

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİGARA İÇENLERDE OKSİDATİF STRES  
GÖSTERGELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Vügar ALIYEV**

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ TIP (ADLİ KİMYA VE TOKSİKOLOJİ)  
ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof.Dr. Şahan SAYGI**

**2006 - ANKARA**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# **SİGARA İÇENLERDE OKSİDATİF STRES GÖSTERGELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Vügar ALIYEV**

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ TIP (ADLİ KİMYA VE TOKSİKOLOJİ) ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Şahan SAYGI**

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü  
tarafından 80-2093 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**2006 - ANKARA**

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Adli Tıp Enstitüsü, Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan, "Sigara İçenlerde Oksidatif Stres Göstergelerinin Değerlendirmesi" konulu tezi, aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26.06.2006

Prof. Dr. Şahan SAYGI  
Jüri Başkanı



Üye  
Prof. Dr. Tülin SÖYLEMEZOĞLU  
A.Ü. Adli Tıp Enstitüsü



Üye  
Prof. Dr. Gülin GÜVENDİK  
A. Ü.Eczacılık Fakültesi



Üye  
Prof. Dr. Mevlüt BERTAN  
H.Ü Eczacılık Fakültesi



Üye  
Doç. Dr. Yaşar BİLGE  
A.Ü. Tıp Fakültesi



## TEŐEKKÖR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmalarım süresince beni yönlendiren, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, danışmanım Prof. Dr. Şahan Saygı'ya, emek ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Ankara Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Müdür Yardımcısı, hocam Prof. Dr. Tülin Söylemezoğlu'na; örneklerin toplanmasında büyük emeği geçen Adli Toksikolog Dr. Banuçiçek Yücesan'a; desteğini, ilgisini ve bilgisini esirgemeyen Araş.Gör. Şebnem Şefika Çeçen'e, yorucu labaratuvar çalışmaları boyunca beni yalnız bırakmayan arkadaşlarım Uzm. Bio. Ayşe Karakuş ve Biolog Serap Yalçın'a ve destek ve güvenlerini her zaman hissettiğim aileme sonsuz saygı ve şükranlarımı sunar, teşekkür ederim.

Vügar Aliyev

# İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
Teşekkür	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
<b>1. GİRİŞ</b>	1
1.1. Sigara	1
1.1.1. Sigara dumanı	2
1.1.2. Yapısı ve Ticari Kullanım Çeşitleri	5
1.1.3. Oksidatif Stres	6
1.1.4. Toksikite Mekanizması	7
1.1.5. Akciğerde Birikimi	9
1.1.6. Akut Etkileri	10
1.1.7. Kronik Etkileri	10
1.2. Serbest Radikaller	12
1.2.1. Oksijen Radikalleri	16
1.2.1.1. Singlet Oksijen	17
1.2.1.2. Süperoksit Radikali	18
1.2.1.3. Hidrojen Peroksit	19
1.2.1.4. Hidroksil Radikali	20
1.3. Lipid Peroksidasyon	21
1.3.1. Malondialdehit	24
1.3.2. Glutasyon (GSH)	27

1.4. Antioksidan Savunma Sistemleri	30
1.5. Protein karbonil	34
1.6. Serbest Radikal Hasarı Biyogöstergeleeri	37
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>39</b>
2.1. Gereçler	39
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	39
2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	39
2.1.3. Deney Protokolü	40
2.2. Yöntemler	41
2.2.1. Plazmada Lipid Peroksidasyon Ürünlerinin (LPO) Tayini	41
2.2.2. Plazmada Total Sülfidril Gruplarının Tayini	42
2.2.3. Plazmada Protein Karbonil Tayini	43
2.3. İstatistiksel Analiz	45
<b>3. BULGULAR</b>	<b>46</b>
3.1. Kalibrasyonlar	46
3.1.1. Plazma MDA	46
3.1.2. Plazma Total Sülfidril Düzeyleri	47
3.2. MDA, TSH ve PCO Düzeyleri	47
3.2.1. Plazma MDA Düzeyleri	47
3.2.2. Plazma TSH Düzeyleri	48
3.2.3. Plazma PCO Düzeyleri	49
3.2.4. MDA, TSH ve PCO Arasındaki İstatistiksel Korelasyonlar	52
3.2.5. MDA, TSH ve PCO Düzeylerinin Yaş ile İlişkisi	53
3.2.6. Karaciğer Fonksiyon Testleri	54
3.2.7. Böbrek Fonksiyon Testleri	55
3.2.8. Lipid Profilleri (Panelleri)	55
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>57</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>65</b>

<b>ÖZET</b>	68
<b>SUMMARY</b>	70
<b>KAYNAKLAR</b>	72
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	83
<b>EKLER</b>	84

## SİMGELER VE KISALTMALAR

BHT	Bütil hidroksi toluen
DTNB	5, 5- ditiobis-2-nitro benzoik asit
GSH	İndüklenmiş glutatyon
GSH-Px	Glutatyon Peroksidaz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
MDA	Malondialdehit
LPO	Lipid peroksidasyon
O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	Süperoksit anyon radikali
OH <sup>•</sup>	Hidroksil radikali
ROT	Reaktif oksijen türleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik asit
TBA-Rs	Tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddeler
TCA	Trikloro asetik asit
TEP	1, 1, 3, 3-tetra etoksi propan
TRIS	Tris-(hidroksimetil)-aminometanhidroklorid
Na <sub>2</sub> EDTA	Etilen dinitrilotetra asetik asid disodyum tuzu
HCl	Hidroklorik asit
DNPH	2,4- dinitrofenilhidrazin
GSSG	Glutatyon disülfid
PUFA	Çoklu doymamış yağ asidi

## ŞEKİLLER

1.1. Nikotinin kimyasal yapısı	6
1.2. Oksijen türevli radikaller	17
1.3. Malondialdehitten Schiff bazı oluşumu	25
1.4. Tiyobarbitürik asitin MDA ile reaksiyonu	27
1.5. Glutatyonun yapısı	28
1.6. Glutatyon peroksidaz tarafından $H_2O_2$ ve lipid hidroperoksitlerin yıkımı	30
3.1. Buege ve Aust'un spektrofotometrik yöntemi ile plazmada MDA tayini için hazırlanan kalibrasyon eğrisi ve regresyon denklemi.	46
3.2. Sedlak ve Lindsay'in spektrofotometrik yöntemi ile plazmada total sülfidril tayini için hazırlanan kalibrasyon eğrisi ve regresyon denklemi.	47
3.3. Kontrol grubu ve sigara kullanan gönüllülerde sigara tüketim miktarına göre plazma MDA düzeyleri	48
3.4. Kontrol grubu ve sigara kullanan gönüllülerde sigara tüketim miktarına göre plazma total sülfidril düzeyleri	49
3.5. Kontrol grubu ve sigara kullanan gönüllülerde sigara tüketim miktarına göre plazma protein karbonil düzeyleri	50
3.6. MDA ve TSH korelasyon grafiği	52
3.7. MDA ve PCO korelasyon grafiği	52
3.8. TSH ve PCO korelasyon grafiği	53

## ÇİZELGELER

3.1. Sigara içen ve içmeyenlerde MDA, GSH düzeyleri ve protein karbonil içerikleri arasındaki istatistiksel farklılıklar	50
3.2. Farklı miktarlarda sigara kullanan ve sigara kullanmayan bireylerin oluşturduğu gruplarda MDA, GSH ve PCO düzeylerinde hesaplanan istatistiksel farklılıklar	51
3.3. MDA, TSH ve PCO arasında hesaplanan korelasyon ve p değerleri	53
3.4. MDA, TSH düzeyleri ve protein karbonil içeriklerinin yaş ile aralarında bulunan korelasyon ve p değerleri	54
3.5. Karaciğer AST, ALT ve GGT düzeyleri	54
3.6. Böbrek Üre, Serum keratinin ve ürik asit düzeyleri	55
3.7. Lipid profilleri kollesterol, HDL-kollesterol, LDL-kollesterol, VLDL-kollesterol ve trigliserit düzeyleri	56

# 1. GİRİŞ

## 1.3. Sigara

Tütün, kutuplar ve Ekvator bölgeleri dışında, dünyanın her yerinde üretilmekte; bu nedenle de kolaylıkla elde edilip çeşitli biçimlerde tüketilebilmektedir. Tütünün değişik kullanılış biçimleri arasında enfiye, tütün çiğneme, nargile, pipo, puro ve sigara bulunmaktadır. Ancak, günümüzde tütünün en yaygın tüketim biçimi sigara'dır. Özellikle ülkemizde, öteki tütün tüketimi biçimleri göz yumulabilecek düzeyde olduğundan, “ tütün ” denildiğinde akla daha çok sigara gelmektedir.

Dumanın keyif verici olarak kullanılmasının öyküsü, tarih önceki dönemlere değin uzanmaktadır. Uygar dünyanın tütünle tanışması ise, Amerika'nın keşfiyle başlar. Oysa, yüzyıllar önce tütünü bulan Amerika anakarasının yerli halkı, o tarihte bu keyif verici maddeyi kullanır durumdaydı. Gemicilerin kolaylıkla alıştığı tütün, 16. Yüzyılın başlarında Avrupa'ya götürülerek orada ekilmeye başlandı. Kısa sürede tütün kullanma alışkanlığı Avrupa'ya yayıldı. Amerika yerlilerinin bu “ büyük” keşfinin uygar dünyayı tutsak etmesi böyle başlamıştır. Anadolu'ya ilk kez 17. Yüzyıl başında Avrupa'dan gelen tütün, toplum içinde yaygın bir kullanım alanı buldu. 17. Yüzyılın sonlarında, ülkede tütün üretimine izin verildi (Bilgiç, 2000).

Sigara dünyada en yaygın kullanılan bağımlılık yapıcı madde olarak kabul edilmektedir (Fahn ve ark. 1998).

### 1.3.1. Sigara dumanı

Çevresel toksik maddelerin birçok hastalığın patogeneğinde rol oynadığı bilinmektedir. Genel olarak, bu etkiler ksenobiyotiklerin biyotransformasyonla reaktif metabolitlere dönüşümü ve serbest radikal hasarı ile açıklanmaktadır. Öte yandan aynı çevresellere maruz kaldığı halde aynı derecede etkilenmeyen veya daha fazla etkilenen birey ve grupların varlığı genetik farklılıkla açıklanmaktadır (Beatty ve ark., 2000; Ames ve ark., 1993; Swan ve ark., 2004).

Sigara yandığında, ana akım (main stream) ve yan akım (side stream) denilen iki duman oluşur. Ana akım, sigara dumanı içe çekildiğinde, yanan sıcak sigara bölümünde ortaya çıkar; tütün kitlesi içinden geçerek, sigaranın ağız bölümünden dışarı çıkar. Yan akım dumanı ise, sigara kendiliğinden yanarken havaya yayılan dumandır.

Sigara dumanı, gaz ve parçacık (partikül) olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır. Doğal bir çalışma odasında  $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$  olan parçacık düzeyi, odada sigara içildiğinde  $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 'e, yoğun sigara içilmesi durumunda ise  $500-1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 'e ulaşmaktadır (Bilgiç, 2000).

Sigara içiminin akciğer, larenks, ağız boşluğu ve özafagus gibi organlarda kansere sebep olduğu bilinmektedir (IARC, 1986). İncelemeler sonucu sigara dumanında, kanserojen olduğu saptanan maddeler ve kanser yapıcı etkilerinin dereceleri aşağıda belirtilmiştir:

İnsanlarda kanserle nedensel ilişki olan maddeler: 4-aminobifenil, arsenik, benzen, krom, nikel ve vinilklorür.

İnsanda olası kanserojen maddeler: benzoapiren, kadmiyum, dibenzahantrasen, formaldehit, N-nitrozodietilamin, N-nitrozodimetilamin. (IARC, 1986).

Sigara dumanının kanser dışındaki zararlı etkileri, içerdiği nikotin, karbonmonoksit, azotoksitler, amonyak, hidrojeniyanür ve akrolein gibi maddelere bağlıdır. Katran, ayrı bir madde değildir. Katran, sigara dumanının özel bir filtre üzerinde kalan bölümünün, su ve nikotin dışındaki parçasıdır. Katran, binlerce kimyasal maddeden oluşan karmaşık bir yapıdır ve bunların çoğunun, deney hayvanlarında kanser yaptığı bilinmektedir (IARC, 1986). Ayrıca, katranda bulunan kimi maddeler de akciğerlerde bronşiyolleri daraltarak, silyostaz gelişmesine yol açmaktadır. Sigaranın ölüm nedeni olan 40 hastalık ile pozitif korelasyon göstermekte ve yıllık ölüm riskini her iki cinsten de iki katına çıkarmaktadır (Doll, 1999). Sigaraya bağlı hastalıklar nedeniyle her yıl yaklaşık 3 milyon insan ölmekte, 20-30 yıl sonra bu sayının 10 milyona ulaşacağı ve bu ölümlerin de yaklaşık 7 milyonunun az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde olacağı tahmin edilmektedir (WHO, 1992). Ayrıca aktif sigara içicilerinin yanında pasif sigara içimine maruz kalanlarda da solunum sistemi hastalıkları, akciğer kanseri ve kalp hastalıkları morbidite ve mortalitesinin arttığı, yine sigara içilen ortamda yetişen çocuklarda alt solunum yolları ve orta kulak enfeksiyonları, ani ölümler ve astım ataklarında artış görüldüğü bilinmektedir.

Sigara alışkanlığının birçok kanser türüyle doğrudan ya da dolaylı ilişkisi vardır. Sigara alışkanlığı, kanser ölümlerinin en önemli tek nedeni olup, gelişmiş ülkelerdeki erkeklerde görülen kanserlerin % 40-45'i, tüm nüfustaki kanserlerin %30'u sigaraya bağlıdır. Akciğer kanseri ölümlerinin %80-90'ı, kronik akciğer hastalığı ölümlerinin %75-90'ı, koroner kalp hastalığı ölümlerinin %25-30'u sigarayla ilgilidir. Öte yandan, son 20 yıl içinde, sigara dumanının yalnızca sigara içen bireyi değil, aynı zamanda o ortamı paylaşan başka insanları da benzer biçimde etkilediği kesin verilerle kanıtlanmıştır. Pasif veya istemsiz sigara içme denen bu durumun, sigara ve alkol alışkanlığını izleyen üçüncü "Önlenebilir Ölüm Nedeni" olduğu ortaya konmuştur. Bu nedenle, özellikle son yıllarda, pasif sigara içenlerin korunmasına yönelik çeşitli önlemler gündeme gelmiş, gelişmiş ülkelerde bu doğrultuda önemli adımlar atılmıştır (Stirling ve ark., 1986).

Sigara alışkanlığı, günümüzde dünya nüfusunu tehdit eden en önemli etkidir. Sigara içimi, 35-69 yaş arası ölümlerin %30' unun nedenidir. Gelişmiş ülkeler, sigara ile etkin bir savaş verdiği için, onlarda sigara tüketimi her yıl azalmasına karşın , Üçüncü Dünya Ülkelerinde, uluslar arası sigara tekellerinin yaygın tanıtım gayretleriyle sigara içimi hızla artmakta ve dolayısıyla ilgili hastalıklar çoğalmaktadır (WHO, 1992).

Türkiye'de sigara içme alışkanlığının çok yaygın olduğu kolaylıkla gözlenen bir gerçektir. Toplumumuzda 15 yaş ve üstü erkeklerin % 62.8'i, kadınların % 24.3'ü, tüm nüfusun ise % 43.6'sı sigara içmektedir. Sigara içenlerin yaklaşık % 25 'i, sigara içme sonucu,

yaşamlarının erken bir döneminde ölmektedir. Bu ölümler, ortalama 10-15 yıllık bir yaşam kesitine mal olmaktadır. Yapılan dolaylı hesaplamalar sonucu, Türkiye’de sigarayla ilişkili ölüm sayısının yılda yaklaşık 35 bin olduğu sanılmaktadır. Ancak, ülkemizde morbidite ve mortalite istatistik kayıtları yeterli olmadığından, kesin bir yargıya varılamamaktadır (WHO, 1992). Bununla birlikte ülkemizde sigarayla ilgili 26.11.1996 tarih ve 4207 sayılı kanun gereğince eğitim – öğretim hizmeti veren kurumlardaki kapalı mekanlarda ve toplu taşıma araçlarında tütün ve tütün mamüllerinin içilmesi yasaklanmıştır.

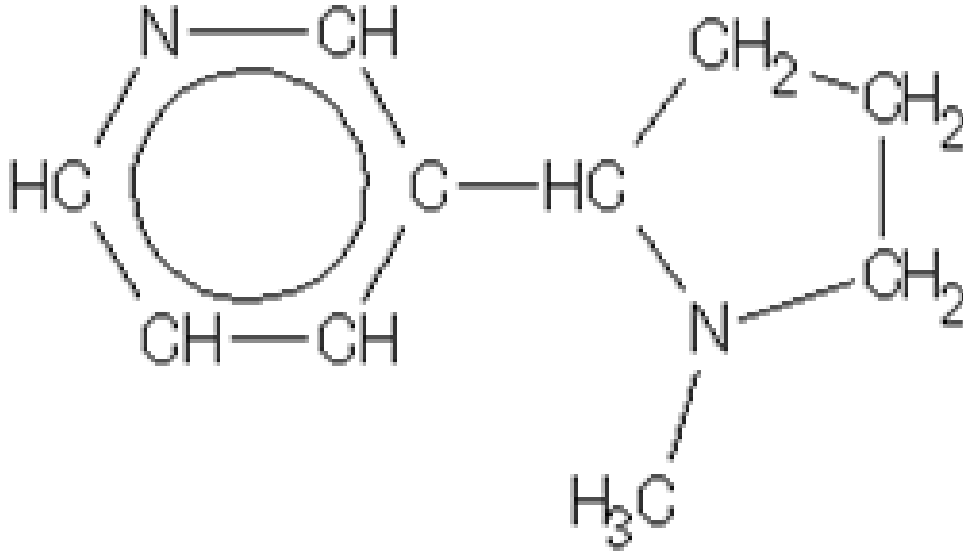
Sigara dumanında bulunan veya bu maddelerin uğradığı biyotransformasyon sonucu ortaya çıkan serbest radikallerle hasara uğrayan birçok organ ve doku bulunmaktadır. Bu bilgilerin ışığında; serbest radikallere maruziyet ve oluşturdukları hasarı belirlemek amacıyla yeni göstergelerin yöntemlerini kurmak ve sigara içenlerde görülen etkiyi araştırmak açısından önem taşımaktadır (Petruzelli ve ark., 1997).

### **1.1.2. Yapısı ve Ticari Kullanım Çeşitleri**

Sigara dumanı 4000’den fazla kimyasal, bir çok bilinen kanserojen ve zararlı madde içermektedir (Church ve Pryor, 1985; Pryor ve Stone, 1993). Özellikle sigara dumanının önemi süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil ve peroksinitril radikalleri gibi çeşitli reaktif oksijen

türlerini (ROS) ve reaktif nitrojen türlerini (RNS) içermesi ve oluşturmasıdır (Aoshiba ve Nagai, 2003).

Sigara dumanında bulunan en önemli kimyasal madde nikotindir.



*Şekil 1.1. Nikotinin kimyasal yapısı*

Nikotinin kimyasal adı: (S)-3-(1-methyl-2-pyrrolidinyl) pyridin;  
kimyasal formülü ise C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>  
([www.fch.vutbr.cz/home/bucherova/down/Bartonovaprezentace.ppt](http://www.fch.vutbr.cz/home/bucherova/down/Bartonovaprezentace.ppt) ).

### 1.1.3. Oksidatif Stres

Organizmada serbest moleküllerin oluşum hızı ile bunları ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak tanımlanır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına

neden olur. Oksidatif stres olarakta adlandırılan bu durum özetle: serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına (Serafini ve Del Rio, 2004), kanser, diyabet ve ateroskleroz gibi patolojik durumların gelişmesinde etkin olduğu gösterilmiştir (Cross ve ark., 1987; Asayama ve ark., 1994; Corrocher ve ark., 1986; Mantha ve ark., 1993; McCoy ve ark., 1988). Başka bir ifadeyle oksidatif stres, artmış oksidana maruz kalma ya da azalmış antioksidan kapasite olarak tanımlanabilir (Horvath ve ark., 1998).

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA ve karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve böylece yapılarının bozulmalarına neden olurlar. Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri (ROS), süperoksit anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ), nitrik oksit (NO), peroksil radikali ( $ROO^{\cdot}$ ) ve radikal olmayan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerinden birini oluştururlar ( Babior, 2000).

Oksidatif stres düzeyindeki artışın, hücrede reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminin artışına ve buna bağlı olarak da toksikasyona neden olduğu ifade edilmektedir (Quinn, 2002, Evans ve ark., 2003).

