve bu radikalın de $O_2^{\bullet}$ 'yi tutarak antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Melatoninin bir diğer önemli özelliği lipofilik olmasıdır. Böylece hücrelerin bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan-beyin bariyerini de kolayca geçer. Bu nedenlerle çok geniş bir dağılımla antioksidan aktivite gösterir. Melatoninin çok yüksek dozlarda ve uzun süre kullanımında bile toksik etkisi gözlenmemiştir. Ayrıca, bazı antioksidanlar gibi pro-oksidan aktivitesi de yoktur. DNA hasarının melatonin tarafından çok

etkili bir şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir. Yaşlanma ile birlikte melatonin üretimi azalır. Bu durumun yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogenezinde önemli olabileceği düşünülmektedir ¹⁶.

Ürik asid: Ürik asid normal plazma konsantrasyonlarında antioksidan etki gösteren bir moleküldür. Antioksidan etkisinin çeşitli kaynakları vardır:

- a) Demir ve bakır iyonlarını bağlayarak etkisizleştirir,
- b) Singlet oksijen, hipoklorit, $\text{OH}^\bullet$, $\text{O}_2^\bullet$ ve $\text{ROO}^\bullet$ gibi reaktif oksijen türlerini temizler.

Lipid radikalleri üzerinde etkisi yoktur. Ayrıca, C vitaminini oksidasyonuna karşı korur ¹⁶.

Albümin: Yapısında bulunan çok sayıdaki sülfidril grubu aracılığı ile bakır iyonlarını bağlar ve lipid peroksidasyonunun başlamasını engeller. Bakır iyonlarının bağlanması ile protein yapısında hasar ortaya çıkar, ancak albümin yarı ömrü oldukça kısa bir protein olduğundan kolaylıkla yenilenebilmektedir. Böylece, bakır iyonlarının diğer proteinlerdeki -SH gruplarına bağlanması ve bu proteinleri hasara uğratması engellenmiş olur. Albümin kanda serbest yağ asitlerinin ve bilirubinin taşıyıcısıdır. Bilirubinin lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği, $\text{OH}^\bullet$ ve $\text{O}_2^\bullet$ nin toplayıcısı olduğu bildirilmiştir ¹⁶.

Diğer Antioksidanlar: Yukarıda sözü edilen antioksidanların dışında, çok sayıda endojen molekülün antioksidan etkisi olduğu ileri sürülmüştür. Bu moleküller arasında sistein, histidin gibi amino asitler ile safra asitleri, bilirubin gibi bileşikler ve sitokinler gibi yapıları ve işlevleri çok farklı olan moleküller vardır. Ayrıca çeşitli eksojen moleküllerin de antioksidan etkisi bildirilmiştir. Başlıcaları şunlardır: XO, NADPH oksidaz gibi radikal kaynağı enzimlerin inhibitörleri, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, steroid yapıda olmayan antiinflamatuvarlar, rekombinant antioksidan enzimler (r-SOD), GPx aktivitesini artıran veya benzer etki gösteren moleküller (asetilsistein, ebselen), serbest radikal toplayıcıları (DMSO, mannitol), demir tutucuları (desferroksamin), besinlere eklenen koruyucular (BHA, BHT, sodyum benzoat, propil gallat) vb. ⁸⁶.

Metal iyonlarının bağlanması yolu ile antioksidan etki: Demir ve bakır iyonları serbest radikal reaksiyonlarına katılarak, reaktivitesi az olan radikallerin daha reaktif şekillere

dönüşmesini hızlandırırlar. Bu etkilerini ancak serbest halde iken gösterebildikleri, çeşitli moleküllere özellikle de proteinlere bağlı durumda iken radikal reaksiyonlarında yer almadıkları bildirilmiştir. Bu nedenle, demir ve bakırın depolanmasında ve taşınmasında görev alan proteinlerin antioksidan savunmaya önemli katkıları vardır. Bakır bağlayıcı, taşıyıcı bir protein olan seruloplazmin, ferro-oksidad aktivitesi gösterir ve Fe^{+2} 'yi Fe^{+3} 'e yükseltgeyerek serbest radikal oluşumunu baskılar. Transferrin ve laktoferrin dolaşımdaki serbest demiri bağlayarak antioksidan etki gösterirler. Ferritin dokulardaki demiri bağlar. Desferrioksamin gibi demir şelatörleri hücre içine girerek serbest demiri bağlamak suretiyle antioksidan etki gösterirler. Albümin de seruloplazmin gibi bakır iyonlarını bağlayan bir taşıyıcı proteindir. Bakır ve demir iyonlarını bağlayarak antioksidan etki gösteren bir başka molekül de ürik asittir¹⁶.

Balık Yağı: Balık yağı *Gadus morrhua* ve *Gadidea* familyası grubu balıkların uygun şekilde saklanmış karaciğerinden elde edilir. 0 °C' de süzülerek katı yağlardan kurtarılmış sabit yağdır. Bir gramında en az 600 IU A vitamini, 85 IU D vitamini ihtiva etmektedir⁸⁷.

Balık yağı içerisinde bulunan omega-3 poliansatüre yağ asitleri eikosapentaenoik asid ve dokosaheksaenoik asittir. Bunlar omega-6 yağ asitleri (ayçiçek yağı, mısır yağı, pamuk yağı gibi bitkisel yağ asitleri) ile birlikte antiaterojen yağ asitleri olarak benimsenmektedir. Omega-6 yağ asitlerini içeren yağlar 1960'lı yıllardan beri serumda total kolesterol düzeylerini düşürmek amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Omega-3 yağ asitleri de giderek önem kazanmaktadır. Bunların aterosklerotik damar lezyonlarının oluşmasını ve gelişmesini engellediği, hatta oluşmuş lezyonları geriletği ileri sürülmektedir. Balık yağlarının antiaterojen etkisinin kan lipidlerini düşürmekten ziyade, prostasiklin, tromboksan, lökotrien (LT) ve fibrinojen gibi değişik faktörleri etkilemesinden kaynaklandığı saptanmıştır. Tromboksan A_3 'ün vazokonstriksiyon ve trombosit agregasyonunu artırıcı etkisi zayıftır. Böylece balık yağı kullanımı ile trombosit agregasyonu azalmakta ve vazodilatasyon gelişmektedir⁸⁷.

Omega-3 ve omega-6 yağ asitleri (çok doymamış yağ asitleri, PUFA) dayanıklı olmayıp kolayca otooksidasyona uğramaktadırlar. Bu olay zararlı lipid peroksidlerinin ve onun parçalanma ürünlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle omega-6 yağ asitlerinden zengin beslenme organizmada lipid peroksidasyonuna duyarlılığı artırmakta ve organizmanın antioksidan rezervini bozmaktadır.

Balık yağı içerisinde bulunan A vitamini özellikle görme, üreme, ekzokrin bez salgısı ve mukus salgılanması gibi fizyolojik fonksiyonlarda önemli rol oynar. Hücre membranlarının normal stabilitesinin devam etmesi için gereklidir. A vitamini, bitkilerde karotenoidler; hayvansal besinlerde ise retinol esteri halinde bulunur. A vitamini hücre düzeyinde antioksidan etkinlik gösterir. Serbest oksijen radikallerinden singlet oksijeni inaktif O₂'e indirger. Yağda çözünür olması nedeni ile bu etkisini sitoplazmadan ziyade hücrede subsellüler yapıların membranında gösterir⁸⁷.

2.5. Steroid Olmayan Antiinflamatuvar İlaçlar (NSAİİ)

NSAİİ'lar kimyasal yapı açısından heterojen olmalarına rağmen farmakolojik yönden benzer ortak özellikler gösterirler. Plazma proteinlerine güçlü olarak bağlanırlar. Yağda ve zayıf asitlerde çözünürler. Antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkileri ve benzer yan etkileri vardır⁵. NSAİİ'lar pKa değerleri 3 ile 5 arasında değişen zayıf organik asitlerdir⁸⁸. PG sentezini inhibe ederler. PG'ler vasküler permeabilitede değişikliğe neden olurlar. PG sentez inhibisyonundan bağımsız olarak nötrofillerin aktivasyonu üzerine inhibe edici etkileri vardır⁸⁹. Ayrıca ağrı reseptörleri üzerine etkirler. Termoregülasyonda rol oynarlar⁵.

NSAİİ'lar PG sentezinde siklooksijenaz yolunu inhibe ederler. Enzimin sentezi farmakolojik olarak fosfolipaz A₂ inhibisyonu, araşidonik asit ile kompetisyon ya da peroksit konsantrasyonunun azalması ile inhibe edilir⁵.

Siklooksijenaz enziminin COX-1 ve siklooksijenaz-2 (COX-2) izoformlarının olduğu gösterilmiştir. COX-1 konstitütif enzimdir. Fizyolojik koşullarda trombosit ve vasküler endotelial hücrelerde bulunur. Vasküler hemostazın düzenlenmesinde, gastroprotektif etkide rol oynar. COX-2 ise indüklenebilir formdur. Fizyolojik durumlarda dokularda saptanamaz. İnflamasyon gibi patolojik olaylarda sitokinler, endotoksinlerle indüklenir ve daha çok endotelial hücrelere lokalizedir⁹⁰⁻⁹⁵. Bazı NSAİİ'ler daha çok COX-2'yi inhibe ederler. NSAİİ'ların antiinflamatuvar etkilerinin COX-2 inhibisyonu yolu ile olduğu düşünülmektedir. Böylece istenmeyen gastrointestinal ve renal etkiler daha az ortaya çıkmaktadır^{95,96}.

NSAİİ'lar ayrıca LT'lerin ve eikozanoik asitlerin biyosentezini inhibe ederler. 12 lipoksijenaz tarafından oluşturulan 12-hidroperoksieikozatetraenoik asit (12-HPETE) peroksidaz tarafından redükte olduğunda 12-hidroeoikosatetraenoikasit (12-HETE) ve serbest oksijen radikalleri açığa çıkar. NSAİİ'lar 12-peroksidazı inhibe edip 12-HETE açığa çıkmasını engeller. 5-lipoksijenaz enzimi ile LTB₄, C₄, D₄, E₄ açığa çıkar⁵. LT'lerin açığa çıkışını ve etkilerini inhibe eden ilaçlara potent antiinflamatuvar ilaçlar denmektedir⁹⁷.

NSAİİ'lar tromboksan A₂ (TxA₂) biyosentezini inhibe ederek antiagregan etki göstermektedirler. Siklooksijenaz inhibitörlerinin antiagregan özelliği vardır⁵.

PG'ler akut ve kronik inflamasyonun yanı sıra, periferik ağrı ve ateşten de sorumludurlar⁵. NSAİİ'lar hiperalejik olan PG'lerin birikimine engel olarak ağrı uyarısının etkinliğini azaltabilmektedirler⁹⁸.

Tüm NSAİİ'lar nötrofil agregasyonunu inhibe etmektedir. Akut inflamasyonda en önemli başlangıç mekanizmalarından birisi nötrofillerin vasküler endotel ile etkileşimidir⁹⁹. NSAİİ'ların ayrıca nötrofil migrasyonunu yavaşlattıkları ve hücre membranına zarar verdikleri gösterilmiştir⁵. Nötrofillerin inflamasyon ile serbest oksijen radikalini yıkan savunma enzimlerinin saturasyonu sonucu, eikozanoik asitler artmaktadır^{5,100-102}. Bazı NSAİİ'ların serbest radikalleri yakalama ve inaktive etme yeteneğine sahip oldukları ileri sürülmüştür⁵.

İnflamasyonda araşidonik asit metabolizmasındaki bozulma, fagositozda serbest radikallerin birikimi, yabancı partiküllerin C_{3b} peptidi ile opsonizasyonu lizozomal enzimlerin açığa çıkışını kolaylaştırmaktadır. NSAİİ'lardan bazılarının lizozomal enzimlerin serbestleşmesini engellediği in vitro olarak gösterilmiştir⁵.

2.5.1. NSAİİ'ların başlıcaları:⁵

Salisilatlar: Asetilsalisilik asit, sodyum salisilat

İndol türevleri: İndometazin, sulindak, oksametazin

Pirazolon türevleri: Fenilbutazon, pirazinobutazon, oksifenbutazon, dipiron

Oksikam bileşikleri: Piroksikam, tenoksikam

Propiyonik asit türevleri: Ketoprofen, ibuprofen, naproksen, nabumeton, fenobrofen

Fenilasetik asit türevleri: Diklofenak sodyum

Pirolasetik asit türevleri: Ketorolak

Fenamatlar ya da antranilik asit türevleri: Meklofenamat, mefanamik asit, niklumik asit

Siklooksijenaz enzimi inhibisyonu yapan NSAİİ'lar arasında aspirin, indometazin, flurbiprofen, mefanamik asit, piroksikam, sulindak, nabumeton, ibuprofen, diklofenak sodyum, naproksen sayılabilir ⁵. İndometazin, piroksikam, ibuprofen, sulindak özellikle COX-1'i inhibe eder ^{90,91,95}. Meklofenamat hem COX-1 hem de COX-2'yi inhibe eder ⁹⁰.

Doğal savunma ya da immunolojik hücrel reaksiyonlarda NSAİİ'ların etki mekanizması açık değildir. PGE₂, T hücrelerinin transendotelial migrasyonunu inhibe ederek antiinflamatuvar etki gösterir. Bu etkiyi T hücre ve endotelial hücrelerdeki cAMP aracılı değişiklikleri inhibe ederek ortaya çıkarır ¹⁰³.

Yüksek konsantrasyonlardaki oksijen radikalleri otoimmün hastalıklardaki kronik inflamasyon ve DNA hasarında, ayrıca primer alloantijen-indüksiyonlu T hücre aktivasyonu ve proliferasyonunda rol alırlar. Romatoid artritte oksijen radikali süpürücülerinin yararları henüz inceleme aşamasındadır ⁶.

Araşidonik asidin siklik endoperoksidler olan PGG₂'nin PGH₂'ye dönüşümü sırasında ve ayrıca araşidonik asitten lipoksijenaz aracılığı ile lipid peroksidler oluşurken, aktif oksijen radikalleri olan O₂[•] anyonu ve serbest OH[•] oluşur. Fazla sitotoksik olan bu bileşikler iltihap olayının meydana gelmesine katkıda bulunurlar. Gerçekte aktif oksijen radikalleri hücrelerde normal durumda da oluşurlar; fakat SOD ve benzeri enzimlerle hemen inaktive edilirler. İltihaplı dokuda, özellikle PMNL'ler ve makrofajlar tarafından aşırı derecede ve kontrolsüz bir şekilde aktif oksijen radikali üretilir. Bunun bir nedeni, iltihabı oluşturan stimulusun, anılan hücrelerde heksoz monofosfat şantını aktive ederek non-mitokondriyal enerji üretimini artırmasıdır ^{6,104}.

Serbest radikalleri yakalama ve inaktive etme yeteneğine sahip NSAİİ'lar içinde salisilatların in vitro olarak böyle bir etkiye sahip oldukları gösterilmiştir ⁴. Ayrıca indometazin, fenilbutazon da süperoksid açığa çıkışını inhibe eder. Böylece doku peroksidasyonu engellenir ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Sodyum salisilat, indometazin, fenilbutazon, sulindak,

diklofenak, meklofenamat ve azapropazonun antiinflamatuvar etkilerinin kısmen, iltihaplı dokuda aktif oksijen radikallerinin oluşmasını inhibe etmeleri ile ve/veya oluşmaları bağlayıp inaktive etmeleri ile ilişki gösterdiği saptanmıştır. Aktif oksijen radikallerini inaktive eden SOD enzimi preparatları (Orgetein gibi), romatoid artritli hastalarda intraartiküler veya parenteral verilerek tedavi edici ilaç olarak halen denenmektedir; alınan sonuçlar olumlu gözükmemektedir ^{6,104}.