#### **1.1.4. Toksikite Mekanizması**

Sigara dumanının bir soluşununun  $10^{14}$ 'ü ROS olan toplam  $10^{17}$  oksidan molekül içerir (Church ve Pryor, 1985). Başlıca sigara dumanının gaz fazında kısa bir süreliğine oluşan süperoksit ve nitrojen oksit radikalleri hemen reaksiyona girerek yüksek reaktan olan

peroksinitrite dönüşür. Buna karşı katran fazında uzun ömürlü hidrokinon redoks döngüsüne uğrayarak süperoksit radikal ve hidrojen peroksit yolu ile semikinona sonuç olarakta oksidatif strese neden olmaktadır (Pryor ve Stone, 1993; Cross ve ark., 1997; Nakayama ve ark., 1989). Hidrokinon ve hidrojen peroksit hücrelere girerek çekirdeğe ulaşırlar ve burada oksidatif DNA hasarına neden olurlar (Van der Vliet ve ark., 1997; Stone ve ark., 1994). Bazı sigara dumanının bileşenleri demiri ferritin formunda serbest bırakırlar ve böylece akciğer hücrelerinde daha büyük bir oksidatif strese neden olurlar (Moreno ve ark., 1992). Sigara dumanında bulunan nitrik oksit ve diğer serbest radikaller oksidasyon reaksiyonlarını tetikleyerek membran ve proteinlerin yapısını değiştirirler (Eiserich ve ark., 1994). Hasarlı dokularda, nitrik oksit ve süperoksitin reaksiyon vermesi ile peroksinitrit oluşmasını, albumin ya da lipoproteinler gibi proteinlerin tirozinlerinin nitrasyonu takip eder (Ischiropoulos ve Al-Mehdi, 1995; Van der Vliet ve ark., 1995, Gatti ve ark., 1994, Beckmann ve ark., 1994). Peroksinitrit ayrıca, nükleik asitlerle reaksiyon vererek DNA sarmalında hasara veya guanin ile reaksiyon vererek 8-nitro guanozin oluşumuna neden olur. Böylece karsinojenesisin ara basamaklarına da katkıda bulunur (Szabo ve ark., 1996, Yermilov ve ark., 1995). Ayrıca nitro-aromatik bileşiklerin oluşması da, biyolojik sistemlerdeki peroksinitritlerle reaksiyonların tanımlanmasında biyogösterge olarak kullanılır. Tirozinin orto pozisyonunda nitrasyonu 3-nitrotirozinin oluşmasını sağlar (Haddad ve ark., 1993; Kooy ve ark., 1995; Kaur ve Halliwell, 1994). Kronik inflamasyonda, akut akciğer hasarında ve romatoid artritli hastaların serum ve eklem sıvılarında oksidatif hasarın sonucu olarak 3-nitrotirozin bulunmuştur. Fenil alanin ve triptofan gibi aminoasit taşıyan diğer proteinler de peroksit ve nitrojenioksitle nitrasyona uğrayabilir. Sigara

içiminde doğrudan oksidan ve serbest radikal aktivitesi ya da solunum sistemindeki inflamasyona neden olabilecek hücrelerin aktivasyonu ile nitrotirozin oluşabilir (Van der Vliet ve ark., 1994, Haddad ve ark., 1993, Mezzetti ve ark., 1995).

### **1.1.5. Akciğerde Birikimi**

Akciğerin dış ortama karşı korunmasını ilk olarak alveolar epiteli hücreleri sağlamaktadır. Bu hücreler bir de yüzey gerilimini azaltmakta, enflamasyon düzenlemesiyle sitokinleri serbest bırakmakta, büyüme faktörünü oluşturmakta, matriks proteinlerinin tamirat mekanizmasına yardımcı olmakta ve alveol matriks proteinlerinin düzenlenmesinde proteinaz inhibitörlerini serbest bırakmaktadırlar. Bu durumda sigara dumanının epitelial geçirgenliğinin artmasına, yüzey geriliminin azalmasına, sitokinezin ve büyüme faktörünün uygunsuz oluşmasına ve akciğer kanser riskinin artmasına neden olmaktadır (Aoshiba ve Nagai, 2003). Böylece sigara dumanın alveolar hücrelerin üzerine çok yüksek toksik etkisiyle apostosis ve nekrosise her iki durumda da ölümlerine neden olmaktadır. Sigara dumanın etkisiyle çoğunlukla ortaya çıkan değerler oksidatif stresin artmasına ve hücre ölümlerine neden olmaktadır (Church ve Pryor, 1985; Pryor ve Stone, 1993).

### **1.1.6. Akut Etkileri**

Akut sigara tüketimi sonucu alveolar hücrelerinde glutatyon peroksidaz ve glukoz-6-fosfotaz, eritrositler ve akciğer epitelinin yüzey akıcılığı azalmakta ve glutatyon düzeyi düşmektedir (Maranzana ve Mehlhorn, 1998; Joshi ve ark., 1988; Rahman ve ark., 1995; Rahman ve ark., 1999; Lannan ve ark., 1994).

### **1.1.7. Kronik Etkileri**

Sigara dumanındaki hidrojen siyanid, bronşlarınızın çeperini yıkar ve kronik öksürük ortaya çıkar. Bronşlar zayıfladıkça, bu bölgede pek çok hastalık oluşur. Akciğer koruyucu salgılarında azalma olur ve bu da kronik öksürüklere yol açar. Sigara içenler, içmeyenlere göre on kat daha fazla akciğer kanseri olma riski taşırlar (Warden, 1987).

Sigaranın kalbe verdiği zararlar tek kelimeyle yıkıcıdır. Nikotin kan basıncını yükseltir ve kanın daha çabuk pıhtılaşmasına sebep olur. Sigarada bulunan karbon monoksitin kandaki oksijeni yok etmesiyle damarlarda kolesterol depolanır ve bu da kalp krizi riskini artırır. Bunun yanı sıra, kan dolaşımını bozukluklarına bağlı olarak, felç, parmaklarda kangren ve iktidarsızlık, sigara içenlerde çok sıklıkla görülen hastalıklardır (Hukkanen ve ark., 2005).

Sigaranın sindirim sistemine pek çok kötü etkisi bulunmaktadır. Sigara tüketimine bağlı olarak, midede asit salgılanması artar, mide yanmaları ve ülser başlar. Sigara bağımlılarında pankreas kanseri çok

sıklıkla ortaya çıkar, büyük ölçüde ölümle sonuçlanır. Sigaranın ihtiva ettiği kanserojen maddeler, idrarla dışarı atılır ancak bu maddelerin vücuttaki varlığı mesane kanserine yol açar. Sigara yüzünden oluşan yüksek kan basıncı ise böbreklere büyük zarar verir (Cigremis, 2004).

Sigara bağımlılarını kendisine bağlayan nikotin; kokain ya da amfetamin kadar güçlü ve onlara benzer bir uyarıcıdır. Tiryakiye sürekli sigara içme isteği veren şey de odur. Nikotin sigara içen kişiyi uyarır, kalp çarpıntısına, yüksek tansiyona, kişinin nefes alıp verişinin hızlanmasına sebep olur. Ne yazık ki, bu etkiler yirmi dakika içinde kaybolur ve tiryaki bir sigara daha yakar. Sigarada bulunan karbon monoksit, kişiyi sersemleştirir. Bu kimyasal maddeler, kısa bir süre için gerilimi, kızgınlığı ve diğer güçlü hisleri bastırır (Lerman ve ark., 2004; Hukkanen ve ark., 2005).

Sigara bağımlısının ağız kanserine de yakalanma riski çok yüksektir. Ayrıca tütün duman dış eti hastalıklarına yol açar, dış çürümmesine ve nefesinizin kötü kokmasına sebep olur. Bunların yanı sıra sigara bağımlılarında kronik baş ağrılarında rastlanır. Beyne giden oksijende azalma olur, bu da beyin damarlarının daralmasında neden olur. Sonunda felç gerçekleşebilir.

Kolesterolü yüksek hastalarda, kardiyovasküler risk faktörlerinin değerlendirilmesi ve mümkünse değiştirilmesi, tedavinin temel noktalarından birisidir. Kolesterolü yüksek hastalarda, kolesterol yüksekliği dışındaki kardiyovasküler risk faktörlerine de sık rastlanır ve bu kardiyovasküler risk faktörlerinin düzeltilmesi ile kardiyovasküler

kalıcı hasar ve ölüm riski kesin olarak azaltılır (Kugiyama ve ark., 1996).

Bugünkü verilere göre hastalık ve ölümlerin en önemli önlenilebilir nedeni olarak tanımlanan sigara alışkanlığı , kanser ölümlerinin en büyük tek nedenidir. Sigaranın değişik kanserlerle ilişki derecesi şöyle özetlenebilir:

Başlıca neden olduğu kanserler: Akciğer ,ağız ,larinks, farinks, özofagus.

Katkıda bulunduğu kanserler : Mesane , böbrek, pankreas.

İlişkili olduğu kanserler : Mide, serviks.

Gelişmiş ülke erkeklerinde görülen kanser ölümlerinin % 40-45'i sigaraya bağlıdır. Bu oran, kadınlarda daha düşük olup, %10'un altındadır; ancak hızla yükselmektedir (WHO, 1992).

Başka kanserojen etkenlerle etkileşim: Sigara tiryakilerinin kimi başka etkenlerle de karşılaşması durumunda sigaranın kanserojen etkisi artmaktadır. Bu etkenlerin en önemlileri alkol, asbest tozu ve uranyum madenlerindeki iyonlaştırıcı radyasyondur. Ağız, orafarinks, hipofarinks, özofagus kanserleri riski, alkol alan sigara tiryakilerinde, alkolün dozuyla orantılı olarak artmaktadır (Haddad, 1994; Kooy ve ark., 1995; Pignatelli ve ark., 2001).

#### **1.4. Serbest Radikaller**

Bir veya daha fazla sayıda eşlenmiş elektron içeren ve yüksek reaktivite gösteren atom veya moleküllere "serbest radikal" denir (Brent ve Rumack, 1993). Ayrıca bu moleküllere "oksidan moleküller" veya "reaktif oksijen türleri (ROS)" de denmektedir (Halliwell, 1991).

Her ne kadar da serbest radikal reaksiyonları, n6trotofil, makrofaj gibi bağışıklık sistemi h6crelerinin savunma mekanizması için gerekli olsada, serbest radikallerin fazla 6retimi doku hasarı ve h6cre 6l6m6 ile sonuçlanmaktadır (Halliwell ve ark., 1992).

H6crelerdeki oksidatif hasarların oluşumunda ilk sırada yer alan serbest radikaller normal h6crenel bileşenleri bağlayarak, membran lipidlerinin doymamış bağları ile reaksiyona girerler, proteinlerini denat6re ederler ve n6kleik asitlerine saldırırlar (Trush ve Kensler, 1991). Reaktif oksijen t6rlerinin (ROS) ilk hedefleri h6cre zarlarındaki çoklu doymamış yağ asitleri olup, bunun sonucunda zarlarda lipid peroksidasyon sonucu h6cre yapısı ve fonksiyonunda 6nemli hasarlara neden olurlar (Soyd, 1990). Ayrıca DNA ve n6kleik asitler 6zerine serbest radikallerinin etkisiyle DNA zincirinde kopmalar ve bazlarda kırılmalar meydana gelmektedir (Stampfer ve ark., 1993). Proteinler açısından bakıldığında ise Triptofan, Tirozin, Fenilalanin, Histidin, Metiyonin gibi s6lf6r içeren aminoasitlere sahip proteinler serbest radikaller ile reaksiyonları daha hızlı gerçekleşmektedir (Wyllie ve ark., 1992). Oluşan bu hasarları belirlemek için ksenobiyotiğin toksisitesini, hastalığın patojenezini ve birçok biyog6stergenin bulunması gereklidir (De Zwart ve ark., 1999). Birçok molek6l elektron kazanarak veya kaybederek serbest radikal haline gelebilirken, sadece sınırlı bir kısmı patolojik olaylarda yer alırlar (Ivanova ve ark., 1991).

Membranlara bağlı sitokrom oksidasyonu da endoplazmik retikulum ve n6kleer membranda serbest radikal oluşumuna neden olur (Lawrence ve Benedich, 1987).

Sigara içimi; sigaranın içerdiği yüzlerce zararlı madde ve neden olduğu bilinen hastalıklar nedeni ile serbest radikal hasarının izlenebileceği bir model oluşturmaktadır. Bu serbest radikaller gaz fazda varlıklarını 5 dakikadan fazla sürdürmekte ve sigara içenlerin akciğerlerinde hücreleri biyokimyasal fonksiyonları bozacak şekilde etkilemektedirler (Pryor ve ark., 1993).

Sigara dumanının hem gaz hem de partikül düzeyde etkisi incelenmektedir. İkisi de birçok oksidan ve serbest radikal içerir. Özellikle gaz fazında nitrik oksit ve katranında kinon/hidrokinon kompleksi vardır. DNA sarmalında kopmalara ve DNA bazlarında modifikasyonlarla 8-hidroksiguanin, ksantin ve hipoksantin gibi ürünlerin oluşmasına neden olur. DNA hasarı genellikle nükleer membranda ortaya çıkan serbest radikallere bağlıdır (Lawrence ve Benedich, 1987). Lökositlerin akciğerde aktivasyonu ve akümüasyonu karakterize akut enflamatuvar reaksiyonlarla yüksek konsantrasyonda reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin oluşmasına neden olur. Bu reaktif türlerin enflamasyonla bağıntılı birçok doku hasarı ve hastalıklardan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Sigara içmeyenlerle kıyaslandığında, sigara içenlerde periferal lökosit ve akciğer dokusunda oksidatif DNA hasarının arttığı gözlenmiştir (Yoshie ve Ohshima, 1997; Morrow ve ark., 1995; Reilly ve ark., 1996; Miller ve ark., 1997; Spencer ve ark., 1995; Asami ve ark., 1996, Kiyosawa ve ark., 1990). Ayrıca sigara dumanında bulunan Fe (Demir) ve Cu (Bakır) da hidroksil radikali oluşumuna yol açarlar (Kökoğlu, 1998;).

Sigara dumanında da her soluk için ortalama  $10^{17}$  oksidan molekül bulunmaktadır (Pryor ve Stone, 1993). Sigara dumanında oluşan

katran; kinon-semikinon-hidrokinon kompleksi taşımaktadır (Pryor ve ark. 1987, 1998), bu kompleks, moleküler oksijeni süperokside, hidrojen peroksidi de hidroksil radikaline çevirir (Pryor ve ark., 1993). Bu radikaller hücre membranındaki fosfolipidlerle lipid hidroperoksidlerini oluşturacak şekilde etkileşirler. Dolaşımda bulunan F<sub>2</sub>- isoprostanlar gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin sigara içenlerin plazmalarında miktarının artması, sigara içiminin in vivo olarak da lipid peroksidasyonda artış göstergesi olarak yorumlanmaktadır (Morrow ve ark., 1995).

Bu serbest radikallerin üretiminin artması iki şekilde gerçekleşebilir (Halliwell, 1991; Troll ve Weisner, 1985). Serbest radikallerin endojenik üretimi normal aerobik metabolizma sonucu gerçekleşir (Nita ve ark., 2001). Bunun sonucunda ise: sitokrom oksidasyonunun, peroksizomların etkisi, organik materyallerin ısı etkisiyle bozulmasının ve metal iyonlarının etkisi sonucunda da serbest radikaller oluşur veya üretimi artar (Hinder ve Stein, 1991; Basaga, 1989; Freeman ve Crapa, 1982; Lawrence ve Benedich, 1987). Çevresel kaynaklı etkenler; sigara dumanı, inflamasyon, tütün içimi, radyasyon, ilaçlar, hiperoksit, fotokimyasal, hava kirliliği, organik çözücüler, anestezikler, pestisitler, aromatik hidrokarbonlar, alkol ve çevre kirleticiler olarak özetlenebilir (Halliwell, 1991; Troll ve Weisner, 1985).

Ksenobiyotiklerin oksidatif stres sonucu ortaya çıkan serbest radikaller ve organizmanın savunma mekanizmasını oluşturan antioksidanlar sağlık ve hastalıkta biyogösterge olarak değerlendirilmektedir. Serbest radikaller; vücutta ayrıca yangı, bağışıklık sistemine ait hastalıklar, yaşlanma, nörolojik hastalıklar, ateroskleroz,

hipertansiyon, iskemik hasar, karsinogenezis, mutajenezis, infeksiyöz hastalıklar, karaciğer hastalıkları, akciğer hastalıkları, göz hastalıkları ve ürolojik hastalıklar gibi hastalıklara da neden olabilir (Kaneko ve ark., 1980; Zima ve ark., 1995).

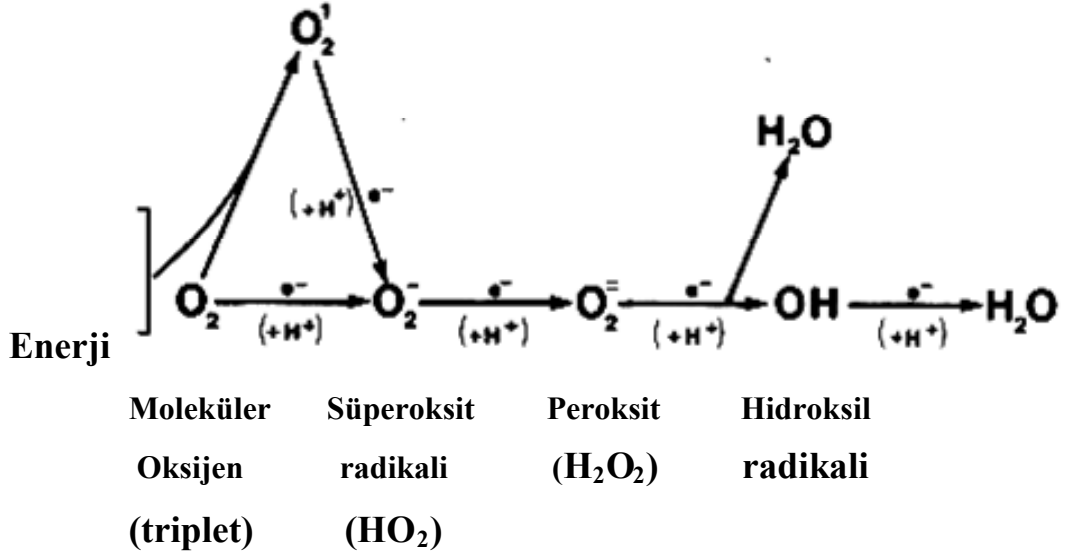
Biyolojik sistemlerde önemli serbest radikallerin çoğu oksijene dayanır. Bunlardan süperoksit radikali hem çevresel etkenler, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikalidir (Halliwell, 1989).

### **1.2.1. Oksijen Radikalleri**

Serbest oksijen radikalleri singlet oksijen radikali, süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali olup bu radikaller oksijenli solunum metabolizması esnasında oluşurlar. Bu radikallerin yarılanma ömürleri birkaç mili saniye ile saatler arasında değişmektedir (Yeh ve ark., 2005).

Moleküler oksijen, aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü sebebiyle hayati bir öneme sahiptir. Moleküler oksijenin toksik etkisi yoktur, fakat aerobik hücre metabolizmasında moleküler oksijen, serbest oksijen radikallerine dönüşür. Enzim reaksiyonları da ROS oluşumuna neden olmaktadır (Stahl ve ark., 2002). Ayrıca oksijen radikalleri doku hasarına neden oldukları için daha bir önem kazanmaktadırlar (Hinder ve Stein, 1991).

Biyokimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan oksijen türevli radikaller aşağıda gösterilmiştir :



*Şekil 1.2. Oksijen türevli radikaller (Peter ve ark., 1989).*

### 1.2.1.1. Singlet Oksijen

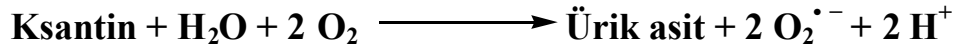
Moleküler oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış formudur. Biyolojik sistemlerde fotosentez reaksiyonları sırasında oluşmaktadır. Oksijenin bu şekilde uyarılan formunun reaktivitesi çok yüksektir. İçerdiği bu yüksek enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde vererek yeniden oksijene dönebilir veya kovalent tepkimelere girer. Singlet oksijenin yarılanma ömrü  $10^{-6}$  ile  $10^{-5}$  saniye arasındadır, bunun içinde çift bağlar ile tepkimeye girmeye eğilimlidir (Stahl ve ark., 2002).

Singlet oksijen molekülü yapısında iki adet çiftlenmemiş elektron taşır. Singlet oksijen hücre membranındaki çoklu doymamış yağ

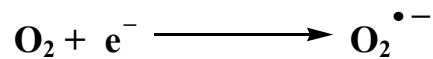
asitleriyle doğrudan reaksiyona girerek lipid peroksitlerin oluşumuna yol açar (Halliwell, 1991).

### 1.2.1.2. Süperoksit Radikali

Oksijen molekülü, orbitalinde çiftlenmemiş elektron taşıyorsa süperoksit radikali olarak adlandırılır (Halliwell, 1991). Selüler hasarlarda tek başına fazla etkili değildir (Valentine ve ark., 1984). Bütün aerobik hücrelerde  $O_2^{\bullet -}$  oluşturulur. Organizmanın normal metabolizması sonucu veya çevresel kaynaklı olarak meydana gelebilir (Hinder ve Stein, 1991). Normal metabolizma sonucu olarak moleküler oksijenin oksidatif fosforilasyon esnasında ksantin oksidaz veya NADPH-oksidadz gibi enzimlerin katalizörlüğünde bir elektron indirgenmesi sonucunda meydana gelmektedir (Stahl ve ark., 2002):



Ayrıca indirgeyici moleküler oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşturabilir (Halliwell, 1984). Çevresel etki sonucu olarak da alınan bir ksenobiyotiğin redoks döngüsü sırasında oksidasyona uğrayarak tek elektronunu kaybetmesi ve ayrıca moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu oluşur (Hinder ve Stein, 1991):



Süperoksit radikalinin yarılanma ömrü hücrelerin farklı yerlerinde bulunan süperoksit dismutaz enziminin varlığına bağlıdır (Stahl ve ark., 2002), fakat genel olarak milisaniye düzeyindedir. (Kappus ve Sies, 1981). Süperoksit radikali, yüksek katalitik etkiye sahip süperoksit dismutaz (SOD) enziminin etkisiyle dismutasyona girerek konsantrasyonu azalır. SOD tarafından katalizlenen bu reaksiyon dismutasyon tepkimesi olarak adlandırılır (Halliwell, 1984).