OH[•]'ın klasik süpürücüleri mannitol ve tioürelerdir. Ancak bu bileşikler çok yüksek konsantrasyonda etki gösterirler, in vivo böyle kullanımları uygun değildir. Süpürücü özellikler açısından PGB₂ analogları, kafein, hipotaurin, antiaritmikler (lidokain, kinidin, prokainamid) ibuprofen ve yeşil çaydan elde edilen polifenoller sayılabilir. Test edilen birçok antiinflamatuvar ilaç arasında en güçlü antioksidan etkisi olan ilaçlar lobenzarit, ibuprofen ve metabolitleridir.

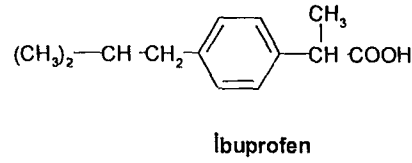
2.5.2. Profenler (Fenilpropionik Asit Türevleri)

Profenler; aspirin ve asetaminofenden sonra en fazla kullanılan analjezik ilaçlardır. Bu grup içinde en fazla kullanılan ibuprofendir ve bazı batı ülkelerinde oral ibuprofen preparatları reçetesiz ilaç statüsündedir.

Profenlerin moleküllerinde bir kiral merkez bulunduğu için S ve R enantiyomerleri vardır. Saf S şeklinden oluşan naproksen hariç, profenler rasemat şeklinedirler. S-enantiyomerlerinin siklooksijenazı inhibe edici ve analjezik etki gücü, R- şekline göre çok fazladır. Vücuttaki metabolizmaları stereoselektiftir; bu olay ibuprofen ile etraflı bir biçimde incelenmiştir. Karaciğerde R-profenler tek yönlü olarak daha aktif olan S-profenlere dönüştürülürler (inversiyon). En fazla inversiyona uğrayanlar ibuprofen ve fenoprofendir (%60). Gerek S- ve gerekse R- şekilleri karaciğerde oksidatif değişikliklere ve glukuronat konjugasyonuna maruz kalırlar. R-şekilleri, S-şekillerinden farklı olarak, endojen yağ asitleri gibi hareket ederek gliserolle birleşirler ve kısmen hibrid triasilgliseroller haline geçerler. Böylece R şekli, kronik kullanılış sırasında giderek artan bir miktarda yağ dokusunda birikir; bu olayın terapötik etkinliğe yansımalarının sonuçları halen bilinmemektedir ¹⁰⁴.

2.5.3. İbuprofen

Fenilpropionik asid türevleri içinde ilk bulunanıdır. Analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkinliği diğer fenilpropionik asid türevlerine ve indometasine oranla zayıftır. Trombosit agregasyonunu aspirin ve indometasine göre daha düşük bir derecede inhibe ettiği bulunmuştur. Günde 1.2 g dozunda, esas olarak analjezik etki yaptığı ve antiinflamatuvar etkisinin ancak 1.6 g ve özellikle 2.4 g günlük doz düzeyinde belirgin duruma geldiği saptanmıştır.



Şekil 3. İbuprofenin kimyasal yapısı.

İn vitro incelemeler, ibuprofenin sadece S(+)-enantiyomerinin prostaglandin sentez inhibitörü olduğunu ve dolayısı ile sadece bu enantiyomerin in vivo antiinflamatuvar etki yapabildiğini göstermiştir. Sıçan ve farelerde yapılan incelemeler, yukarıda belirtildiği gibi, rasemik ibuprofenin yarısını oluşturan inaktif R(-)-izomerinin vücutta aktif izomere kısmen dönüşebildiğini göstermiştir. Bu nedenle in vivo koşullarda izomerler arasındaki etkinlik farkı azalır. Tıpta rasemik karışım şeklinde kullanılan ibuprofenin antiinflamatuvar dozunun, analjezik dozundan daha yüksek olması yukardaki özelliği ile ilgili olabilir.

İbuprofenin analjezik etkisi ağızdan alınmasının ardından çabuk (1 saat içinde) başlar. Ancak genellikle 4 haftalık bir uygulamadan sonra gecikmeli olarak belirgin hale gelir. Hastalar bu ilaca, aspirin, indometasin veya fenilbutazona karşı olduğundan daha iyi dayanırlar. Günlük dozun 1.2 g'dan 2.4 g'a çıkarılması yan tesir insidensinde nisbeten az bir artma yapar.

Mide-barsak kanalından yaklaşık % 80 oranında ve çabuk absorbe edilir. Tek dozdan sonra maksimum plazma düzeyine 1-2 saatte erişilir. Besin ile birlikte verilmesi absorpsiyon hızını ve derecesini azaltır. Plasmada yüksek oranda proteinlere bağlanır (% 99). Karaciğerde

metabolize edilmek suretiyle inaktive edilir. Eliminasyon yarılanma ömrü 1.6-2.5 saattir. Metabolizması stereoselektiflik gösterir; aktivitesi düşük olan R- enantiyomeri daha yavaş elimine edilir. Bu enantiyomer kısmen S- enantiyomerine dönüştürülür (inversiyon). İbuprofen, sinovyal dokuda, diğer bazı antiinflamatuvar analjezikler gibi, plazmadakinden daha uzun bir süre kalır.

En sık görülen yan tesirleri gastrointestinal kanalla ilgili olanlardır (bulantı, kusma, diyare veya kabızlık). Bu yan tesirler aspirin, indometasin ve fenilbutazona kıyasla daha seyrek görülür. Hepatotoksik etki potansiyeli çok düşük de olsa vardır; serum transaminaz düzeyini yükseltebilir. Deney hayvanlarında teratojenik etki yapmadığı görülmüştür¹⁰⁴.

2.6. Yağ Asitleri

Doğada 40' dan fazla yağ asidi vardır. Yağ asitleri $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ genel formülü ile gösterilebilir. Bu formülde n mevcut CH_2 köklerinin sayısını gösterir. Bu sayı 2'den 24'e kadar değişebilir. Doğadaki yağ asitleri 3 tipe ayrılabilir:

- 1) Doymuş yağ asitleri; karbon atomları arasında sadece tekli bağlar içerir.
- 2) Tekli doymamış yağ asitleri; sadece 2 karbon atomu arasında bir tek çiftli bağ vardır.
- 3) Çoklu doymamış yağ asitleri; iki veya daha fazla çiftli bağ içerirler.

Bir yağın ne oranda doymamış yağ asidi içerdiğini anlamak için iyod yakalama yeteneği araştırılır. Buna o yağın iyod sayısı denir.

Yağ asitlerindeki karbon atomu sayısı rakamla gösterilebilir. Yağ asidi doymamış yağ asidi ise hangi karbon atomundan sonra çift bağ varsa onun numarası da yanına delta (Δ) işareti konarak gösterilebilir. Örneğin 9. ve 10. karbon atomları arasında çift bağ olan oleik asit $\text{C}_{18\Delta9}$ diye ifade edilir. Doğada bulunan önemli yağ asitleri;

Doymuş Yağ Asitleri:

Bütirik Asit	C ₄
Kaproik Asit	C ₆
Kaprik Asit	C ₁₀
Laurik Asit	C ₁₂
Miristik Asit	C ₁₄
Palmitik Asit	C ₁₆
Stearik Asit	C ₁₈

Tekli Doymamış Yağ Asitleri:

(Monoetenoid Asitler)

Palmitoleik Asit	C ₁₆ Δ 9
Oleik Asit	C ₁₈ Δ 9
Erusik Asit	C ₂₂ Δ 13

Çoklu Doymamış Yağ Asitleri:

(Polietenoid Asitler)

Linoleik Asit	C ₁₈ Δ 9 12
Linolenik Asit	C ₁₈ Δ 9 12 15
Araşidonik Asit	C ₂₀ Δ 5 8.11 12

Tatlı su bitki ve hayvanlarında doymamış C₁₆, C₁₈, C₂₀ ve C₂₂ yağ asitleri bol bulunur. Bu canlılarda tek doymamış yağ asidi % 10-20 oranında bulunan palmitik asittir. Deniz dünyasında ise doymamış C₂₀ ve C₂₂ yağ asitleri egemendir.

Bazı bitkisel sıvı yağlar sağlık için önemli tehlikeler oluşturabilir. Erusik asit oranı yüksek kolza yağı sağlığa zararlı olması açısından en ünlü bitkisel yağdır. Kolza tohumlarının yağ oranı yüksek olduğundan maliyeti düşük bu yağ aslında sanayi amaçlarıyla üretildiği halde maalesef bazen yemeklik yağlara karıştırılmaktadır. 1981 yılında İspanya'daki kitlesel yağ zehirlenmesi bunun örneklerinden biridir. Erusik asit oranı düşük kolza tohumlarının

üretilmiş olması şüphesiz önemli bir aşamadır. Ancak erusik asit oranı % 5'in altında bile olsa erusik asit içeren yağların sağlığa zararlı olabileceğini telkin eden ciddi yayınlar vardır ^{43,108}.

2.6.1. Erusik Asit

Tekli doymamış yağ asitleri grubunda yer alan erusik asit ($C_{22} \Delta_{13}$), C_{20} ve C_{24} gibi polienoik yağ asitleri, linoleik ve α -linolenik asid'den zincir uzaması yolu ile türerler ⁴⁶.

Adenolökodistrofi hastalığında kullanılan erusik asit (cis-13 dokozoenik asit, Ω -9), yağ asitleri yıkımından sorumlu peroksizom organellerinin sayı ve fonksiyonunu düzenleyen PPAR (peroksizom prolife edici reseptör) reseptörlerine bağlanmaktadır. Son yıllarda bu reseptörlere bağlanıp aktive eden bazı ilaçların hem kanseri engelleyici (ör: trazolidindione türevi antidiabetikler), hem de provake edici (klofibrat gibi kolesterol düşürücü ilaçların kemirgenlerde karaciğer kanseri indüksiyonu) etkileri yoğun araştırmaların konusudur ^{109,110}.

Erusik asidin antioksidan olduğuna dair veriler elde edilmektedir. Bazı çalışmalarda erusik asidin kardiyotrofik etkilerinin olduğu ve kalbi miyokard infarktüsü sonucu oluşan hasardan koruduğu gösterilmiştir ^{108,109}.

2.7. Peroksizom Prolifere Edici Reseptör (PPAR)

PPAR'lerin 1990'da ilk keşfi peroksizom proliferasyonunu anlamamız için bir anahtar olmuştur. Sonrasında PPAR'lar adiposit farklılaşmasının anlaşılmasına yardımcı oldular. PPAR'ler peroksizomlar hakkındaki bilinmezliğin çözülmesinde de etkili olmuşlardır. Onların medikal önemi obesite üzerindeki rolünün ötesindedir. Artmış PPAR alfa ekspresyonu, kardiovasküler hastalıklara karşı koruyucudur. PPAR mekanizmaları, asıl olarak fazla diferansiye hücre fenotiplerinin indüksiyonu yolu ile, bazı kanserlere karşı koruyucudur. Pek çok hücre tipinin diferansiasyonu (hepatosit, fibroblast, adiposit, keratinosit, miyosit ve

monosit/makrofaj) PPAR 'ler içerir ve şimdi bu nükleer reseptörler pek çok medikal spesiyalitelerin ve farmakoloji endüstrisinin dikkatini çekmektedir ¹⁰⁹.

PPAR biyolojisine ilk önemli bakış PPAR alfa aracılı karaciğer peroksizomal beta oksidasyonunun kontrolünün gösterilmesi ve PPAR gamanın adipogenezisteki rolünün incelenmesinden kaynaklanmaktadır. Bu yüzden PPAR hedef genlerinin tanımlanma araştırmaları temel olarak hepatosit ve adipositlerde yoğunlaşmıştır. Böylece her ikisi de sistemik lipid metabolizmasında ve lipid homeostazisinde PPAR'nin genel düzenleyici etkisinin ortaya çıkmasında anahtar rol oynamışlardır ¹¹¹.

2.7.1. Peroksizom Proliferasyonu

Peroksizom bir subselüler organeldir, fonksiyonu moleküler oksijenin kaldırılması ve daha sonra hidrojen peroksidin bozulmasının ötesinde, gliserolipid sentezi, kolesterol biyosentezi ve bozulması (safra asidi oluşumu), yağ asidi oksidasyonunu içermektedir. Issemann ve Green'in ¹⁰⁹, peroksizom proliferatörlerinin steroid reseptör ailesinde bir geni aktive edebileceğini bildirmesi ile 1990 yılında PPAR denilen bu nükleer reseptör yeni bir buluş halini almıştır. Üç temel PPAR tanımlanmıştır ^{109,110}.

2.7.2. PPAR Yapısı ve Fonksiyonu

PPAR bir kompakt moleküldür. İnsan PPAR alfa 468, PPAR beta/delta 441 ve PPAR gama 479 aminoasit residüsüne sahiptir. Diğer steroid–reseptör süperfamilyasında olduğu gibi, PPAR'lar da dört fonksiyonel bölgede beş ya da altı yapısal alana (A-F) sahiptirler. C bölgesi, DNA-bağlayan bölge (DBD)'dir. E/F bölgesi ligand bağlayıcıdır (LBD). PPAR alfanın fosforilasyonu, reseptör/ligand afinitesini pozitif olarak etkileyebilmektedir ¹⁰⁹.

2.7.3. PPAR ve Gen Ekspresyonu

PPAR üç izoforma sahiptir: alfa, beta (delta), gama. PPAR beta, yağ asitleri tarafından aktive edilir, fakat adipozit farklılaşmasında rolü zıt kalmaktadır. Doğal prostaglandin 15-deoksi-delta-prostaglandin J₂ (15d-PG J₂) ve sentetik tiazolidindion ilaçların her ikisi de PPAR gamaya bağlanmaktadır. Poliansatüre yağ asitleri için asıl tercih PPAR alfa olmasına rağmen, birçok yağ asidi her üç PPAR izoformuna da bağlanmaktadır. Yağ asitleri kendi metabolizmalarını düzenleyeceğinden dolayı, hormonlar gibi davranırlar. Lökotrienler ve prostaglandinler gibi bazı yağ asidi türevleri kendi reseptörlerine olandan daha yüksek bir afinite ile PPAR'lara bağlanabilirler. İnflamatuvar yanıtın güçlü bir mediatörü olan LB₄, doğal güçlü bir ligandır ^{109,111}. 8-hidroksi eikozatetraenoik asit gibi lipoksijenaz yolağının diğer ürünleri de PPAR alfaya bağlanabilmektedir. PG A, D ve J'nin yüksek konsantrasyonları PPAR'ları aktive edebilmektedir. Bu işte PPAR gama en fazla sorumludur ve 15d-PG J₂ güçlü bir aktivatördür. PG F₂, PPAR gama ekspresyonunu negatif olarak düzenleyebilir ¹⁰⁹.

Deneyisel hipolipidemik bileşik Wy-14.643 PPAR alfanın güçlü bir ligandır. Hipolipidemik ilaçlardan bezafibrat ve klofibrat gibi fibratlar da PPAR alfaya bağlanırlar ve bu, sözkonusu ilaçların kardiyovasküler bozukluklardaki terapötik değerlerini göstermektedir. Gemfibrozil ve probukol gibi non-fibrat hipolipidemik ilaçlar PPAR ile etkileşmezler ^{109,111}.

Antidiabetik tiazolidindion da PPAR gamanın ligandır ve bu onun insülin duyarsızlaştırıcı ve antihiperglisemik etkilerini açıklar. İlaç nedenli PPAR gama aktivasyonu adipozit farklılaşması ve köpük hücre oluşumunu uyarmaktadır ve tümör hücre büyümesine katkıda bulunmaktadır ¹⁰⁹.

Çeşitli nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar (indometasin, flufenamik asit, fenoprofen, ibuprofen vb.) PPAR alfa ve gamaya bağlanmaktadır ^{109,111,112}. Bunların antiinflamatuvar özellikleri COX-1 ve COX-2'yi inhibe etme kapasitelerinden kaynaklanmaktadır. PPAR alfa COX-2 oluşumunu baskılamaktadır, bu yüzden PPAR alfanın aktivasyonu bu ilaçların antiinflamatuvar etkilerine katkıda bulunmaktadır. Aynı ilaçların adipojenik özellikleri, onların PPAR gama ile etkileşim yetenekleri ile paraleldir ¹⁰⁹.

PPAR alfa glukoneogenezisin olduğu organlarda (karaciğer, barsak ve renal korteks) ve kalp kası hücrelerinde yoğun bir şekilde eksprese edilmektedir. Oysa PPAR gama ekspresyonu beyaz yağ dokusu ve immün hücrelerde daha fazladır. Bu ekspresyon rodent ve insanlarda oluşmaktadır. PPAR'lar yağ asidinin transportu, aktivasyonu ve oksidasyonuna katılan genlerde bulunmuşlardır. Çünkü bunlar doğal ya da ksenobiotik bileşikler tarafından oluşturulan mitokondriyal yağ asidi oksidasyonunu düzenliyor olarak kabul edilirler. PPAR aracılı olaylar negatif feedback tarafından lipid metabolizmasının kontrolü gibi düşünülmektedir ¹⁰⁹.

PPAR gama aktivasyonu, hepatosit, fibroblast, miyosit, göğüs ve kolon epitel hücrelerinde, hücre farklılaşmasını uyarır ¹⁰⁹.

2.7.4. Antiinflamatuvar Özellikler

Lipid mediatörleri, prostaglandinler, lökotrienler, tromboksanlar ve lipoksinler, inflamasyonun stimülasyonu ve inhibisyonu gibi fizyolojik süreçlere katılırlar. PPAR'ın inflamasyondaki rolü ilk kez bir membran reseptörü tarafından aktivasyonuna aracılık eden, güçlü bir kemotaktik inflamatuvar eikozanoid olan LTB₄'ün gösterilmesi ile tanımlanmıştır ¹¹¹

PPAR alfa gibi PPAR gama da antiinflamatuvar özelliğe sahiptir. PPAR gama aktive makrofajlarda up-regüle edilir ve inducibl nitrik oksit sentazın sekresyonunu, jelatinaz B'yi (doku hasarına neden olabilir) ve süpürücü reseptör A'yı (hücre adhezyon olaylarına ve okside LDL'nin uptake'ine neden olur) inhibe eder. PPAR gama, IL-1 β , IL-6 ve TNF α 'nın monosit sekresyonunu azaltır. Bu sitokinler PPAR gamanın adipojenik özelliklerini antagonize ederler ve bunun tersi de doğrudur. PPAR gamanın ligandları olan NSAİİ'ler, siklooksijenaz inhibisyonu için gereken dozdan daha yüksek dozlarda, monositler tarafından üretilen sitokinleri azaltabilirler. Bu, romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıklarda yüksek dozlarda verilen bu ilaçların neden daha etkili olduklarını açıklamaktadır ^{109,111}.

PPAR'ların kardiovasküler hastalıklar da ilişkisi vardır. Aterosklerozisin göstergesi olan, aortik düz kas hücresinin inflamatuvar aktivasyonu, fibratlar tarafından oluşturulan

artmış PPAR alfa aktivasyonu tarafından inhibe edilebilmektedir. Fibratlar tarafından PPAR alfanın aktivasyonu, dolaşan HDL’de bir artışla sonuçlanan hepatositlerde APO-A1 ve APO-A2’nin indüksiyonuna yol açar ¹⁰⁹.

Artmış PPAR gama ekspresyonu hem koruyucu hem de istenmeyen etkilere neden olabilir. Çünkü bu ikisi arasındaki denge bilinmemektedir. Bu yüzden PPAR gama agonisti ya da antagonistleri tedavisinin kalp hastalığı gelişmesindeki etkisi hakkında bir şey söylemek henüz erkendir ¹⁰⁹.

PPAR alfa asıl olarak karaciğer ve immün sistemi içeren, yüksek yağ asidi katabolizmasına sahip dokularda eksprese edilir. PPAR alfanın fonksiyonları karaciğerde omega ve beta oksidasyon yolağı ile aktive edilen çeşitli ksenobiyotikleri detoksifiye etmek ve yağ asitlerini degrade etmektir. PPAR alfanın diğer dokulardaki rolü bilinmemektedir. PPAR alfa, LTB₄ ya da onun metabolik prekürsörü araşidonik asit tarafından oluşan inflamatuvar cevabın süresini etkilemektedir. PPAR alfa ve PPAR gama’nın selektif agonistlerinin tanımlanmasına rağmen ¹¹², hNUC1/PPAR delta (beta)’nı tanımlanamamıştır. Johnson ve arkadaşları hNUC1/PPAR delta(beta)’nın selektif aktivatörlerini araştırmışlar ve çok uzun zincirli yağ asitlerinden olan erusik asidin hNUC1’e selektif olduğunu bulmuşlardır ^{110,111}. Doğal inflamasyon mediatörü LTB₄ ve sentetik hipolipidemik ilaç olan Wy 14.643’ün her ikisi de PPAR alfanın ligandlarıdır ^{109,111}. Erusik asit PPAR alfayı aktive etmeyen bileşiklerdendir ¹⁰⁸.

İndometasinin yanısıra fenoprofen, ibuprofen ve flufenamik asit gibi diğer birkaç NSAİİ’lerin de PPAR gama ligandları olduğu gösterilmiştir. PPAR gama’yı aktive eden benzer NSAİİ’lerin PPAR alfa’nın aktivasyonunda da etkili olduğu bulunmuştur. PPAR alfa’nın karaciğerde bol bulunan bir PPAR alt tipi olduğu ve peroksizom proliferasyonunda anahtar rol oynadığı gösterilmiştir. Birkaç NSAİİ’nin hepatositlerde hem in vivo hem de in vitro peroksizomal aktivasyon oluşturduğu rapor edilmiştir ¹¹².

2.7.5. PPAR Alfa ve İnflamasyon Cevabı

İnflamasyon bölgesinde, LTB₄'ün degradasyon oranı ve seviyesi inflamatuvar cevabın süresini ve yaygınlığını belirler. PPAR alfa ve LTB₄ arasındaki direkt ilişki, yağ asidi degradasyonu enzimlerini meydana getirir ve LTB₄ katabolizmasını artırır. Bu yüzden PPAR alfa, LTB₄ aracılı inflamasyonun süresinin güçlü bir düzenleyicisidir. Bu PPAR alfa Wild-type (+/+) ve knockout (-/-) farelerde inflamatuvar cevap karşılaştırılarak test edilebilir. PPAR alfa aktivitesi eksikliğinde inflamatuvar cevabın uzadığı gösterilmiştir ¹⁰⁸.

PPAR alfa omega ve beta oksidasyonun miktarını düzenlemektedir. PPAR alfa karaciğer, böbrek, kahverengi yağ dokusu, göz, sindirim sistemi, immün ve genital sistemlerde eksprese edilmektedir. Fakat sadece karaciğerde (yağ asitleri ve ksenobiotiklerin katabolizmasında) ve immün sistemde (inflamatuvar cevabın süresinin belirlenmesinde) onun fonksiyonu bilinmektedir. PPAR alfa fonksiyonunu artıran bileşikler ki bunu ya reseptör seviyesini artırarak ya da reseptörü aktive ederek yaparlar, antiinflamatuvar ilaçlar olmalıdırlar ¹⁰⁸. PPAR alfanın gen ekspresyonunun down-regülasyonu sıçanda kronik alkolik karaciğer hastalığında gözlenmiştir ¹¹¹.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Deney Hayvanı:

Bu çalışmada İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma ve Üretim Laboratuvarında yetiştirilen ortalama ağırlığı 250-300 g olan 3.5-4 aylık "Sprague Dawley" erkek sıçanlar kullanıldı. % 20'lik protein içeren Eriş Yem Sanayiden temin edilen fare yemi ile ad libitum beslenen ve taze çeşme suyu verilen sıçanların düzenli olarak kafes bakımları yapıldı. Deney grupları aşağıda belirtilen şekilde oluşturuldu:

- 1) Kontrol grubu (K; n=8)
- 2) İbuprofen grubu (I; n=8)
- 3) Erusik asid grubu (E; n=8)
- 4) İbuprofen+Erusik asid grubu (I+E; n=8)

Kontrol grubundaki deney hayvanlarına 20 gün boyunca 1 mL çeşme suyu gavajı yapıldı. İbuprofen grubuna 20 gün boyunca 17 mg/kg ibuprofen gavajı; erusik asid grubuna 20 gün boyunca 100 mg/sıçan erusik asid gavajı; ibuprofen+erusik asid grubuna 17 mg/kg ibuprofen ve 100 mg/sıçan erusik asid gavajı yapıldı. 20. Gün tüm grupların gavajları tamamlandıktan 2 saat sonra, 6 g/kg etanol dozu ikiye bölünerek 2 saat ara ile gavaj yöntemi ile her gruba uygulandı. 1 saat sonra eter anestezisi altında hayvanların toraksları açıldı. Sağ ventrikülden heparinize kan örnekleri alındı, karaciğer perfüze edilerek total olarak çıkarıldı ve plazmaları ayrılan kan örnekleri ile birlikte çalışmanın yapılacağı zamana kadar -70 °C'de saklandı.

3.1.2. Etanol dozu: ⁴⁷

Çalışmanın 20. gününde verilecek olan toplam günlük doz 6 g/kg olacak şekilde % 30'luk etanol intragastrik olarak uygulandı. Ancak bu doz tek gavajla öldürtücü olabileceği için ikiye bölünerek verildi.

% 100'lük absolü etanolün yoğunluğunun (d) 0.79 g/mL olduğu bilindiğinden buradan 6 g etanolün mL olarak miktarı hesaplandı. Bu değer 7.6 mL olarak bulundu. 7.6 mL absolü etanolün miktarı olduğu için, % 30'luk etanol miktarının 25.3 mL olduğu belirlendi. Bu miktar sıçan ağırlığına göre hesaplanıp deney şemasına uygun şekilde iki eşit doz bölünerek gavaj yapıldı. % 30'luk etanol hazırlamak için gerekli olan absolü etanol distile su ile seyreltilerek hazırlandı.

3.1.3. İbuprofen dozu ¹¹³

Yetişkinlerde günlük maksimum doz olan 2,4 g göz önünde bulundurularak, toplam günlük doz 17 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde intragastrik ibuprofen gavajı yapıldı.

3.1.4. Erusik asid dozu:

Toplam günlük doz 100 mg/sıçan olacak şekilde intragastrik erusik asid gavajı yapıldı.

Tablo 2. Deney gavaj şeması

Gruplar	1-20. Gün	20. Gün
Kontrol	1 mL çeşme suyu	6 g/kg etanol
İbuprofen	17 mg/kg ibuprofen	6 g/kg etanol
Erusik asid	100 mg/sıçan erusik asid	6 g/kg etanol
İbuprofen+Erusik asid	17 mg/kg ibuprofen 100 mg/sıçan erusik asid	6 g/kg etanol

3.1.5. Aletler:

- Rua Instruments –86 °C derin dondurucu
- Shimadzu UV/VIS 1202 spektrofotometre
- Hettich Mikrolitter Eppendorf santrifüjü
- Shimadzu Libror AEU-210 hassas terazi
- Christ UJ2 düşük devirli santrifüj
- Elektro-mag vorteks
- Shott CG 840 pH metre
- Boehringer-Mannheim Precitherm PFV su banyosu
- Otomatik pipet
- Mekanik Prufgerate Medingen teflon homojenizatör
- Muhtelif laboratuvar cam malzemeleri

3.2. Yöntemler

3.2.1. Fosfat Tamponu Hazırlanması⁸⁰

Stok fosfat tamponları:

a) 0.05 M KH_2PO_4 = 3.4 g KH_2PO_4 bidistile su ile 500 mL'e tamamlandı.

b) 0.05 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = 4.45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bidistile su ile 500 mL'e tamamlandı.

0.05 M pH:7 fosfat tamponu (çalışma tamponu) = a ve b çözeltileri 1:1.5 (v:v) oranında karıştırıldı.

3.2.2. Karaciğer Dokusu Homojenizasyonu

Karaciğer dokusu $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 'den çıkarıldıktan sonra buz çözülmeyen kesilerek tartıldı. 0,05 M pH=7'lik fosfat tamponu ile %10'luk (w:v) olacak şekilde hazırlandı. Teflon homojenizatörde buz içinde homojenize edildi. Hazırlanan homojenat eppendorf tüplere alınarak 3000 rpm'de 10 dk $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de santrifüj edildi ve süpernatant ayrıldı.

Ayrılan süpernatant MDA, SOD ve CAT ölçümünde kullanıldı.

3.2.3. MDA Ölçümü¹¹⁴

Lipid Peroksidasyonu: Kantitatif ölçüme dayalı testlerden biri olan tiyobarbitürik asid yöntemi ile saptandı.

Bu yöntem, TBARS (Tiyobarbitürik asid ile etkileşen maddeler) olarak da adlandırılır. Sıklıkla kullanılan bu yöntem, lipid peroksitlerinden türeyen çeşitli aldehitlerin ölçümüne dayanır.

Stok Çözelti:

% 30 Triklorasetik asid

% 0,75 Tiyobarbitürik asid

5 M Hidroklorik asid

Prosedür:

Dalga boyu: 535 nm

Küvet: 1 cm ışık yolu

Ölçüm: Köre karşı

Pipetleme:

	Deney	Kör
Örnek (doku)	1mL	—
Distile su	—	1mL
Stok Çözelti	2,7 mL	2,7 mL

Pipetleme:

	Deney	Kör
Örnek (plazma)	350 µL	—
Distile su	—	350 µL
Stok Çözelti	2,7 mL	2,7 mL

Pipetleme işleminden sonra tüpler 15 dk. 100 °C’de tutuldu. Tüpler soğuduktan sonra 3000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Üst faz alınarak spektrofotometrede 535 nm’de absorbansları okundu.

Hesaplama:

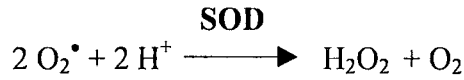
$\Delta \text{Absorbans} \times 47,5 = \text{nM/g doku}$

$\Delta \text{Absorbans} \times 0,05586 = \text{nM/mL}$

3.2.4. Cu-Zn Superoksit Dismutaz Aktivitesi Ölçümü ¹¹⁵

Prensip:

Süperoksit dismutaz oksidatif enerji oluşumu sırasında oluşan O₂[•]'nin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir.