Süperoksit radikali kuvvetli bir redüktan, fakat zayıf bir oksidandır. Bunun için de tek başına hücrel hasar oluşturma potansiyeli düşüktür (Kappus ve Sies, 1981). Fakat kısa yarı ömrüne karşın hidrojen peroksitle reaksiyona girerek hidroksil radikalinin oluşmasına ve böylece oksidatif hasara neden olur (Thomas ve Aust, 1986).

### 1.2.1.3. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit membranlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik rollere sahip olabilir, fakat çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığından radikal olarak adlandırılmaz. (McCord, 1993).

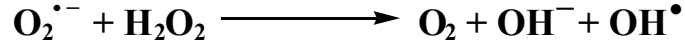
Hidrojen peroksit çok potent oksitleyici bir ajan olmasına karşın çok yavaş reaksiyona girmektedir. (Chance ve ark., 1979). Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz, reaktif bir tür değildir. Oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşurlar. Hidrojen peroksitin

oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığına bağlıdır. Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir.

Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan hidrojen peroksit derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirir (Halliwell, 1984). Hidrojen peroksidin doğrudan gösterdiği hasar protein tiyollerini okside etmesi ve DNA ipliklerine hasar vermesidir. Hidrojen peroksit çok yavaş reaksiyon verdiği için bu etkiler artacaktır. Gösterdiği daha önemli hasar ise Haber-Weiss reaksiyonunda bir substrat görevi görerek çok daha güçlü bir serbest radikal olan hidroksil radikalini oluşturmasıdır (Horton ve Fairhurst, 1987).

#### **1.2.1.4. Hidroksil Radikali**

Hidroksil radikali, en aktif ve en toksik oksijen radikali olup üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyon verebilmektedir. Hidroksil radikali, iyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda oluşabildiği gibi, hidrojen peroksidin metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilmektedir (Stahl ve ark., 2002). Demir ve bakır gibi metal iyonları tarafından katalizlenen bu indirgenme reaksiyonu Haber-Weiss tepkimesi olarak bilinmektedir.



Şekil 1.4. Haber-Weiss reaksiyonu ve mekanizması (Thomas, 1999).

Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan hidroksil radikali, su dahil ortamda rastladığı her molekül ile tepkimeye girer. Bütün bu tepkimeler, bu radikalin paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (Halliwell, 1984). Hidroksil radikali neredeyse hücrel moleküllerin tümüyle reaksiyona girebilir. Yağlar, sitokromlar (Halliwell ve Gutteridge, 1986), tiyoller, inaktif membran proteinleri, deoksiriboz ve DNA bazları ile de reaksiyon verdiği için genetik hasara da yol açabilir (Brent ve Rumack, 1993).

Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. Hücre zarı su içermediğinden hidroksil radikalının öncelikli hedefi yağ asididir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (Nishiyama ve ark., 1998).

### 1.3. Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyon (LPO) reaksiyonları, genel olarak serbest radikal kaynaklı zincir reaksiyonları olarak bilinir ve serbest radikal çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) (Cochrane CG, 1991) oksidasyonuna

neden olan ve böylece zar lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan bir olaydır (Thomas, 1999).

Hücre bileşenlerinin, lipid peroksidasyonu (LPO) olarak adlandırılan bu şekilde parçalanışı, hücrenin harabiyeti ile sonuçlanır (Basaga, 1989). Lipid peroksidasyonu kimyasal bir reaksiyon zinciri olup serbest radikallerin membrandaki doymamış yağ asitlerini uyarmasıyla iler başlar (Canoruç ve ark., 2000). Lipid peroksidasyonu bir zincir tepkimesi şeklinde başlayıp, serbest radikaller için kesintisiz bir kaynak oluşturmaktadır. Sürekli olarak kendi kendini devam ettiren bu zincir reaksiyonları hücre membranına hasarı tahrip edicidir (Murray ve ark., 1996).

PUFA'lar peroksidasyona kolaylıkla maruz kalabilen yapılardır. Lipid peroksidasyonu tepkimeleri serbest radikallerin çok doymamış yağ asiti zincirinin  $\alpha$ -metilen gruplarından bir hidrojen uzaklaştırması ile başlamaktadır. Uzaklaşan hidrojen atomu sebebiyle karbon atomu üzerinde ortaklanmamış bir adet elektron kalır ki bu da yağ asiti zincirinin radikal olmasına neden olur. Oluşan lipid radikali kararsız bir bileşiktir. Molekül stabil duruma gelebilmek için molekül içi bağlarını tekrar düzenler ve konjuge dien yapısına dönüşür. Reaksiyon moleküler oksijenin lipid radikali ile etkileşmesi ve lipid peroksi radikalinin oluşmasıyla devam eder. Lipid peroksi radikali, membran yapısında bulunan diğer çok doymamış yağ asidi zincirlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşmasına yol açarken, kendisi de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksite dönüşmüş olur. Böylece tek bir substrat radikal diğer yağ asitlerini tetikleyerek birden çok lipid hidroperoksit oluşmasına sebebiyet verir. Bu tetikleme olayının ne zaman sona ereceği ortamda bulunan oksijen ve antioksidan miktarına

bağlıdır. Hidroperoksitler oldukça stabil moleküller olup yapıları ancak yüksek sıcaklıkla veya demir, bakır gibi geçiş metallere maruz kalmakla bozulabilir (Sodergren, 2000).

Lipid peroksidasyonu membran akıcılığını azaltır, membranların biyofiziksel özelliklerini etkiler (Cheesman, 1993). Lipid peroksidasyonunun sonucunda oluşan hasar nedeni ile homeostaz bozularak, iyonlara özellikle kalsiyuma olan geçirgenlik artarken kalsiyum pompası aktivitesi bozulur (Jones ve ark., 1983).

Lipid peroksidasyon kanser, kalp hastalıkları ve yaşlanmanın başlıca nedeni olarak görülmekte olup, inflamasyon, ateroskleroz, alkolik karaciğer hastalıkları ve travma gibi birçok hastalığın patojenezinde önemli rol oynamaktadır (Horton ve Fairhurst, 1987).

Lipid peroksidasyon serbest radikaller tarafından indüklenen en önemli oksidasyon reaksiyonudur. Membran fosfolipidleri serbest radikallerle kolayca etkileşebilir. Yağ asitlerindeki lipidlerin peroksidasyonu, radikal zincir reaksiyonlarına sebep olur (De Zwart ve ark., 1999).

Lipid peroksidasyonla oluşan, bozularak çoğalma reaksiyonları sonucu karbonil bileşiklerini de içeren bir çok ürün oluşur (Benedetti ve ark., 1979). PUFA'ların peroksidasyonu sonucu oluşan kararsız yağ asidi hidroperoksitleri daha kararlı karbonillere dönüşür. Bunlar; n-alkenler, 2-alkenaller, 2,4 alkadienaller, alkatrienaller hidroksialkenaller, hidroperoksialkanallar, 4-hidroksialkenaller, 4-hidroksiperoksialkenaller, MDA, dikarboniller, ketonlar, alkanlar ve alkenlerdir. Yağ asitlerinin

peroksidasyonu sonucu oluşan ve biyolojik dokularda tesbit edilebilen en önemli karbonil bileşikleri; hekzanal, 4-hidroksi-2,3-transnonenal, propanol, 4-hidroksi-2,3-transhekzanaldır. Aldehitler ve metabolitleri stabil olduğundan lipid peroksidasyonu tanımlamada kullanışlı parametrelerdir (Esterbauer ve ark., 1982).

Serbest radikaller, yapıları, hücresel kaynakları, fiziksel ve kimyasal, özellikleri rol oynadıkları tepkimeler ve etkileri ile çeşitli klinik durumların patogeneğinde rol oynarlar. Hücre membranlarındaki doymamış yağ asitlerinden hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlayan lipid peroksidasyonu oksidan stresin en tipik göstergesidir (Dormandy, 1983; Gutteridge, 1995; Halliwell, 1993; Hruszkewycz, 1992; Reiter, 1995).

Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerin aldehit ve diğer karbonil bileşikler ile etan, pentan gibi uçucu gazlara dönüşmesi ile son bulur (Thomas, 1999). Oluşan son ürünlerden birisi de kan plazmasında kolaylıkla teşhis edilebilen ve oksidatif stres ölçümlerinde kullanılan MDA molekülüdür (Canoruç ve ark., 2001).

### **1.3.1. Malondialdehit (MDA)**

Lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA, kimyasal olarak aktif bir moleküldür, çevre hücre ve dokulara kolayca difüze olarak moleküler düzeyde, özellikle proteinler üzerinde zararlı etkiler gösterebilir (Parantainen ve ark., 1986). Malondialdehit, bir Schiff bazı oluşturmak için iki amin grubu ile reaksiyona girebilen bifonksiyonel bir aldehittir (Şekil 1.3.).



MDA



Schiff Bazı

*Şekil 1.3. Malondialdehitten Schiff bazı oluşumu (Horton ve Fairhurst, 1987).*

Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile MDA oluşur. MDA düzeyi lipid peroksidasyonunun yaygınlığı ile korelasyon gösterir (Cochrane CG, 1991).

Malondialdehit (MDA), TBA ile belirlenebilen bir lipid peroksidasyon ürünüdür. Billirubin gibi diğer başka maddeler de TBA ile reaksiyon verdiği için, lipid peroksidasyon düzeyi TBARs olarak ifade edilir (Knight ve ark. 1988). Bunun sonucunda iyon taşıma özellikleri ve enzim aktivitesi zarar görür. Kolaylıkla difüze olabildiğinden DNA'nın azotlu bazlarıyla reaksiyon vererek yapılarını bozar (Draper ve ark., 1986). Lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan lipid peroksitler kararsız yapılardır ve ikincil, üçüncül reaksiyonlara girmeye müsaittirler. Girdikleri dekompozisyon reaksiyonları sonucu zincir ayrılma ürünleri oluşur. Bu ürünler n-alkanaller, 2-alkanalle, 2,4-

alkadenaller, malondialdehit (MDA), alkoller, ketonlar, furanlar, laktonlar, alkanlar ve alkenlerdir (Kappus ve Sies, 1981).

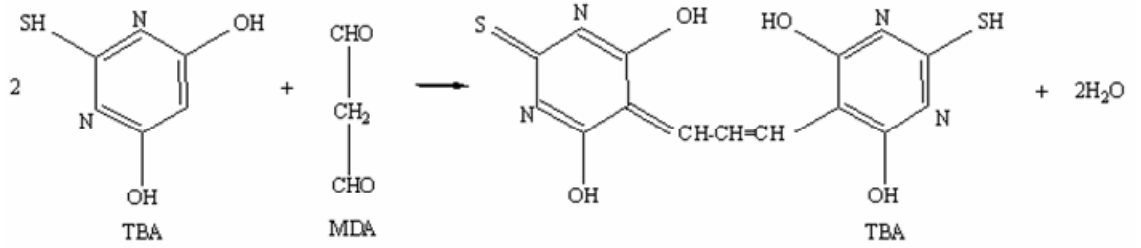
Malondialdehit, *in vivo* enzimatik LPO ürünü olarak ortaya çıktığı gibi prostaglandin metabolizmasında da siklooksijenaz reaksiyonunun ürünü olarak da meydana gelmektedir. Vitamin E yetersizliği, demir veya karbontetraklorüre maruziyet gibi LPO'yu indükleyen durumlarda ve dokuların PUFA açısından zengin olduğu ortamlarda total MDA atılımı artar (Halliwell ve Guetteridge, 1988).

En yüksek oranda bulunan ürünlerin 4-hidroksi-alkaneller olmasına karşı, üzerinde en fazla durulan LPO ürünü MDA'dır. Peroksidasyon sonucu oluşan MDA çapraz bağlanmaya ve membran komponentlerinin polimerizasyonuna neden olabilir. Bunun sonucunda iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özellikleri değişmektedir. Malondialdehit, aminoasitler ve proteinlerle de reaksiyona girebildiği gibi, diffüze olabildiği için DNA'nın nitrojenli bazlarıyla da reaksiyon verebilir (Draper ve ark., 1986).

Lipid peroksidasyonunu ölçmek için geliştirilen teknikler biri Tiyobarbitürik asit (TBA) testidir (Esterbauer ve ark., 1989; Halliwell ve Gutteridge, 1985). Bu metod lipid peroksid seviyelerinin ölçülmesinde kullanılan en yaygın ve en kolay spektrofotometrik yöntemdir. MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Lipid peroksidasyonu, biyolojik zarların özelliklerinde ciddi hücre hasarlarına yol açan değişiklikler yaparak hastalık patogenezinde önemli bir rol

oyunlar (Aleynik ve ark., 1997; Bruce ve Crapo, 1982). Serbest radikaller çok kısa ömürlü oldukları için LPO analizlerinde kullanılması uygun değildir (Halliwell ve Gutteridge, 1985).

Malondialdehit iki molekül TBA ile reaksiyona girerek 532 nm’de pembe renkli bir kompleks oluşturur.

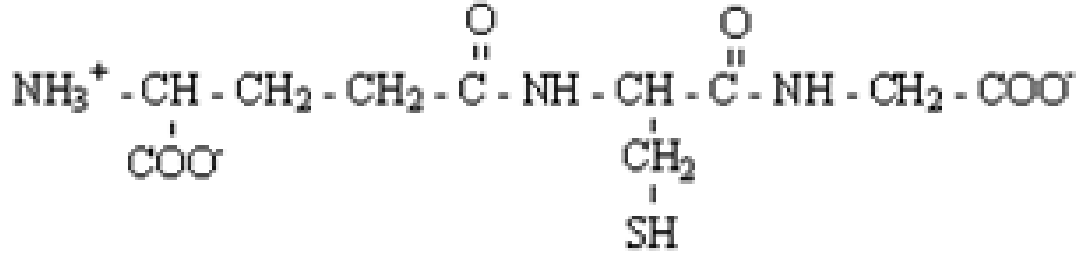


**Şekil 1.4.** Tiyobarbitürik asitin MDA ile reaksiyonu.

Tiyobarbitürik asit testinde ölçülen MDA miktarının tümünün LPO esnasında oluştuğu düşünülmekteydi. Ancak deney esnasında(özellikle ısıtma ve ortamı asidik yapma) gerçekleşen reaksiyonlar sonucunda bir miktar MDA açığa da çıkabilir. Bu yüzden yöntemin TBA-RS olarak adlandırılması daha uygundur (Slater, 1984).

### 1.3.2. Glutasyon (GSH)

GSH, vücudun birçok hücresinde bulunan ve hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidan ajanlara karşı koruyan bir tripeptitdir:



*Şekil 1.5. Glutatyonun yapısı(Champe ve ark., 1997).*

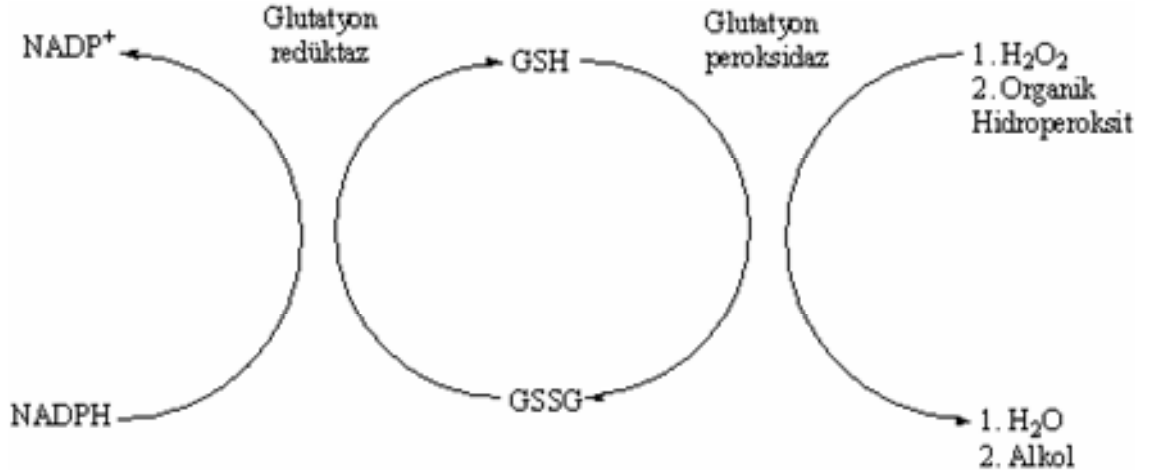
GSH, hayvan hücrelerinin hemen hemen hepsinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur (0,1 – 10 mM). Glutatyon disülfid (GSSG), GSH'deki sisteinin tiyol grubunun oksidasyonu ile oluşmaktadır. Hücrede bulunan GSH' ın üçte bire yakın miktarı disülfid şeklinde ve tiyol grubu içeren sistein, koenzim A gibi bileşikler ile beraber bulunur (Zhao, 2001).

GSH, DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır (Chavan ve ark., 2005).

GSH iki peptit bağı, iki karboksilik asit grubu, bir amino grubu ve bir tiyol grubundan oluşmuş bir moleküldür. GSH molekülünde çok sayıdaki hidrofilik fonksiyonel grubun düşük molekül ağırlıklı atomlarla birleşmesi bu molekülün su, etanol ve amonyak gibi polar çözücüler içinde kolaylıkla çözünmesine neden olmaktadır. GSH' deki en aktif grup tiyol grubudur. GSH'daki tiyol grubunun oksitlenmesi ile oluşan GSSG, antioksidan özelliğini kaybeder. Tiyol grubunun asitliği GSH' ı kendi anyonu ile sulu çözeltilerde kuvvetlice reaksiyon vermesine sebep olur. Reaksiyonun oluşma sıklığı ortam PH'sına bağlı olarak değişmektedir (Zhao, 2001).

GSH sentezi, L-glutamat ve L-sisteinin gama-glutamilsistein sentetaz enzimi ile katalizlenmesi başlar ve GSH sentetaz enziminin katalizörlüğünde GSH' ye dönüştürülür. GSH, doğrudan elektrofillere bağlanarak veya dolaylı olarak GSH biyosentezi ve rejenerasyonunun inhibitörlerine eklenerek tüketilir. GSH in vivo olarak karaciğerde g-glutamilsistein ve glisinlerden, GSH sentetaz enzimi ile üretilir (Reed ve Fariss, 1984).

GSH iki önemli enzime sahiptir: glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve Glutatyon-S-transferaz. GSH-Px selenyuma bağlı ve bağımsız iki formda bulunabilir ve hidroperoksitlerin reaktif olmayan bileşiklere dönüşmesini sağlar (Brent ve Rumack, 1993). Memeli hücreleri, toksik kimyasallar ve selüler metabolizmanın yarattığı normal oksidatif ürünlerinden, en önemli endojen sistem olan glutatyon redoks döngüsü ile korunur (Reed, 1986). Glutatyon yüksek konsantrasyonda (genelde milimolar düzeyinde) GSH, düşük konsantrasyonda GSSG (GSH'ın disülfidleri ve diğer tiyol grupları içeren) ve az miktarda tiyoeter içerir. GSH nükleofilik özellik göstererek bir çok bileşiğin elektrofilik merkezi ile tiyoeter bağları oluşturur (Moldeus ve Quanguan, 1987). GSH peroksidaz ise hidroperoksitleri süpürür. Total glutatyondaki GSH tüketimi %20-30 seviyesine ulaşırsa hücrenin savunma mekanizması darbe alır ve hücre hasara uğrar (Reed ve Fariss, 1984).



**Şekil 1.6.** Glutasyon peroksidaz tarafından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve lipid hidroperoksitlerin yıkımı (Mc Coy ve ark., 1988).

İkinci enzim ise glutasyon-s-transferazdır. Glutasyon-S-transferaz, asetaminofen veya halojenli aromatik hidrokarbonların mikrozomal metabolizması sonucu oluşan elektrofilik ürünlerin GSH ile reaksiyonunu katalizler. Oluşan konjugatlar merkapturat olarak atılırlar. Elektrofilik ajanlar nükleofilik tiyollerle ve proteinlerle reaksiyon verme eğiliminde olduğundan indirgenmiş GSH ile kolayca reaksiyon verebilirler (Corcoran ve ark., 1985). Sigara içimi ile birlikte, kimyasal maddelere maruziyet ve hastalıklarda glutasyon ve glutasyon enzimleri ile sayısız çalışma bulunmaktadır, ancak son yıllarda antioksidan enzimlerin genetik polimorfizmi yönünden araştırmalar yoğunlaşmıştır.