Ksantin ksantin oksidazla reaksiyonu sonucu oluşan O₂[•]'nin nitroblutetrazolium (NBT) ile formazan rengi meydana getirmesi prensibine dayanır. Doku ortamındaki SOD aktivitesinin miktarına göre NBT ile oluşan renk, doku içermeyen köre göre azalır. Ortamdaki SOD aktivitesi fazla olursa, renk o derece azalacaktır. SOD aktivitesi, reaksiyonunun % inhibisyon derecesine göre ölçülür.

Ayırıcılar:

1) pH=10.2'lik çalışma ayıracı (taze hazırlanır)

1 mM DETAPAC (Dietiltriamin pentaasetik asit, Sigma, M.W. 393.3 g)

250 µM BCS (Disodyum bathokuproindisulfonat, Sigma, M.W. 564.5 g)

0.3 mM Ksantin (ACN, M.W 152.1 g)

50 mg/L BSA

50 µM NBT (Nitroblutetrazolium Sigma, M.W 817.6 g)

40 mM Sodyum karbonat (Sigma, M.W 106 g)

2) 0.05 M pH 7'lik fosfat tamponu

3) 2 M Amonyum sülfat (Sigma, M.W. 132.14 g)

4) 0.8 mM CuCl₂.2H₂O (Sigma, M.W. 170,5 g)

5) Ksantin oksidaz (XO)

0.0164 U/tüp olacak şekilde 2M amonyum sülfatla çözülerek hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

Karaciğer dokusu için: Seyreltilmemiş süpernatantla çalışıldı.

Deney körü: Ortama eklenen BCS dokuda bulunan yüksek konsantrasyondaki XO'un yol açacağı etkileşimi azaltır. Bu nedenle, kaynatılmış deney körü çalışılmadı; kaynatılmış dokuda radikallerin ortaya çıktığı ve deney ortamını olumsuz etkilediği görüldü. Dolayısı ile BCS ve DETAPAC eklenen dokudaki XO konsantrasyonunun ihmal edilebileceği düşünüldü.

	Deney	Kör
Çalışma ayırıcı:	1 mL	1 mL
0,05 M fosfat t.:	—	20 µL
Süpernatant:	20 µL	—

25 °C'lik su banyosunda 2 dk tüplerin ısınması beklenir.



XO eklenmesi her tüpe 30 sn ara ile yapılır ve hemen vortekslenir.



XO 50 µL



35 dk 25 °C'de inkübe edilir.



0,8 mM CuCl₂ 2H₂O 50 µL



Vortekslenir.

560 nm dalga boyunda havaya karşı spektrofotometre sıfırlanarak körün ve deney tüplerinin absorbansları kaydedilir.

Hesap:

$$\frac{A_K - A_D}{A_K} \times 50.000 = \text{U/g doku}$$

3.2.5. Katalaz Aktivitesi Ölçümü ¹¹⁶

Prensip:

H₂O₂'in katalaz tarafından O₂ ve H₂O'ya parçalanması sırasında reaksiyon ortamındaki absorbans değişiminin ölçülmesi esasına dayanmaktadır.



Ayırıcılar:

- 1) 0.05 M pH=7'lik fosfat tamponu
- 2) 0.0136 M H₂O₂ (Hidrojen peroksit, Merck, d=1.13 g/mL, % 35 M.W 31.01g):
% 30'luk H₂O₂'den 0.125 mL alınıp fosfat tamponu ile 100 mL'e tamamlanır.

Deneyin Yapılışı:

Karaciğer dokusu için: % 10'luk homojenatın süpernatanı 10 kez seyreltilerek çalışıldı. Spektrofotometre fosfat tamponu içeren köre karşı sıfırlandı. 25 °C'de 240 nm'de başlangıç ve 70 sn sonundaki absorbanslar kaydedildi.

Hesap:

$$\frac{\Delta A \times 312.5}{1000} = \text{U/mg doku}$$

3.2.6. İstatistiksel Analiz ¹¹⁷

İstatistiksel analiz 9.0 SPSS istatistik paket programında (Lisans no: 105192) yapılmış ve veriler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. Sonuçlar One-Way ANOVA (analysis of variance) ve bunu takiben Post Hoc testlerden Tukey HSD testi ile değerlendirilmiştir.

$p \geq 0,05$ anlamsız

$p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

Kontrol ve tedavi gruplarına ait karaciğer dokusu MDA düzeyleri (Tablo 3), karaciğer dokusu SOD aktivitesi (Tablo 4), karaciğer dokusu CAT aktivitesi (Tablo 5), plazma dokusu MDA düzeyleri (Tablo 6) one way ANOVA yöntemi ile değerlendirildi.

4. 1. Karaciğer Dokusundan Elde Edilen Bulgular

4. 1. 1. Karaciğer Dokusu MDA Düzeyleri

Kontrol ve tedavi gruplarının karaciğer dokusu homojenatlarında ölçülen MDA düzeyleri (nmol/g yaş doku) Tablo 3’de görülmektedir. MDA düzeyleri doku ağırlığı gramı başına nmol olarak hesaplandığında, kontrol grubunda 81.487 ± 5.540 , ibuprofen grubunda 51.487 ± 2.588 , erusik asid grubunda 40.512 ± 3.099 , ibuprofen+erusik asid grubunda 63.125 ± 4.003 bulunmuştur. En düşük doku MDA düzeyleri erusik asid grubunda bulunmuştur. 20 gün boyunca çeşme suyu gavajı yapılan ve 20. gün akut yüksek doz etanol alan kontrol grubunda (tedavisiz) MDA düzeyleri en yüksek seviyede çıkmıştır. Her üç deney grubunda (tedavili) MDA düzeylerinin ortalama değerleri kontrol grubuna göre hepsinde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) derecede düşüktür.

Tablo 3. Kontrol ve Tedavi Gruplarının Karaciğer Dokusu MDA Değerleri (nMol/g doku).

N	Kontrol (n=8)	İbuprofen (n=8)	Erusik asid (n=8)	İbuprofen+ Erusik asid (n=8)
1	83.60	55.10	36.60	51.80
2	64.10	57.50	28.50	63.20
3	70.30	59.40	46.60	61.80
4	75.10	53.20	52.70	81.20
5	76.50	57.00	32.80	70.30
6	73.20	42.80	34.20	60.80
7	111.20	47.00	42.80	70.80
8	97.90	39.90	49.90	45.10
X±SEM	81.49±5.54	51.49±2.59*	40.51±3.10*	63.13±4.00*

* p<0.05, kontrole göre

4. 1. 2. Karaciğer Dokusu SOD Aktivitesi

Karaciğer dokusu homojenatlarında ölçülen SOD aktivitesi değerleri (U/mg yaş doku) Tablo 4’de görülmektedir. SOD aktivitesi ortalamaları doku ağırlığı gramı başına ünite olarak hesaplandığında, kontrol grubunda 12.275 ± 0.388 , ibuprofen grubunda 19.975 ± 0.795 , erusik asid grubunda 18.425 ± 1.121 , ibuprofen+erusik asid grubunda 17.712 ± 1.376 , bulunmuştur. Tedavili üç grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) değişim saptanmıştır.

Tablo 4. Kontrol ve Tedavi Gruplarının Karaciğer Dokusu SOD Enzim Aktivitesi (U/mg doku).

N	Kontrol (n=8)	İbuprofen (n=8)	Erusik asid (n=8)	İbuprofen+ Erusik asid (n=8)
1	10.80	14.90	21.10	15.70
2	12.40	21.40	14.60	21.60
3	12.20	19.20	18.70	15.10
4	11.60	20.30	16.80	17.60
5	13.00	20.80	23.20	13.50
6	11.10	20.50	18.40	18.70
7	13.00	22.40	20.50	24.90
8	14.10	20.30	14.10	14.60
X±SEM	12.28±0.39	19.98±0.80*	18.43±1.12*	17.71±1.38*

* p<0.05, kontrole göre

4. 1. 3. Karaciğer Dokusu CAT Aktivitesi

Karaciğer dokusu homojenatlarında ölçülen CAT aktivitesi değerleri (U/mg yaş doku) Tablo 5’de görülmektedir. CAT aktivitesi ortalamaları doku ağırlığı gramı başına ünite olarak hesaplandığında, kontrol grubunda 129.563 ± 1.466 , ibuprofen grubunda 116.000 ± 3.083 , erusik asid grubunda 114.675 ± 3.087 , ibuprofen+erusik asid grubunda 118.550 ± 4.354 , bulunmuştur. Tedavili üç grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) değişim saptanmıştır.

Tablo 5. Kontrol ve deney gruplarının karaciğer dokusu CAT enzim aktivitesi (U/mg doku).

N	Kontrol (n=8)	İbuprofen (n=8)	Erusik asid (n=8)	İbuprofen+ Erusik asid (n=8)
1	125.30	128.40	118.40	129.70
2	126.90	115.90	121.90	130.00
3	133.40	117.80	121.20	120.00
4	132.80	123.40	120.60	104.70
5	131.60	119.10	111.60	125.90
6	133.40	115.60	100.90	122.20
7	130.60	106.90	102.20	95.30
8	122.50	100.90	120.60	120.60
X±SEM	129.56±1.47	116.00±3.08*	114.68±3.09*	118.55±4.35*

* p<0.05, kontrole göre

4. 2. Plazma Dokusundan Elde Edilen Bulgular

4. 2. 1. Plazma MDA Düzeyleri

Deney gruplarının plazma dokusunda ölçülen MDA düzeyleri (nmol/mL) Tablo 6’da görülmektedir. MDA düzeyleri ortalamaları mL başına nmol olarak hesaplandığında kontrol grubunda 13.375 ± 0.344 , ibuprofen grubunda 9.463 ± 0.362 , erusik asid grubunda 10.800 ± 0.541 , ibuprofen+erusik asid grubunda 9.987 ± 0.486 bulunmuştur. Tedavili her 3 deney grubunda MDA düzeylerinin ortalama değerleri kontrol grubuna göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) değişim saptanmıştır.

Tablo 6. Kontrol ve Tedavi Gruplarının Plazma MDA Değerleri (nMol/mL).

N	Kontrol (n=8)	İbuprofen (n=8)	Erusik asid (n=8)	İbuprofen+ Erusik asid (n=8)
1	12.60	8.60	9.20	8.70
2	13.10	9.80	11.80	10.10
3	13.80	11.00	8.70	8.90
4	13.30	9.10	12.40	11.20
5	13.50	10.30	11.70	10.70
6	12.10	8.00	9.50	10.80
7	15.40	8.70	12.60	11.70
8	13.20	10.20	10.50	7.80
X±SEM	13.38±0.34	9.46±0.36*	10.80±0.54*	9.99±0.49*

* p<0.05, kontrole göre

5. TARTIŞMA

ROS birçok dejeneratif hastalığın patogeneğinde rol oynamaktadır. ROS'un etkisi ile ortaya çıkan membran lipidlerinin peroksidasyonu hücresel bütünlüğü bozarak sonuçta doku hasarına neden olmaktadır. Son yıllarda ROS'un radyasyon hasarı, kanser, katarakt, inflamasyon, fagositoz ve membran peroksidasyonu gibi pek çok biyolojik olayda rol oynadığı gösterilmiştir. Çeşitli çalışmalarda da bu hastalıkların patogeneğinde lipid peroksidasyonundaki artıştan söz edilmektedir ¹¹⁸.

Uyarıcı ve keyif verici maddeler arasında kullanımı en eskiye dayanan ve en yaygın olan etanol, aslında hem sistemik hem de santral sinir sisteminde toksik özellikleri ile primer ve sürekli bir etki yapmaktadır. Bu nedenle etanolün sebep olduğu fizyopatolojik değişiklikleri inceleyen araştırmalara oldukça yoğun bir biçimde gereksinim duyulmaktadır. Literatürde deney hayvanları ve insanlarda kronik etanol alınımlı sonucunda oluşabilecek biyokimyasal metabolik değişimlere ilişkin araştırmalar çok sayıda olmakla birlikte halen de sürdürülmektedir. Buna karşılık akut alkol intoksikasyonunun serbest radikal hasarı ve antioksidan enzimler üzerine olan etkileri konusundaki çalışmalar sınırlıdır ¹¹⁹⁻¹²¹. Biz de çalışmamızda akut alkol protokolü uygulanan sıçanlarda oluşan serbest radikaller üzerine antioksidan özellikleri deneme aşamasında olan çeşitli maddeleri incelemeyi düşündük.

Alkolle ilgili deneysel çalışmalarda karşılaşılan en büyük güçlük deney hayvanlarının şempanze hariç alkol içmeyi reddetmesidir. Bazı sıçan ve fare türlerinin diğerlerine nazaran daha istekli alkol almasına rağmen absorbe edilebilen alkol miktarının düşük olması, deneysel alkolizm oluşturmakta sorun yaratmaktadır. Bu nedenle intraperitoneal (i.p.) veya intravenöz (i.v.) enjeksiyonlar, gastrik entübasyon, hayvanları alkol buharının olduğu yerde tutmak gibi yöntemler denenmiştir ¹²².

Çalışmamızda, sıçanlarda akut alkol intoksikasyonunun gastrik entübasyonla oluşturulması uygun bulunmuş ve 2 saat ara ile iki doz etanol gavajı ile (toplam 6.0 g etanol/kg) akut alkol intoksikasyonu oluşturulmuştur ¹²⁰.

Büyük ölçüde hepatositlerde metabolize olan alkol, karaciğerde ciddi hasarlara sebep olur. Alkolle indüklenen karaciğer hasarının patogeneğinde serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif hasar birçok çalışmalarda gösterilmiştir ^{29,45,48,54,55,57,63}. Bu hasarın derecesinin artışının içki tüketim miktarı artışı ile bağlantılı olduğu, hem karaciğer hem de plazma lipid peroksidasyon hasarının ölçülmesi ile vurgulanmıştır ¹²³.

Etanol metabolizmasında rol oynayan ADH beyinde az miktarlarda bulunur ¹²⁴, bu yüzden de karaciğerde olduğundan daha az bir rol oynayabilir. Etanol metabolizmasının, DNA bölünmesine sebep olabilen oksidatif ürünlerin oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir ¹²⁵. Bu buluş etanolün zayıf karsinojenik ve hem de teratojenik etkisini açıklayabilmektedir ¹²⁶. Fakat şimdiye kadar etanolün, sağlam hayvanda DNA hasarına sebep olduğuna dair bir bulgu yayınlanmamıştır ¹²⁴.

Etanolün karaciğerde mikrosomal karma fonksiyonlu oksidaz enzimlerin indüklenmesine neden olduğu bilinmektedir ^{127,128} ve bunun özellikle P450E1 olduğu bulunmuştur ¹²⁹. Son zamanlarda da daha düşük konsantrasyonda olmak üzere santral sinir sistemi (SSS)'nde de P450E1 indüklenmesi gösterilmiştir ^{130,131}.

Hasar büyük ölçüde alkol alınımı ile indüklenen CYP₄₅₀ bağımlı MEOS'a, özellikle de bu sistemdeki CYP2E1 sistemine bağlanmıştır, çünkü indüklenen bu sistemin oluşturduğu hidroksietil serbest radikalleri ve asetaldehid hasar oluşumunda büyük rol oynamaktadır ^{29,59-62,132}.