#### 1.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikaller potansiyel olarak toksik oldukları için organizmalar bunları etkisiz hale getirmek amacıyla savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Bunlar kısaca “antioksidanlar” şeklinde adlandırılır

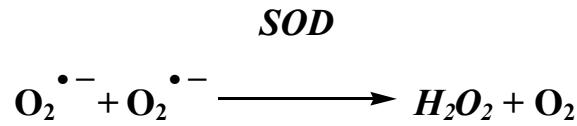
(Lohr, 1991). Hücreler serbest radikal oluşumunu önlemek ve serbest radikallerin verdiği hasarı sınırlamak için “antioksidan savunma sistemi” adı verilen bu mekanizmaların enzimleri peroksitleri inaktive eder, geçiş metalleri tutan proteinler sentezler ve serbest radikalleri süpürürler (De Zwart ve ark., 1999). Antioksidan molekülleri endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerinin neden olduğu hasarı hem hücre içi hemde hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirilirler. Hücre dışı savunma, albümin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır (Halliwell, 1995).

Belirli bir düzeye kadar olabilen oksidan molekül artışı yine vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Böylece sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge içindedir. Oksidanlar belirli düzeyin üzerinde oluşur veya antioksidanlar yetersiz olursa, yani denge bozulursa söz konusu oksidan moleküller organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbohidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar (Halliwell, 1991). Dolayısıyla işleyişin radikaller lehine bozulduğu durumlarda patolojik olaylar ortaya çıkar (Lohr, 1991).

Serbest radikaller çeşitli kimyasal olayların sonucu olarak vücutta sürekli olarak ortaya çıkmaktadırlar. Serbest radikallerin yol açtığı hücre hasarının derecesi, hücre içindeki koruyucu sistemlerin etkinlik derecelerine bağlıdır (Gianetti, 2002). Bunun için vücutta serbest radikalleri önleyici, süpürücü özelliklere sahip olan endojen sistemler

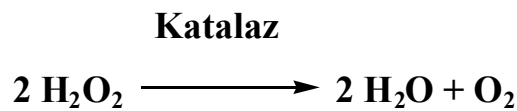
geliştirmişlerdir. Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki hassas dengenin oksidanlar tarafına kayması sonucu “oksidatif hasar” oluşur (Brent ve Rumack, 1993). Serbest radikallere karşı doğal antioksidan savunma sistemleri arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksit ve melatonin vardır. SOD'un yapısında bakır, çinko ve manganez; GPx'de ise selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler metaloenzim olarak da adlandırılırlar (Halliwell, 1991).

Süperoksit dismutaz (SOD),  $O_2^{\bullet-}$  detoksifikasyonunda önemli rol oynayan bir metaloenzimdir.



Enzim, süperoksidi uzaklaştırıcı etkiye sahipken; çok güçlü bir oksidan olan peroksit oluşumuna katkıda bulunacaktır (Brent ve Rumack, 1993). Süperoksit dismutaz aktivitesi, karaciğer gibi oksijen kullanımının fazla olduğu organlarda yüksektir (Jones, 1986). Katalaz ve glutatyon peroksidaz da  $H_2O_2$ 'e detoksifiye ederek, SOD'u  $H_2O_2$ 'nin inaktive edici etkisinden kurtarmaktadır (Siest, 1990; Zhou, 2000).

Katalaz, GSH-Px gibi hidrojen peroksiti reaktif olmayan ürün çevirir (Basaga, 1989).



Enzim  $H_2O_2$ 'e karşı spesifiktir ve özellikle hücre içi tüm peroksizomlarda bulunur. Glutatyon proksidazla karşılaştırıldığında daha yüksek konsantrasyonlarda  $H_2O_2$ ' süpürebilir. Katalaz sirkülasyona giren bir enzim değildir. Plazmadaki yarı ömrü dakikadan azdır (Bast ve ark., 1991; Brent ve Rumack, 1993). Bu enzimler serbest radikallerin oluşmasını ve lipid peroksidasyonunun başlamasını önleyen enzimlerdir (Gianetti, 2002).

Tek ve çok moleküllü organizmalar serbest radikallere karşı  $\alpha$ - tokoferol ve askorbatla da korumayı sağlamaktadır.  $\alpha$ -tokoferol lipidte çözülebilir olduğu için kolayca kan-beyin baryerini geçerek hücre membranlarına girerler. Bunun sonucunda antioksidanlar radikal zincir reaksiyonlarını önlerler. Askorbatın kan-beyin baryerinden geçişi çok yavaş gerçekleşir. Askorbatın süperoksit radikali ve hidrojen peroksit ile etkileşimi sonucu dehidroaskorbat oluşur (Nita ve ark., 2001). Bunların yanı sıra E vitamini (alfa tokoferol), C vitamini, beta-karoten, şavanooidler, koenzim Q ve A vitamini de antioksidan faktörlerdir. Demir taşıyıcı protein olan transferrin, laktoferrin ve seruloplazmin vücut sıvılarında demir ve bakırı bağlayarak oksidatif hasarı önlerler (Cross, 1987).

Sigara içiminin antioksidan savunmasına etkisi tartışmalıdır. Ancak peroksinitritin plazma bileşenleri ile etkileşiminin plazma antioksidanlarını azalttığı gösterilmiştir (Van der Vliet ve ark., 1994, Haddad ve ark., 1993, Mezzetti ve ark., 1995). Oksidatif ortamlarda yaşayan tüm aerobik organizmalar, doğal olarak oksijen radikallerinin etkisi altında kalmaktadır. Oluşan ROS'lar proteinlere, lipidlere, karbohidratlara ve DNA'ya hasar verebilme yeteneğindedir (Hinder ve

Stein, 1991). Endojen sistemler bazı ksenobiyotiklerin indüklediği hasarı da önlemekte önemli rol oynarlar. Teorik olarak organizmada endojen olarak bulunan savunma sistemleri ekzojen radikal süpürücüler ile desteklenirse oksidatif hasara karşı koruma daha güçlü olur.

Antioksidanlar, hücreleri oluşabilecek oksidatif hasara karşı değişik şekillerde koruma özelliklerine sahiptirler. Bunlar (Gutteridge, 1995);

- a) radikal oluşumunu engelleyerek,
- c) radikallerin oluşturdukları hasarı azaltarak veya engelleyerek
- d) hasara uğrayan moleküllerin eliminasyonunu arttırarak,
- e) hasarlı molekülleri onarıp mutasyonları en aza indirgeyerek olabilir.

Her ne kadar antioksidanlar LPO'nun inhibitörleri ya da zincir kırıcılar olarak adlandırılmalarda aslında daha ayrıntılı savunma ile hücreleri korudukları bir gerçektir. Antioksidanlar, oksijenli ortamdan uzaklaştırarak veya konsantrasyonunu düşürerek; süperoksit radikali ve peroksit gibi ana oksijen türevlerini ortadan kaldırarak; singlet oksijeni süpürerek; hidroksil, alkoksil ve peroksil gibi serbest radikalleri temizleyerek ve başlatılmış LPO zincirini kırarak etki gösterirler (Gutteridge, 1995).

### **1.5. Protein karbonil**

Reaktif oksijen türevlerinin oluşumunda artış veya antioksidan tutucu kapasitesinde azalma proteinler dahil hücresel moleküllerdeki oksidatif modifikasyonların artışına yol açmaktadır (Usmar ve ark., 1996). Serbest

radikallerin DNA, proteinler ve lipitlerde hasara yol açtığı bildirilmiştir. Diğer taraftan oksidatif strese bağlı olarak oluşan in vivo DNA ve protein hasarının, lipitlerdeki hasardan daha önemli olduğu öne sürülmektedir (Dean ve ark., 1997; Evans ve ark., 1999). Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arginin ve lizin gibi çok sayıda amino asit bakiyesinden ve/veya peptid omurgasında meydana gelen oksidatif hasar sonucunda protein karbonil ürünleri meydana gelir (Reznick ve Packer, 1994). Protein karbonillerinin oluşumuna sebep olan primer modifikasyonlar;  $Cu^+$  ve  $Fe^{++}$  varlığında metal-katalizli oksidasyon, radyasyon-aracılı oksidasyon, ozon ile oksidasyon ve azot oksitlerle oksidasyondur (Levine ve ark., 1994). Metal İyon katalizli protein oksidasyonu reaksiyonlarında; protein yapısındaki histidin, sistein, lizin ve metiyonin bakiyeleri geçiş metallerrinin iyonlarını bağlayarak oksidasyon reaksiyonlarını hızlandırır (Blakeman ve ark., 1995). Proteinlerin diğer moleküllerle modifikasyonu sekonder modifikasyonları oluşturur. Karbonil ürünlerinin oluşumuna yol açan protein oksidasyonu reaksiyonları; oksijenvarlığında alifatik yan zincir ve peptid omurgası radikallerinin oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları (Stadtman ve Berlett, 1998), glikasyon ve gliksidasyon reaksiyonları, çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyon ürünleri ile meydana gelen sekonder modifikasyon reaksiyonları olarak sıralanabilir (Berlett ve Stadtman, 1997). Protein karbonillerin oluşumunun, oksidatif protein hasarının erken bir marker'ı olduğu bildirilmektedir. Vitamin E ve alipoik asit gibi antioksidanlar ile metal kelatlayıcı özelliği olan desferrioksamin ve L-propionil karnitinin protein karbonillerinin birikimini önlediği ortaya konulmuştur. Protein karbonil düzeylerinin saptaması oksidatif protein hasarını belirlemede duyarlı bir yöntemdir. Protein karbonil düzeyleri HPLC,

spektrofotometrik, Western blot yöntemleri ile saptanabilmektedir. Bu yöntemler 2,4-dinitrofenilhidrazinin karbonil grupları ile oluşturduğu kromoforik dinitrofenilhidrazonların düzeyinin saptanması esasına dayanır (Goto ve ark., 1999; Levine ve ark., 1994; Reznich ve Packer, 1994). Reaktif oksijen türevleri çok sayıda fizyolojik olan v olmayan reaksiyondan kaynaklanabilir. Okside protein düzeylerinin artmasına neden olan faktörler: sigara ve alkol kullanımı, hiperoksi, ozon, nötrofil aktivasyonu, karma fonksiyonlu oksidaz sistemi, elektron transfer zinciri, X-ışınları, hipomagnezemi olarak sıralanabilir (Dean ve ark., 1997).

Oksidatif protin hasarı sonucunda protein yapısında meydana gelen değişiklikler; agregasyon ile fragmentasyonda artış, sekonder ve tersiyer yapının değişikliğe uğraması olarak sıralanabilir. Bu değişiklikler sonucunda proteolize yatkınlık ve normal fonksiyonda azalma meydana gelir. Okside proteinlerin hücre içindeki düzeyi protein oksidasyon hızı ile okside proteinlerin degradasyon hızı arasındaki engeye bağlıdır. Oksidatif olarak modifikasyona uğramış proteinlerin büyük bir kısmı onarıma uğramadan proteolitik degradasyon ile uzaklaştırılır. Diğer taraftan ileri derecede oksidatif modifikasyona uğramış proteinler proteolize direnç gösterirler. Proteinlerde in vivo olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler, proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücresel fonksiyonları etkiler. Reseptörlerin, sinyal transdüksiyon mekanizmalarının, yapısal proteinlerin, transport sistemlerinin ve enzimlerin rol oynadığı hücresel olaylar oksidatif protein hasarından etkilenir.

Reaktif oksijen türevleri proteinlerdeki amino asit yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna ve protein

omurgasının oksidasyonuna yol açmak suretiyle protein fragmentasyonunda etkili olur. Radikallere bağlı oksidatif protein hasarı, eğeşmemiş elektronlar, metal iyonlarına bağlı reaksiyonların yanısıra lipid ve şekerlerin otoksidasyonu ile başlamaktadır. Bu olayları takip eden protein oksidasyonu özellikle süperoksit radikalinin biyolojik sistemlerde daha reaktif olan peroksil ( $ROO^{\bullet}$ ), alkoksil ( $RO^{\bullet}$ ) ve hidroksil( $OH^{\bullet}$ ) gibi türevlere dönüşümüne bağlıdır. Reaktif oksijen türevleri içinde protein oksidasyonunu başlatmada en etkili olanı  $OH^{\bullet}$  radikalidir. Geçiş metal iyonlarından özellikle  $Cu^{+}$  ve  $Fe^{++}$  Fenton reaksiyonu ile  $H_2O_2$ 'den  $OH^{\bullet}$  radikal oluşumunu katalizler. Ferritin, transferrin, laktoferrin ve albumin serbest haldeki geçiş metal iyonlarının konsatrasyonunu kontrol ederek Fenton reaksiyonuna dolaylı olarak etki ederler. Protein oksidasyonuna bağlı olarak 20 amino asitten çok sayıda reaktif türevler ve stabil ürünler oluşur. Bu reaktif türevler ve stabil ürünlerden yapısı aydınlatılanların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Oksidatif protein hasarını saptamada güncel olarak kullanılan başlıca marker'lar protein karbonil, protein tiol, nitrotirozin, ditirozin ve 2-oksohistidin olarak sayılabilir (Dean ve ark., 1997).

## **1.6. Serbest Radikal Hasarı Biyogöstergeleri**

Ksenobiyotiklerin zararlı etkilerinin açıklanmasında serbest radikallerin oluşturduğu ürünlerin ölçülmesi amacıyla birçok biyogösterge üzerinde çalışılmaktadır. Bu biyogöstergeler temel olarak serbest radikallerle, protein, lipid veya DNA'nın reaksiyon vererek oluşturduğu yeni kimyasal bileşiklerdir. Biyogöstergeler, ksenobiyotik ve diğer toksik maddelere maruziyetin veya etkilerin biyolojik

sistemlerde gözlemlenmesini sağlarlar Biyogöstergeler maruziyet ve etki biyogöstergeleri olmak üzere iki gruba ayrılır. (Greim ve ark., 1985). Serbest radikallerin hücrel membranlarla reaksiyonları sonucu lipid hidroperoksitler oluşur ve bunlar da birçok farklı ürün oluşturacak şekilde bozunur. Solunum havasında bulunan kısa zincirli alkanlar bu bozunma ürünlerinden biridir. İnsanlarda ve hayvanlarda in vivo olarak lipid peroksidasyonu gösteren en önemli alkanlar etan ve pentandır. Bunların dışında aldehitler, n-alkeniller ve 4-hidroksialkeniller de lipid peroksidasyon bozunma ürünleridir (Benedetti ve ark., 1979). Primer ve sekonder radikal hasar ürünlerinin biyogösterge olmalarının yanısıra serbest radikal hasarına karşı olan savunma mekanizmaları da serbest radikal hasarı belirlemede rol oynar. Antioksidan savunma sistemleri enzimatik ve non-enzimatik olmak üzere ikiye ayrılır. Süperoksitdismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz enzimatik; glutatyon, vitamin E ve ürat non-enzimatik antioksidan sistemine girer (De Zwart ve ark., 1999) .

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereçler

#### 2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 1,1,3,3-tetra etoksi propan (TEP)	SIGMA
- Tiyobarbitürük asit (TBA)	SIGMA
- Sodyum dodesil sulfat (SDS)	MERCK
- Trikloro asetik asit (TCA)	SIGMA
- Sodyum hidroksit (NaOH)	MERCK
- 5,5-ditiyobis-2-nitro benzoik asit (DTNB)	SIGMA
- Tris (hidroksimetil)-aminometanhidroklorit (TRIS)	MERCK
- Etilendinitrilotetraacetik acid disodyum tuzu (Na <sub>2</sub> EDTA)	MERCK
- Hidroklorik asit (HCl)	MERCK
- Bütil hidroksi toluen (BHT)	MERCK
- Metanol	MERCK
- Etanol	DELTA
- Etil asetat	MERCK
- 2,4- dinitrofenilhidrazin (DNPH)	SIGMA
- Guanidin/Hidroklorid	SIGMA

#### 2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

- Spektrofotometre	SCHIMADZU UV-1208
- Elektrikli hassas terazi	SCHIMADZU LIBROR

- Santifuj aleti	HERAEUSSEPATECH LABOFUGE 200
- Manyetik karıştırıcı ve ısıtıcı	MIRAK THERMOLYNE
- Vorteks karıştırıcı	NÜVE, NM 110
- pH metre	CORNING 320
- Otomatik pipet uçları	GILSON VE RAININ
- Soğutmalı santifuj aleti	HETTICH ZENTRIFUGEN

### 2.1.3. Deney Protokolü

Sigara içen ( n=36 ) ve içmeyen ( n=17 ) sağlıklı gönüllülerden alınan kanda;

- a) lipid peroksidasyon son ürünü olan malondialdehit,
- b) organizmanın en önemli antioksidan savunma sistemlerinden biri olan glutasyon (total sülfidril düzeyleri),
- c) protein karbonil miktar tayini,
- d) karaciğer fonksiyon testleri (AST, ALT ve GGT)
- e) böbrek fonksiyon testleri (üre, ürik asit ve serum kreatinin düzeyi),
- f) lipid profilleri (kolesterol, HDL-kolesterol, LDL- kolesterol, VLDL-kolesterol ve trigliseritler) yapılacaktır.

Sigara içenler kendi aralarında tekrar gruplandırılmışlardır:

**GRUP A-** Kontrol grubu: Sağlıklı sigara içmeyen gönüllüler, n=17

**GRUP B-** Sigara indeksi 1-400 arasında olanlar, n=21

**GRUP C-** Sigara indeksi 400-800 arasında olanlar, n=11

**GRUP D-** Sigara indeksi 800'den fazla olanlar, n=4

Sigara indeksi:  $SI = \text{toplam günde tüketilen tane sigara} \times \text{ortalama kronik sigara tüketimi (yıl cinsinden)}$

Toplanan kanlar santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Plazma örnekleri gerekli analizler yapılıncaya kadar PVC tüplerde  $-20^{\circ}C$ 'de saklandı.

## **2.2. Yöntemler**

### **2.2.1. Plazmada Lipid Peroksidasyon Ürünlerinin (LPO) Tayini**

Plazmada LPO tayini için Buege ve Aust'un (1978) yöntemi çalışıldı. Yöntem; plazmada peroksidize lipidlerin yıkımı sonucu oluşan TBA ile reaksiyon verebilen maddelerin, TBA-Rs çözeltisi ile reaksiyona girerek verdiği renkli üründe miktar tayini prensibine dayanmaktadır.

Bu amaçla;

- 0.5 ml plazma üzerine; 2 ml TBA-Rs çözeltisi ilave edilir. (TBA-Rs çözeltisi: %15 TCA+ %0.375 TBA+ 0.25 N HCl çözeltileri eşit oranda karıştırılır.)
- Üzerine 20 µl %0.02 BHT eklenir.
- Örnekler 15 dakika  $100^{\circ}C$ 'lik kaynar su banyosunda bekletilir, soğutulur ve çökelti varsa yeniden santrifüj edilir.
- 4,500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek; süpernatant alınır.
- Absorbanslar 532 nm'de köre karşı okunur.

- K r, 0.1 ml plazma yerine eŖit hacimde distile su üzerine 1 ml TBA-Rs ve 20  l BHT konularak hazırlanır.
- Sonuçlar, nmol MDA/ml cinsinden ifade edilir.
- Standard madde olarak TEP (1,1,3,3-tetraetoksi propan) kullanılır.

### **2.2.2. Plazmada Total Sülfidril Gruplarının Tayini**

Plazmada TSH tayini için Sedlak ve Lindsay'in (1968) metodu kullanıldı. Yöntem ELLMAN reaktifinin (DTNB) sülfidril grupları ile redükte olarak 2-nitro-5-merkaptobenzoik asit oluŖturma prensibine dayanır. Nitro merkaptobenzoik asit anyonu açık sarı renktedir ve plazmadaki sülfidril gruplarının spektrofotometrik olarak  l lmesine dayanır. Standart olarak redükte (indirgenmiŖ) glutasyon kullanılır.

Bu amaçla;

- EDTA'lı tüplerdeki kan örnekleri 3500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek plazma ve serum kısmı birbirinden ayrılır.
- Santrifüj tüplerine 0,5 ml plazma konulur.
-  zerine 1,5 ml 0,2 M Tris tamponu (Ph:8,2) ilave edilir.
- 0,1 ml 0,01 M DTNB eklenir.
- Tüpler vortekslenerek iyice karıŖması sağlanır.
-  zerine 7,9 ml metanol ilave edilir.
- KarıŖım 15 dakika bekletilerek renk oluŖması sağlanır. Bu karıŖım oda sıcaklığında 10 dakika 4500 rpm'de santrifüj edilir.

- 412 nm'de köre karşı okunur.
- Köre plazma yerine disodyum EDTA, DTNB yerine distile su ilave edilir.

### **2.2.3. Plazmada Protein Karbonil Tayini**

Plazmada protein karbonil tayini için Levine ve Reznick'in (1994) yöntemi çalışıldı. 2,4-dihidrofenilhidrazin (DNPH)'in protein karbonillerle reaksiyona girerek protein hidrazon oluşturması prensibine dayanan kliniğe en uygun metodlar spektrofotometrik yöntemlerdir.

Bu amaçla;

- EDTA'lı tüplerdeki kan örnekleri 3500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek plazma ve serum kısmı birbirinden ayrılır.
- Kör ve numune için 2 adet santrifüj tüpü alınır.
- Her birine 100µl plazma eklenir.
- Proteinlerin çökmesi için üzerine 1 ml, %10' luk soğuk TCA eklenir.
- Tüpler vortekslenir.
- Numune tüpüne 1ml 2N HCL içinde hazırlanmış 10 mM DNPH eklenir. Kör tüpüne ise 1ml 2N HCL eklenir.
- Tüpler 1 saat, oda sıcaklığında 10 -15 dk'da bir karıştırılmak üzere karanlık odada inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyondan sonra kör ve numune tüplerine 1ml %50'lik TCA eklenir ve 5 dk beklenip 4000 rpm de 5 dk santrifüj edilir.

- Santrifüjden sonra süpernatant kısmı atılır, kör ve numune tüplerindeki pelletler 3 defa (1:1) (v/v) etanol/etil asetat karışımı ile yıkanır.
- Son olarak 37°C'ye ısıtılmış ve 2N HCL içinde hazırlanmış 1 ml 6 M guanidin/ hidroklorid eklenerek 15 dakika 50-60°C' de tüpler bekletilir.
- Tüpler 4000 rpm' de 5 dk santrifüj edilir.
- Absorbanslar spektrofotometrede 360 nm'de hazırlanan köre karşı okunur.
- Örneklerdeki DNPH konsantrasyonları aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$(A = \epsilon \times b \times c, \epsilon = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$$

### **2.3. İstatistiksel Analiz**

Tüm değerler ortalama  $\pm$  standard hata (standard error mean, SEM) olarak verilmiştir. Grupların birbirinden farklılığı istatistiksel açıdan Oneway ANOVA ve gruplarda  $n < 30$  olduğu durumlarda Mann Whitney U testi kullanılarak incelendi. Tüm hesaplamalarda ve istatistiksel analizlerde SPSS 11.5 versiyonu kullanıldı.

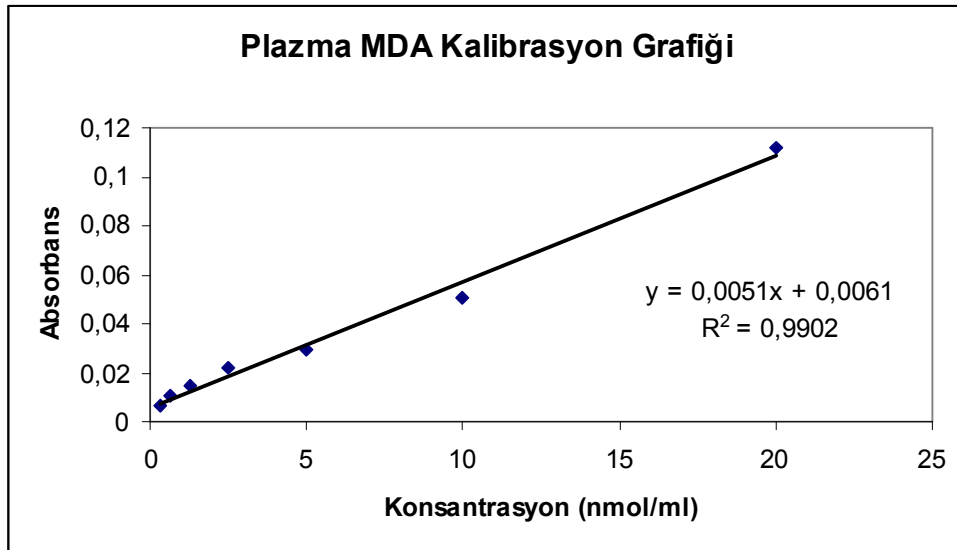
### 3. BULGULAR

#### 5.1. Kalibrasyonlar

Absorbans değerleri ordinata (y eksenini), konsantrasyon değerleri apsiste (x eksenini) olmak üzere çizilen kalibrasyon eğrileri ve regresyon denklemleri Şekil 3.1. ve 3.2.'de gösterilmiştir.

##### 5.1.1. Plazma MDA

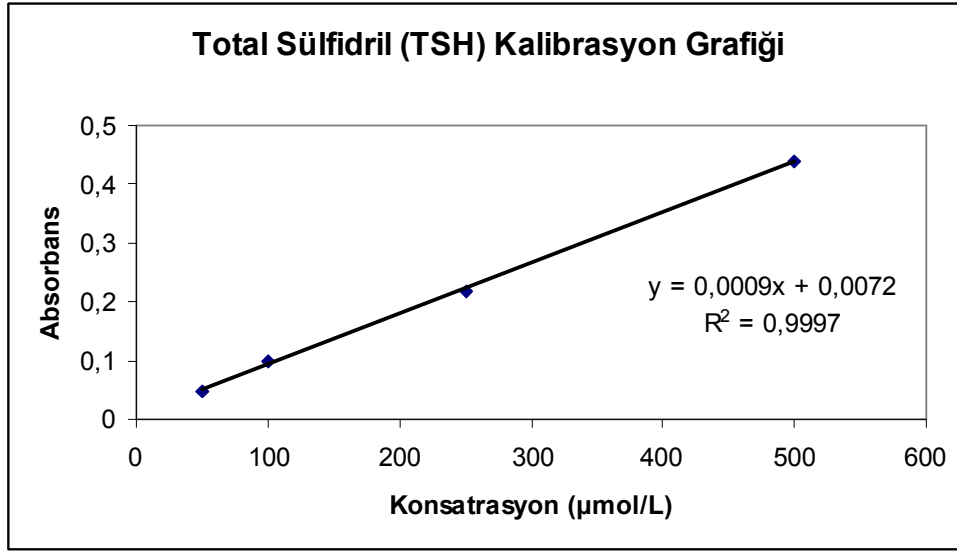
Kalibrasyon eğrisini çizmek için standart madde olarak kullanılan TEP (tetraetoksi propan)'in suda 20, 10, 5, 2.5 , 1.25, 0.625 ve 0.312 nmol/ml'lik çözeltileri hazırlandı. Kalibrasyon eğrisi konsantrasyona karşı absorbans değerleri yerine konularak çizildi.



*Şekil 3.1. Buege ve Aust (1978)'un spektrofotometrik yöntemi ile plazmada MDA tayini için hazırlanan kalibrasyon eğrisi ve regresyon denklemleri.*

### 5.1.2. Plazma Total Sülfidril Düzeyleri

Kalibrasyon eğrisini çizmek için TSH'ın 20, 10, 5, 2.5,  $1.25 \times 10^{-4}$  M'lik çözeltileri hazırlandı. Dilüsyonlar 0.02 M  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ile yapıldı. Kalibrasyon eğrisi konsantrasyona karşı absorbans değerleri yerine konularak çizildi.



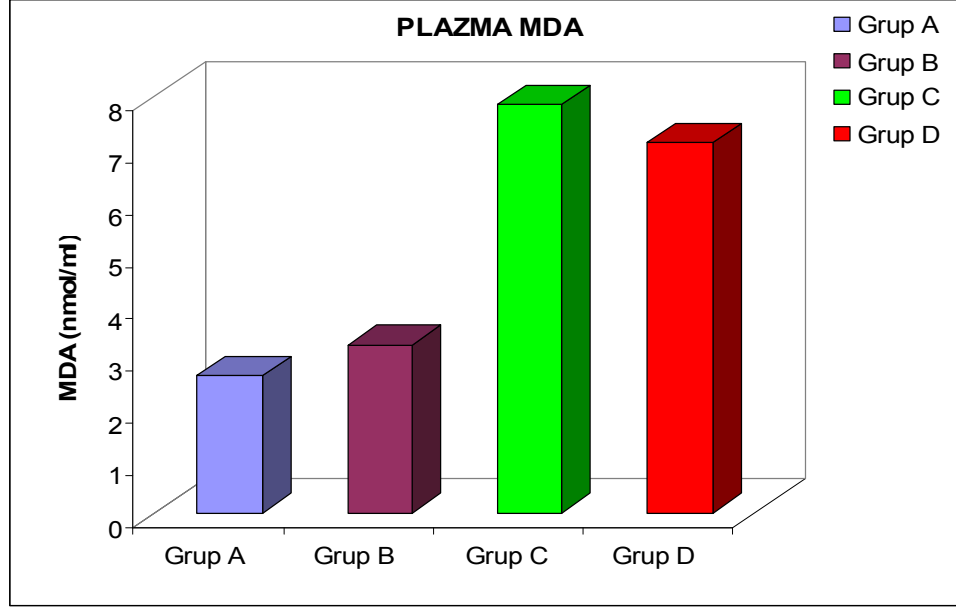
*Şekil 3.2. Sedlak ve Lindsay (1968)' in spektrofotometrik yöntemi ile plazmada total sülfidril tayini için hazırlanan kalibrasyon eğrisi ve regresyon denklemi.*

## 5.2. MDA, TSH ve PCO Düzeyleri

### 3.2.1. Plazma MDA Düzeyleri

Kronik sigara kullanımı sonucu, sigara tüketen gruplarda kontrol grubuna göre plazma MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış ( $p=0,025$ ) görüldü.

Kontrol grupları ve sigara içen gönüllülerde MDA düzeyleri Şekil 3.3’de gösterilmiştir.

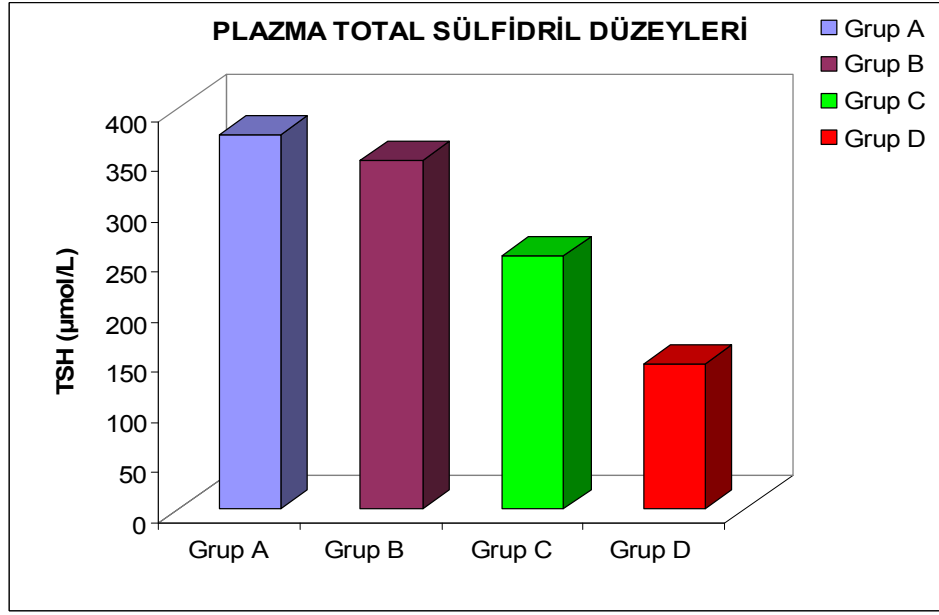


*Şekil 3.3. Kontrol grubu ve sigara içen gönüllülerde sigara tüketim miktarına göre plazma MDA düzeyleri.*

### 3.2.2. Plazma TSH Düzeyleri

Kronik sigara kullanımı sonucu, sigara tüketen hastalarda kontrol gruplarına göre plazma TSH düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş ( $p=0,049$ ) görüldü.

Kontrol grupları ve sigara içen gönüllülerde TSH düzeyleri Şekil 3.4’de gösterilmiştir.

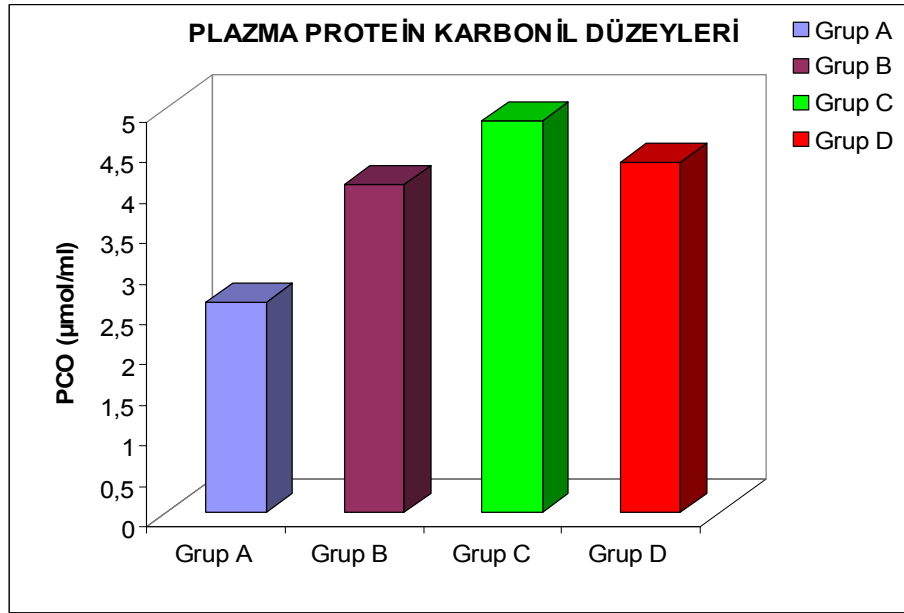


*Şekil 3.4. Kontrol grubu ve sigara içen gönüllülerde sigara tüketim miktarına göre plazma total sülfidril düzeyleri.*

### 3.2.3. Plazma PCO Düzeyleri

Kronik sigara kullanımı sonucu, sigara tüketen hastalarda kontrol gruplarına göre plazma PCO düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış ( $p=0,018$ ) görüldü.

Kontrol grupları ve sigara içen gönüllülerde PCO düzeyleri Şekil 3.5’de gösterilmiştir.



*Şekil 3.5. Kontrol grubu ve sigara içen gönüllülerde sigara tüketim miktarına göre plazma protein karbonil düzeyleri.*

Kontrol grubuna ve sigara tüketen hastalara ait MDA, TSH ve PCO sayısal değerleri ve bu değerleri göz önünde bulundurarak yapılan istatistiksel analizler sonucu iki grup arasında hesaplanan istatistiksel farklılık aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 3.1.).

*Çizelge 3.1. Sigara içen ve içmeyenlerde MDA, TSH düzeyleri ve protein karbonil içerikleri arasındaki istatistiksel farklılıklar.*

	Kontrol Grubu n=17	Sigara içen bireyler n=36	F	P
MDA(nmol/ml)	2,63±0,26	5,06±0,71	5,306	0,025
TSH(µmol/L)	373,69±29,61	296,00±22,47	4,062	0,049
PCO(µmol/ml)	2,59±0,44	4,33±0,48	6,113	0,018

Sigara tüketim miktarının ölçülen parametreler üzerinde oluşturduğu etkiyi gözlemlemek amacıyla sigara içen bireyler sigara içim indekslerine (SI= sigara tüketim endeksi: günlük tüketim X tüketim süresi yıl olarak) göre tekrar sınıflandırıldı (Chin-San Liu ve ark., 1997):

**GRUP A-** Kontrol grubu: Sağlıklı sigara içmeyen gönüllüler, n=17

**GRUP B-** Sigara indeksi 1-400 arasında olanlar, n=21

**GRUP C-** Sigara indeksi 400-800 arasında olanlar, n=11

**GRUP D-** Sigara indeksi 800'den fazla olanlar, n=4

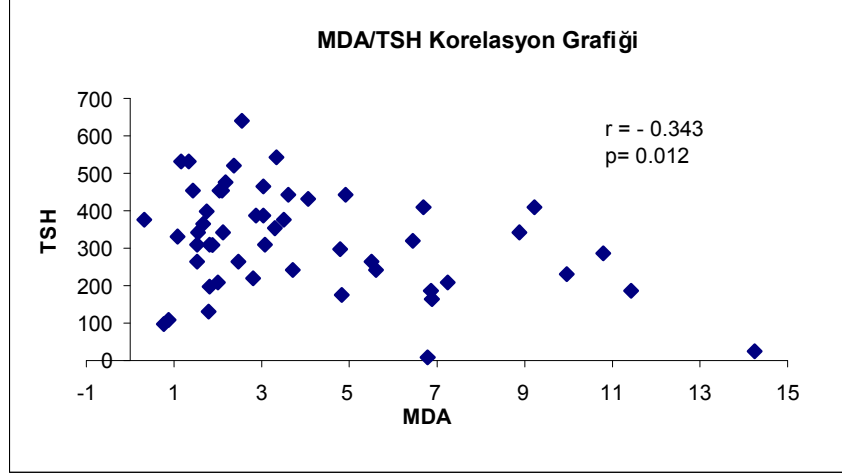
Yapılan istatistiksel analizler sonucu dört grup arasında hesaplanan istatistiksel farklılıklar aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 3.2.).

**Çizelge 3.2.** Farklı miktarlarda sigara içen ve sigara içmeyen bireylerin oluşturduğu gruplarda MDA, TSH ve PCO düzeylerinde hesaplanan istatistiksel farklılıklar.

	MDA (nmol/ml)	TSH (µmol/L)	PCO (µmol/ml)
<b>GRUP A</b> (Kontrol, n=17)	2,63±0,26 A ve B 0,725 A ve C 0,007* A ve D 0,003*	373,69±29,61 A ve B 0,780 A ve C 0,016* A ve D 0,004*	2,59±0,43 A ve B 0,109 A ve C 0,030* A ve D 0,186*
<b>GRUP B</b> SI=1-400 n=21	3,22±0,58 B ve C 0,018* B ve D 0,014*	347,46±28,58 B ve C 0,028* B ve D 0,018*	4,06 ±0,71 B ve C 0,405 Bve D 1,000
<b>GRUP C</b> SI=400-800 n=11	7,83 ±1,67 C ve D 1,000	252,68±29,97 C ve D 0,037*	4,83 ± 0,76 C ve D 0,909
<b>GRUP D</b> SI= 800+ n=4	7,11 ±1,06	144,97±47,65	4,33±1,42

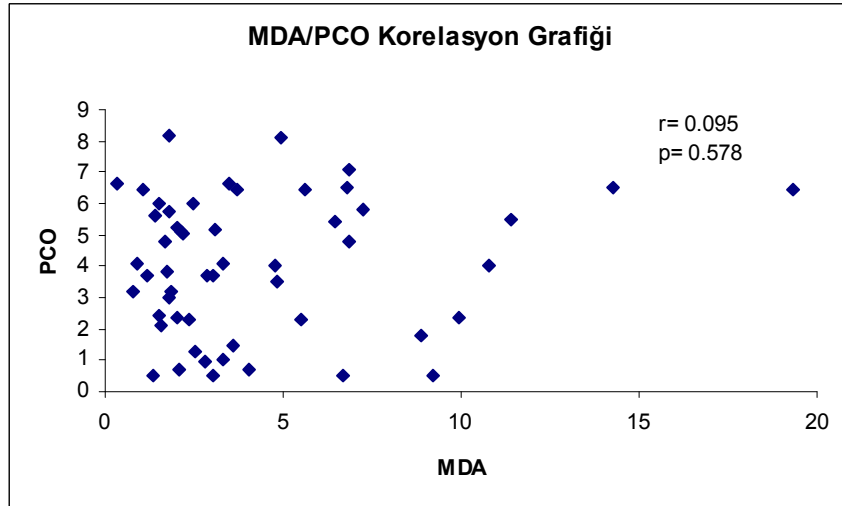
### 3.2.4. MDA, TSH ve PCO Arasındaki İstatistiksel Korelasyonlar

MDA ve TSH arasında görülen negatif anlamlı ( $r = -0.343$ ,  $p = 0.012$ ) korelasyonun grafiksel görüntüsü Şekil 3.6'daki gibidir.



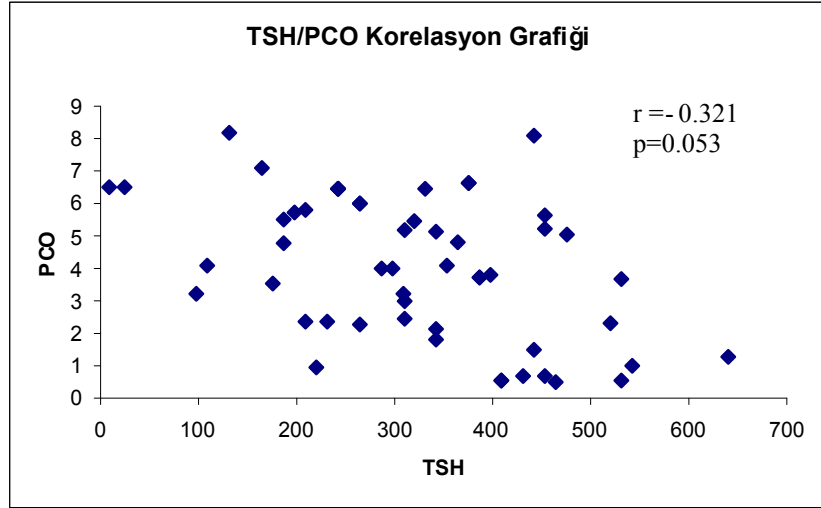
Şekil 3.6. MDA ve TSH korelasyon grafiği

MDA ve PCO düzeyleri arasında pozitif yönde ( $r = 0.095$ ,  $p = 0.578$ ) hesaplanan korelasyonun grafiği aşağıdaki gibidir (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. MDA ve PCO korelasyon grafiği

TSH ve PCO düzeyleri arasında negatif yönde ( $r = -0.321$ ,  $p = 0.053$ ) hesaplanan korelasyonun grafiği aşağıdaki gibidir (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. TSH ve PCO korelasyon grafiği.