Kronik etanol verilen sıçanlarda CYP2E1'in aktivitesinin artması etanolün daha hızlı asetaldehid oluşturmaya, lipid peroksidasyonunun hızlanmasına ve etanolün membran üzerindeki toksik etkilerinin daha belirgin olmasına yol açmaktadır ¹³³.

Ayrıca etanolün hepatik oksidasyonu sonucunda, hücrede şiddetli redoks değişimlerinin meydana geldiği, bununla birlikte pek çok metabolik bozukluğun ortaya çıktığı ve reaktif oksijen türlerinin arttığı bilinmektedir ⁴⁹. Diğer bazı organik solventlerin de karaciğerde serbest radikal oluşumunu artırdığı bilinmektedir. Bunlar karbontetraklorür gibi alifatik bileşikler ve benzen, toluen, ksilen gibi aromatik solventleri içermektedir ¹³⁴⁻¹³⁷.

MDA in vivo oksidatif stresin bir belirleyicisi olarak sıklıkla kullanılır. Plazma MDA düzeyinin alkol alımı ile arttığı ve alkolün kesilmesinden sonra azaldığı pek çok çalışma ile gösterilmiştir ¹³⁸⁻¹⁴¹. Alkol kullanımı ile ilişkili olan kandaki çeşitli antioksidan enzimlerin düzeyi ile ilgili literatürler oldukça kafa karıştırıcıdır ¹⁴². Bu durum çalışma yapılan popülasyonun sınırlı sayıda olmasından ve heterojenitesinden kaynaklanabilmektedir ¹³⁸.

Etanol organ sistemlerini geniş bir şekilde etkileyebilmektedir. Bu etki etanolün ya kendisinin direkt etkisine ya da metabolitlerine bağlıdır ve yine alkol kullanımı ile birlikte yetersiz beslenme ile de ilişkili olabilmektedir. Alkol kullananlarda görülen doku hasarının çoğu alkolün metabolizması ya da takiben gelişen lipid peroksidasyonu sırasında oluşan serbest radikal oluşumuna bağlı olabilmektedir ¹⁴³.

Lecomte ve ark'nın 417 sağlıklı ve nadiren düşük ya da orta derecede alkol tüketen erkekler ile ciddi karaciğer hastalığı olmayan 102 erkek hasta grubunda yaptıkları bir çalışmada α -tokoferol, askorbik asit gibi antioksidan vitaminlerin ve selenyumun plazma konsantrasyonları üzerinde alkol tüketiminin etkilerini ve MDA gibi oksidatif stresin belirleyicileri olan maddeleri incelemişlerdir. α -Tokoferol, askorbik asit ve selenyum düzeylerinin alkoliklerde, düşük miktarda alkol kullananlara göre düşük olduğunu, oysa bunlarda MDA düzeylerinin oldukça yüksek olduklarını gözlemlemişlerdir ¹³⁸. Bizim çalışmamızda da antioksidan tedavi alan deneklerdeki karaciğer MDA düzeyleri sadece alkol verilen kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Bu bulgular yukarıda adı geçen çalışmalarla da uyumludur.

Sağlıklı kişiler üzerinde, etil alkolün zararlı etkilerinin çoğunun özellikle bazı oksijen ve diğer serbest radikaller olan reaktif oksijen türevleri ile oluştuğu sanılmaktadır ^{1,144}. Sonuç olarak intraselüler ortamda bu reaktif oksijen türevlerinin oluşumu etanolün oksidatif metabolizması ile ilişkilidir ve bu da zaten çoğunlukla karaciğerde olmaktadır ¹⁴⁵. Poliansatüre yağ asitleri, proteinler ve diğer biyolojik maddelerin oksidatif değişiklikleri bir yandan koruyucu antioksidan güçte bir azalmaya sebep olur ^{3,146}, diğer yandan da deney hayvanlarında etanolle oluşturulan kronik intoksikasyon sırasında SSS ve karaciğerin çeşitli kısımlarında bulunabilir ^{119,147}. Deney hayvanları ve sağlıklı kişilerde yapılan deneylerin sonuçları alkolün neden olduğu oksidatif hasarın etyopatogenezinde organ zedelenmesinin önemli bir rol oynadığı ve bununla artmış membran lipid peroksidasyonu tarafından olduğu gösterilmiştir ¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Bununla birlikte ister akut ister kronik alkol modeli olsun uygulanan

alkol dozunun miktarı ve sıklığı kadar deneysel objenin beslenme durumu da alkol intoksikasyonu sırasında oksidatif stresin ortaya çıkmasını ve karakterini etkilemektedir ¹⁵¹⁻¹⁵³. Biz de bu yüzden deneyimizde daha önce Guerri ve Grisolia'nın kullandığı metoda göre 6 g/kg dozunda alkolü ikiye bölerek iki doz halinde oral olarak deney hayvanlarına uyguladık ⁴⁷. Bu yöntemle göre oluşturulan serbest radikaller üzerine antioksidan özellikleri olduğu araştırma konusu olan ibuprofen ve erusik asidin etkilerini inceledik.

Etanol ve nikotinin birlikte uygulandığı bir çalışmada lensteki TBARS düzeyleri kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Alkolün pek çok dokuda oksidatif hasara neden olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Alkole bağlı karaciğer ve mide hasarında lipid peroksidasyonunda artış, buna karşın endojen koruyucu madde düzeylerinde azalma olduğu gösterilmiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada etanol ve nikotinin birlikte kullanımının karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonunu artırırken glutatyon düzeylerini azalttığı saptanmıştır ¹¹⁸.

Yağ asidi etil esterleri (YAEE) fare karaciğerinde etanol intoksikasyonundan 16 gün sonra bulunmuştur. Fare karaciğerinde diğer dokulara nazaran daha fazla miktarda doymamış yağ asitlerinin esterleri rastlanmıştır ¹⁵⁴. Etanolün yıkımı sırasında YAEE'nin olduğu bilinmektedir. YAEE mitokondriyal bozukluklara, hücre membranının bozulmasına, protein sentezinin inhibisyonuna sebep olur ^{155,156}. Kolesterol esterleşmesini ve myelin metabolizmasını değiştirir. Sonuç olarak YAEE etanolün toksisite göstermesine yol açan etkenlerden biridir ^{153,157}.

Etanolün izole kalp preparatlarında fosfolipaz A₁ ve A₂'yi aktive ettiği gösterilmiştir ¹⁵⁸. Fosfolipaz A₂ tarafından araşidonik asidin liberasyonu araşidonik asit kaskadı denen oksidatif katabolik bir süreci harekete geçirir. Bu poliansatüre yağ asitleri dört etilenik bağ içerirler ve kolayca okside olabilirler. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz tarafından prostaglandin, lökotrien ve tromboksanlara bu bileşiğin enzimatik değişimi belirgin bir ROS oluşumuna yol açar ¹⁵⁹.

İşte bizim çalışmamızda kullandığımız ibuprofen siklooksijenaz enzimi inhibisyonu yapması nedeni ile bu ROS türevi oluşumunu inhibe ederek antioksidan özellik kazanıyor olabilir. Bunun ispatı için daha geniş çalışmalara gereksinim vardır.

CAT SSS'de alkolün en önemli primer oksidanı olabilir. Pek çok serebral oksidatif enzimin seviyelerinin düşük olması, SSS'deki asetaldehitin hepatik bir kaynaktan oluştuğu anlamına gelmektedir. Karaciğer mitokondrisi beyin mitokondrilerine göre etanol ile tahribata daha duyarlıdır ¹⁶⁰ ve hepatik glutatyon seviyesi etanol ile güçlü bir şekilde azaltılır. Ayrıca, karaciğer etanol ile oluşturulan ROS'a ve diğer kaynaklara daha duyarlıdır ¹⁶¹.

Etanol, katalaz tarafından asetaldehite oksitlenebilir ¹⁶². Katalazın, etanolü okside etmesi için ortamda H₂O₂ bulunması gerekir. Deney koşullarında dokular homojenize edilirken H₂O₂ kaynakları seyreltilmiş olur. Bu nedenle H₂O₂ konsantrasyonunun in vivo koşullarda daha yüksek olması gerekir. Etanolün katalaz tarafından oksidasyonunda H₂O₂ hız düzenleyici faktördür ¹⁶³. Organizmadaki H₂O₂ kaynaklarından biri süperoksid iyonudur ¹⁶⁴. Süperoksid iyonu, mitokondri elektron transport zincirinde, CYP₄₅₀ sisteminde, ksantin oksidaz ve aldehit oksidaz reaksiyonunda, prostaglandin metabolizmasında, askorbik asid metabolizmasında, hemoglobin ve katekolamin oksidasyonunda oluşabilir ¹⁶⁵. L-aminoasid oksidazlar aminoasidlerin, monoamin oksidazlar da biyolojik aminlerin oksidatif deaminasyonu sırasında H₂O₂ oluşturur. Bunların dışında flavin içeren monooksijenazlar ve nitrik oksid sentaz H₂O₂ oluşturabilir ¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Tüm bu yolların H₂O₂ oluşturma kapasitesi değişiktir. H₂O₂, konsantrasyonu çok artmadıkça katalaz ve GPx tarafından metabolize olabilir. Farmakolojik olarak CAT aktivitesi inhibe edildiğinde sıçanın etanol alma isteği de azalmaktadır. Bazı çalışmalarda ise, CAT aktivitesi bulunmayan farelerin daha fazla etanol tükettikleri görülmüştür ¹⁶⁹.

CAT aktivitesinin etanol tüketimi ile ilişkili olduğu, asetaldehit oluşumu ve eliminasyonunu kontrol ettiği bilinmesine rağmen bunun alkol metabolizmasına bağlı oksidatif hasarda pozitif veya negatif yönde etkisi olduğu kesin olarak söylenememektedir ^{170,171}. Solubl bir enzim olan CAT'ın alkol degradasyonuna katıldığı deneyler ile gösterilmiştir ^{124,172}. Bizim bulgularımıza göre, incelenen antioksidan enzimlerden CAT aktivitesi akut alkol intoksikasyonu oluşturulan kontrol grubunda antioksidan tedavi gören diğer gruplara göre anlamlı düzeyde artmış bulunmuştur. Etanolü asetaldehite yükseltgeyen ajanlardan birinin katalaz enzimi olduğu bilindiğine göre, bu artışın verdiğimiz yüksek doz etanolün metabolizması sonucunda oluştuğu düşünülebilir. Beyin hücre kültürlerinde etanol varlığında CAT aktivitesinin arttığını gösteren çalışma sonuçları bizim bulgularımızı desteklemektedir ¹⁷³.

CAT'ın yüksek alkol alımı durumlarında etanolün katabolize olduğu üç yoldan biri olduğu bilinmektedir. Tek başına etanol verilmiş kontrol grubunda gözlenen CAT enzim aktivitesindeki artış, yüksek dozlarda etanol verilmesi ile karaciğer CAT aktivitesinin değişmediğini bildiren araştırmacıların bulguları ile benzerlik göstermemektedir ^{174,175}.

Literatürlere baktığımızda lipid peroksidasyonu klasik olarak, biyolojik dokularda yüksek dansiteli yağ asitlerinin peroksidatif bozulumunun sonucunda oluşan MDA'nın kantitatif ölçülmesi ile incelenmiştir. Fakat antioksidan enzim aktivitelerinde ve MDA düzeylerinde incelenen bölgeye göre değişen cevaplar saptanmıştır. Örneğin, kronik etanolün serebral kortekste SOD aktivitesini kontrole göre % 25 oranında azalttığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada CAT aktivitesinde de anlamlı azalma görülmüştür. MDA düzeylerinde ise % 30 oranında anlamlı yükselme izlenmiştir ¹⁷⁶.

Lipid peroksidasyonu seviyesi lipidden zengin hücre membranlarında ROS aktivitesinin sonuçlarını yansıtan bir indirek ölçümdür. Sonuçlar sıklıkla malondialdehid gibi reaktif maddeler açısından belirtilir ¹²⁴. Bu prosedür çeşitli artifaktlara maruz kalmıştır ¹⁷⁷, fakat çok sık kullanılmaktadır ve doğruluk değerine sahiptir ¹²⁴. Etanol tedavisini takiben lipid peroksidasyonunda artış hem beyin hem de karaciğer için bildirilmiştir ¹⁷⁸⁻¹⁸². Asetaldehid tedavisinin de hepatik lipid peroksidasyonunu artırdığı Dianzani tarafından gösterilmiştir ¹⁷⁷. Etanol nedenli bu değişikliklerin bazıları, lipide çözülebilir antioksidan A ve E vitaminleri tarafından azaltılmıştır ve etanol tedavisi gören sıçanlarda antioksidan vitaminlerin miktarının vücutta azalması da oluşan bu oksidatif stresin varlığı ile uyumludur ^{180,183-185}.

Bizim bulgularımıza göre de akut etanol intoksikasyonu oluşturulan kontrol grubunun plazma ve karaciğer dokusu MDA konsantrasyonu diğer gruplara göre anlamlı düzeyde artmış olarak bulunmuştur. Buna göre akut etanol intoksikasyonunun, plazma ve karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonunu artırdığı düşünülebilir. Bu bulgularımız, etanolün lipid peroksidasyonunun artışına sebep olduğunu bildiren araştırmacıların bulguları ile uyumludur ^{186,187}. 20 gün boyunca ibuprofen, erusik asid ve ibuprofen+erusik asid verilen gruplarda oluşturulan akut etanol intoksikasyonu sonucunda ölçülen plazma ve karaciğer dokusu MDA konsantrasyonları kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Bu bulgu ibuprofen ve erusik asid verilmesi ile etanolün etkisinin baskılandığını ve bu etkinin verilen maddelerin literatürlerde belirtilen antioksidan özelliklerinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Tedavi grupları olan ibuprofen, erusik asid ve ibuprofen+erusik asid grupları kendi aralarında karaciğer dokusu MDA konsantrasyonları bakımından karşılaştırılacak olursa; ibuprofen grubunun MDA konsantrasyonu, erusik asid grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Buna göre erusik asidin, ibuprofene göre etanolün toksik etkisini daha iyi baskıladığı görülmüştür. Erusik asid grubu ibuprofen+erusik asid grubu ile karşılaştırılacak olursa; erusik asid grubunun MDA konsantrasyonu, ibuprofen+erusik asid grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Bu bulgu erusik asidin yalnız başına verildiğinde lipid peroksidasyonu üzerine daha etkili olduğunu düşündürmektedir. İbuprofen grubu ile ibuprofen+erusik asid grubu karşılaştırılacak olursa; ibuprofen grubunun MDA konsantrasyonu kombine gruba göre daha düşük bulunmuştur. Bu bulgu da ibuprofenin lipid peroksidasyonu üzerine ibuprofen+erusik asid kombinasyonuna göre daha etkili olduğunu düşündürür.

Yaptığımız çalışmanın sonuçlarına göre, tedavi gören gruplar karaciğer MDA düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında, erusik asidin akut etanolle oluşturulan serbest radikaller üzerine diğer gruplara göre istatistiksel olarak daha etkili olduğu ($p<0.001$) ve bunu ibuprofen grubunun izlediği, kombine tedavinin lipid peroksidasyonu üzerine daha az etkili olduğu gözlenmiştir. Plazma MDA düzeyleri açısından bakıldığında ise tedavi gruplarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oldukları fakat gruplar arasında lipid peroksidasyonu üzerine anlamlı farklılık göstermedikleri bulunmuştur.

Süperoksid radikali ve hidrojen peroksid süperoksid dismutaz enziminin dışarıdan verilmesi ile ya da in vivo aktivasyonlarının artırılmasıyla uzaklaştırılabilir. SOD bir çok sistemde görülen iskemi sonrası reperfüzyon hasarında koruyucudur. Hücre içi antioksidan savunma süperoksid dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi spesifik enzimlerle sağlanır. Plazma ve sinovyal sıvıda süperoksid dismutaz aktivitesinin çok düşük olduğunu gösteren çalışmalar vardır ⁶. Langerhans adacıklarının Cu-Zn SOD içeriği bakımından zengin olduğu ve insan β hücrelerinde bu enzimin seçimli lokalizasyonu gösterilmiştir ¹⁸⁸.

Aerob hücrelerin tümünün radikal oluşumunu en az düzeye indirecek ya da alternatif olarak radikal oluşur oluşmaz bu radikalleri hızla etkisiz hale getirecek koruyucu mekanizmalar geliştirdiklerini biliyoruz. SOD'un iki molekül süperoksid radikalini moleküler oksijen ve hidrojen perokside dönüştürmesi buna örnek verilebilir ¹⁸⁸.

Bir indüklenebilir enzim olan SOD'un artmış seviyeleri genellikle artmış oksidan ortamın indirekt kanıtı olarak kabul edilmektedir. Bununla beraber SOD bir sülfidril enzim olduğu için, bir dokuda seviyesinin azalması oksidatif denatürasyonu da yansıtabilmektedir. Etanol uygulamasını takiben karaciğerde ^{189,190} ve beyinde ¹⁹¹ SOD seviyesinde azalma olduğu çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Bu çalışmaların sonucuna göre, biz de çalışmamızda akut alkol uygulaması sonrası kontrol değeri olarak saptadığımız karaciğer SOD seviyesinin, antioksidan tedavi olarak uyguladığımız ibuprofen ve erusik asid ile yükseltildiğini gözlemledik. Bu da antioksidan tedavinin karaciğer SOD enzimi üzerine etkisini göstermektedir.

SOD'un aerob hücrelerin tümünde bulunduğu fakat anaerob hücrelerin çoğunda bulunmadığı bilinmektedir. SOD'un fizyolojik fonksiyonu aerob metabolizma reaksiyonları yolu ile oluşan süperoksid radikalının hasar yapıcı potansiyel etkilerine karşı hücreyi korumaktır ¹⁸⁸.

Bizim bulgularımıza göre etanol ile indüklenen oksidatif hasara karşı ibuprofen, erusik asit ve kombine olarak verilen ibuprofen+erusik asidin karaciğer dokusunda SOD enzim aktivitesini artırdığı, bu da karaciğerdeki oksidatif hasardan süperoksid radikalının büyük ölçüde sorumlu olduğunu düşündürmektedir.

İbuprofen ve erusik asidin antioksidan etkilerinin mekanizmasının peroksizomlarda bulunan ve yağ asidi katabolizmasında rol oynayan PPAR (peroksizom aktive edici reseptör) ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. İbuprofenin de içinde yer aldığı nonsteroidal antiinflatuvar ilaçların ve erusik asidin PPAR'a bağlanarak bu etkilerini ortaya çıkardığı düşünülmektedir ¹⁰⁸⁻¹¹².

PPAR alfa'nın karaciğerde bol bulunan bir PPAR alt tipi olduğu ve peroksizom proliferasyonunda anahtar rol oynadığı gösterilmiştir. Birkaç NSAİİ'nin hepatositlerde hem in vivo hem de in vitro peroksizomal aktivasyon oluşturduğu rapor edilmiştir ¹¹². PPAR alfanın gen ekspresyonunun down-regülasyonu sıçanda kronik alkolik karaciğer hastalığında gözlenmiştir ¹¹¹.

Bu bilgiler ışığında ibuprofen ya da erusik asidin antioksidan etkilerinin mekanizmalarını açıklamak için reseptör düzeyinde daha ileri çalışmalara gerek duyulacaktır.

6. SONUÇ

1. Lipid peroksidasyonu göstergesi olan MDA düzeyleri, hem karaciğer hem de plazma dokusunda incelendiğinde, 20 gün boyunca sadece çeşme suyu gavajı sonrası 20. gün akut yüksek doz etanol verilen kontrol grubunda en yüksek bulunmuştur. Diğer gruplar arasında ise, en fazla erusik asid, daha sonra ibuprofen, son olarak da ibuprofen+erusik asid kombinasyonu, MDA düzeyini kontrole göre düşürmüştür. MDA düzeyindeki bu azalma erusik asidin, ibuprofenin ve ibuprofen+erusik asid kombinasyonunun etanole bağlı lipid peroksidasyonunu baskıladığını düşündürülebilir.

2. Antioksidan savunma enzimlerinin aktivitesindeki değişmelere bakıldığında; karaciğer dokusundaki SOD aktivitesi, kontrol grubunda düşük, diğer gruplarda daha yüksek bulunmuştur. Bu da karaciğerdeki oksidatif hasardan sorumlu olan süperoksid radikalının zararlı etkilerinden hücreleri korumak amacıyla tedavi gruplarında SOD enzim aktivitesinin tetiklendiğini göstermektedir. Böylece oksidatif hasarı önlemek açısından kullandığımız ibuprofen, erusik asid ve ibuprofen+erusik asid kombinasyonu akut alkol intoksikasyonu sonucunda SOD enzim aktivitesini artırmaktadır. Bu artış da en fazla ibuprofen grubunda göze çarpmaktadır.

3. Karaciğer dokusu CAT aktivitesi, kontrol grubunda yüksek, diğer gruplarda daha düşük bulunmuştur. Etanol varlığında CAT aktivitesinin arttığını bildiren çalışma sonucu ile bizim bulgularımız uygunluk göstermektedir. Bu da yüksek dozda etanol verilmesi ile karaciğer CAT enzim aktivitesinin arttığını göstermektedir.

Sonuç olarak, Sprague-Dawley sıçanlarda akut yüksek doz etanol uygulaması sonucunda oluşan serbest radikaller üzerine antioksidan etkileri araştırılan ibuprofen ve erusik asidin, alkolün oluşturduğu oksidatif hasarı önlemek açısından etkili oldukları saptanmıştır. Çalışmalarımız, kullandığımız bu maddelerin antioksidan etki mekanizmalarını daha iyi aydınlatmak amacı ile kronik alkolizm modelinde, çeşitli dokularda MDA, SOD, CAT vb antioksidan enzim aktivitelerinin tespit edilmesi yönünde devam edecektir.

7. ÖZET

Bu çalışmada, antioksidan özellikleri araştırma aşamasında olan steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar arasında yer alan ve spesifik olarak siklooksijenaz-1 enzim inhibisyonu yapan ibuprofen ile polienoik yağ asitleri içerisinde, tekli doymamış yağ asitleri grubunda yer alan erusik asit ($C_{22\Delta 13}$) kullanılmıştır. İbuprofen ve erusik asitin 20 gün uygulanmasının ardından verilen akut yüksek doz etanolün karaciğer ve plazmadaki antioksidan enzimler ve lipid peroksidasyonu üzerine etkileri incelenmiştir.

Bu amaçla ortalama ağırlığı 250-300 g olan 3.5-4 aylık 32 adet Sprague Dawley erkek sıçan kullanılarak dört grup oluşturulmuştur. Her üç deney grubuna 20 gün boyunca sırasıyla ibuprofen (17 mg/kg), erusik asit (100 mg/sıçan), ibuprofen+erusik asit gavaj yolu ile uygulanmış, kontrol grubuna ise 20 gün boyunca 1mL çeşme suyu gavaj yolu ile verilmiştir. 20. Gün tüm grupların gavajları yapıldıktan 2 saat sonra 6 g/kg etanol dozu ikiye bölünerek 2 saat ara ile 4 gruba da etanol gavaj yolu ile verilmiştir. Uygulamaların bitiminden 1 saat sonra hayvanlar sakrifiye edilerek heparinize kan örnekleri alınmış ve karaciğer dokusu perfüze edilerek çıkarılmıştır. Plazmaları ayrılan kan örnekleri ile karaciğer dokusu -70°C 'de saklanmıştır. Biyokimyasal incelemeler için doku homojenatları hazırlanmış ve plazma ve karaciğer malondialdehit (MDA) düzeyleri ile karaciğer süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) aktiviteleri ölçülmüştür.

Etanol gerek plazmada gerek karaciğer dokusunda MDA düzeylerinde belirgin bir artışa yol açmıştır. İbuprofen, erusik asit ve ibuprofen + erusik asit MDA düzeylerini kontrole göre düşürmüştür. Erusik asit MDA düzeylerini düşürmede daha etkili bulunmuştur. Etanol, ibuprofen ve erusik asitin antioksidan savunma enzimleri üzerine etkisi incelendiğinde; SOD aktivitesi kontrol grubunda diğer gruplara göre daha düşük bulunmuştur, bu da etanolün SOD aktivitesini düşürdüğüne bir kanıttır. İbuprofen, erusik asit ve ibuprofen + erusik asit SOD aktivitesini kontrole göre artırmıştır. Bu artış en fazla ibuprofen grubunda göze çarpmaktadır. CAT aktivitesi kontrol grubunda diğer gruplara nazaran artmıştır, bu da yüksek dozda etanol

uygulamasının karaciğer CAT enzim aktivitesini artırdığını göstermektedir. İbuprofen ve erusik asit CAT aktivitesini kontrole göre düşürmüştür.

Çalışmamızın bulguları etanolün oksidan bir madde olduğu yönündeki bilgilere uygun düşmektedir. Bulgularımız ibuprofen ve erusik asitin antioksidan özellik taşıdığı yönündeki düşüncelerimizi desteklemektedir.

Anahtar kelimeler: etanol, serbest radikal, ibuprofen, erusik asit, antioksidan.



8. SUMMARY

THE EFFECTS OF IBUPROFEN AND ERUCIC ACID ON FREE RADICALS INDUCED BY ALCOHOL

In this study, we used ibuprofen which is a nonsteroidal antiinflammatory drug, a selective blocker of cyclooxygenase-1 and the antioxidative characteristics of which is under investigation, and erucic acid ($C_{22}\Delta_{13}$), the polyenoic fatty acid in the group of monounsaturated fatty acids. After ibuprofen and erucic acid had been administered for 20 days, acute high dose ethanol was administered and their effects on the liver and plasma which have antioxidative enzyme systems and lipid peroxidation have been investigated.

To do this investigation, four groups were formed by using 32 3.5-4 month-old Sprague Dawley male rats, weighing 250-300 g. Ibuprofen (17 mg/kg bw), erucic acid (100 mg/rat) and ibuprofen + erucic acid by stomach gavage were administered for 20 days to all the experimental groups, respectively. On the other hand, the control group received 1 ml tap water by gavage for 20 days. Two hours after the four groups had received drugs by gavage, ethanol dose (6 g/kg) -divided into two- was administered by gavage route with 2-hour-intervals to all the four groups. One hour after the administrations had been completed, the animals were sacrificed, heparinized blood samples were collected and hepatic tissue was removed by perfusion. Blood serum and hepatic tissue were stored at -70°C . Tissue homogenates were prepared for biochemical investigation and plasma and hepatic malondialdehyde (MDA) levels and hepatic superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) activities were analysed.

Ethanol caused a significant increase in both plasma MDA and hepatic MDA levels. Ibuprofen, erucic acid and ibuprofen + erucic acid reduced MDA levels compared to the control group. Erucic acid was found to be quite effective in MDA level decrease. When the effects of the ethanol, ibuprofen and erucic acid on the antioxidant defence enzymes were investigated SOD activity was lower in the control group than the other groups. This proves that ethanol decreases SOD activity. Ibuprofen, erucic acid and ibuprofen + erucic acid

increased SOD activity more compared to the control group. This increase was maximum in the ibuprofen group. CAT activity increased more in the control group compared to the other groups, which demonstrates that high dose ethanol administration increased hepatic CAT enzyme activity. Ibuprofen and erucic acid diminished CAT activity compared to the control group.

The results of our study are parallel with the fact that ethanol is an oxidant substance and our results have supported our opinion that ibuprofen and erucic acid have antioxidant characteristics.

Key words: Ethanol, free radical, ibuprofen, erucic acid, antioxidant.



9. KAYNAKLAR

1. Nordman R, Ribiere C, Rouch H. Implication of free radical mechanisms in ethanol induced cellular injury. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 219-240.
2. Duce AM, Ortiz P, Labrero C, Mato JM. S-adenosyl-L-methionine synthetase and phospholipid methyltransferase are inhibited in human cirrhosis. *Hepatology*. 1988; 8: 65-68.
3. Rouach H, Ribiere C, Park MK, Saffar C, Nordmann R. Lipid peroxidation and brain mitochondrial damage induced by ethanol. *Bioelectrochem Bioenerg* 1987; 18: 211-217.
4. Rouach H, Park MK, Orfanelli MT, Javier B, Nordman R. Ethanol-induced oxidative stress in the rat cerebellum. *Alcohol*. 1987; 51: 202-211.
5. Dökmeci İ. Eikazonoidler ve steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ). Nobel Tıp Kitap Evi LTD. ST. 2000 İstanbul; 379-420.
6. Carrol E, Cross MD. Oxygen radicals and human disease. *Ann. Internal Med.* 1987; 107 (4): 526-545.
7. Reiter JR. Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *Eur J Endocrinol* 1996; 134: 412-420.
8. Kılınç K. Oksijen radikalleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. *Klinik Gelişim* 1995; 8:3850-3868.
9. Southarn PA, Powis G. Free radicals in medicine I. Chemical nature and biological reaction. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 381-389.

10. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1975; 44: 147-159.
11. Yu PB. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74: 1.
12. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993; 23: 21-48.
13. Harman D. Free radicals in aging. *Mole Cell. Biochem* 1988; 84: 155-161.
14. Halliwell B, Gutteridge. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *The Lancet* 1984; 23: 1396-1397.
15. Dormandy TL. An approach to free radicals. *The Lancet* 1983; 29: 1010-1013.
16. Senyelli B. İntraperitoneal Mitomisin C ile geliştirilen deneysel kolitte antioksidanların etkisi. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi 1999 Edirne.
17. Einsele H, Clemens MR, Remmer H. Invitro aging of red blood cells and lipid peroxidation. *Arch Toxicol* 1987; 60: 166.
18. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 390-408.
19. Yagı K. Lipid peroxides and human diseases. *Chem and Phy of Lipids* 45: 337-351, 1987.
20. Slater TF. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 105: 283-293, 1984.
21. Masotti L, Casali E, Gesmundo N, Sertur G. Lipid peroxidation in cancer cells. *Chemical and physical studies. Annals of New York Academy of Sciences* 1988; 551: 47-57.