Şekil 3.6., Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'ye ait sayısal değerler Çizelge 3.3'de topluca gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. MDA, TSH ve PCO arasında hesaplanan korelasyon ve p değerleri.

	MDA	TSH	PCO
MDA	-----	r = - 0.343 p = 0.012	r = 0.095 p= 0.578
TSH	r = - 0.343 p = 0.012	-----	r = - 0.321 p = 0.053
PCO	r = 0.095 p= 0.578	r = - 0.321 p = 0.053	-----

### 3.2.5. MDA, TSH ve PCO Düzeylerinin Yaş ile İlişkisi

Yaşa göre MDA düzeylerinde pozitif bir korelasyon hesaplanırken (MDA/yaş  $r=0,327$ ), TSH ile aralarında negatif bir korelasyon (TSH/yaş  $r= - 0,428$ ) bulunmuştur. PCO düzeyleri ile yaş arasındaki korelasyon ise

istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu değerler Çizelge 3.3’de topluca gösterilmiştir.

*Çizelge 3.4. MDA, TSH düzeyleri ve protein karbonil içeriklerinin yaş ile aralarında bulunan korelasyon ve p değerleri.*

	<b>MDA</b>	<b>TSH</b>	<b>PCO</b>
<b>YAŞ</b>	r = 0,327 p = 0,017	r = -0,428 p = 0,001	- p = 0,965

### 3.2.6. Karaciğer Fonksiyon Testleri

Sigara içenlerde ve kontrol grubunda AST (p=0.424), ALT (p=0.221) ve GGT (p=0.852) değerlerinde istatistiksel olarak farklı anlamlılık bulunamamıştır.

*Çizelge 3.5. Karaciğer AST, ALT ve GGT düzeyleri*

	<b>Kontrol Grubu N=17</b>	<b>Sigara tüketenler n=36</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>AST (U/L)</b>	19.93±1.29	25.47±4.48	0.652	0.424
<b>ALT(U/L)</b>	18.71±1.92	31.47±6.70	1.539	0.221
<b>GGT(U/L)</b>	29.00±3.83	28.16±2.47	0.035	0.852

### 3.2.7. Böbrek Fonksiyon Testleri

Sigara içenlerde ve kontrol grubunda üre (p= 0,584), serum keratinin (p= 0.701) ve ürik asit (p= 0.501) değerlerinde istatistiksel olarak farklı anlamlılık bulunamamıştır.

Çizelge 3.6. Böbrek Üre, Serum keratinin ve ürik asit düzeyleri

	<b>Kontrol Grubu n=17</b>	<b>Sigara tüketenler n=36</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Üre (mg/dl)</b>	27.64±2.06	26.37±1.23	0.304	0,584
<b>Serum keratinin (mg/dl)</b>	0.92±0.51	0.93±0.27	0.149	0.701
<b>Ürik asit (mg/dl)</b>	5.01±0.54	5.35±0.22	0.460	0.501

### 3.2.8. Lipid Profilleri (Panelleri)

Sigara içenlerde ve kontrol grubunda HDL-kollesterol (p=0.032) ve trigliserit (p=0.008) değerlerinde istatistiksel farklılıklar gözlenirken; kolesterol, LDL-kollesterol ve VLDL-kollesterol düzeylerinde farklı bir anlamlılık bulunamamıştır.

**Çizelge 3.7.** Lipid profilleri kollesterol, HDL-kollesterol, LDL-kollesterol, VLDL-kollesterol ve trigliserit düzeyleri

	<b>Kontrol Grubu N=17</b>	<b>Sigara içen bireyler n=36</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Kollesterol (mg/dl)</b>	201.69±11.98	207.35±7.73	0.165	0.686
<b>HDL- Kollesterol (mg/dl)</b>	62.44±4.31	49.12±2.59*	7.815	0.008
<b>LDL- Kollesterol (mg/dl)</b>	120.75±8.65	125.32±7.91	0.130	0.720
<b>VLDL- Kollesterol (mg/dl)</b>	23.36±3.43	28.41±2.86	1.165	0.287
<b>Trigliseritler (mg/dl)</b>	111.44±15.49	169.45±16.58**	4.901	0.032

#### **4. TARTIŞMA**

Kronik sigara içiciliğinin kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi bir çok kronik hastalıklara yakalanma riskini arttırdığı bilinmektedir. Sigara dumanında hücrel fonksiyonlara hasar veren NO<sub>x</sub> ve diğer oksitleyici radikaller gibi bir çok toksik kimyasal bulunmaktadır. Sigara dumanında bulunan yüksek oksidan madde içeriği, sigara içenlerde düşük antioksidan düzeylerini açıklar. Sigara maruziyeti ile oluşan serbest radikalleri süpürmek amacıyla endojen savunma sistemlerinden faydalanılır. Bu savunma sistemlerinin başında üç aminoasitten oluşan ve memeli hücrelerinde en fazla bulunan protein olmayan tiyol bileşiği GSH gelmektedir. GSH redükte formunda sentezlenir ve hücrelere ortamda bulunan serbest radikallere karşı korur.

Organizmadaki aşırı serbest radikal üretimi, özellikle hücre membranlarındaki lipidleri etkileyerek lipid peroksidasyonuna neden olur. Ayrıca proteinler, karbohidratlar ve DNA da serbest radikallere hedef olur. Lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA, kimyasal olarak aktif bir moleküldür, çevre hücre ve dokulara kolayca difüze olarak moleküler düzeyde, özellikle proteinler üzerinde zararlı etkiler gösterebilir (Parantainen ve ark., 1986).

Oksidatif stres organizmada lipid, protein ve DNA gibi makromolekülleri etkilemekte ve bu moleküllerin yapı ve fonksiyonlarında değişikliklere yol açmaktadır. Bu değişiklikler çeşitli yöntemlerle gösterilmektedir. Lipidlerdeki hasarı göstermek için

genellikle lipid peroksidasyon ölçümü, protein hasarını belirlemek için protein karbonil grupları ölçümü kullanılmaktadır (Sattler ve ark., 1998).

Bu literatür bilgileriyle uyumlu olarak, yaptığımız çalışmada sigara içen bireylerin plazma MDA düzeyleri anlamlı derecede artarken ( $p=0.025$ ), TSH düzeylerinde ( $p=0.049$ ) belirgin istatistiksel düşüşler gözlenmiştir. Sigara tüketim miktarının MDA, TSH ve PCO üzerinde oluşturduğu etkiyi daha ayrıntılı ortaya çıkarabilmek amacıyla sigara kullanan bireyler sigara tüketim endekslerine göre yeniden sınıflandırılmışlardır (SI= sigara tüketim endeksi: günlük tüketim X tüketim süresi yıl olarak):

**GRUP A-** Kontrol grubu: Sağlıklı sigara içmeyen gönüllüler,  $n=17$

**GRUP B-** Sigara indeksi 1-400 arasında olanlar,  $n=21$

**GRUP C-** Sigara indeksi 400-800 arasında olanlar,  $n=11$

**GRUP D-** Sigara indeksi 800'den fazla olanlar,  $n=4$

Yaptığımız istatistiksel analizler sonucu az miktarda sigara tüketen grup ile (Grup B), çok tüketen (Grup D) gruplar arasında MDA ( $p=0.014$ ) ve GSH ( $p=0.018$ ) anlamlı farklılıklar bulunmaktadır. Aynı şekilde Grup B ve Grup C MDA ( $p=0.018$ ) ve TSH ( $p=0.018$ ) düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Ancak Grup C ve Grup D kendi aralarında incelendiklerinde MDA ( $p=1.000$ ) ve PCO ( $p=0.909$ ) düzeylerinde anlamlı farklılık tespit edilememiştir. Yine aynı gruplar içerisinde yapılan istatistiksel çalışmada çok miktarda sigara tüketen bireylerin TSH düzeylerinde ( $p=0.037$ ) Grup C'ye göre anlamlı düşüş görülmüştür. Tüm bu sonuçlara dayanarak diyebiliriz ki, sigara kullanım miktarının artmasıyla oksidatif hasar artarken, TSH düzeylerinde belirgin düşüşler gözlenmiştir.

ROT, amino asit kalıntılarının okside olmalarını, peptid bağlarının kırılmalarının, protein fragmentasyonunun ve agregasyonunun artmasına ve proteolizis oranının değişmesini sağladığı için proteinler oksidatif ataklar için hedef moleküllerdir (Berlett ve Standman, 1997). Kronik sigara içimine bağlı olarak oksidatif stresin artışı, PCO düzeylerinde artışa sebep olmaktadır. PCO düzeylerinin saptanması protein oksidasyonunu belirlemede duyarlı bir yöntemdir (Dean ve ark., 1997). Bu bilgiler ışığında yaptığımız çalışmada, sigara içen bireylerin PCO düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış ( $p=0.018$ ) gözlemledik. Ancak yapılan istatistiksel araştırmalar sonucu sigara tüketim miktarının sınıflandırdığımız gruplar arasında (Grup B, C, D) PCO düzeylerinde bir değişikliğe neden olmadığını gözlemledik. Bununla birlikte kontrol grubu ile orta derecede sigara tüketenlerin (Grup C,  $p=0.030$ ) PCO düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Ölçülen bu üç parametre arasındaki korelasyonları hesaplamak amacıyla yapılan istatistiksel araştırmalar sonucunda MDA ve PCO arasında pozitif yönde ( $r=0.095$ ), MDA /TSH ( $r=-0.043$ ) ve PCO/TSH arasında negatif yönde korelasyon gözlemledik. Bulduğumuz bu sonuca göre diyebiliriz ki, MDA düzeylerindeki artışla beraber, yani oksidatif hasarın artmasıyla birlikte vücudun önemli endojen savunma mekanizması olan TSH düzeylerinde düşüş gözlenir ve serbest radikallerin lipidler üzerine oluşturduğu hasar (MDA düzeylerindeki artış) proteinler üzerine oluşturduğu hasarlarla (PCO düzeylerindeki artış) doğru orantılıdır.

Sigara kullanımının karaciğer üzerindeki etkilerini gözlemlemek amacıyla karaciğer fonksiyon testleri olan ALT, AST ve GGT düzeyleri ölçülmüştür. Ancak yapılan çalışmalar sonucunda bu iki grup arasında AST ( $p=0.424$ ), ALT( $p=0.221$ ) ve GGT ( $p=0.852$ ) düzeylerinde

istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Sıçan dokuları üzerinde yapılan bir çalışmada nikotinin en yüksek konsantrasyonunun böbreklerde ölçüldüğü bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada karaciğerde ölçülen nikotin konsantrasyonları ise çok düşük bulunmuştur (Chowdhury ve ark., 1993). Nikotin her ne kadar karaciğerde metabolize ediliyor olsada burada birikime uğramaz ve hızlıca böbrekler tarafından elimine edilir (Lambers ve Clark, 1996).

Sigara tüketiminin ortaya çıkardığı diğer bir ana problem ise, içerdiği ağır metaller dolayısıyla neden olduğu nefrotoksitedir. Sigaranın içerisinde ağır metallerden başlıca kadmiyum (Cd), kurşun (Pb) ve civa (Hg) bulunur (Pragsi ve Leo, 1991; Kalcher ve ark., 1993). Bu metallerin çevresel ve mesleki maruziyetleri sonucu organizmaya nefrotoksik ajanlar olarak etki ettikleri bilinmektedir. Kadmiyum (Cd) böbreklerde tübüler disfonksiyona ve daha ciddi maruziyetlerde geri dönüşümü olmayan glomeruler hasara ve glomeruler filtrasyon oranında azalmaya neden olur. Kurşunun renal etkileri üç safhadan oluşur. Birincisi, akut maruziyet sonucu oluşan proksimal tübüllerdeki disfonksiyon, mitokondriyal değişiklikler ve karakteristik ek cisimciklerin oluşumudur. İkinci safha ise, kronik kurşun maruziyeti ile birlikte gelişen tübüler atrofi, fibröz glomeruler filtrasyonda azalma ile kendini gösterir. Üçüncü safha ise, renal tübüler neoplazinin gelişimidir (Goyer, 1996). Civanın (Hg) böbrekler üzerindeki etkileri kimyasal yapıları ile ilişkilidir. Organik civa (Hg) birleşikleri nefrotoksik etkiye sahip değildir, ancak inorganik civanın (Hg) birikiminin gerçekleştiği hedef organ böbreklerdir ve toksisitenin ilk görüldüğü yer proksimal tübüllerdir (Clarkson, 1997; Golstein ve Schnellmann, 1996). Absorbsiyondan sonra civa (Hg) buharı eritrositlerde veya dokularda

hızlıca oksidasyona uğrayarak inorganik cıvaya (Hg) dönüşür. Bu yüzden ki, cıva (Hg) buharının dokularda dağılımı ve toksik etkileri inorganik cıva (Hg) ile aynıdır. Sigara içiminin ağır metallerin indüklediği nefrotoksisitenin risk faktörü olup olmadığıyla ilişkili çalışmalar çok sınırlıdır (Goyer, 1996). Bu amaçla, sigara içen bireylerde nefrotoksik etkiyi gözlemlemek amacıyla böbrek fonksiyon testleri olan üre, ürik asit ve serum kreatinin düzeyleri ölçülmüştür. Mortada ve ark., yaptığı çalışmada sigara içen kişilerin kan ve tırnaklarında kadmiyum (Cd) ve kurşun (Cu) düzeylerinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ancak böbrek hasarının biyogöstergeleri olan serum kreatinin, GGT, NAG, ALP gibi parametrelerde sigara içen ve içmeyen bireylerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulamamışlardır (Mortada ve ark., 2001). Yaptığımız çalışmada sigara tüketen kişiler ve kontrol grubu kıyaslandığında serum kreatinin ( $p=0.701$ ), ürik asit ( $p=0.501$ ) ve üre ( $p=0.584$ ) düzeylerinde istatistiksel olarak farklı bir anlamlılık bulunamamıştır. Yaptığımız çalışmada her ne kadar nefrotoksik etki gözlemesek de aşağıdaki nedenlerden dolayı sigaranın hala bir risk faktörü olduğu düşünülebilir:

- 1) Ağır içicilik ve kronik maruziyet sonucu sigara içerisinde bulunan ağır metaller böbreklerde bu metallerin birikimine neden olurken renal hasar oluşturabilir.
- 2) Bu metallere maruziyet diabet, hipertansiyon gibi diğer risk faktörlerinin bulunduğu durumlarda sigara kullanımıyla birlikte böbrek hastaları için kofaktör bir risk olarak gündeme gelebilir.
- 3) Sigara kullanımıyla birlikte bu ağır metallerin toksik etkilerini belirleyen başka bir faktör de Background maruziyet dediğimiz yiyecek, su, hava kirliliği gibi etkenlerdir. Sözü geçen maruziyet

düzeyi, böbrek disfonksiyonuna neden olabilecek kritik düzeyde ise, sigara kullanımı toksisitenin ortaya çıkmasında bir faktör olarak gözlenebilir, ancak bu maruziyet düzeyi toksisiteyi oluşturacak limitlerin çok altında ise sigara tüketimi bizim çalışmamızda olduğu gibi her hangi bir artı etki göstermeyecektir (Mortada ve ark., 2004).

Sigaranın vücutta serbest radikal oluşturduğu bilinmektedir. Sözü geçen bu radikaller antioksidan düzeylerindeki yetersizliğe bağlı olarak aşırı miktarda arttığında koroner arter hastalığı (CAD) riskini de arttırabilir. Genç bireylerde koroner kalp hastalığı en büyük risk faktörlerinden biri sigara kullanımınıdır. Tek ve çapraz populasyonlarda yapılan bir çok epidemiyolojik çalışma göstermektedir ki sigara içimi ile birlikte hipertansiyon artmakta total ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL) yükselmekte ve bunu takiben koroner arter hastalık (CAD) gelişmektedir (Ramachandran ve ark., 2001; Mohan ve ark., 2001). Serbest radikaller lipid metabolizmasını değiştirirler ve okside olmuş sitotoksik LDL oluşumuna neden olurlar (Kelishadi ve ark., 2002; Khan ve ark., 1995) . Oluşan yapısı değişmiş LDL, LDL'nin normal halinden daha aterojeniktir (Steinberg, 1997). Sharma ve ark., yaptıkları çalışmada sigara içenlerde LDL-kolesterol, total serum kolesterol ve trigliserit düzeylerinde artış tespit etmişlerdir. İlginç bir gözlem ise sigaranın bırakılmasıyla birlikte HDL-kolesterol düzeylerinde artış gözlenmiştir (Quensel ve ark., 1989; Stubbet ve ark., 1982). Sigara içenlerde LDL/HDL oranlarında da artış gözlenir. Bu bilgi göstermektedir ki, sigara içenlerde ateroskleroz ve CAD görülme riski daha fazladır. Sigara kullanımı lipid düzeylerini lipoprotein lipaz aktivitesinde, lesitin kolesterol asil transferaz (LCAT) aktivitesinde

düşüşe ve hepatik lipaz aktivitesinde artışa neden olarak değiştirir (Chen ve Loo, 1995). Tüm bu bilgiler ışığında yaptığımız çalışma sonucunda, sigara içen bireylerin ( $49.12 \pm 2.59$ ) HDL-kolesterol düzeylerini, kontrol grubu ( $62.44 \pm 4.31$ ) ile kıyasladığımızda istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlemledik ( $p=0.032$ ). Aynı şekilde sigara içen bireylerin trigliserit düzeylerinde ( $169.45 \pm 16.58$ ) kontrol grubuna ( $111.44 \pm 15.49$ ) göre istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur ( $p=0.008$ ). Ancak total serum kolesterol LDL, VLDL-kolesterol düzeylerinde iki grup arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Çizelge 3.6.). Çalışmamızın sonuçları doğrultusunda sigara içen bireylerin dislipidemik ve koroner arter hastalıklarına (CAD) yakalanma risklerinin sigara içmeyen bireylere oranla daha yüksek olduğunu söyleyebiliriz.

Yaşlanmayla ilgili olarak öne sürülen teorilerden biri olan serbest radikal teorisinde; canlının yaşamı boyunca etkilendiği reaktif oksijen türlerinin (ROS) oksidatif hasara neden olabileceği öne sürülmektedir. Kümülatif ve potansiyel olarak artan miktardaki hasar, yaşlanmadaki fonksiyonel ve patolojik bozukluklara yol açar (Butterfield ve ark., 1998). Daha önce çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, serbest radikallerin proteinler (Butterfield ve ark., 1998; Cini ve Moretti, 1995) ve lipidlerde (Liu ve ark., 1996; Cini ve Moretti, 1995; Cai ve ark., 1996) hasara yol açtığı bildirilmiştir. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan reaktif oksidanlar olan lipid epoksidleri, lipid hidroperoksitleri, lipid alkoksil, peroksil radikalleri ile lipid alkoksil ve peroksi radikallerin yaşlanmayı hızlandırdığı bilinmektedir (Ames ve ark., 1993). Çalışmamızda tüm deneklerin yaşları da lipid ve proteinlerde yaş ile oluşacak oksidatif hasarı gözlemlemek amacıyla sorgulanmıştır. Bu amaçla yaptığımız çalışmada MDA düzeyleri ve yaş arasında istatistiksel

olarak pozitif anlamlı ( $r=0.327$ ,  $p=0.017$ ) bir korelasyon gözlenirken, glutasyon düzeyleri ile aralarında negatif anlamlı korelasyon ( $r=-0.428$ ,  $p=0.001$ ) bulunmuştur. Ancak PCO düzeyleri ile yaş arasındaki korelasyon istatistiksel olarak anlamlı değildir. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda yaşlanmanın MDA düzeylerinde artışa ve GSH düzeylerinde belirgin düşüŖlere neden olarak oksidatif hasarı arttırdığını söyleyebiliriz.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Sigara tüketen bireylerde oksidatif stresi belirlemede bir gösterge olan LPO ve bu reaksiyon zincirinin ürünü olan MDA' nın plazmadaki düzeyi ve plazmadaki TSH düzeyi önemli parametrelerdir.
2. Plazmada MDA tayini için Buege ve Aust'un (1978) TBA-Rs yöntemi, TSH tayini için Sedlak ve Lindsay'in (1968) plazma TSH yöntemleri laboratuvarımız koşullarında uygulanabilir hale getirilerek plazma MDA ve total TSH düzeyleri araştırılmıştır.
3. Kronik sigara içimine bağlı olarak oksidatif stresin artışı, diğer bir göstergesi olan protein oksidasyonunun ve bunun ürünü olan PCO düzeylerinin artışına sebep olmaktadır. PCO düzeylerinin saptanması protein oksidasyonunu belirlemede duyarlı bir yöntemdir. Plazma PCO tayini için Levine ve Reznick'in (1994) yöntemi U.V. spektrofotometri cihazı ile rutin laboratuvarımız koşullarında uygulanabilir hale getirilmiştir.
4. Çalışmamızda kronik sigara kullanımı sonucunda sigara tüketim endeksine (günlük tüketim X tüketim süresi yıl olarak) göre sınıflandırılmış gruplar kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, sigara az tüketen ile orta ve çok miktarda tüketenler arasında istatistiksel olarak plazma MDA ve PCO düzeylerinde anlamlı bir artış, hücresel TSH düzeylerinde anlamlı bir düşüş saptanmıştır. Sonuç olarakta, sigara kullanım miktarının artmasıyla oksidatif

hasar (MDA ve PCO düzeyleri) artarken, TSH düzeylerinde belirgin düşüşler gözlenir.