22. Halliwell B. Oxidants and human disease. Some New Concepts FASEB J 1987; 1: 358-364.
23. Fridovich I. The biology of free radicals. Science 1978; 201: 875-880.
24. Sinet PM, Heikkila RE, Cohen G. Hydrogen peroxide production in rat brain in vivo. J Neurochem 1980; 34: 1421-1428.
25. Aruoma OI, Halliwell B, Laughton ME, et al. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron (II), iron (III) complex. Biochem J 258: 617-620, 1989.
26. Schafer L, Tharling EB. Lipid peroxidation and antioxidant supplementation in old age. Scand J Clin Lab Invest 50: 69-75, 1990.
27. Wohaieb SA, Godin DV. Starvation related alterations in free radical tissue defense mechanisms in rats. Diabetes 1987; 36: 169-173.
28. Freeman BA and Crapo JD. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. Lab Invest. 1982; 47: 412-427.
29. Albano E, Clot P, Morimoto M, Tomasi A, Ingelman-Sundberg M, French SW. Role of cytochrome P4502E1 dependant formation of hydroxyethyl free radicals in the development of liver damage in rats intragastrically fed with ethanol. Hepatology 1996; 23: 155-163.
30. Bodyway JA, Karnowsky MC. Production of superoxide by phagocytic leucocytes: A paradigm for stimulus-response phenomena. Curr. Topics Cellular Regul 1986; 28: 183-208.
31. Terelius Y, Ingelman-Sundberg M. Cytochrome P₄₅₀-dependent oxidase activity and hydroxyl radical production in micellar and membranous types of reconstituted systems. Biochem Pharmacol 1988; 37: 1383-1389.
32. Bedwell S, Dean RT, Jessup W. The action of oxygen centered free radicals on human low-density lipoprotein. Biochem J 1989; 262: 707-712.

33. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. Arch Biochem Biophys 1986; 246: 501-514.
34. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide and oxygen. J Biol Chem 1969; 244: 6056-6063.
35. Kavas G. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. Türkiye Klinikleri 1989; 9: 1-8.
36. Richards DCH, Jessup W, Dean RT. Cell surface proteins may be the primary target during free-radical mediated catalysis. Biochem Biophys Acta 1988; 946: 281-288.
37. Wolff SP, Dean RT. Fragmentation of polypeptides by free radicals and its effect on susceptibility to proteolysis. Biochem J 1986; 234: 399-403.
38. Wolff SP, Garner A, Dean RT. Free radicals, lipids and protein breakdown. Trends in Biochemical Science 1986; 11: 27-31.
39. Dean RT, Cheeseman KH. Restriction of free radical attack on monoamine oxidases in mitochondrial membrane by vitamin E. Biochem Biophys Res Commun 1987; 148: 1277-1282.
40. Seven A, Candan G. Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu. Klinik Gelişim 1995; 8: 3906-3911.
41. Frei B, Stocker R, Amans BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. Proc Natl Acad Sci USA 85: 9748-9752, 1988.
42. Pacifici RE, Davies KJ. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: The free-radical theory of ageing revisited. Gerontology 37 (1-3): 166-80, 1991.
43. Sencer E. Beslenme ve diyet. İstanbul 1991; 54-68

44. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper'ın biyokimyası.Hastalığın Biyokimyası. Barış Kitabevi 1993; 62: 853.
45. Diluzio NR, Hartman AD. Role of lipid peroxidation in the pathogenesis of the ethanol induced fatty liver. Fedn Proc 1967; 26: 1436-1442.
46. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper'ın Biyokimyası. Lipidlerin taşınması ve depolanması. Barış Kitabevi 1993; 27: 306.
47. İyidoğan Y. Melatoninin beyin antioksidan enzim aktivitelerine etkisi ve etanolle etkileşimi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Tezi, 1999.
48. Lieber CS. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver disease. Advances in Pharmacology, 1997; 38: 601-628.
49. Domschke S, Domschke W, Lieber CS. Hepatic redox state: Attenuation of the acute effects of ethanol induced by chronic ethanol consumption. Life Sci 1974; 15: 1327-1334.
50. Lieber CS, Jones DP, Losowsky MS, Davidson CS. Interrelation of uric acid and ethanol metabolism in man. J Clin Invest 1962; 41: 1863-1870.
51. Faller J and Fox IH. Evidence for increased urate production by activation of adenine nucleotide turnover. N Eng J Med 1982; 307: 1598-1602.
52. Kato S, Kawase T, Alderman J, Inatomi N, Lieber CS. Role of xanthine oxidase in ethanol induced lipid peroxidation in rats. Gastroenterology 1990; 98: 203-210.
53. Hoerner M, Behrens UJ, Worner T, Lieber CS. Humoral immune response to acetaldehyde adducts in alcoholic patients. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1986; 54: 3-12.
54. Iseri OA, Gottlieb LS, Lieber CS. The ultrastructure of ethanol induced fatty liver. Fed Proc 1964; 23: 579.

55. Iseri OA, Lieber CS, Gottlieb LS. The ultrastructure of fatty liver induced by prolonged ethanol ingestion. *Am J Pathol* 1966; 48: 535-55.
56. Lane BP, Lieber CS. Ultrastructural alterations in human hepatocytes following ingestion of ethanol with adequate diets. *Am J Pathol* 1966; 49: 593-603.
57. Lieber CS, and DeCarli LM. Ethanol oxidation by hepatic microsomes: Adaptive increase after ethanol feeding. *Science* 1968; 162: 917-918.
58. Lieber CS, and DeCarli LM. Hepatic microsomal ethanol oxidizing system: In vitro characteristic and adaptive properties in vivo. *J Biol Chem* 1970; 245: 2505-2512.
59. Albano E, Tomasi A, Gorla-Gatti L, Dianzani MU. Spin trapping of free radical species produced during the microsomal metabolism of ethanol. *Chem Biol Interact* 1988; 65: 223-243.
60. Albano E, Tomasi A, Gorla-Gatti L, Persson JO, Terelius Y, Ingelman-Sundberg M, Dianzani MU. Role of ethanol inducible cytochrome P450 (P4502E1) in catalysing the free radical activation of aliphatic alcohols. *Biochem Pharmacol* 1991; 41: 1895-1902.
61. Clot P, Tabone M, Arico S, Albano E. Monitoring oxidative damage in patients with liver cirrhosis and different daily alcohol intake. *Gut* 1994; 35: 1637-1643.
62. Kamimura S, Gaal K, Britton RS, Bacon BR, Triadafilopoulos G, Tsukamoto H. Increased 4-hydroxynonenol levels in experimental alcoholic liver disease: association of lipid peroxidation with liver fibrogenesis. *Hepatology* 1992 ; 16: 448-453.
63. Nanji AA, Khwaja S, Tahan SR, Sadrzadeh HSM. Plasma levels of a novel noncyclooxygenase derived prostanoid correlate with severity of liver injury in experimental alcoholic liver disease. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 269: 1280-1285.
64. Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, French SW, Morimoto M, Nordmann R. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology* 1997; 25: 351-355.

65. Moussavian SN, Becker RC, Piepmeyer JL, et al. Serum gamma-glutamyl transpeptidase and chronic alcoholism: Influence of alcohol ingestion and liver disease. *Dig Dis Sci* 1985; 30: 211-214.
66. Ryback RS, Erhardt MJ, Felsher B, et al. Biochemical and hematologic correlates of alcoholism and liver disease. *JAMA* 1982; 248: 2261-2265.
67. Shaw LM, Petersen-Archer L, London JW, Marsch E. Electrophoretic, kinetic and immuno inhibition properties of gamma-glutamyl transferase from various tissues compared. *Clin Chem* 1980; 26: 1523-1527.
68. Akkuş I, Gültekin F, Aköz M, Çağlayan O, Bahçacı S, Can ÜG, Ay M, Gürel A. Effect of moderate alcohol intake on lipid peroxidation in plasma, erythrocyte and leukocyte and some antioxidant enzymes. *Clinica Chimica Acta* 1997; 266: 141-147.
69. Nanji AA, Sadrzadeh SMH, Yang EK, Fogt F, Meydani M, Dannenberg AJ. Dietary saturated fatty acids: A novel treatment for alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 1995; 109: 547-554.
70. Tanaka K, Tokunaga S, Kono S, Tokudome S, Akamatsu T, Moriyama T, Zakouji H. Coffee consumption and decreased serum gamma-glutamyl transferase and aminotransferase activities among male alcohol drinkers. *International Journal of Epidemiology* 1998; 27: 438-443.
71. Cheri SZ, Halsted CH, Olin KL, Reisenauer AM, Keen CL. The effect of chronic alcohol ingestion on free radical defence in the miniature pig. *J. Nutr.* 1990; 120: 213-217.
72. Vertechy M, Cooper BM, Chiraradi O, Ramacci MT. The effect of age on the activity of enzymes of peroxide metabolism in rat brain. *Exp Gerontol* 1993; 28:77-85.
73. Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest* 1984; 74: 1398-1403.

74. Keele BB, McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase from *Escherichia Coli* B: A new manganese-containing enzyme. *J Biol Chem* 1972; 245: 6176-6181.
75. Vance PG, Keele BB, Rajayopalan KV. Superoxide dismutase from *Streptococcus mutans*. *J Biol Chem* 1972; 247: 4782-4786.
76. Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase: Site of synthesis and intra mitochondrial localization. *J Biol Chem* 1973; 248: 4793-4796.
77. McAlpine PJ, Boucheix C, Pakstis AJ, Stranc LC, Berent TG, Shows TB. The 1988 catalog of mapped genes and report of the nomenclature committee. *Cytogenet Cell Genet* 1988; 49: 4-38.
78. Rest RF, Spitznagel JK. Subcellular distribution of superoxide dismutases in human neutrophils. *Biochem J* 1977; 166: 145-153.
79. Weisiger RA, Fridovich I. Superoxide dismutase: organelle specificity. *J Biol Chem* 1973; 248: 3582-3591.
80. Aebi HE. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126.
81. Bewick M, Coutie W, Tudhope GR. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in red cells of patients with malignant lymphoma. *Brit J Haematol* 1987; 65: 347-350.
82. Maral J, Puget K, Michelson AM. Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 77: 1525-1535.
83. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
84. Carillo CM; Kanai S; Sato Y, Kitani K. Age-related changes in antioxidant enzyme activities are region and organ, as well as sex, selective in the rat. *Mech Ageing Dev* 1992; 65: 187-198.

85. Seven A, Candan G. Antioxidan savunma sistemleri. Cerrahpaşa Tıp Dergisi 1996; 27: 41-50.
86. Kayaalp O. Yağda çözünen vitaminler. E vitamini. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji cilt 3. Feryal Matbaası Ankara 1997; 2890-2896.
87. Sertçelik G. Antioksidanların gastrik mukozal lipid peroksidasyonları ve stres ülser oluşumuna koruyucu etkisi. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi 1997 Edirne.
88. Amadio P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Sendrom Ekim 1993; 9-22.
89. Abramson S, Edelson H, Kaplan H, Ludewig R, Weissmann G. Inhibition of neutrophil activation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am. J. Med. 1984; 77(4B): 3-6.
90. Smith WL, Meade EA, DeWitt DL. Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes-1 and -2. Ann. N. Y. Acad Sci. 1994; 18, 714: 136-142.
91. Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR, Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. Proc. Natl. Acad Sci. 1993; 15, 90: 11693-11697.
92. DeWitt DL, Meade EA, Smith WL. PGH synthase isoenzyme selectivity: The potential for safer nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am. J. Med. 1993; 95: 2A-41S-2A-44S.
93. Klein T, Nüsing RM, Pfeilschifter J, Ullrich V. Selective inhibition of cyclooxygenase 2. Biochem. Pharmacol. 1994; 48: 1605-1610.
94. Terlain B, Jouzeau JY, Gillet P, Lecompte T, Netter P. Inducible cyclooxygenase. New relationship between nonsteroidal anti-inflammatory agents and inhibition of synthesis of prostaglandins. Presse Med. 1995; 24: 491-496.
95. Ulugöl A, Dökmeci D, Karadağ H, Dökmeci İ. Yeni bir siklooksijenaz izoformu: Siklooksijenaz-2. Trakya Ün. Tıp Fak. Dergisi. 1995; 12(1,2,3): 256-260.

96. Vane JR, Botting RM. Mechanisms of actions of aspirin-like drugs. *Semin. Arthritis. Rheum.* 1997; 26: 2-10.
97. Brain SD, Williams TJ. Leukotrienes and inflammation. *Pharmacol. Ther.* 1990; 46(1): 57- 66.
98. Dökmeci İ, editors. Eikozanoidler ve inflamasyon, ateş ve ağrı farmakolojisi. *Farmakoloji. İlaç Uygulamalarında Temel Kavramlar.* Saray Medikal Yayıncılık Sanayi ve Tic. Ltd. Şti. 1996; 1: 523-545.
99. Cronstein BN, Van de Stouwe M, Druska L, Levin RI, Weissmann G. nonsteroidal anti-inflammatory agents inhibit stimulated neutrophil adhesion to endothelium: adenosine dependent and independent mechanisms. *Inflammation.* 1994; 18 (3): 323-335.
100. Davies MG, Hagen P. The vascular endothelium. A New Horizon. *Annals of surgery.* 1993; 218 (5): 593-609.
101. Jawiga R, Marcinkiewicz E. Scavenging of reactive oxygen species as the mechanism of drug action. *Pol. J. Pharmacol.* 1995; 47: 89-98.
102. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Laboratory Invest.* 1982; 47 (5): 412-426.
103. Oppenheimer MN, Kavanaugh AF, Lipsky PE. Inhibition of the transendothelial migration of human T lymphocytes by prostaglandin E2. *J. Immunol.* 1994; 152 (12): 5703-5713.
104. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji, Ankara, Feryal matbaacılık 1999; 66: 1043-1044.
105. Weglarz L, Drodz M, Goss M. Effect of anti-inflammatory drugs on the activity of antioxidant enzymes and in vivo peroxidation products in the liver and kidney rat. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 1990; 96 (1): 83-85.

- 106.** Umeki S, Soejima R. Studies on relationships between the inhibition of human neutrophil NADPH oxidase by anti-inflammatory drugs and development of bacterial infections. *Kansenshogaku. Zasshi.* 1990; 64 (9): 1184-1191.
- 107.** Umeki S. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on human neutrophil NADPH oxidase in both whole cell-free systems. *Biochem. Pharmacol.* 1990; 40 (3): 559-564.
- 108.** Devchand PR, Keller H, Peters JM, et al. The PPAR alpha-leukotriene B sub 4 pathway to inflammation control. *Nature*, 1996; November 384 (6604): 39-43.
- 109.** Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisom proliferator-activated receptors. *The Lancet*, 1999; July 354 (9173): 141-148.
- 110.** Johnson TE, Holloway MK, Vogel R, et al. Structural requirements and cell-type specificity for ligand activation of peroxisom proliferator-activated receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1997; Sep-Oct 63 (1-3): 1-8.
- 111.** Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism. *Endocrine Reviews*, 1999; Oct 20 (5): 649-688.
- 112.** Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem*, 1997; Feb 272 (6): 3406-3410.
- 113.** Kayaalp O. Editör. BNF/TİK Türkiye İlaç Klavuzu 1999 Formülleri. Turgut Yayıncılık ve Ticaret A.Ş. 1999; 404-405.
- 114.** Michael F, Angel MD, Sai S, et al. The critical relationship between free radicals and degrees of ischemia: Evidence for tissue intolerance of marginal perfusion. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1988; February: 233-239.
- 115.** Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34(3): 497-500.

116. Beers FR, Sizer WI. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J Biol Chem 1952; 195: 133-140.
117. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V. Biyoistatistik. Hatipoğlu Yayınevi Ankara, 1990:76-142
118. Şener G, İlgünşatıroğlu H, Kabasakal L, Uysal KM, Kronik etanol ve nikotin uygulamasının sıçan lensinde lipit peroksidasyonuna ve glutatyon düzeylerine etkileri, Klinik Gelişim 1997; 10: 314-317.
119. Chen LH, Hu N, Huang TL. Effects of acute alcohol intoxication on liver antioxidant defense system in rats. Biochem Arch 1992; 8: 95-100.
120. Guerri C, Grisolia S. Changes in glutathione in acute and chronic alcohol intoxication. Pharmacol Biochem Behav 1980; 13: 53-61.
121. Sato M, Lieber CS. Changes in vitamin A status after acute ethanol administration in the rat. J Nutr 1982; 112: 1188-1196.
122. Liljequist S, Carlsson A. Alteration of central catecholamine metabolism following acute administration of ethanol. J Pharm Pharmacol 1978; 30: 728-730.
123. Belfrage P, Berg B, Cronholm T, et al. Prolonged administration of ethanol to young, healthy volunteers: Effects on biochemical, morphological and neurophysiological parameters. Acta Med Scand (Suppl.) 1973; 552: 5-55.
124. Bondy SC. Ethanol toxicity and oxidative stress. Toxicology Letters 1992; 63: 131-141
125. Rajasinghe. H, Jayatileke E, Shaw S. DNA cleavage during ethanol metabolism: role of superoxide radicals and catalytic iron. Life Sci 1990; 47: 807-814.
126. Blakley PM, Scott WJ. Determination of the peroximate teratogen of the mouse fetal alcohol syndrome. 2. Pharmacokinetics of the placental transfer of ethanol and acetaldehyde. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1984; 72: 364-371.

127. Reinke LA, Moyer MJ. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. *Drug Disp. Metab.* 1985; 13: 548-552.
128. Lucas D, Lamboeuf Y, DeSaint-Blanquet G, et al. Ethanol-inducible cytochrome P-450 activity and increase in acetaldehyde bound to microsomes after chronic administration of acetaldehyde or ethanol. *Alcohol Alcohol.* 1990; 25: 395-400.
129. Ekstrom G, Ingelman-Sundberg M. Activity and lipid peroxidation dependent of ethanol-inducible cytochrome P450 (P4502E1). *Biochem. Pharmacol.* 1989; 38: 1313-1319.
130. Hansson T, Tindberg N, Ingelman-Sundberg M, et al. Regional distribution of ethanol-inducible cytochrome P4502E1 in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1990; 34: 451-463.
131. Anandatheerthavarada HK, Shankar SK, Bhamre S, et al. Induction of brain cytochrome P4502E1 by chronic ethanol treatment. *Brain Res.* 1992; 45:2134-2142.
132. Morgan ET, Koop DR, Coon MJ. Catalytic activity of cytochrome p450 isozyme 3a isolated from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. *J Biol Chem* 1982; 257: 13951-13957.
133. Montoliu C, Valles S, Pigueros JR, Guerri C. Ethanol induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. *J Neurochem* 1994; 63: 1855-1862.
134. Mattia CJ, Adams JD, Bondy SC. Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. *Biochem. Pharmacol.* 1992; 54: 1452-1460.
135. Van Doorn R, Box RP, Brouns RME, et al. Effect of toluene and xylenes on liver glutathione and their urinary excretion as mercapturic acids in the rat. *Arch. Toxicol.* 1980; 43: 293-304.
136. Khan S, Krishnamurthy R, Pandya KP. Generation of hydroxyl radicals using benzene toxicity. *Biochem. Pharmacol.* 1990; 39: 1393-1395.

- 137.** Trenga CA, Kunkel DD, Eaton DL, et al. Effect of styrene oxide on brain glutathione. *Neurotoxicology* 1991; 12: 165-178.
- 138.** Lecomte E, Herbeth B, Pirollet P, et al. Effect of alcohol consumption on blood antioxidant nutrients and oxidative stress indicators. *Am J Nutr* 1994; 60: 255-261.
- 139.** Tanner AR, Bantock I, Hinks L, et al. Depressed selenium and vitamin E levels in a alcoholic population. *Dig Dis Sci* 1986; 31: 1307-1312.
- 140.** Matsumura T, Suetmatsu T, Sato N, et al. Lipid peroxidation in alcoholic liver disease in man. *Adv Exp Med Biol* 1980; 132: 187-293.
- 141.** Suematsu T, Matsumura T, Sato N, et al. Lipid peroxidation in alcoholic liver disease in humans. *Alcohol Clin Exp Res* 1981; 5: 427-430.
- 142.** Guemouri L, Lecomte E, Artur Y, et al. Blood activities of antioxidant enzymes in alcoholics before and after a withdrawal cure. *J stud Alcohol* 1993; 54: 626-629.
- 143.** Ward RJ, Jutla J, Peters TJ. Antioxidant status in alcoholic liver disease. *Adv Biosci* 1989; 76: 343-351.
- 144.** McCay PB, Reinke LA, Rau JM. Hydroxyl radicals are generated by hepatic microsomes during NADPH oxidation: relationship to ethanol metabolism. *Free Rad Res Comms* 1992; 15: 335-346.
- 145.** Lieber CS. Hepatic metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 update. *Alcoholism: Clin Exp Res* 1991; 15: 573-592.
- 146.** Nordmann R, Ribiere C, Rouach H. Ethanol-induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. *Alcoh Alcoholism* 1990; 25: 231-237.
- 147.** Zidenberg-Cherr S, Halsted CH, Olin K, et al. The effects of chronic alcohol ingestion on free radical defense in miniature pig. *J Nutr* 1990; 120: 213-217.

- 148.** Bautista AP, Spitzer JJ. Acute ethanol intoxication stimulates superoxide anion production by in situ perfused rat liver. *Hepatology* 1992; 15: 892-898.
- 149.** Rashba-Steb J, Turro NJ, Cederbaum AI. Increased NADPH- and NADH-dependent production of superoxide and hydroxyl radical by microsomes after chronic ethanol treatment. *Arch Biochem Biophys* 1993; 300: 401-408.
- 150.** Reinke LA, Rau JM, McCay PB. Possible roles of free radicals in alcoholic tissue damage. *Free Rad Res Comms* 1990; 9: 205-211.
- 151.** Nadkarni GD, D'Souza NB. Antioxidant and free radical-scavenging enzymes in chronically ethanol-consuming rats: controversy over hepatic lipid peroxidation. *Drug Alcohol Depend* 1988; 22: 161-164.
- 152.** Remmer H, Kessler W, Einsele H, et al. Ethanol promotes oxygen-radical attack on proteins but not on lipids. *Drug Metab Rev* 1989; 20: 219-232.
- 153.** Laposata EA, Scherrer DE, Mazov C, Lange LG. Metabolism of ethanol by human brain to fatty acid ethyl esters. *J Biol Chem* 1987; 262: 4653-4657.
- 154.** Hungund BL, Goldstein DB, Villegas F, Cooper TB. Formation of fatty acid ethyl esters during chronic ethanol treatment in mice. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 3001-3004.
- 155.** Lange LG, Sobel BE. Mitochondrial dysfunction induced by fatty acid ethyl esters, myocardial metabolites of ethanol. *J Clin Invest* 1983; 72: 724-731.
- 156.** Lange LG. Mechanism of fatty acid ethyl ester formation and biological significance. *Ann N. Y. Acad Sci* 1991; 625: 802-805.
- 157.** Bora PS, Lange LG. Molecular mechanism of ethanol metabolism by human brain to fatty acid ethyl esters. *Alcoholism: Clin Exp Res* 1993; 17: 28-30.
- 158.** Choy PC, Man RYK, Chan AC. Phosphatidylcholine metabolism in isolated rat heart: modulation by ethanol: and vitamin E. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1005: 225-232.

- 159.** Saunders R, Horrocks LP. Eicosanoids plasma membranes and molecular mechanisms of spinal cord injury. *Neurochem Pathol* 1987; 7: 1-22.
- 160.** Trenga CA, Kunkel DD, Eaton DL, et al. Effect of styrene oxide on brain glutathione. *Neurotoxicology* 1991; 12: 165-178.
- 161.** Mattia CJ, Ali SF, Bondy SC. Toluene-induced oxidative stress in several brain regions and other organs. *Mol Chem. Neuropath* 1992; 23: 453-462.
- 162.** Cohen G, Sinet PM, Heikkila R. Ethanol oxidation by rat brain in vivo. *Alcoholism: Clin and Exper Res* 1980; 4: 366-370.
- 163.** Gill K, Menez JF, Lucas D, Deitrich RA. Enzymatic production of acetaldehyde from ethanol in rat brain tissue. *Alcoholism: Clinical and Exper Res* 1992; 16: 910-915.
- 164.** Pardo CA, Xu Z, Borchett DR, Price DL, Sisodia SS, Cleveland DW. Superoxide dismutase is an abundant component in cell bodies, dendrites and axons of motor neurons and in a subset of other neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985; 92: 954-958.
- 165.** Cross A, Jones OTG. Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta*, 1991; 1057: 281-298.
- 166.** Heinzl B, John M, Klatt P, Bohme E, Mayer B. Ca^{2+} /calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J* 1992; 281: 627-630.
- 167.** Simonson SG, Zhang J, Canada JRAT, SU YF, Benveniste E, Piantadosi CA. Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase during ischemia-reperfusion in the rat brain. *J Cerebral Blood Flow Met* 1993; 13: 125-134.
- 168.** Tijmes M, Tedraga R, Valladerco L. Melatonin in the rat testis: Evidence for local synthesis. *Steroids* 1996; 61: 65-68.

169. Aragon CMG, Amit Z. Differences in ethanol induced behaviours in normal and acetalasemic mice: systematic examination using a biobehavioural approach. *Pharmacol Biochem Behav* 1993; 44: 547-554.
170. Amit Z, Aragon CMG. Catalase activity measured in rats naive to ethanol correlates with later voluntary ethanol consumption: possible evidence for a biological marker system of ethanol intake. *Psychopharmacology* 1988; 95: 512-515.
171. Koechling UM, Amit Z. Effects of 3-amino 1,2,4 triazole on brain catalase in the mediation of ethanol consumption in mice. *Alcohol* 1994; 11: 235-239.
172. Cohen G, Sinet PM, Heikkila R. Ethanol oxidation by rat brain in vivo. *Alcohol Clin Exp Res* 1980; 4: 366-370.
173. Aspberg A, Soderback M, Totimar O. Increase in catalase activity in developing rat brain cell reaggregation cultures in the presence of ethanol. *Biochem Pharmacol* 1993; 46: 1873-1876.
174. Chen LH, Huang CY, Daio Y. Large doses of ethanol and activities of liver enzymes which detoxify reactive oxygen species: effect of antioxidants. *Biochem Arch* 1996; 12: 95-104.
175. Van Thiel DH, Chaio YB. Characterization of rat testicular alcohol dehydrogenase. *Alcohol Metabolism* 1986; 21: 9-15.
176. Somani SM, Husain K, Philips LD, Lanzotti DJ, Kareti KR, Trammell GL. Interaction of exercise and ethanol on antioxidant system of rat brain regions. *J Appl Toxicol* 1997; 329-336.
177. Dianzani MV. Lipid peroxidation in ethanol poisoning a critical reconsideration. *Alcohol* 1985; 20: 161-173.
178. Di Luzio NR. Antioxidants lipid peroxidation and chemical-induced liver injury. *Fed Proc* 1973; 32: 1875-1881.

- 179.** Shaw S. Lipid peroxidation iron mobilization and free radical generation induced by alcohol. *Free Rad Biol Med* 1989; 7: 541-547.
- 180.** Koch OR, Galeotti T, Bartoli GM, et al. Alcohol-induced oxidative stress in rat liver. *Xenobiotica* 1991; 21: 1077-1084.
- 181.** Uysal M, Odzemirler G, Kutalp G, et al. Mitochondrial and microsomal lipid peroxidation in rat liver after acute acetaldehyde and ethanol intoxication. *J Appl Toxicol* 1989; 9: 155-158.
- 182.** Rouach H, Park MK, Orfanelli MT, et al. Ethanol-induced oxidative stress in the rat cerebellum. *Alcohol Alcohol Suppl* 1987; 1: 207-211.
- 183.** Nordmann R. Oxidative stress from alcohol in the brain. *Alcohol Alcohol* 1987; 1: 75-82.
- 184.** Nadiger HA, Marcus SK, Chavdrakala MV. Lipid peroxidation and ethanol toxicity in rat brain: effect of vitamin E deficiency and supplementation. *Med Sci Res* 1988; 16: 1273-1274.
- 185.** Hagen BF, Bjoernboe GEA, Drevon CA. Alcohol: Effect of chronic ethanol consumption on the content of alpha-tocopherol in subcellular fractions of rat liver. *Clin Exp Res* 1989; 13: 146-251.
- 186.** Nordmann R, Ribeere C, Rouach H. Ethanol-induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. *Alcohol Alcoholism* 1990; 25: 231-237.
- 187.** Rosenblum ER, Gavalier JS, Van Thiel DH. Lipid peroxidation: a mechanism for alcohol induced testicular injury. *Free Rad Biol Med* 1989; 7: 569-577.
- 188.** Belce A, Kökoğlu E, Superoksid dismutaz ve diabet, *Klinik Gelişim* 1994; 7: 2979-2981.
- 189.** Schisler NJ, Singh SM. Effect of ethanol in vivo on enzymes which detoxify oxygen free radicals. *Free Rad Biol Med* 1989; 7: 117-123.

190. Farbiszewski R, Chwieko M, Holownia A, et al. The decrease of superoxide dismutase activity and depletion of sulfhydryl compounds in ethanol-induced liver injury. *Drug Alcohol Depend* 1991; 28: 291-294.

191. Ledig M, M'Pavia JR, Mandel P. Superoxide dismutase activity in rat brain during acute and chronic alcohol intoxication. *Neurochem Res* 1981;6: 385-391.



10. RESİMLEMELER LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1. Oksijen Türevi Bileşikler.....	4
Şekil 1. Süperoksid Anyonu ve Hidroksil Radikali Oluşumu.....	6
Şekil 2. Lipit Peroksidasyonu Fazları.....	11
Şekil 3. İbuprofenin Kimyasal Yapısı.....	32
Tablo 2. Deney Gavaj Şeması.....	43
Tablo 3. Kontrol ve Tedavi Gruplarının Karaciğer Dokusu MDA Değerleri.....	51
Tablo 4. Kontrol ve Tedavi Gruplarının Karaciğer Dokusu SOD Enzim Aktivitesi.....	52
Tablo 5. Kontrol ve Tedavi Gruplarının Karaciğer Dokusu CAT Enzim Aktivitesi.....	53
Tablo 6. Kontrol ve Tedavi Gruplarının Plazma MDA Değerleri.....	54

11. ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Niğde’de doğdum. Orta öğrenimimi Gelibolu Lisesi’nde tamamladıktan sonra 1993 yılında T. Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’ne girdim. 1997 yılında biyolog olarak mezun oldum ve 1998 yılında T. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nde Deneysel Tıbbi Araştırma Bilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimime başladım. İki yıl boyunca bilim dalımızın bağlı bulunduğu Farmakoloji Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalıştım. Halen eğitime devam etmekteyim.