5. Sonuçlarımıza göre kronik sigara kullanımı arttığında oksidatif stres organizmada lipid ve protein gibi makromolekülleri etkilemekte ve bu moleküllerin yapı ve fonksiyonlarında değişikliklere yol açtığı saptanmıştır.
6. Kronik sigara tüketiminin biyokimyasal parametreleri olan AST, ALT ve GGT düzeylerinde istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamamıştır.
7. Sigaranın içerisinde bulunan kadmiyum (Cd), kurşun (Pb) ve civa (Hg) gibi ağır metallerinin nefrotoksik etkisi böbrek fonksiyon testleriyle (serum kreatinin, ürik asit ve üre düzeyleri) ölçülmüş ve sigara içen kişiler ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak farklı bir anlamlılık bulunamamıştır.
8. Sigara içen bireyleri kontrol grubu ile kıyasladığımızda HDL-kolesterol düzeylerinde anlamlı bir düşüş, trigliserit düzeylerinde anlamlı artış gözlenirken; total serum kolesterol, LDL-kolesterol, VLDL-kolesterol düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Çalışmamızın sonuçları doğrultusunda sigara içen bireylerin dislipidemik ve koroner arter hastalıklarına (CAD) yakalanma risklerinin sigara içmeyen bireylere oranla daha yüksek olduğu söyleyenebilir.

9. Yaptığımız çalışma sonucunda yaşlanmanın MDA düzeylerinde artışa ve TSH düzeylerinde belirgin düşüşlere neden olarak oksidatif hasarı arttırdığı söylenebilir.

## ÖZET

### **Sigara İçenlerde Oksidatif Stres Göstergelerinin Değerlendirilmesi**

Çalışmamızın amacı sigara içiminin ve sigara içim miktarının oksidatif hasar, protein karbonil içeriği, böbrek ve karaciğer hasarı ve lipid profili üzerindeki etkisini klinik ve biyokimyasal yöntemler kullanarak araştırmaktır. Bu amaçla gönüllüler sigara içim miktarlarıyla yeniden sınıflandırılmışlardır. Sigara içim miktarı sigara endeksine göre hesaplanmıştır( gruplar dört kategoriye ayrılmışlardır. Grup A (kontrol, n=17); Grup B (SI=1-400, az miktarda tüketenler, n=21); Group C (SI=400-800, orta miktarda tüketenler, n=11); Group D (SI=800+, çok miktarda tüketenler, n=4). Kontrol grubu ve az miktarda sigara tüketenler ve az /çok miktarda sigara tüketen bireylerin MDA düzeyleri arasında istatistiksel bir farklılık bulunamamıştır. Ancak kontrol grubu ve orta derecede sigara tüketenler (p=0.007) ve kontrol grubu ile çok miktarda sigara tüketen bireylerin MDA düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir. Ayrıca sigara tüketim miktarında artış da MDA düzeylerini artırmıştır (az/orta p=0.018; az/çok p=0.014). TSH düzeylerinde de kontrol grubu orta derecede sigara tüketenler (p=0.016) ve çok miktarda sigara tüketenler (p=0.004) ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşüşler gözlenmiştir. MDA sonuçları ile orantılı olarak sigara tüketim miktarı TSH düzeylerinde de anlamlı düşüslere neden olmuştur (az/orta sigara tüketenler p=0.028; az/çok sigara tüketen p=0.018). Sigara içen bireylerin PCO düzeylerinde de kontrol grubuna göre artışlara rastlanmıştır (p=0.018). Gönüllülerin detaylı biyokimyasal testleri de yapılmıştır. Gönüllülerin böbrek (üre, ürik asit, serum

kreatinin) fonksiyon testleri, karaciğer fonksiyon testleri (ALT, AST, GGT) ve lipid profilleri de (kolesterol, trigliserit, LDL, HDL, VLDL) incelenmiştir. Böbrek, karaciğer fonksiyon testleri ve kolesterol, LDL ve VLDL düzeylerinde herhangi bir farklılık gözlenemezken sigara içen bireylerin HDL-kolesterol düzeylerinde kontrol grubuna oranla anlamlı bir düşme ( $p=0.008$ ) ve trigliserit düzeylerinde anlamlı bir artış ( $p=0.032$ ) tespit edilmiştir. Sonuçlarımıza göre diyebiliriz ki; sigara kullanımı ve sigara kullanım miktarı oksidatif hasara neden olarak MDA düzeylerinde artışa TSH düzeylerinde anlamlı azalmalara ve PCO düzeylerinde artışa neden olur. Çalışılan biyokimyasal parametreler göz önüne alındığında, sigara kullanımının koroner arter hastalık (CAD)ve riskini artırdığı sonucuna ulaşılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** sigara, lipid peroksidasyonu, glutatyon, malondialdehyde , protein karbonil düzeyi, lipid profilleri.

## ***SUMMARY***

### **Determination of Oxidative Stress Biomarkers in Cigarette Smokers**

The objective of the current study was to evaluate the effect of cigarette smoking and degree of consumption on oxidative damage, protein carbonyl content, kidney damage, liver injury and lipid profile by many clinical and biochemical procedures. For this aim groups of volunteers were arranged according to their smoking status. Smoking status was determined with smoking indices which was calculated as  $\Sigma$  number of cigarettes consumed per day X average duration of smoking in years. The groups were divided into the following categories: Group A (nonsmoker, n=17); Group B (SI=1-400, light smokers, n=21); Group C (SI=400-800, moderate smokers, n=11); Group D (SI=800+, heavy smokers, n=4). No significant difference in MDA levels found between nonsmokers/light smokers ( $p=0.725$ ) and moderate/heavy smokers. However a significant increase was observed in MDA levels if nonsmokers/moderate smokers ( $p=0.007$ ) and nonsmokers/heavy smokers were compared. Also degree of cigarette consumption increased MDA levels significantly when light smokers were compared with moderate ( $p=0.018$ ) and heavy smokers ( $p=0.014$ ). Accordingly, a significant decrease was observed in TSH levels when nonsmokers were compared with moderate ( $p=0.016$ ) and heavy smokers ( $p=0.004$ ). Furthermore it is apparent that degree of cigarette consumption like in MDA case, affected TSH levels in volunteers by decreasing the levels significantly if light smokers were compared with moderate ( $p=0.028$ )

and heavy smokers ( $p=0.018$ ). a significant increase was observed in protein carbonyl content if smokers and nonsmokers were compared overall ( $F=6.113$ ,  $p=0.018$ ). Volunteers were also subjected to detailed laboratory investigation. Markers of kidney damage (urea, creatinine, uric acid) and liver injury (AST,ALT,GGT) were studied, however no significant difference was found in any of these clinical parameters. In addition lipid profile (cholesterol, HDL,LDL,VLDL, triglycerides) of each subject was evaluated. No significant difference was found in terms of cholesterol, LDL, HDL and VLDL. However HDL-cholesterol levels of smokers ( $49.12\pm 2.59$ ) were significantly lower than that of nonsmokers ( $62.44\pm 4.31$ ;  $F=7.815$ ,  $p=0.008$ ) whereas triglyceride levels of smokers ( $169.45\pm 16.58$ ) were higher ( $11.44\pm 15.49$ ;  $F=4.901$ ,  $p=0.032$ ) when compared. Our results indicate that cigarette smoking and degree of consumption induces oxidative stress by increasing MDA levels and protein carbonyl content and decreasing TSH levels. Also smokers who are dyslipidaemic are more likely to encounter coronary artery disease.

**Key Words:** Cigarette, lipid peroxidation, glutathion, malondialdehit, protein carbonil content, lipid profiles.

## KAYNAKLAR

- ALEYNIK, I.S., LEO, A.M., MA, Y., ALEYNIK, K.M. and LIEBER, S.C. (1997). Polyenylphosphatidylcholine Prevents Carbon Tetrachloride-Induced Lipid Peroxidation while it Attenuates Liver Fibrosis. *J. Hepatol.* **27**: 554-561.
- AMES, BN., SHIGENAGA, MK., HAGEN, TM. (1993). Oxidants, antioxidants, and degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**: 7915-7922
- AOSHIBA, K., NAGAI, A., (2003). Oxidative Stress, Cell Death, and Other Damage to Alveolar Epithelial Cells Induced by Cigarette Smoke. *First Department of Medicine.* **166**-8666
- ASAMI, S., HIRANO, T., YAMAGUCHI, R., TOMIOKA, Y., ITOH, H., KASAI, H. (1996). Increase of a type of oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanine, and its repair activity in human leukocytes by cigarette smoking. *Cancer Res.* **56**: 2546-2549.
- ASAYAMA, K., NAKANE, T., UCHIDA, H., et al. (1994). Serum antioxidant status in streptozosin-induced diabetic rat. *Horm Metab Res* **26**:617-620.
- BABIOR, BM. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine* **109(1)**:33-44)
- BASAGA, H. S. (1989). Biochemical aspects of free radicals. *Biochem. Cell. Biol.* **68**: 989-998
- BAST, A., HAENEN, GR., DOLMAN, CJ. (1991). Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med.*; **91(3C)**:2S-13S. Review.
- BEATTY, S., KOH, H., PHIL, M., HENSON, D., BOULTON, M. (2000). The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol.* **45**:115-134.
- BECKMANN, J. S., Y. Z. Ye, P. G. ANDERSON, J. CHEN, M. A. ACCAVATTI, M. M. TARPEY, and C. R. WHITE. (1994). Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **375**: 81-88.
- BENEDETTI, A., CASINI, A.F., FERRALI, M., COMPORTI, M. (1979). Effects of diffusible products of peroxidation of rat liver microsomal lipids. *Biochem. J.*, **180**:303-312.
- BERLETT, BS., STANDMAN, ER. (1997). Protein oxidative in aging disease and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **272**: 20313.
- BILGIÇ, H. Sigara ve kanser. ([www.gata.edu.tr/dahilibilimler/onkoloji/sigara\\_kanser.htm](http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/onkoloji/sigara_kanser.htm)). Erişim: 06.05.2006
- BLAKEMAN, DP., RYAN, TP., JOLLY, RA., PETRY, TW. (1995). Diquat-dependent protein carbonyl formation. Identification of lipid-dependent and lipid-independent pathways. *Biochem Pharmacol.*; **50(7)**:929-35.
- BRENT, J.A., RUMACK, B. H. (1993). Role of free radicals in toxic hepatic injury. I. Free radical biochemistry. *Clin. Toxicol.* **31(1)**-139-171
- BRUCE, A., F., and Crapo, J., D. (1982). Biology of Disease. Free Radicals and Tissue Injury. *Lab Invest.* **47(5)**: 412-426.

- BUEGE, J.A., AUST, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* **52**: (303-310).
- BUTTERFIELD, DA., KOPPAL, T., HOWARD, B., SUBRAMANIAM, R., HALL, N., HENSLEY, K., YATIN, S., ALLEN, K., AKSENOV, M., CARNEY, J. (1998). Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitron and vitamin. *Acad Sci.* **854**: 448-462
- CAI, Q., TIAN L., WEI, H. (1996). Age dependent increase of indigenous DNA hys adduct in rat brain is associated with lipid peroxidation product. *Gerontol.* **31**: 373-385
- CANORUÇ, N., ÇIÇEK R., ALTANER, A; A., DURSUN M., TURGUT, C., GÜNELİ, E. C CANORUÇ, F., (2001). Protective effects of vitamin E selenim and allopurinol against stres-induced ulcer formation in rats. *Türk J. Meal Sci*, **31**: 199-203
- CHAMPE, P.C., HARVEY, R.A. (1997). Glikozaminoglikanlar. A. TOKULLUGİL, M.DIRICAN, E. ULUKAYA. Lippincott's illustrated reviews serisi: Biyokimya. İkinci bask., Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, s. 147-156.
- CHANCE, B., SEIS, H., BAVERIS, A. (1979). Hyroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**: 527-605.
- CHAVAN, S., SAVA, L., SAXENA, V., PILLAI, S., SONTAKKE, A., INGOLE, D. (2005). Reduced glutathione: Importance of specimen collection. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, **20(1)**:150-152.
- CHEESMAN, K. H. (1993). Mecanisms and effect of lipid peroxidation. *Molec.Aspects. Med.* **14**: 191-197.
- CHEN, C., LOO, G. (1995). Inhibition of lecthin: cholesterol acyltransfease activity in human blood plazma by cigarette smoke extract and reactive aldehydes. **10**: 121-8
- CHIN-SAN, LIU., SHU-HUEI, KAO., YAO-HUEI, WEI. (1997). Smoking-Associated Mitochondrial DNA Mutations in Human Hair Follicles. Enviromental and Molecular Mutagenesis
- CHOWDHURY, P., DOI, R., CHANG, LW., RAYFORD, PL. (1993). Tissue distribution of [3]-nicotine in rats. *Biomed Environ sci.* **6**:59-64.
- CHURCH, DF., PRYOR, WA. (1985). Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect.* **64**: 111-126.
- CIGREMIS, Y., TURKOZ, Y., AKGOZ, M., SOZMEN, M. (2004) Jun. The effects of chronic exposure to ethanol and cigarette smoke on the level of reduced glutathione and malondialdehyde in rat kidney. *Urol Res.*; **32(3)**:213-8.
- CINI, M., MORETTI, A. (1995). Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain. *Neurobiol. Aging.* **16**: 53-57
- CLARKSON, TW. (1997). The toxicology of mercury. *Crit Rev Clin Lab Sci.* **34**:369-403
- COCHRANE, CG. (1991) Sep 30. Cellular injury by oxidants. *Am J Med.*; **91(3C)**:23S-30S. Review.
- CORCORAN, GB., TODD, EL., RACZ, WJ., HUGHES, H., SMITH, CV., MITCHELL, JR. (1985). Effects of N-acetylcysteine on the

- disposition and metabolism of acetaminophen in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* **232(3)**:857-63.
- CORROCHER, R., CASARIL, M., BELLISOLA, G., et al. (1986). Severe impairment of antioxidant system in human hepatoma. *Cancer* **58**: 1658-1662.
- CROSS, C. E., HALLIWELL, B., BORISH, E. T., et al. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Ann Int Med* **107**:526-545.
- CROSS, C. E., VAN DER VLIET, A., EISERICH, J. P., WONG, J. (1997). Oxidative stress and antioxidants in respiratory tract lining fluids. Oxygen, Gene Expression, and Cellular Function. Lung Biology in Health and Disease edited by Clerch LB., Massaro DJ. Marcel Dekker, New York. 367-398.
- DE ZWART, L. L., MEERMAN, J. H., COMMANDEUR, J. N., VERMEULEN, N. P. (1999 Jan). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med.* **26(1-2)**:202-26.
- DEAN, R. T., FU, S., STOCKER, R., DAVIES, M. T., (1997). Biochemistry and pathology of radical mediated protein oxidation. *Biochem. J.* **324**: 1.
- DOLL, R. (1999). Tobacco: A medical history *J Urban Health.* **76(3)**:289-313.
- DORMANDY, T. L. (1983). An approach to free radicals. *Lancet.* **322**:1010-1013.
- DRAPER, H. H., MCGIRR, L. G., HANDLEY, M. (1986). The metabolism of malondialdehyde. *Lipids.* **21**: 305-307
- EISERICH, J. P., V. VOSSSEN, C. A. O'NEILL, B. HALLIWELL, C. E. CROSS, and A. van der VLIET. (1994). Molecular mechanisms of damage by excess nitrogen oxides: nitration of tyrosine by gas-phase cigarette smoke. *FEBS Lett.* **353**: 53-56
- ESTERBAUER, H., CHEESEMAN, K. H., DIANZANI, M. U., POLI, G., SLATER, T. F. (1982). Separation and characterization of the aldehydic products of ADP/Fe<sup>2+</sup> stimulated lipid peroxidation in the rat liver microsomes. *Biochem. J.* , **208**:129-140.
- EVANS, J. L., GOLDFINE, I. D., MADDUX, B. A., ve GRODSKY, G. M. (2003). Are Oxidative Stress –Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and  $\beta$ -Cell Dysfunction. *Diabetes*, **52**, 1-8.
- EVANS, P., LYRAS, L., HALLIWELL, B. (1999). Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. *Methods Enzymol.* **300**: 145-156.
- FAHN, H. J., WANG L-S., KAO S-H., CHANG, S-C., HUANG, M-H., WEI, YH. (1998): Smoking-Associated Mitochondrial DNA Mutations and Lipid Peroxidation in Human Lung Tissues. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **19( 6)**: 901-909
- FREEMAN, B. A., CRAPO, J. D. (1982). Biology of disease. *Lab. Invest.* **47**: 412-426
- GATTI, R. M., R. RADI, and O. AUGUSTO. (1994). Peroxynitrite-mediated oxidation of albumin to the protein-thiyl free radical. *FEBS Lett.* **348**: 287-290
- GIANETTI, J., PEDRINELLI, R., PETRUCCI, R., et al. (2002). Inverse association between carotid intima-media thickness and the antioxidant lycopene in atherosclerosis. *AM Heart J*, **143**: 467-474.

- GINKEL, G. V., SEVENIAN, A. (1994). Lipid peroxidation induced membrane alterations. *Meth. Enzymol.* **233**: 273-277
- GOLSTEIN, RS., SCHNELLMANN, RG. (1996). Toxic responses of the kidney. In: *Caserett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*, Ed.: Klassen, CD., Amdur, MO., Doull, J., New York, **p**.:417-42
- GOTTO, AM., Jr. (1999) Jul. Therapeutic impact of statin therapy in patients with low HDL cholesterol. *Curr Atheroscler Rep.*; **1(1)**:1-2.
- GOYER, RA. (1996). Toxic effects of metals. In: *Caserett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*, Ed.: McGraw Hill, Klassen, CD., Amdur, MO., Doull, J., New York, **p**.:691-736
- GREIM, H., CSANADY, G., FILSER, J.G., KREUZER, P., SCHWARZ, L., WOLFF, T., WERNER, S. (1985). Biomarkers as tools in human health risk assessment. *Clin. Chem.* **41**:1804-1808.
- GUTTERIDGE, J. M. C. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* **41**: 1819-1828
- HADDAD, I. Y., G. PATAKY, P. HU, C. GALLIANI, J. S. BECKMANN, and S. MATALON. (1994). Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J. Clin. Invest.* **94**: 2407-2413
- HADDAD, I. Y., H. ISHCHIROPOULOS, B. A. HOLM, J. S. BECKMANN, J. R. BAKER, and S. MATALON. (1993). Mechanisms of peroxynitrite-induced injury to pulmonary surfactant. *Am. J. Physiol.* **265**: L555-L564
- HALLIWELL, B. (1989). Oxidants and the central nervous system : Some fundamental questions. *Acto Neurol. Scand*, **126**:23-33.
- HALLIWELL, B. (1991). Drug antioxidant effects. *Drugs* **42(4)**: 569 -605.
- HALLIWELL, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.* **91**: 14-22
- HALLIWELL, B. (1995). Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology* **49(10)**, 1341-1348
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J., M. (1984). Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet.* **2(8411)**:1095.
- HALLIWELL, B., CHIRICO, S. (1993). Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr*; **57(suppl)**: 715-725.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. (1996). Free Radicals in Biology and Medicine (2 nd ed). **pp** 11- 21.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. (1985). Oxygen radicals and singlet oxygen. *Molec. Aspect. Med.* **8**: 93-133
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. (1988). Free radical and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. *Human. Toxicol.* **7**: 7-13
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J., M., C., CROSS, C. ( 1992). Free Radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **119(6)**, 598-620.
- HALLIWELL, B., M. GROOTVELD. (1989). Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biochemical systems: deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation. *Methods Biochem. Anal.* **33**: 59-90 .

- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Arch. Bioche., Biophys.* **26**: 501-514
- HINDER, R. A., STEIN, H. J. (1991). Oxygen derived free radicals. *Arch. Surg.* **126**: 104-105
- HORTON., AA. (1987). Fairhurst S. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Crit Rev Toxicol.* **18(1)**:27-79.
- HORVATH, I., DONNELLY, LE., KISS, A., et al. (1998). Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* **158**:1042-1046.
- HRUSZKEWYCZ, A., (1992). M. Lipid peroxidation and mtDNA degeneration. *A hypothesis. Mutation Research* **275**:243-248.
- HUKKANEN, J., JACOB, P 3rd., BENOWITZ, NL. (2005). Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev.* **57(1)**:79-115.
- IARC., (1986). Tobacco Smoking. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 38. Lyon, France: IARC
- ISHIROPOULOS, H. and AL-MEHDI, (1995). Peroxynitrite-mediated oxidative protein modification. *FEBS Lett.* **364**: 279-282
- IVANOVA, LA., TALAKIN, IUN., KORSHUN, MN., SAVCHENKO, MV. (1991) Nov. The comparative toxicity of inorganic mercury compounds for a cell culture and the whole organism. *Gig Sanit.* **11**: 66-7. Russian.
- JONES, D.P., THOR, H., SMITH, M. T., JEWELL, S., ORRENIUS, S. (1983). Inhibition of ATP-dependent microsomal Ca<sup>+2</sup> sequestration during oxidative stress and its prevention by glutathione. *J.Biol.Chem.* **268**: 6390-6397
- JONES, T.W. (1986). Cellular defence mechanism against toxic substances. *Arch. Toxicol. suppl.* **9**: 259-271
- KALCHER, K., KERN, W., PIETSCH, R. (1993). Cadmium and lead in the smoke of a filter cigarette. *Sci Total Environ.* **128**: 21-35
- KANEKO, JJ., HARWEY, JW., BRUST, ML., (1980), Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 3rd Ed., London, Academic Press. Inc Ltd.
- KAPPUS, H., SIES, H. (1981). Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: Redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia.* **37(12)**: 1233-1241.
- KAUR, H., and B. HALLIWELL. (1994). Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation: nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett.* **350**: 9-12
- KELISHADI, R., NADERY, GA., ASGARY, S. (2002). Oxidised LDL metabolites with high family risk for premature cardiovascular disease Indian. *J Pediatr.* **69**:7557-9
- KHAN, BV., PARTHASARANTHY, SS., ALEXANDER, RW., MEDFORD, RM. (1995). Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* **95**: 1262-70
- KIYOSAWA, H., SUKO, M., OKUDAIRA, H., MURATA, K., MIYAMOTO, T., CHUNG, M. H., KASAI, H., NISHIMURA, S. (1990). Cigarette smoking induces formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, one of the

- oxidative DNA damages in human peripheral leukocytes. *Free Radic. Res. Commun.* **11**: 23-27.
- KNIGHT, J.A., PIEPER, R.K., MC CLELLAN, L. (1988). Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clin. Chem.*, **34**: 2433-2438.
- KONNTINEN, A., RAJASALMI, M. (1963). Effect of heavy cigarette smoking on postprandial triglycerides, free fatty acids, and cholesterol. *Br Med J.* **2**:850-2
- KOOY, N. W., J. A. ROYALL, Y. Z. Ze, D. R. KELLY, and J. S. BECKMANN. (1995). Evidence for *in vivo* peroxynitrite production in human lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**: 1250-1254.
- KÖKOĞLU, E. (1998). Serbest radikal reaksiyonlarının kanserdeki rolü. *Klinik Gelişim* **11**: 358-64
- KÖSE, K., and DOĞAN, P.: (1992). Lipid Peroksidasyonu. *Erciyes Tıp Dergisi.* 340-350.
- KUGIYAMA, K., YASUE, H., OHGUSHI, M., et al.: Deficiency in nitric oxide bioactivity in epicardial coronary arteries of cigarette smokers. *J Am Coll Cardiol* **28**:1161-1167.
- LAMBERS, DS., CLARK, KE. (1996). The maternal and fetal physiologic effects of nicotine. *Sem Perinatol.* **20**:115-26.
- LAWRENCE, J.M., BENEDICH, A. (1987). Free radical tissue damage: Protective role of antioxidant nutrients. *Clin. Nutr.* **1**: 441-445
- LERMAN, C., KAUFMANN, V., RUKSTALIS, M., PATERSON, F., PERNIKS, K., (2004). Audrain-McGovern J, Benowitz N. Individualizing nicotine replacement therapy for the treatment of tobacco dependence: a randomized trial. *Ann Intern Med.* Mar 16;**140(6)**:426-33.
- LEVINE, RL; JA. WILLION S. ER. STADTMAN and E.SHACTER. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, **233**, 346-57.
- LIU, J., WANG, X., SHIGENAGA, MK., YEO, HC., MORI, A., (1996). Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of the rats. *Faseb J.* **10**: 1532-1538
- LOHR, JB., MD. (1991). Oxygen Radicals and Neuropsychiatric Illness. News and Views. *Arch Gen Psychiatry* **48**:1097-1106.
- MANTHA, S., V., PRASAD, M., KAKA, J., PRASAD, K. (1993). Antioxidant enzymes in hypercholesterolemia and effects of vitamin E in rabbits. *Atherosclerosis* **101**:135-144.
- MCCORD, J. (1993). Human disease, free radicals and the oxidant / antioxidant balance. *Clin Biochem* **26**: 351 - 57.
- MCCOY, R., N., HILL, K., E., AYON, M., A., STEIN, J., H., BURK, R., F. (1988). Oxidant stress following renal ischemia: Changes in the glutathione redox ratio. *Kidney Int* **33**:8127.
- MEZETTI, A., D. LAPENNA, S. D. PIERDOMENICO, A. M. CALAFIORE, F. CONSTANTINI, G. RIARIO-SFORZA, T. IMBASTARO, M. NERI, and F. CUCCURULLO. (1995). Vitamins E, C and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and non-smokers. *Atherosclerosis.* **112**: 91-99.

- MILLER, E. R., 3<sup>rd</sup>, APPEL, L. J., JIANG, L., and RISBY, T. H. (1997). Association between cigarette smoking and lipid peroxidation in a controlled feeding study. *Circulation*. **96**: 1097–1101,
- MOHAN, V., DEEPA, R., RANI, SS., PREMALATHA, G. (2001). Prevalence of coronary artery disease and its relationship to lipids in a selected population in south India. *J Am Coll Cardiol*. **38**:682-7
- MOLDEUS, P. VE QUANGUAN, J. (1987). Importance of the glutathione cycle in drug metabolism. *Pharmacol. Ther.* **33**:37-40.
- MORENO, JJ., FOROOZESH, M., CHURCH, DF., PRYOR, WA. (1992). Release of iron from ferritin by aqueous extracts of cigarette smoke. *Chem Res Toxicol*. **5**: 116-123.
- MORROW, J. D., FREI, B., LONGMIRE A. W., GAZIANO, J. M., LYNCH, S. M., SHYR, Y., STRAUSS, W. E., OATES, J. A., ROBERTS L. J. (1995). Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N. Engl. J. Med.* **332**: 1198-1203.
- MORTADA, WI., SOBH, MA., EL-DEFRAWY, MM. (2004). The exposure to cadmium, lead and mercury from smoking and its impact on renal integrity. *Med Sci Monit*. **10**: 112-116
- MORTADA, WI., SOBH, MA., FARAHAT, SE., EL-DEFRAWY, MM. (2001). Assessment of cadmium exposure among cast iron smelter workers in Egypt and its impact on renal integrity. *Kidney Froum*. **2**: 47-52
- MURRAY, A., SHVEDOVA, AA., KISIN, E., GOLDSMITH, T., REYNOLDS, JS., CASTRANOVA, V., FRAZER, DG., KOMMINENI, C. (2002). Metal working fluids: sub-chronic effects on pulmonary functions in B6C3F1 mice given vitamin E deficient and sufficient diets. *Toxicology*. **177(2-3)**: 285-97.
- NAKAYAMA, T., CHURCH, DF., PRYOR, WA. (1989). Quantitative analysis of the hydrogen peroxide formed in aqueous cigarette tar extracts. *Radic Biol Med*. **1**:9-15.
- NISHIYAMA, Y., IKEDA, H., HARAMAKI, N., YOSHIDA, N., IMAIZUMI, T. (1998). Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J*. **135(1)**:115-20.
- NITA, D., AL., VIORICA NITA, St., SPULBER, M., MOLDOVAN, DANIELA, PAULA POPA, ANA-MARIA agreean, (2001). L. Zagrean Department of Physiology, Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion - a biochemical study in rat "Carol Davila" University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, Romania Received:; Accepted: June 18, 2001
- ONAT, A., TÜRKMEN, S., KARABULUT, A., YAZ, C., M., CAN, G., SANSOY, V. (2004). Türk yetişkinlerinde hiperkolesterolemi ve hipertansiyon birlikteliği: Sıklığına ve kardiyovasküler riski öngördürmesine ilişkin TEKHARF çalışması verileri. *Türk Kardiyol Dern Arş* **32**:397-405.
- PARANTAINEN, J., VAPAATALO, H., HOKKANEN, E. (1986). Clinical aspects of prostaglandins and leukotrienes in migraine. *Cephalalgia*. **6 Suppl 4**:95-101.
- PETER, H., PROCTOR, PH.D., MD. (1989). Free Radicals and Human Disease *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants*, vol 1 p 209-221.

- PETRUZELLI, S., PUNTONI, R., MIMOTTI, P., PULERA, N., BALIVA, F., FORNAI, E., GIUNTINI, C. (1997). Plasma 3-nitrotyrosine in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* **156(6)**:1902-7.
- PIGNATELLI, B., LI, CQ., BOFFETTA, P., CHEN, Q., AHRENS, W., NYBERG, F., MUKERIA, A., BRUSKE-HOHLFELD, I., FORTES, C., CONSTANTINESCU, V., ISCHIROPOULOS, H., OHSIMA, H. (2001). Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. *Cancer Res.* **61(2)**:778-84.
- PRAGSI, F., LEO, S. (1991). Smoking trials with mercury contaminated cigarettes. *Arch Kriminal.* **188**: 77-86
- PRYOR, W. A. (1987): Cigarette smoke and the involvement of free radical reactions in chemical carcinogenesis. *Br. J. Cancer* **55**. (Suppl. 8): 19-23.
- PRYOR, WA., STONE, K. (1993). Oxidants in cigarette smoke. Radicals hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann NY Acad Sci.* **686**:12-27.
- PRYOR, WA., STONE, K., ZANG, LY., BERMUDEZ, E. (1998). Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage. *Chem Res Toxicol.* **11(5)**: 441-8.
- QUENSEL, M., SODERSTROM, A., AGARDH, CD., (1989). Cessation of smoking: the importance of alterations in diet. *Atherosclerosis.* **75**: 189-93
- QUINN, L. (2002), Mechanism in The Development of Type II Diabetes Mellitus. *Journal of Cardiovascular Nursing*, **16(2)**, 1-16.  
radiation biology graduate program, Iowa
- RAHMAN, I., LI, XY., DONALDSON, K., HARRISON, DJ., MACNEE, W.(1995). Glutathione homeostasis in alveolar epithelial cells in vitro and lung in vivo under oxidative stress. *Am J Physiol.* **269**: L285-L292.
- RAMACHANDRAN, A., SATHYAMURTHY, I., SNEHALATHA, C., SATYAVANI, K., SIVASANKARI, S., MISRA, J. (2001). Risk variables for coronary artery disease in Asian Indians. *Am J Cardiol.* **87**:267-71
- REED, D.J., FARISS, M.W. (1984). Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol. Rev.* **36**:25-33.
- REED, DJ. (1986) Aug. Defense mechanisms of normal and tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*; **12(8)**:1457-61.
- REILLY, M., DELANTY, N., LAWSON, J. A., FITZGERALD, G. A. (1996). Modulation of oxidant stress *in vivo* in chronic cigarette smokers. *Circulation*, **94**: 19-25.
- REITER, R., J. (1995). Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *Faseb.* **9**:526-533.
- REZNICK, AZ., PACKER, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* **233**: 357-363.
- SATTLER, W., MALLE, E., KOSTNER, GM. (1998). Methodological approaches for assessing lipid and protein oxidation and modification in plasma and isolated lipoproteins. *Methods Mol Biol.*; **110**:167-91. Review.

- SEDLAK, J., LINDSAY, RH. (1968). Estimation of total protein-bound and non protein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* **25**:192-205.
- SERAFINI M., DEL RIO, D. (2004) Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Report* **9(3)**, 145-152
- SIES, H. (1991). Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am. J. Med.* **91**: 31-38
- SIEST, G. (1990). Blood activity of Cu-Zn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in Alzheimers disease : a casecontrol study. *Gerontology* ., **36**:306- 313.
- SLATER, T. F. (1984). Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* **105**: 283-293.
- SOYD, RA., (1990). Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* **4**: 2587-97.
- SPENCER, J. P., JENNER, A., CHIMEL, K., ARUOMA, O. I., CROSS, C. E., WU, R., HALLIWELL, B. (1995). DNA damage in human respiratory tract epithelial cells: damage by gas phase cigarette smoke apparently involves attack by reactive nitrogen species in addition to oxygen radicals. *FEBS Lett.*, **375**: 179-182.
- STADTMAN, ER., BERLETT, BS. (1998). Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev.*; **30(2)**:225-43. Review.
- STAHL, M., BOUW, R., JACKSON, A., PAY, V. HUMAN. (2002). Microdialysis. *Curr Pharm Biotechnol.*; **3(2)**:165-78. Review.
- STAMPFER, MJ., OSBORN, JA., JARAKI, M. (1993). Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest*; **91**: 308-318.
- STEINBERG, D. (1997). Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* **95**:62-71
- STIRLING, HF., HANDLEY, JE., HOBBS, AW. (1986). Passive smoking in utero: its effects on neonatal appearance. *Bri. Med. Jour.* **Vol:295**, **p:627-628**.
- STONE, KK., BERMUDEZ, E., PRYOR, WA. (1994). Aqueous extracts of cigarette tar containing the tar free radical cause DNA nicks in mammalian cells. *Environ Health Perspect.* **102**: 173-178.
- STROLIN-BENEDETTI, M., BROGIN, G., BANI, M., OESCH, F., HENGSTLER, JG. (1999). Association of cytochrome P450 induction with oxidative stress in vivo as evidenced by 3-hydroxylation of salicylate. *Xenobiotica.* **29(11)**:1171-80.
- STUBBET, I., ESKILSSON, J., NILSSON-EHLE P. (1982). High density lipoprotein concentration after stopping smoking. *Br Med J.* **284**: 1511-3
- SWAN, GE., BENOWITZ, NL., JACOB, P., 3rd, LESSOV, CN., TYNDALE, RF., WILHELMSSEN, K., KRASNOW, RE., MCELROY, MR., MOORE, SE., WAMBACH, M. (2004). Pharmacogenetics of nicotine metabolism in twins: methods and procedures. *Twin Res.*; **7(5)**:435-48.

- SZABO, C., B. ZINGRELLI, M. O'CONNOR, and A. L. SALZMAN. (1996). DNA strand breakage, activation of poly(ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity in macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 1753-1758
- THOMAS, CE., AUST SD. (1986). Free radicals and environmental toxins. *Ann Emerg Med.* **15(9)**:1075-83. Review.
- TROLL, W., WEISNER, R. (1985). The role of oxygen radicals as a possible mechanisms of tumor promotion. *Am. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **25**: 509-528
- TRUSH, MA., KENSLER, TW. (1991). An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* **10**: 201-9.
- VALENTINE, JS., MIKSZTAL, AR., SAWYER, DT. (1984). Methods for the study of superoxide chemistry in nonaqueous solutions. *Methods Enzymol.* **105**:71-81.
- VAN DER VLIET, A., C. A. O'NEILL, B. HALLIWELL, C. E. CROSS, and H.KAUR. (1994). Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxynitrite: evidence for hydroxyl radical production from peroxynitrite. *FEBS Lett.* **339**: 89-92.
- VAN DER VLIET, A., EISERICH, JP., HALLIWELL, B., CROSS, CE. (1997) Mar 21. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem.*; **272(12)**:7617-25.
- VAN DER VLIET, A., J. P. EISERICH, C. A. O'NEILL, B. HALLIWELL, and C. E. CROSS. (1995). Tyrosine modification by reactive oxygen species: a closer look. *Arch. Biochem. Biophys.* **319**: 341-349.
- WARD, P. A. (1986). Host defence mechanisms responsible for lung injury. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **78(3)**: 373-378
- WARDEN, J. (1987). Carry on smoking? *Br. Med. Jour.* vol:294,p:849.
- WHO, (1992). "Resolution: Action Plan for a Tobacco-free Europe". WHO Regional Committee for Europe—Forty- *Second Session*. Copenhagen, (EUR/RC 42/Conf.Doc./7 Rev 2).
- WYLLIE, AH., DUVALL, E. (1992). Cell injury and death. In: McGee JO'D, Isaacson PG, Wright NA. *Oxford Textbook of Pathology*. Newyork: Oxford University Press.141-193.
- YEH, C.C., HOU, M.F., TSAI, S.M., LIN, S.K., HSIAO, J.K., HUANG, J.C., WANG,L.H., WU, S.H., HOU, L.A., MA, H., TSAI, L.Y. (2005). Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. *Clinica Chimica Acta*, **25**:175-181.
- YERLIMOV, V., J. RUBIO, M. BECCHI, M. D. FRIESEN, B. PIGNATELLI, and H. OHSHIMA. (1995). Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro. *Carcinogenesis.* **16**: 2045-2050.
- YOSHIE, Y., OHSHIMA, H. (1997). Synergistic induction of DNA strand breakage by cigarette tar and nitric oxide. *Carcinogenesis (Lond.)*, **18**: 1359-1363.

- ZHAO, L. 2001. Glutathione, a ubiquitous thiol. Iowa University. Free radical and
- ZHOW, Z., and KANG, Y. (2000). Cellular and Subcellular Localization of Catalase in the *Heart of Transgenic Mice*, **48(5)**:585- 594.).
- ZIMA, T., CRKOVSKA, J., MERTA, M., , STIPEK, S., NEMECEK, K., TESAR, V. (1995). Activity of the Antioxidant Enzymes, Glutathione Peroxidase, on Autosomal Dominant 54 polycystic kidney disease patient. *Biochemical Molecular Biology International*, **35(4)**, 699-704.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı	Vügar
Soyadı	ALİYEV
Doğum yeri ve tarihi	Azerbaycan 1980
Uyruğu	Azeri
Medeni durumu	Bekar
Askerlik durumu	Tecilli
İletişim adresi ve telefonu	Atatürk mah. Esenkent sit. C blok no: 4 Kazan/ANKARA

### Eğitim durumu:

Ankara Üniversitesi Disiplinlerarası Adli Tıp Anabilim Dalı  
Adli Kimya ve Toksikoloji Bölümü Tezli Yüksek Lisans  
(2003- )

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü  
(1998-2003)

Ankara Üniversitesi Tömer Türkçe Hazırlık Programı  
(1997-1998)

17 Numaralı Orta Mektebi-Lise (1995-1997)

17 Numaralı Orta Mektebi-Ortaöğretim (1987-1995)

### Yabancı Dili:

Ankara Doruk Dil Kursu-İngilizce Hazırlık (2002-2003)

Ankara Üniversitesi Tömer-Türkçe Hazırlık (1997-1998)

17 Numaralı Orta Mektebi-Rusça Hazırlık (1987-1997)

### Ünvanları:

Biyolog-Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü  
(1998-2003)

### Aldığı Burslar:

Azerbaycan Büyükelçilik Eğitim Bursu (2003- )

Türkiye Milli Eğitim Bakanlığı Bursu (2003- )

Prof. Dr. Işık Sayıl Üye	Psikiyatri	Ankara Tıp Fakültesi	K	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Sevim D.Cengiz Üye	Kadın Doğum	Ankara Tıp Fakültesi	K	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr. Nermin Mutluer Üye	Nöroloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	Kongrede
Prof.Dr. Sumru Beder Üye	Göğüs Hastalıkları	Ankara Tıp Fakültesi	K	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Nurten Girgin Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Ankara Tıp Fakültesi	K	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Ragıp Çam Üye	Genel Cerrahi	Ankara Tıp Fakültesi	E	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Ali Rıza Uysal Üye	Endokrinoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Birsnel Erdem Üye	Mikrobiyoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	Rahatsız
Prof. Dr. Ahmet Demirkazık Üye	Tıbbi Onkoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Günhan Gürman Üye	Hematoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Ajlan Tükün Üye	Tıbbi Genetik	Ankara Tıp Fakültesi	K	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Işınso Kuzu Üye	Patoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	Derste
Prof. Dr. Özer Kendi Üye	Adli Tıp	Ankara Tıp Fakültesi	E	Rahatsız
Prof.Dr. Erdal Onar Üye	Hukuk	Ankara Üniv. Hukuk Fakültesi	E	Toplantıda
Prof.Dr.Yasemin Oğuz Üye	Deontoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr.Serenay Elgün Ülkar Üye	Biyokimya	Ankara Tıp Fakültesi	K	<i>[Signature]</i>
Ecz. Funda Aytun Üye	Eczacılık	Ankara Tıp Fakültesi	K	<i>[Signature]</i>

ASLI GİZLİDİR

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

Doç.Dr. İsmail KARATASOĞLU

Ankara Tıp Fakültesi

Endemik Bilimler


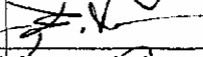
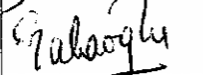
*[Signature]*

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU  
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, ANKARA UNIVERSITY  
ANKARA-TÜRKİYE  
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU		
	PROTOKOL ADI	Sigara içenlerde ve diyabet hastalarında serbest radikal ve antioksidan düzeyleri ile mitokondrial DNA mutasyonlarının araştırılması	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Prof.Dr.Tülin Söylemezoğlu	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı	
	DESTEKLEYİCİ FİRMA		
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BİLGİLER	Belge Adı	Değişiklik No. / Tarihi	Dili
	PROTOKOL		
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLURU		
	OLGU RAPOR FORMU		

ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALARI KLAUVUZU
---------------	----------------------------------

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 80-2093	Tarih: 07 Kasım 2005
	Araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Yönergesinde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve Yönergenin 11/h maddesi gereği sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere bütçesi temin edildiği takdirde klinik araştırmanın yürütülmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan öğretim üyelerinin oybirliği ile karar verildi.	

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ayhan Başkan	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	
Prof. Dr. Efser Kerimoğlu Başkan Yardımcısı	Çocuk Psikiyatrisi	Ankara Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Özden Palaoglu Sekreter	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	

BENYAMİN KARATAŞOĞLU  
Tıp Fakültesi  
Akademik Binyüzyıl  
